UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Isotopenlabor
der Universität zu Lübeck
Leiter: Prof. Dr. Schmidt

„Isolierung und biomedizinische Anwendung von Xylan und Xylooligosacchariden aus Haferspelzen“

Inauguraldissertation zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Ann-Katrin Lehmann
aus Osnabrück

Lübeck, 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian L. Schmidt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Peters

Tag der mündlichen Prüfung: 07. November 2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 22. November 2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **IV**

Abbildungsverzeichnis **VII**

Tabellenverzeichnis **IX**

1 Einleitung **1**

1.1 Ziel dieser Arbeit 2

2 Allgemeiner Teil **3**

2.1 Aufbau der Pflanzenzellwand 3

2.1.1 Cellulose 4

2.1.2 Lignin 4

2.1.3 Hemicellulosen 5

2.2 Hafer und Haferspelzen 8

2.3 Nutzungspotential von Xylanen aus industriellen Nebenprodukten 9

2.4 Enzymatische Hydrolyse von Hemicellulosen 11

2.4.1 Endo-1,4-β-Xylanase 11

2.4.2 Ferulasäure- und Cumarsäure-Esterase 12

2.4.3 Acetyl-Xylan-Esterasen 12

2.5 *Trichoderma reesei* 13

2.6 Gewinnung xylanolytischer Enzyme 14

2.7 Isolierung von Xylan 17

2.8 Xylooligosaccharide 19

2.8.1 Biomedizinische Anwendung von Xylooligosacchariden 19

3 Material und Methoden **21**

3.1 Material 21

3.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen 21

3.1.2 *Trichoderma reesei* QM9414 21

3.1.3 Haferspelzen 22

3.1.4 Rapsmehl 22

3.1.5 Wiesenschwingel 22

3.2 Kultivierung von *Trichoderma reesei* QM9414 23

3.2.1 Nährmedien 23

3.2.2 Inokulum 24

3.2.3 Ansetzen der Vorkultur 24

3.2.4 Schüttelkolben-Fermentation 25

3.3 Gewinnung von Xylan und Xylooligosacchariden 26
3.3.1 Basische Extraktion am Rückfluss 26
3.3.2 Extraktion im Autoklaven 27
3.3.3 Xylan - Delignifizierung 27
3.3.3.1 Bleichen mit Wasserstoffperoxid 27
3.3.3.2 Enzymatische Delignifizierung 28
3.3.4 Enzymatische Hydrolyse von Xylan 29
3.4 Fraktionierung von Xylan-Proben 30
3.4.1 Fraktionierung mittels SEC 30
3.4.1.1 SEC I: Sephacryl S-400 HR 30
3.4.1.2 SEC II: Superdex™75 prep 30
3.4.2 Fraktionierung der Xylooligosaccharide an Sephadex LH-20 31
3.4.3 Fraktionierung der Xylooligosaccharide mittels AEC 31
3.5 Charakterisierung der Xylane und Xylooligosaccharide 32
3.5.1 Dünnschichtchromatografie 32
3.5.2 Totalhydrolyse 32
3.5.3 Bestimmung des Ligninanteils 32
3.5.4 Analyse der Monosaccharid-Zusammensetzung 33
3.5.5 Bestimmung des Acetylierungsgrades von Xylan 33
3.5.6 Extraktion und Quantifizierung der Ferulasäure 34
3.5.7 FT-IR Spektroskopie 34
3.5.8 Molmassenverteilung der Xylan-Proben 34
3.5.9 ESI-MS Messungen 35
3.5.10 NMR Spektroskopie 35
3.6 Bioanalytische Methoden 36
3.6.1 Aktivitätstest der Enzyme 36
3.6.2 Proteinbestimmung 37
3.6.3 Immunmodulierung (TNF-alpha) 38
3.6.4 Xylooligosaccharid-Effekte auf Wachstum und Biofilmbildung von *Staphylococcus epidermidis* 1457 39

4 Ergebnisse **41**
4.1 Enzym-Expression aus *Trichoderma reesei* QM9414 42
4.2 Isolierung & Charakterisierung von Haferspelzen-Xylan 47
4.2.1 Chemische Zusammensetzung der Xylan-Proben 48
4.2.2 Xylan-Nachweis mittels FT-IR 54
4.2.3 Molmassen der Xylan-Proben 56
4.2.4 Semipräparative SEC von Xylan-Proben 58
4.3 Charakterisierung von Xylooligosacchariden 62
4.3.1 ESI-MS-Spektren 74

4.3.2 NMR von Xylooligosacchariden 80
4.4 Biomedizinische Untersuchungen 81
4.4.1 Immunmodulatorische Effekte 81
4.4.2 Effekte auf Zellwachstum und Biofilmbildung 83

5 Diskussion **85**
5.1 Enzym-Expression aus *Trichoderma reesei* QM9414 86
5.2 Isolierung von Haferspelzen-Xylan 89
5.3 Charakterisierung von Haferspelzen-Xylan 90
5.4 Isolierung von Xylooligosacchariden 94
5.5 Charakterisierung von Xylooligosacchariden 95
5.6 Biomedizinische Anwendungen 100

6 Zusammenfassung **102**

Literaturverzeichnis **104**

Anhang **114**
Verwendete Materialien und Chemikalien 114
Ergänzende Diagramme und Tabellen 119

Abkürzungsverzeichnis

4-NPA	4-Nitrophenyl α-L-Arabinofuranoside
4-NPAc	4-Nitrophenol acetate
4-NP-t-FE	4-Nitrophenyl trans-ferulate
4-NPX	4-Nitrophenyl β-xylotrioside
ACN	Acetonitril
AK	Antikörper
Ara	Arabinose
Ara_f	Arabinofuranose
AraF	Arabinofuranosidase
AU	Absorption Units
AXE	Acetyl-Xylan-Esterase
BSA	Rinderserumalbumin
^{13}C-NMR	Carbon nuclear magnetic resonance
CIB	Centrum Industrielle Biotechnologie
CD-14	Glykoprotein Cluster of Differentiation 14
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Polymerisationsgrad (degree of polymerization)
EC	numerisches Klassifikationssystem für Enzyme (Enzyme-Classification)
ED	elektrochemischer Detektor
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
FA	Ferulasäure (ferulic acid)
FAE	Ferulasäure-Esterase (ferulic acid esterase)
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot(-Spektroskopie)
g	Gramm
Gal	Galaktose
GALT	darmassoziierte lymphatische Gewebe (gut associated lymphoid tissue)
GH	Glykosid-Hydrolase
Glc	Glukose
GPC-TDA	Gelpermeations-Chromatographie mit Dreifachdetektion
h	Stunde
HANK´s	Gemisch verschiedener Salze, die als Pufferlösung in Medien für Zellkulturen eingesetzt werden
^{1}H-NMR	Proton nuclear magnetic resonance
HCl	Salzsäure
HPAEC	Hochleistungs-Anionenaustauschchromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie

HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase)
Hz	Hertz
ICS	Ionenchromatographie System
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAL Assay	Limulus-Amöbozyten-Lysat Test zur Bestimmung von Endotoxinen
LALS	Kleinwinkellichtstreuung (low-angle light scattering)
LC	Flüssigchromatographie (Liquid Chromatography)
LiP	Lignin Peroxidase
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
M	molare Masse
MALDI-TOF	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse (time of flight)
Mb	Mega-Basenpaare
MD-2	Glykoprotein Myeloid of Differentiation-2
MeOH	Methanol
MLN	mesenteriale Lymphknoten (mesenteric lymph nodes)
mM	millimolar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mol%	Stoffmengenanteil
Mi	Molmasse der einzelnen Moleküle i
MnP	Mangan Peroxidase
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
NaAc	Natriumacetat
NaClO	Natriumhypochlorit
NaOH	Natriumhydroxid
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance)
n.d.	nicht ermittelt (not detected)
NK	Negativkontrolle
NREL	National Renewable Energy Laboratory
PEO	Polyethylene Oxide
PK	Positivkontrolle

ppm	Teile pro Millionen (parts per million)
RALS	Rechtwinkellichtstreuung (right-angle light scattering)
RI	Brechungsindex (Refraction Index)
RP-18	Reversed-Phase, C18 (octadecyl)phase
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT	Raumtemperatur
SEC	Größenausschluss-Chromatographie (Size-exclusion chromatography)
SOP	Standardarbeitsanweisung (Standard Operating Procedure)
TAPPI	Technical analysis for the pulp and paper industry
TFA	Trifluoressigsäure
TLR-4	Toll-like Rezeptor-4
TNF	Tumornekrosefaktor
TH	Totalhydrolyse
U	Unit [µmol/min·ml]
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volumen
WS	Wiesenschwingel
WSS	Wiesenschwingelsaatgut
XBl	Xylan (XE RF 2) nach Peroxid-Behandlung (bleaching)
XE AK	Xylanextraktion - Autoklav
XE RF	Xylanextraktion - Rückfluss
XLMP	Xylan (XE RF 2) nach LiP/MnP-Behandlung
Xyl	Xylose
Xyl_p	Xylopyranose

Chemische Symbole:

λ	Wellenlänge
^{n}J	Kopplungskonstante über n Bindungen
δ	chemische Verschiebung

Abbildungsverzeichnis

2.1 Schematische Darstellung der primären Zellwand 3
2.2 Cellulose; ein β-1,4-D-Glucan 4
2.3 Strukturausschnitt des phenolischen Makromoleküls Lignin 4
2.4 Strukturelle Merkmale der Hemicellulose Xylan 6
2.5 Strukturelle Merkmale von Arabino-4-O-Methylglucuronoxylan (AGX) 7
2.6 Darstellung kovalenter Verknüpfungen über Ferulasäuren 7
2.7 Schematischer Aufbau eines Getreidekorns 8
2.8 Am Abbau von Hemicellulosen beteiligte Enzyme 11
2.9 Stammbaum der wichtigsten mutierten Stämme von *Trichoderma reesei* 13
2.10 Strukturelle Merkmale des Xylooligosaccharids 1,4-β-D-Xylotetraose 19

3.1 Strategie der experimentellen Arbeit 40

4.1 Entwicklung der AraF-Aktivität aus *T. reesei* im Verlauf der Fermentation mit fünf Substraten zur Enzym-Induktion 42
4.2 Entwicklung der AXE-Aktivität aus *T. reesei* im Verlauf der Fermentation mit fünf Substraten zur Enzym-Induktion 43
4.3 Entwicklung der FAE-Aktivität aus *T. reesei* im Verlauf der Fermentation mit fünf Substraten zur Enzym-Induktion 44
4.4 Entwicklung der Xylanase-Aktivität aus *T. reesei* im Verlauf der Fermentation mit fünf Substraten zur Enzym-Induktion 45
4.5 Entwicklung der Proteinkonzentration im Verlauf der Fermentation von *T. reesei* 46
4.6 Darstellung ausgewählter Xylan-Proben 47
4.7 Prozentuale Monosaccharid-Zusammensetzung der Xylan-Proben XE AK . . . 50
4.8 Prozentuale Monosaccharid-Zusammensetzung der Xylan-Proben XE RF . . . 51
4.9 Acetylierungsgrad diverser Xylan-Proben 52
4.10 Acetylierungsgrad diverser Xylan-Proben II 53
4.11 Ferulasäuregehalt diverser Xylan-Proben 53
4.12 FT-IR Spektrum der Xylan-Probe „XE RF 2“ 54
4.13 FT-IR Spektrum der Xylan-Probe „XBl“ 55
4.14 GPC Daten I: Zahlenmittel Mn diverser Xylan-Proben 56
4.15 GPC Daten II: Gewichtsmittel Mw diverser Xylan-Proben 57
4.16 GPC Daten III: Molmasse an der Peakspitze Mp diverser Xylan-Proben 57
4.17 S-400 Chromatogramm von „XE RF 2“ gelöst in 0,5 M NaOH 58
4.18 Superdex 75 prep Chromatogramm von „XE RF 2“ gelöst in 0,5 M NaOH . . . 59
4.19 Superdex 75 prep Chromatogramm von XLMP gelöst in 0,5 M NaOH 59
4.20 Superdex 75 prep Chromatogramme der Versuchsreihen (a) und (b) 60
4.21 Superdex 75 prep Chromatogramme der Versuchsreihen (c) und (d) 61
4.22 LH-20 Chromatogramm von Xylan XE RF 1 nach enzymatischer Hydrolyse . . 62

4.23 LH-20 Chromatogramm von Xylan XE RF 2 nach enzymatischer Hydrolyse . . 63
4.24 LH-20 Chromatogramm von XE RF 1 und 2 - Superdex 75 prep F 20-42 nach enzymatischer Hydrolyse 64
4.25 Beispiel-DCs: Proben nach LH-20 Trennung (Fraktion 10-20) 65
4.26 HPAEC Chromatogramme der LH-20 Fraktionen 11-13 67
4.27 HPAEC Chromatogramm der LH-20 Fraktion 14 68
4.28 HPAEC Chromatogramme der LH-20 Fraktion 15 und 16 68
4.29 HPAEC Chromatogramme der LH-20 Fraktionen 1-20 69
4.30 HPAEC Chromatogramme der LH-20 Fraktionen 23-25 70
4.31 HPAEC Chromatogramm: (a) LH-20 Fraktion 14 und (b) LH-20 Fraktion 15 . . 71
4.32 HPAEC Chromatogramm der reinjizierten ICS Peaks: (a) LH-20 F14 - ICS P 13 und (b) LH-20 F15 - ICS P 5 72
4.33 PAEC Chromatogramme der Superdex 75 prep Fraktionen 56-68 der Xylan-Proben: (a) XLMP und (b) XE RF 2 73
4.34 ESI-MS Spektrum der LH-20 Fraktion 13 74
4.35 ESI-MS Spektrum der LH-20 Fraktion 14 74
4.36 ESI-MS Spektrum der LH-20 Fraktion 15 75
4.37 ESI-MS Spektrum der LH-20 Fraktion 16 75
4.38 ESI-MS/MS Spektrum 701 m/z der LH-20 Fraktion 14 76
4.39 ESI-MS/MS Spektrum 833 m/z der LH-20 Fraktion 16 76
4.40 ESI-MS/MS Spektrum 1229 m/z der LH-20 Fraktion 13 76
4.41 Strukturvorschläge für m/z 833, m/z 1097 und m/z 1229 77
4.42 ESI-MS Spektrum der Probe „LH-20 F14 - ICS P 13“ 78
4.43 ESI-MS/MS Spektrum 701 m/z der Probe „LH-20 F14 - ICS P 13“ 78
4.44 ESI-MS Spektrum der Probe „LH-20 F15 - ICS P 5“ 79
4.45 ESI-MS/MS Spektrum 833 m/z der Probe „LH-20 F15 - ICS P 5“ 79
4.46 HSQC-Spektrum der LH-20 F 15 P 5 80
4.47 Einfluss von Xylan- und Xylooligosaccharid-Proben auf die TNF-alpha Sekretion von MNCs; mit und ohne den Zusatz von LPS *S. enterica* R60 82
4.48 Wachstum von *S. epidermidis* 1457 unter Zusatz von LH-20 F 14 und F 15 . . . 83
4.49 Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457 unter Zusatz von LH-20 F 14 und F 15 84

5.1 Strukturvorschläge für die Xylooligosaccharide mit DP6/DP8/DP9 97
5.2 Strukturvorschläge für die in der Probe „LH-20 F15 - ICS P 5“ enthaltenen Xylooligosaccharide 99

6.1 Darstellung der GPC-TDA RI-Signale von Probe (a) XE RF 2 und (b) XE RF 9 120
6.2 Darstellung der GPC-TDA Daten von Probe XE RF 2 121

Tabellenverzeichnis

2.1 Übersicht diverser Hemicellulosen 5
2.2 Monosaccharide nach der Hydrolyse von Xylan aus Haferspelzen 9
2.3 Übersicht einiger Hemicellulase-Induktoren 16
2.4 Übersicht diverser Methoden zur Isolierung von Hemicellulosen 18

3.1 Übersicht diverser Xylanextraktionen am Rückfluss - XE RF 26
3.2 Übersicht diverser Xylanextraktionen im Autoklaven - XE AK 27
3.3 Herstellerangaben zu den Enzymen LiP und MnP 28
3.4 Herstellerangaben zur Xylanase X2753 29
3.5 Gradientenverlauf - Oligosaccharid-Methode 31
3.6 Gradientenverlauf - Monosaccharidanalyse 33
3.7 Übersicht der untersuchten Proben und den jeweiligen Konzentrationen 38

4.1 Ausbeuten der Xylanextraktionen am Rückfluss (RF) oder Autoklav (AK) . . . 48
4.2 Monosaccharid-Zusammensetzung und Ligninanteil der Xylan-Proben XE AK 49
4.3 Monosaccharid-Zusammensetzung und Ligninanteil der Xylan-Proben XE RF . 49
4.4 Monosaccharid-Zusammensetzung und Ligninanteil der „XE RF 2“ Variationen 50
4.5 Zuordnung der ermittelten FT-IR Transmissionsbanden zu entsprechenden Schwingungen von Molekülgruppen 55
4.6 Übersicht der in den LH-20 Fraktionen mittels DC nachgewiesenen Xylooligosaccharide und Monosaccharide 66
4.7 Übersicht der in den LH-20 Fraktionen mittels HPAEC nachgewiesenen Mono- und Xylooligosaccharide 70
4.8 Zuordnung der als Natrium-Addukte ermittelten ESI-MS-Daten der LH-20 Fraktionen 13-16 77
4.9 NMR-Daten der Probe LH-20 Fraktion 15, ICS Peak 5 80

5.1 Zuordnung der als Natrium-Addukte ermittelten ESI-MS-Daten der LH-20 Fraktionen 13-16 96

6.1 Übersicht des verwendeten Materials 114
6.2 Übersicht der verwendeten Chemikalien I 115
6.3 Übersicht der verwendeten Chemikalien II 116
6.4 Übersticht der verwendeten Geräte I 117
6.5 Übersticht der verwendeten Geräte II 118
6.6 Acetylierungsgrad und Ferulasäuregehalt diverser Xylan-Proben 119
6.7 Datenübersicht GPC-LS 120

1 Einleitung

Die Verwertung biogener Nebenprodukte sowie Reststoffe aus der Landwirtschaft und Lebensmittelindustrie gewinnt zunehmend an Bedeutung, da diese nicht in Konkurrenz mit Nahrungsmitteln stehen. Sie sollen primär stofflich genutzt werden und somit eine Alternative zu fossilen Rohstoffen bieten.
Eine biogene Reststoffquelle mit hohem Verwertungspotential stellen Pflanzenmaterialien wie Haferspelzen aus der Haferflockenproduktion dar. Es handelt sich hierbei um verholzte Hüllblätter der Haferkörner, die neben Cellulose und Lignin aus Hemicellulosen (überwiegend Xylan) bestehen.
Haferspelzen machen etwa 25 bis 30 % des Gewichts des Hafers aus und fallen somit in großen Mengen bei dessen Verarbeitung an [1, 2]. Mit 35 bis 40 % der Gesamtmasse weisen Haferspelzen zudem einen sehr hohen Xylananteil auf. Aufgrund der relativ geringen Lignifizierung im Vergleich zu dem Xylangehalt, ist zudem eine alkalische Extraktion des Xylans möglich, ohne das Lignin in zusätzlichen Vorbehandlungen heraus lösen zu müssen [2–4].
Bei den in Haferspelzen enthaltenen Xylanen handelt es sich größtenteils um Arabinoxylan, ein heterogenes Polysaccharid, dessen D-Xylopyranose-Hauptkette mit α-L-Arabinofuranose-Seitenketten substituiert ist. Diese sind zum Teil noch mit Ferulasäuren oder p-Cumarsäuren verestert [3]. Dies ermöglicht die kovalente Verknüpfung von Xylan-Ketten über Ferulasäuredimere sowie kovalente Verknüpfungen von Xylan und Lignin.

Bisher wurden Haferspelzen überwiegend als Futtermittelzusatz für die Viehzucht sowie zur Herstellung von Furfural und Xylitol genutzt [1, 2].
Aus Haferspelzen isolierte Xylane wurden u.a. in Hinblick auf die Bildung von Hemicellulose-Pasten oder zur Anwendung in der Holz-und Papierindustrie untersucht [4, 5]. Ferner wurden bereits Daten zum Einsatz von modifizierten Xylanen zur Beschichtung von Implantaten sowie für die Verkapselung von Medikamenten publiziert [6, 7].
Neben dem Einsatz als Hydrogel in Wundauflagen oder Werkstoffzusatz ist die Wirkung von Poly- und Oligosacchairden als Hemmstoff in der (bio-)medizinischen Therapie Gegenstand vieler Untersuchungen. Schwere Infektionskrankheiten durch die zunehmende Antibiotikaresistenz von Bakterien sind klinische globale Probleme, welche immer mehr im Fokus von Forschung und Entwicklung stehen.
Schwerpunkte diverser Studien liegen auf der Bioaktivität und prebiotischen Wirkung [8, 9]. In der Literatur sind zudem Studien bezüglich der immunmodulatorischen Wirkung von (Xylo)-Oligosacchariden beschrieben. Jedoch sind die verwendeten Oligosaccharid-Gemische nicht genauer charakterisiert, der Polymerisationsgrad wurde mit DP2-6 angegeben [10–12].
Der Einsatz von Oligosacchariden als antimikrobieller Wirkstoff stellt darüber hinaus eine mögliche Alternative zu Antibiotika dar. Sie inhibieren die Adhäsion des Bakteriums ohne dieses zu töten und die Ausbildung von Stressfaktoren und Resistenzen zu forcieren. So konnte die Ausbildung von Biofilmen unterdrückt werden, welche den Mikroorganismen als Schutzbarriere vor Antibiotika oder einer Immunabwehr dienen [13].

1.1 Ziel dieser Arbeit

In dieser Promotionsarbeit sollen Beiträge zur Isolierung und Charakterisierung von Haferspelzen-Xylan sowie die Herstellung und Anwendung von Xylooligosacchariden mit definiertem Polymerisationsgrad (DP) geliefert werden.
Hierzu sollen die xylanolytischen Enzyme α-L-Arabinofuranosidase, Acetyl-Xylan-Esterase sowie Ferulasäure-Esterase aus dem Pilz *Trichoderma reesei* QM9414 angereichert werden, da diese nicht kommerziell zur Verfügung stehen.

Zur Isolierung des Xylans sind sowohl alkalische Extraktionen als auch Experimente mit hohen Temperaturen (Autoklav: 121 °C) vorgesehen. Ziel ist es möglichst hohe Ausbeuten zu erzielen ohne die Haupt- und Seitenketten des Xylans zu hydrolysieren. Darüber hinaus soll kovalent gebundenes Lignin vom Xylan abgespalten werden.
Zur Charakterisierung der isolierten Xylane werden neben der Monosaccharid-Zusammensetzung der Lignin- und Ferulasäureanteil sowie der Acetylierungsgrad bestimmt.
Darüber hinaus erfolgen Bestimmungen der Molmassen der Xylane mit unterschiedlichen SEC-Methoden.
Zur Untersuchung von Xylooligosacchariden sollen die in den Xylan-Proben enthaltenen Moleküle abgetrennt sowie isolierte und definierte Xylane enzymatisch hydrolysiert werden. Die enzymatische Hydrolyse erfolgt mit endo-1,4-β-Xylanasen. Die Hydrolysate werden anschließend mit geeigneten Trennverfahren separiert, um Xylooligosaccharid-Fraktionen mit definiertem DP zu erhaltenen.
Die Charakterisierung der Oligosaccharid-Struktur mittels Kernspinresonanzspektroskopie und Massenspektrometrie soll Aufschluss bezüglich möglicher Substituenten (Arabinose, Ferulasäure) geben.
Hinsichtlich der Anwendungspotentiale von Xylooligosacchariden in der Biomedizin sollen u.a. immunmodulatorische Wirkungen untersucht werden. Hierzu finden Stimmulationstests (TNF-alpha, LAL) mit humanen mononukleären Zellen statt. Grundlage waren Ergebnisse in der Literatur bezüglich der Bioaktivität und immunmodulatorischen Wirkungen, die jedoch mit Xylooligosaccharid-Gemischen erzielt wurden.
In der Literatur sind zudem antimikrobielle, anti-biofilm als auch anti-adhäsive Wirkungen von Xylooligosaccharid-Gemischen beschrieben [14, 15]. Daher werden mit den aus Haferspelzen-Xylan isolierten Oligosacchariden Effekte auf die Biofilmbildung und das Zellwachstum von *Staphylococcus epidermidis* 1457 experimentell untersucht.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Aufbau der Pflanzenzellwand

Pflanzliche Zellwände setzen sich zu etwa 10 % aus Proteinen und 90 % aus Kohlenhydraten zusammen, wobei Cellulose den Hauptanteil der Kohlenhydrate ausmacht [16, 17].
Prinzipiell bestehen Pflanzenzellwände aus einer Mittellamelle, einer Primärwand und mehreren Sekundärwandschichten. Die Mittellamelle, welche während der Zellteilung aus der Zellplatte entsteht, fungiert als Bindeglied benachbarter Zellen. Sie setzt sich hauptsächlich aus dem Polysaccharid Pektin zusammen, das über Ca^{2+}- und Mg^{2+}-Ionen vernetzt ist.
Vor und während des Zellwachstums bildet sich die dünne Primärwand aus. Diese besteht größtenteils aus Hemicellulosen und Pektin, wodurch die Primärwand plastisch verformbar ist. Lediglich 8-14 % der Primärwand bestehen aus Cellulose-Fibrillen, die sich ungeordnet in eine Matrix aus Hemicellulosen, Pektin und Glycoproteinen einlagern (siehe Abb. 2.1) [16, 17].

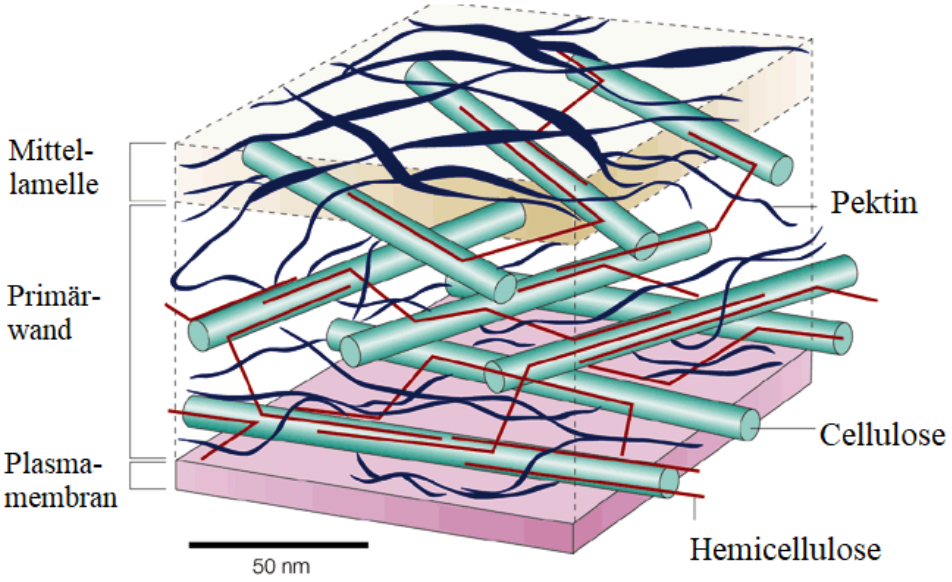


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der primären Zellwand; nach[18]

Nach Beendigung des Zellwachstums lagert sich auf die Primärwand schichtweise eine Sekundärwand auf. Sie befindet sich zwischen Primärwand und dem Zellinneren (Lumen) und bildet die dickste Zellwand-Schicht. Da die Sekundärwand wenig bis kein Pektin enthält und einen Cellulose-Anteil von bis zu 90 % aufweist, ist sie eher starr und schwer dehnbar. Durch die parallel zueinander angeordneten Mikrofibrillen aus Cellulose und Hemicellulose besitzt die Sekundärwand zudem eine hohe Festigkeit. Die innerste Schicht der Sekundärwand, welche die Zellwand zum Lumen abschließt, bildet die sogenannte Tertiärwand [16, 17].

Im Laufe der Zellalterung kommt es zur Einlagerung von Lignin, wodurch die Pflanze an Festigkeit und Stabilität gewinnt. Diese sog. Lignifizierung - auch als Verholzung bezeichnet - beginnt in der Mittellamelle und greift sowohl auf die Primärwand als auch auf die Sekundärwand über [19].

2.1.1 Cellulose

Bei Cellulose handelt es sich um ein lineares Polymer aus β-1,4-glykosidisch verknüpften D-Glucosemonomeren (Abbildung 2.2). Die gebildeten Celluloseketten weisen einen Polymerisationsgrad von bis zu 10000 Glucosemonomeren auf, wobei intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen den Glucose-Einheiten stabilisierend wirken. Es entsteht eine planare Struktur in Form eines β-Faltblattes.

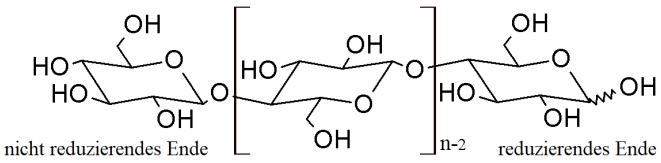


Abbildung 2.2: Cellulose; ein β-1,4-D-Glucan

In den Zellwänden lagern sich die Cellulosemoleküle über intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zu einer kristallinen Gitterstruktur - den sogenannten Mikrofibrillen - zusammen. Diese kristallinen Strukturn sind sehr stabil und erschweren dadurch die Extraktion einzelner Zellwandbestandteile. Die Mikrofibrillen liegen in den Zellwänden sowohl einzeln als auch in gebündelter Form (Makrofibrillen) vor [16, 17].

2.1.2 Lignin

Lignin, ein unlösliches, hochvernetztes Heteropolymer aus Phenolen, zählt nach Cellulose zu den häufigsten Polymeren in der Natur. Es wird in die Zwischenräume der Cellulosefibrillen eingelagert und steigert dadurch die Festigkeit und mechanische Stabilität der pflanzlichen Zellwand. Darüber hinaus dient es dem Schutz vor Abbau durch Mikroorganismen.
Zu den Grundbausteinen von Lignin zählen die Zimtalkohol-Derivate Cumaryl-, Coniferyl- sowie Sinapylalkohol, welche über Etherbindungen und Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen quervernetzt sind [20]. Ein Strukturausschnitt von Lignin ist in Abbildung 2.3 dargestellt:

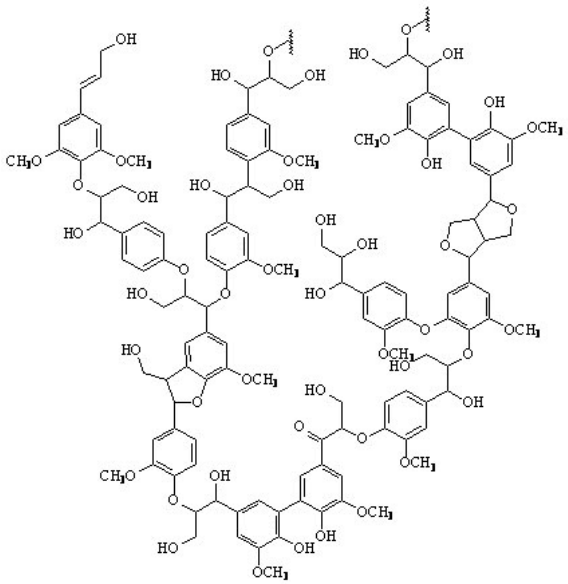
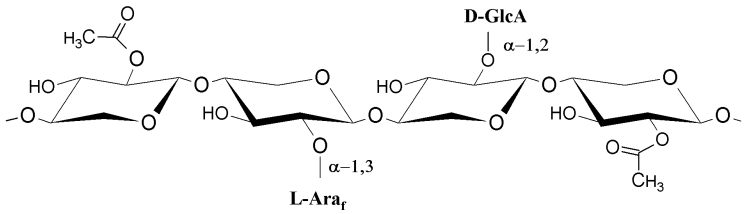
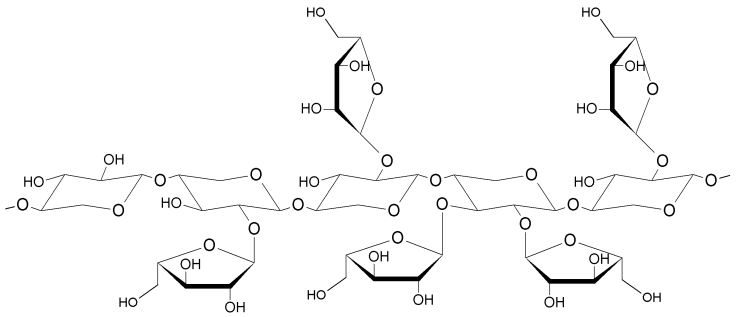
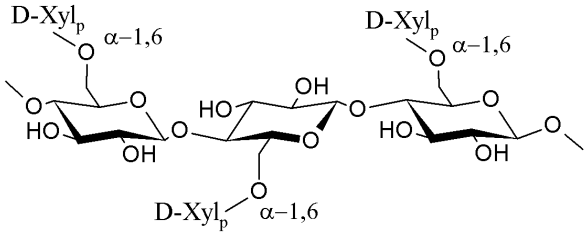
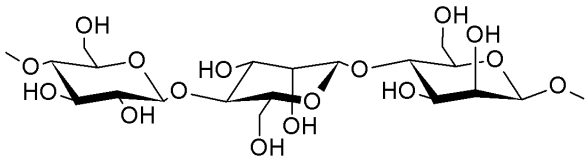
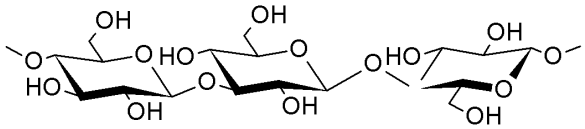


Abbildung 2.3: Strukturausschnitt des phenolischen Makromoleküls Lignin; nach [21]

2.1.3 Hemicellulosen

Bei Hemicellulosen handelt es sich um heterogene Polysaccharide zu deren Grundbausteinen neben den Hexosen D-Glucose, D-Mannose und D-Galactose die Pentosen D-Xylose und L-Arabinose zählen [17]. Anhand der Zusammensetzung ihrer Hauptkette werden sie in Xylane, Arabinogalactane, Xyloglucane, Mannane, Arabinane, und β-Glucane unterteilt [22, 23].

Tabelle 2.1: Übersicht diverser Hemicellulosen - beispielhafte Strukturausschnitte

Hemicellulose	**Strukturausschnitt**
Xylan (β-1,4 D-Xylopyranose)	
Arabinoxylan (β-1,4 D-Xylopyranose)	
Xyloglucan (β-1,4 D-Glucopyranose)	
Mannan (β-1,4 D-Mannopyranose)	
β-Glucan (β-1,3/1,4 D-Glucopyranose)	

Nach Cellulose stellen Hemicellulosen den Hauptbestandteil pflanzlicher Primärzellwände dar. Im Gegensatz zu Cellulose bestehen Hemicellulosen zum einen aus verschiedenen Anhydropentosen und -hexosen, zum anderen weisen sie in der Regel diverse Seitengruppen auf. Aufgrund der daraus resultierenden amorphen Struktur fungieren Hemicellulosen als flexibles Bindeglied zwischen Cellulose-Fibrillen und Lignin. Ferner erleichtert die amorphe Struktur die Bindung von Wasser.

Die am häufigsten vorkommende Hemicellulose ist Xylan, ein Heteroglycan dessen Hauptkette aus β-1,4-glykosidisch verknüpften D-Xylopyranose-Einheiten besteht. Mit einem relativ hohen Massenanteil von 25-35 % sind Xylane u.a. in Laubhölzern wie Buchen- und Birkenholz sowie in Süßgräsern wie Hafer, Roggen oder Weizen (Getreideschalen: 23-40 %) zu finden [22].

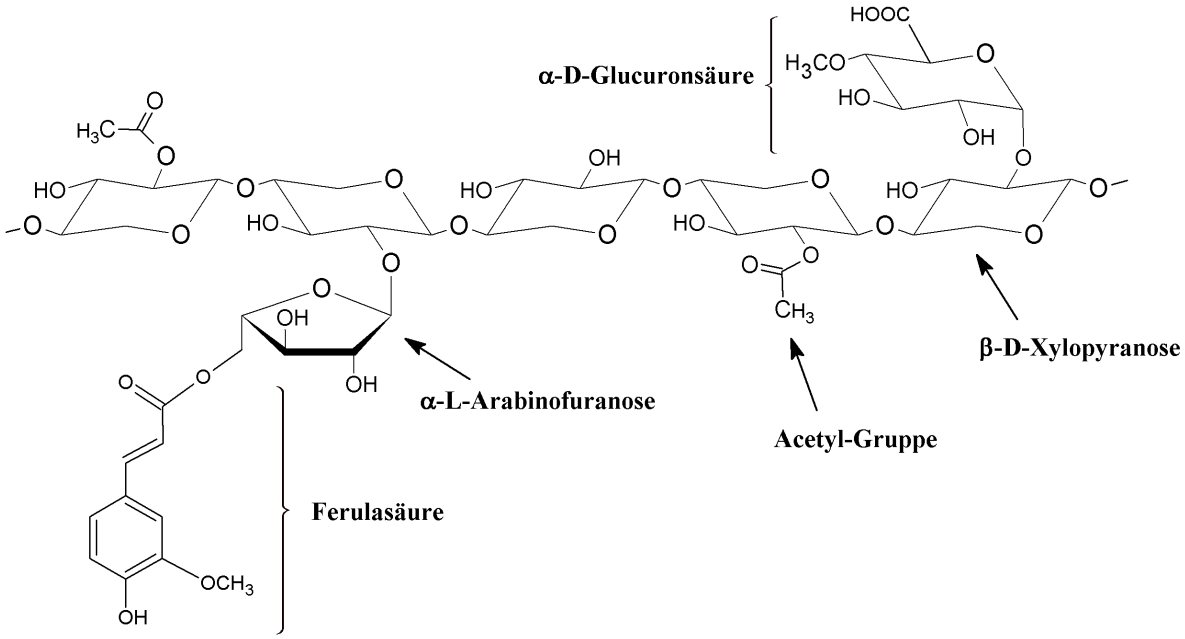
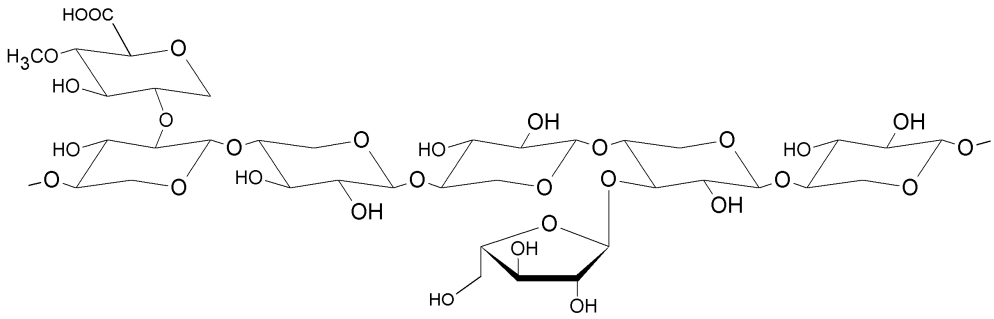


Abbildung 2.4: Strukturelle Merkmale der Hemicellulose Xylan

Die einzelnen Xylopyranose-Moleküle sind über β-1,4-glykosidische Bindungen verknüpft und tragen zum Teil Seitenketten wie α-L-Arabinofuranosyl-Substituenten, Glucuronsäuren oder Acetyl-Gruppen (Abb. 2.4). Dabei variieren Art und Grad der Substitution je nach pflanzlichem Ursprung des Xylan und beeinflussen u.a. die Stabilität oder Löslichkeit. Beispielsweise erhöht sich mit zunehmendem Acetylierungsgrad die Wasserlöslichkeit von Xylanen.
Harthölzer (Laubhölzer) setzen sich aus O-Acetyl-4-O-Methylglucuronoxylanen zusammen. Diese weisen einen sehr hohen Acetylierungsgrad auf und tragen an jeder zehnten Xylose-Einheit eine 4-O-Methyl-D-Glucuronsäure, welche α-1,2-glykosidisch gebunden ist.
Weichhölzer (Nadelhölzer) hingegen bestehen aus Arabino-4-O-Methylglucuronoxylanen und enthalten α-1,3-gebundene α-L-Arabinofuranosyl-Substituenten an Stelle der Acetyl-Gruppen (Abb. 2.5). Außerdem zeichnen sie sich durch eine höhere Konzentration an Methyl-D-Glucuronsäure im Vergleich zu Hartholzxylan aus [24, 25].


HOOC
H3CO
HO
O
OH
OH
OH

2.2 Hafer und Haferspelzen

Hafer (lat. *Avena sativa*) gehört zur Familie der Süßgräser (lat. *Gramineae*)) und wird ebenso wie Roggen (lat. *Secale cereale*) oder Weizen (lat. *Triticum* L.) als Getreidepflanze angebaut. Die Früchte dieser Getreidepflanzen sind nach dem in Abb. 2.7 dargestellten Schema aufgebaut:

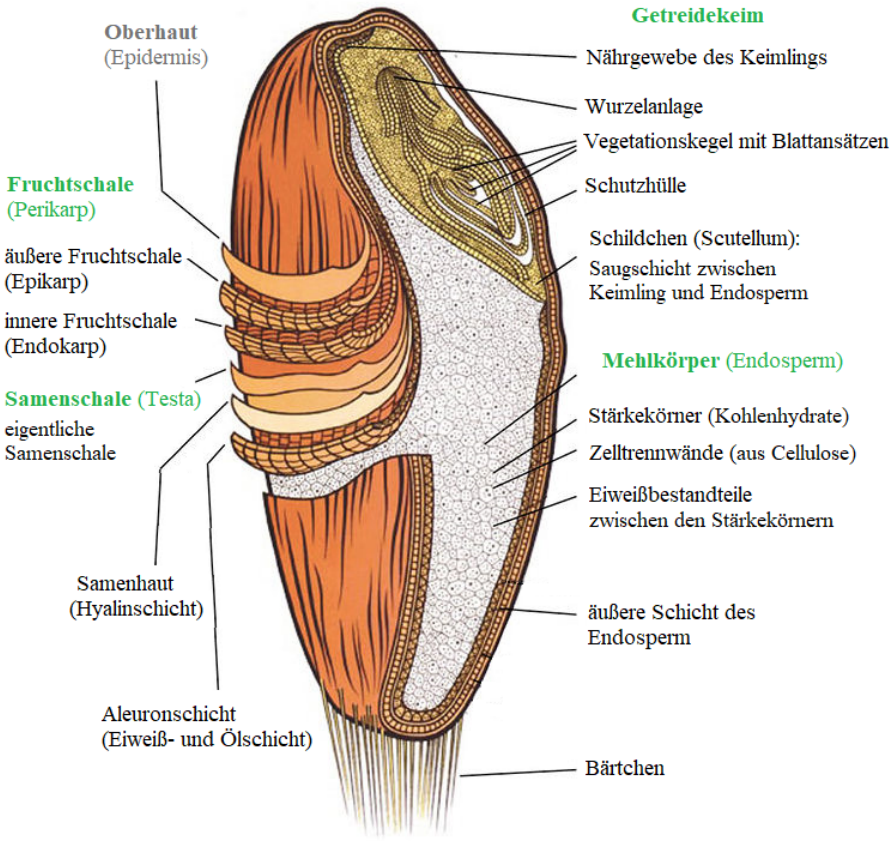


Abbildung 2.7: Schematischer Aufbau eines Getreidekorns, verändert nach [28]

Die Fruchtschale (Pericarp) von Getreidekörnern setzt sich aus einer inneren (Epikarp) und äußeren (Endokarp) Schale zusammen, welche nochmals von der Oberhaut (Epidermis) umschlossen ist. Auf die Fruchtschale folgen die Samenschale (Testa), die als Samenhaut bezeichnete Hyalinschicht sowie die Aleuronschicht.
Im Inneren des Fruchtkörpers befinden sich der Getreidekeim sowie der Mehlkörper (Endosperm). Dieser Mehlkörper besteht vornehmlich aus Stärkekörnern, welche sich zwischen die Eiweißbestandteile einlagern.

Haferspelzen bilden die verholzten Hüllblätter der Haferkörner, welche neben Cellulose und Lignin aus Hemicellulosen bestehen und etwa 25-30 % des Hafergewichts ausmachen [1, 2].
Mit 35-40 % der Gesamtmasse weisen Haferspelzen einen sehr hohen Xylananteil auf. Aufgrund der relativ geringen Lignifizierung der Haferspelzen im Vergleich zu dem Xylangehalt, ist zudem eine alkalische Extraktion des Xylan möglich, ohne das Lignin in zusätzlichen Vorbehandlungen heraus lösen zu müssen [2–4].

Generell handelt es sich bei den in Haferspelzen enthaltenen Xylanen größtenteils um Arabinoxylan, ein heterogenes Polysaccharid dessen D-Xylopyranose-Hauptkette mit α-L-Arabinofuranose-Seitenketten substituiert ist. Diese Seitenketten sind zum Teil mit Ferulasäuren oder p-Cumarsäuren verestert [3].

Chemische Analysen bezüglich der Monosaccharid-Zusammensetzung von Haferspelzen-Xylan wurden unter anderem von Saake et al. (2004), Sarbu et al. (2003) und Ramirez et al. (2008) durchgeführt [29–31].

Tabelle 2.2: Monosaccharide nach der Hydrolyse von Xylan aus Haferspelzen, nach [29–31]

Monosaccharid	**Anteil % (w/w) bezogen auf Einwaage**		
	nach Saake et al.	nach Sarbu et al.	nach Ramirez et al.
Xylose	72,4	81,0	81,9
Arabinose	11,7	9,8	9,6
Glukose	13,4	7,6	7,3
Galactose	-	1,4	1,2

2.3 Nutzungspotential von Xylanen aus industriellen Nebenprodukten

Die Verwertung biogener Nebenprodukte sowie Reststoffe aus der Landwirtschaft und Lebensmittelindustrie gewinnt zunehmend an Bedeutung. Beispielsweise sind bei der Herstellung von Haferflocken große Mengen an Haferspelzen zugänglich, aus denen u.a. Xylane isoliert werden können.

Mögliche Anwendungsgebiete modifizierter Xylane sowie diverser Abbauprodukte ergeben sich u.a. in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie oder in der (Bio)-Medizintechnik.
So kann aus Xylose, dem Grundbaustein von Xylan, der nicht kalorische Süßstoff Xylitol gewonnen werden. Dieser wird u.a. in Süßwaren aber auch in pharmazeutischen Produkten verwendet.
Modifizierte Xylane könnten sich zudem für die Beschichtung von Implantaten sowie für die Verkapselung von Medikamenten eignen. So wurde die Verkapselung von Wirkstoffen mit Xylan von Berlanga-Reyes et al. (2009) und Martínez-López et al. (2011) untersucht. Die Gelbildung von Arabinoxylan aus Maisermöglichte die Verkapselung und anschließende Freisetzung von Insulin und β-Lactoglobulin [6, 7].
Hernández-Espinoza et al. (2012) erprobten an der durch Laccase induzierten Gelbildung zudem die Verkapselung und Freisetzung von Lycopen [32]. Die Anwendung von Xylanen als Hydrogel ist somit vornehmlich Gegenstand biomedizinischer Produkte.

In der aktuellen Forschung wurden zudem enzymatische Modifikation von Haferspelzen-Xylan durchgeführt. Durch Verringerung der Arabinofuranose-Substituenten sollte die Löslichkeit des Xylans herab gesetzt und die Ausbildung eines Nanohydrogels herbeigeführt werden. Das entstandene Hydrogel wurde hinsichtlich Quellverhalten, Partikelgröße sowie der Verkapselung und Freisetzung von Proteinen untersucht [33].

Neben der Anwendung als Hydrogel finden Xylane als Additive in der Holz-und Papierindustrie sowie als Pasten oder thermoplastische Werkstoffe Verwendung [1, 3]. Das Hauptaugenmerk der Xylan-Charakterisierung lag daher auf der Rheologie, Löslichkeit, Sauerstoffdurchlässigkeit und Bindung an Cellulosefasern [34–36].
Hettrich et al. (2006) untersuchten u.a. die Rheologie und Oberfläche von Xylan-Pasten, welche zuvor durch Succinylierung sowie Acetylierung derivatisiert wurden [35].
Mikkonen et al. (2012) setzten eine kommerzielle Endo-Xylanase sowie α-L-Arabinofuranosidase ein, um das aus Roggen stammende Arabinoxylan hinsichtlich Polymerisationsgrad und Substitutionsgrad (bzgl. Arabinose) zu modifizieren. Das erhaltene Arabinoxylan wurde in Kombination mit Cellulose-Mikrofibrillen zur Filmbildung verwendet [34].

Das aus Haferspelzen isolierte Xylan wurde bisher ebenfalls in Hinblick auf die Bildung von Hemicellulose-Pasten oder zur Anwendung in der Holz-und Papierindustrie untersucht [4, 5]. Es zeigte sich, dass die eingesetzten Xylane sowohl Auswirkungen auf die Papierfestigkeit als auch auf die TiO_2-Fixierung nach sich zogen, jedoch Modifizierungen der Seitengruppen notwendig sind, um die gewünschten Eigenschaften zu erreichen [5].
Die Anwendung in der Papierindustrie wird hauptsächlich am Thünen-Institut für Holzforschung in Hamburg (Arbeitskreis Saake et al.) durchgeführt.

2.4 Enzymatische Hydrolyse von Hemicellulosen

Da Hemicellulosen sehr heterogene Polysaccharide darstellen, sind eine Vielzahl an Enzymen zur Hydrolyse von Hemicellulosen und chemischen Modifikationen notwendig.
Die Hydrolyse der Xylan-Hauptkette durch Xylanasen (Endoxylanasen und β-Xylosidasen), welche jedoch durch Seitenketten sterisch gehindert werden.
Auf Grund dessen sind weitere „Hilfsenzyme“ erforderlich, die vorhandene Seitenketten wie Acetyl-Reste, α-D-Glucuronsäure- oder α-L-Arabinofuranosyl-Substituenten zu entfernen.
Die Abbildung 2.8 zeigt einen Überblick der am Abbau von Xylan beteiligten Hydrolasen und den von ihnen gespaltenen Bindungen.

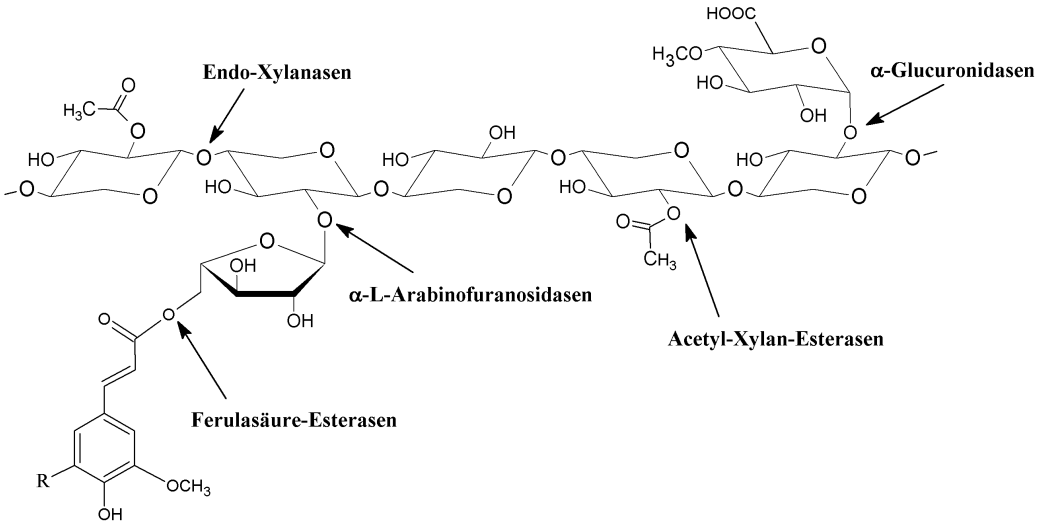


Abbildung 2.8: Am Abbau von Hemicellulosen (hier Xylan) beteiligte Enzyme

Endo-Xylanasen, α-Glucuronidasen sowie α-L-Arabinofuranosidasen zählen zu den Glykosidasen (Glycoside hydrolases; EC 3.2.1.-). Diese werden anhand ihrer Aminosäuresequenz und dreidimensionalen Struktur in verschiedene GH-Familien und GH-Clans unterteilt [37].
Esterasen wie Ferulasäure-Esterasen und Acetyl-Xylan-Esterasen sind nach ihrer Aminosäuresequenz in verschiedene CE-Familien (Carbohydrate esterases) klassifiziert [37].

2.4.1 Endo-1,4-β-Xylanase

Endo-1,4-β-Xylanasen (EC 3.2.1.8) hydrolysieren glykosidische Bindungen innerhalb der Xylose-Hauptkette von Heteroxylanen und setzen dabei Xylooligosaccharide, Xylotriose, Xylobiose sowie Xylose frei.
Aufbau und Kettenlänge der entstehenden Spaltungsprodukte sind sowohl von dem Grad der Substituierung/Verzweigung sowie den Substituenten selber abhängig [25].
Es konnten verschiedene Endo-Xylanasen aus Bakterien und Pilzen wie *Bacillus subtilis*, *Trichoderma konigii*, *Trichoderma reesei* und *Aspergillus niger* isoliert werden.

Eine Vielzahl dieser Endo-Xylanasen weisen ein Temperatur-Optimum zwischen 40 °C und 75 °C auf [25].
Die aus *Trichoderma reesei* gewonnenen Endo-Xylanase besitzt ein Temperatur-Optimum von 55-63 °C sowie ein pH-Optimum von pH 4,8-6,4. Es handet sich um eine Glykosid-Hydrolase der Klasse GH11 mit einer molaren Masse von etwa 21 kDa [38].

2.4.2 Ferulasäure- und Cumarsäure-Esterase

Bei Ferulasäure-Esterasen (EC 3.1.1.73) handelt es sich um Enzyme, welche die Ester-Bindung zwischen Ferulasäure und Arabinose-Seitenketten in Heteroxylanen spalten.
p-Cumarsäure-Esterasen (EC 3.1.1.-) katalysieren die Hydrolyse der Ester-Bindung zwischen p-Cumarsäure und Arabinose-Seitenketten in Heteroxylanen.
Beide Enzyme werden sowohl von Pilzen als auch von Bakterien produziert und sekretiert. So isolierten McCrae et al. aus dem Kulturüberstand von *Aspergillus awamori* eine Ferulasäure-Esterase mit einer molaren Masse von 112 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 3,7. Ferner konnte eine Cumarsäure-Esterase mit einer molaren Masse von 75 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 4,2 isoliert werden [39].
Weitere bis dato untersuchte Ferulasäure- und Cumarsäure-Esterasen stammen aus Kulturüberständen von *Aspergillus niger*, *Aspergillus phoenicis*, *Schizophyllum commune*, *Streptomyces olivochromogenes*, *Neocallimastix* und *Fibrobacter succinogenes* [25, 39].

Das Temperatur-Optimum der isolierten Ferulasäure-Esterasen variiert je nach Organismus zwischen 30 °C und 70 °C, das pH-Optimum liegt etwa zwischen pH 4 und pH 9.
Cumarsäure-Esterasen weisen ein Temperatur-Optimum von 40-50 °C und ein pH-Optimum von pH 5-7,5 auf [39].

2.4.3 Acetyl-Xylan-Esterasen

Acetyl-Xylan-Esterasen (EC 3.1.1.72) spalten Ester-Bindung zwischen dem O-Acetyl-Substituenten und dem C-2 respekive C-3 Atom der Xylose-Einheit in acetylierten Heteroxylanen.
Sie wurden bislang u.a. in den Kulturüberständen der Pilze *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* und *Schizophyllum commune* sowie der Bakterien *Bacillus pumilus* und *Streptomyces sp.* beobachtet. Die höchste Acteyl-Xylan-Esterase-Aktivität konnte dem Organismus *Aspergillus niger* nachgewiesen werden [25].
Bei den Acetyl-Xylan-Esterasen aus *Trichoderma reesei* handelt es sich um zwei glycosidierte, monomere Isoenzyme mit einer molaren Masse von 34 kDa.
Es zeigte sich, dass die beiden Enzyme sehr ähnliche Eigenschaften aufweisen. So liegen die isoelektrischen Punkte der AXE I und AXE II bei 7 bzw. 6,8. Zudem sind sowohl AXE I als auch AXE II in der Lage Acetyl-Gruppen von Xylooligomeren sowie von acetylierten Monosacchariden und Aromaten abzuspalten [25, 40].

2.5 *Trichoderma reesei*

Der filamentöse Moderfäulepilz *Trichoderma reesei* gehört zur Gattung der Ascomycota, den Schlauchpilzen. *Trichoderma*-Arten sind aufgrund ihres breiten Spektrums an verwertbaren Nährstoffquellen ubiquitär in verschiedenen Bodenarten aufzufinden, insbesondere auf Forst- und Agrarböden. Da es sich um eine mesophile und aerobe Schlauchpilz-Gattung handelt, bewohnen sie vorwiegend gemäßigte sowie tropische Klimazonen [41, 42].

Entdeckt und isoliert wurde *Trichoderma reesei* erstmals auf den Salomon Inseln im Südpazifik während des zweiten Weltkrieges [43]. Der isolierte Wild-Typ QM6a unterlag in den folgenden Jahren einer Vielzahl an Stamm-Entwicklungen durch Mutation zur Steigerung der Proteinsekretion. Hierzu kamen u.a. Röntgenstrahlung (RS), Nitrosoguanidine (NTG) sowie UV-Strahlung (UV) zum Einsatz [42, 44]:

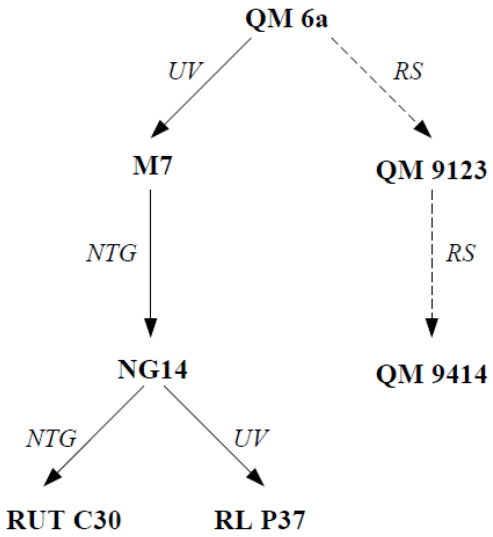


Abbildung 2.9: Stammbaum der wichtigsten mutierten Stämme von *Trichoderma reesei*; nach [44, 45]

Das Genom von *Trichoderma reesei* QM6a, welches eine Größe 33,9 Mb aufweist, besitzt insgesamt 200 Gene zur Codierung von Glykosidasen. Dazu zählen u.a. 16 Gensequenzen für Hemicellulasen [1] und 10 Gensequenzen für Cellulasen [2]. Eine der vorliegenden Hemicellulase-Gensequenzen konnte der GH 54 α-L-Arabinofuranosidase zugeordnet werden [46].

Bei *T. reesei* QM9414 handelt es sich um eine Cellulase überproduzierende Mutante des Wild-Typs QM6a, welche sich durch eine zwei- bis vierfach höhere Menge an sekretierten Proteinen und Cellulasen im Vergleich zum Wild-Typ auszeichnet [43].
Eine genaue Charakterisierung des Genoms von *T. reesei* QM9414 liegt bislang nicht vor. Zu den sekretierten Proteinen zählen diverse xylanolytische Enzyme, wie beispielsweise die α-L-Arabinofuranosidase. [47] Weiterhin ist bekannt, dass Proteasen sekretiert werden, welche jedoch nicht näher identifiziert wurden. [48]

[1] davon: 2 GH43, 1 GH10, 4 GH11, 1 GH74, 1 GH62, 2 GH54, 1 GH67 sowie 4 GH9
[2] davon: 1 CBH1, 1 CBH2, 1 EG1, 2 EG2, 1 EG3, 3 EG4 sowie 1 EG5

2.6 Gewinnung xylanolytischer Enzyme

Der Einsatz technischer Enzyme in industriellen Prozessen gewinnt zunehmende an Bedeutung. Aufgrund dessen wurde der Gewinnung und Charakterisierung technischer Enzyme, insbesondere Cellulasen und Hemicellulasen, in den letzten Jahren eine hohe Aufmerksamkeit gezollt. Als Produktionsstämme dienen Moderfäulepilze wie *Aspergillus* oder *Trichoderma* spp., welche zwecks Steigerung der Cellulase- und Hemicellulase-Produktion gezielt Mutationen unterzogen wurden.
Die Synthese dieser Enzyme kann durch den gezielten Einsatz spezifischer Substrate induziert werden. Diese sog. Induktoren bewirken zunächst die Genexpression substratspefizischer kataboler Enzyme, welche nach erfolgter Synthese an ihren Wirkort sekretiert werden. Im Fall von Cellulasen und Hemicellulasen erfolgt eine Sekretion in den Kulturüberstand, um den Abbau enthaltener Kohlenstoffquellen zu ermöglichen.
Für die anschließende Abtrennung der sekretierten Proteine aus dem Kulturüberstand kommen sowohl einstufige als auch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällungen zum Einsatz. Zur Aufreinigung und Separation einzelner Enzyme erfolgen in der Regel mehrere chromatographische Trennschritte.

Acetyl-Xylan-Esterasen konnten bislang aus *A. niger* [49], *A. awamori* [50],*T. reesei* [51] sowie *S. commune* [52] gewonnen und charakterisiert werden. Neben Weizenkleie und Cellulose wurde Treber als verstoffwechselbare Kohlenstoffquelle verwendet.
Die Aufreinigungsstrategien beinhalteten Anionenaustausch- und hydrophobe Chromatographien [49–52].
Bezüglich der Aufreinigung und Charakterisierung der Acetyl-Xylan-Esterase aus *T. reesei* QM9414 liegen keine Veröffentlichungen vor. Allerdings gelang es Smith et al. (1991) die Sekretion von Acetyl-Xylan-Esterase aus *T. reesei* QM9414 mit Haferspelzen-Xylan und Wiesenschwingel zu induzieren [53].

Bisherige Veröffentlichungen bezüglich der Gewinnung und Aufreinigung von Ferulasäure-Esterasen (FAE) liegen u.a. über *A. pullulans* und *A. awamori* Stämme vor. Dabei kamen vorwiegend hydrophobe und Anionenaustausch-Chromatographien sowie Größenausschluss-Chromatographie zum Einsatz [54, 55].
Als Induktor wurde Haferstroh [39], Birkenholz-Xylan [54] oder Weizenkleie [55] eingesetzt. Weiterhin gelang es Smith et al. (1991) die Sekretion von Ferulasäure-Esterasen aus *T. reesei* QM9414 mit Haferspelzen-Xylan und Wiesen-Schwingel zu induzieren. Allerdings fiel die extrazellulare FAE-Aktivität bei Haferspelzen-Xylan sehr gering aus [53].

Bezüglich der α-L-Arabinofuranosidase (AraF) fanden im Rahmen einer Masterarbeit bereits Untersuchungen zur Induktion und Anreicherung aus dem Pilz *T. reesei* QM9414 statt. Zur Induktion wurden Haferspelzen, Haferspelzen-Xylan und Rapsmehl verwendet [56].
Beim Vergleich mit der Fachliteratur zeigt sich, dass die verwendeten Kultivierungsbedingungen sehr unterschiedlich sind. So induzierten Nogawa et al. (1999) die Sekretion von α-L-Arabinofuranosidasen aus *T. reesei* PC-3-7 mit L-Sorbose [57].
Wood und McCrae (1996) setzten dem Nährmedium Haferstroh als Enzym-Induktor zu [58], während Kaneko et al. (1998) Arabinoxylan aus Getreide zur Induktion der α-L-Arabinofuranosidase aus *A. awamori* IFO 4033 verwendeten [59].
Die Aufreinigung der α-L-Arabinofuranosidase verlief sowohl über Anionen- und Kationenaustauschchromatographien, hydrophoben Chromatographien als auch über Größenausschluss-Chromatographien [58, 59].

Xylanasen konnten bislang aus *A. awamori* [25, 53], *A. kawachii* [25], *T. reesei* RUT 30 [60] sowie *T. reesei* QM9414 [61] gewonnen und charakterisiert werden.
Als Induktor wurde diverse Süßgräser, Weichhölzer sowie aufbereitete Polysaccharide und Reststoffe aus der Lebensmittelindustrie verwendet.
So setzten Gattinger et al. (1990) Cellulose, Lärchenholz und Rapsmehl als Induktoren ein. Lopez et al. (2011) induzierten die Sekretion von Xylanasen mit Weizenstroh [61], während Tenkanen et al. (1992) Cellulose und Treber verwendeten [62].
Zur Aufreinigung der Xylanasen wurden neben Anionen- und Kationenaustauschchromatographien auch Größenausschluss-Chromatographien verwendet [61, 62].

Eine Übersicht der verschiedenen Hemicellulase-Induktoren und Mikroorganismen ist in der folgenden Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: Übersicht einiger Hemicellulase-Induktoren

Hemicellulase	**Induktor**	**Organismus**	
α-L-Arabinofuranosidase	Arabinan	*Aspergillus* sp.,	[25]
		Trichoderma sp.	
	Arabinoxylan	*A. awamori* IFO 4033	[59]
	Haferspelzen-Xylan	*Aspergillus* sp.,	[25, 53]
		Trichoderma sp.	
		T. reesei QM9414	[56]
	Haferstroh	*A. awamori* IMI 142717	[58]
	L-Arabinose	*T. reesei* PC-3-7	[58]
	Rapsmehl	*T. reesei* QM9414	[56]
		T. reesei RUT 30	[60]
	Wiesenschwingel	*Aspergillus* sp.,	[53]
		Trichoderma sp.	
Acetylxylan-Esterase	Cellulose	*T. reesei* RUT 30	[60]
	Haferspelzen-Xylan	*Aspergillus* sp.,	[25, 53]
		Trichoderma sp.	
	Lärchenholz	*T. reesei* RUT 30	[60]
	Rapsmehl	*T. reesei* RUT 30	[60]
	Weizenkleie	*A. awamori* IFO 4033	[50]
	Wiesenschwingel	*Aspergillus* sp.	[53]
		Trichoderma sp.	
Ferulasäure-Esterase	Birkenholz-Xylan	*A. pullulans* NRRL Y 2311-1	[54]
	Haferstroh	*A. awamori* IMI 142717	[39]
	Weizenkleie	*A. awamori* IFO 4033	[55]
	Wiesenschwingel	*Aspergillus* sp.	[53]
		Trichoderma sp.	
Xylanase	Cellulose	*T. reesei* RUT 30	[60]
	Lärchenholz	*T. reesei* RUT 30	[60]
	Rapsmehl	*T. reesei* RUT 30	[60]
	Weizenstroh	*T. reesei* QM9414	[61]
	Wiesenschwingel	*Aspergillus* sp.	[53]
		Trichoderma sp.	

2.7 Isolierung von Xylan

Für die Isolierung von Xylanen ist eine Vielzahl an Extraktionsverfahren aus diversen Getreidesorten wie Gerste [63, 64], Roggen [65], Mais [66] und Hafer [29, 67] in der Literatur beschrieben.
Da die Extraktion des Xylans durch kovalente Bindungen und Wasserstoffbrückenbindungen mit Lignin erschwert wird, ist insbesondere bei Laubhölzern ein Delignifizierungsschritt vor oder während der eigentlichen Xylan-Extraktion erforderlich.

Zu den verbreitetsten Methoden zählen die Behandlung mit Peroxiden, Chlor oder Chlordioxid. So untersuchten Ebringerová und Hromádová (1989) die Delignifizierung von Buchenholz mit wässriger ClO_2-, NaOCl- sowie H_2O_2-Lösungen [68, 69]. Dabei zeigte sich, dass die Hemicelluloseausbeute mit dem Delignifizierungsgrad zunimmt, sich ab einem DG > 0,9 jedoch der Polymerisationsgrad und die Ausbeute des Xylans verringern [68].
Saake et al. (2004) unterzogen dem Xylan nachträglich einer H_2O_2-Behandlung, um das noch gebundene Lignin zu entfernen und die Reinheit und Helligkeit des Xylans zu erhöhen. Es ergaben sich lediglich geringe Abnahmen der molaren Masse (etwa 5-6 %). Auswirkungen auf die Struktur der Seitenketten wurden nicht untersucht [29, 67].
Alternativ zu rein chemischen Delignifizierungsmethoden findet auch die Kombination aus chemischen und mechanischen Behandlungen wie z.B. die mikrowellen- [70, 71] oder ultraschall-unterstützte Methode [72] im Zuge der Xylan-Extraktion Anwendung.

Die gängigste Methode zur Isolierung von Hemicellulosen ist eine zumeist kurzzeitige Extraktion unter milden alkalischen Bedingungen.
Puls et al. (2006) beschrieben sowohl für Birkenholz-Xylan als auch für Haferspelzen-Xylan eine einstündige Extraktion bei 90 °C mit 5 % (w/v) NaOH. Das Xylan wurde anschließend durch Zugabe von 2-Propanol oder Ethanol ausgefällt [29, 67].

Die von Carvajal-Millan et al. (2007) extrahierte Maiskleie wurde zunächst gemahlen und 12 Stunden bei RT mit Ethanol behandelt, um lipophile Bestandteile zu entfernen. Bei der nachfolgenden alkalischen Extraktion stieg die Xylan-Ausbeute mit zunehmender Inkubationszeit an, während sich der Ferulasäure-Gehalt im Xylan verringerte [66].

Unter Verwendung saurer Extraktionsbedingungen konnten vorwiegend Oligomere und ein hoher Anteil an Monomeren nachgewiesen werden [70, 73]. Benko et al. (2007) nutzten dabei 0,025 % und 0,5 % H_2SO_4 citeBenko2007, während Sun et al.(2000) u.a. Perameisensäure sowie Peroxyessigsäure als Extraktionsmittel verwendeten [73].

Neben der Verwendung alkalischer oder saurer Extraktions-Bedingungen gibt es auch eine Vielzahl an Protokollen, bei denen die Extraktion der wasserlöslichen Hemicellulosen mit Wasser als Extraktionsmittel vollzogen wird. Die extrahierten Bestandteile wurden mit einem Ethanol-Aceton-Gemisch (1:1) ausgefällt [65].

Alternativ zu rein chemischen Extraktionsmethoden verwendeten Hromádková et al. (1999) eine alkalische, ultraschall-unterstützte Methode. Im Vergleich zur alkalischen Extraktion konnte durch den Ultraschall-Einsatz bei geringerer NaOH-Konzentration, Temperatur und Extraktionszeit die Xylan-Ausbeute erhöht werden. Die extrahierten Xylane zeigten keine wesentlichen Unterschiede bzgl. ihrer Struktur oder Monosaccharid-Zusammensetzung [72].
Andere Studien ergaben, dass sich durch den Einsatz ultraschall-unterstützter Extraktionsmethoden der Anteil an gebundenem Lignin verringert [74].

Benkö et al. (2007) erprobten eine mikrowellen-unterstützte Extraktion unter neutralen, alkalischen und sauren Bedingungen. Hierzu wurde das Ausgangsmaterial mit entsalztem Wasser, Natriumhydroxid oder Schwefelsäure behandelt und anschließend für fünf Minuten einer Mikrowellenstrahlung unterzogen. Es zeigte sich, dass die Xylan-Ausbeute mit steigender Temperatur zunahm, sich ab einer Temperatur > 180 °C jedoch die molare Masse verringerte. Beispielsweise führte eine Erhöhung der Temperatur auf 210 °C zu einem vermehrten Abbau der Xylane (saure Hydrolyse) und damit einhergehend zu einer um den Faktor 2,3 geringeren molaren Masse [70].
Im Vergleich zur alkalischen Extraktionsmethode (2 % NaOH, 120 °C, 1 h) mit nachfolgender Ethanol-Fällung erreichten die drei mikrowellen-unterstützten Extraktionen deutlich geringere Xylan-Ausbeuten. So ergab sich bei der Verwendung von Wasser eine um den Faktor 2,8 geringere Ausbeute. Unter alkalischen und sauren Bedingungen verringerte sich die Ausbeute um den Faktor 5-12 respektive 14-25.
Darüber hinaus wiesen die Xylane der mikrowellen-unterstützten Extraktionen mit 127 kDa (neutral), 136-172 kDa (alkalisch) und 13,8-17,6 kDa geringere molare Massen auf als die rein alkalisch extrahierten Xylane (192 kDa) [70].

Tabelle 2.4: Übersicht diverser Methoden zur Isolierung von Hemicellulosen

Extraktionsmethode	**Rohstoffquelle**	**Referenz**
wässrige Extraktion, 6 h bei RT	Roggen	[65]
mild alkalisch: 5 % (w/v) NaOH, 1 h bei 90 °C	Birkenholz/Haferspelzen	[29], [67]
mild alkalisch: 0,5 M NaOH, 2-24 h bei 25 °C	Maiskleie	[66]
saure Extraktion: 12 h bei 45 °C, pH 1,5 vs 4,4	Maishalme	[73]
mikrowellen-unterstützte Extraktion bei 160-180 °C, Reinstwasser vs NaOH vs H_2SO_4	Getreidefasern	[70]
ultraschall-unterstützte Extraktion bei 50-70 °C, Reinstwasser vs NaOH	Maiskolben	[72]

2.8 Xylooligosaccharide

Xylooligosaccharide konnten bislang aus diversen lignocellulosehaltigen Rohstoffen wie z.B. Süßgräsern, Kleie, Bagasse und Harthölzern, aber auch aus Früchten, Honig und Milch isoliert werden. Dabei kamen sowohl chemische als auch enzymatische Behandlungen zum Einsatz [8, 9, 75–78]. So berichten beispielsweise Chemin et al. und Reis et al. über mild saure Xylan-Hydrolysen, deren Abbauprodukte mittels SEC und MALDI-TOF MS analysiert wurden [79–82]. Bowman et al. untersuchten die Struktur von chemischen [76] sowie enzymatischen Xylan-Hydrolysaten aus Rutenhirse via LC-MS [77, 78].

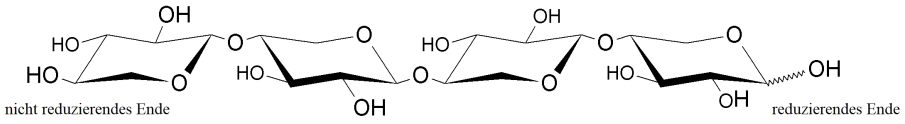


Abbildung 2.10: Strukturelle Merkmale des Xylooligosaccharids 1,4-β-D-Xylotetraose

Hinsichtlich der Anwendung von Xylooligosacchariden liegt der Schwerpunkt diverser Studien u.a. auf der Bioaktivität und prebiotischen Wirkung [8, 9]. Vázquez et al. (2000) berichten über die Verwendung von Xylooligosaccharide in (funktionellen) Lebensmitteln und deren gesundheitsförderlichen Effekte auf die gastrointestinale Flora. So regen Xylooligosaccharide das Wachstum von *Bifidobacterium* ssp. an. Darüber hinaus waren *Bacterodites* als auch *Lactobacillaceae* in der Lage die Xylooligosaccharide verwerten. Dies konnte u.a. durch Studien von Manisseri und Gudipati (2010) bestätigt werden [75, 83].
Grootaert et al. (2009) verglichen die prebiotische Wirkung von Inulin und Arabinoxylan-Oligosacchariden auf die menschliche Darmflora. Es zeigt sich, dass eine Behandlung mit Arabinoxylan-Oligosacchariden zu einer Erhöhung der Propionat- und Lactat-Konzentration sowie einer Verringerung der Acetat-Konzentration führt. Insbesondere im distalen Darm bewirkten die Oligosaccharide stärkere Effekte als eine Behandlung mit Inulin [84].

2.8.1 Biomedizinische Anwendung von Xylooligosacchariden

Sowohl Infektionskrankheiten als auch die zunehmende Antibiotikaresistenz von Bakterien sind globale Probleme, welche immer weiter im Fokus von Forschung und Entwicklung stehen. Neben der Untersuchung diverser Infektionserreger stellen insbesondere Entzündungsreaktionen sowie Abwehrreaktion des Organismus den Schwerpunkt dar.
Eine Vielzahl von Infektionskrankheiten werden durch bakterielle Endotoxine wie Lipopolysaccharide (LPS) hervorgerufen. Es handelt sich dabei um einen Zellmembran-Bestandteil gram-negativer Bakterien, welcher aus einem hydrophilen Polysaccharid-Anteil und einem lipophilen Lipid-Anteil (Lipid A) besteht. Die Struktur des Lipid A ist charakteristisch für gram-negative Bakterien und zugleich Ursache der Endotoxin-Wirkung [85].
Dabei verläuft die Erkennung von LPS über das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP), welches das gebundene LPS auf das membranständige Rezeptorprotein CD-14 transferiert.

CD-14, ein Rezeptorprotein das überwiegend auf Monozyten und Makrophagen zu finden ist, erkennt diesen Komplex und interagiert mit dem Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4). Einhergehend damit erfolgt die Aktivierung des TLR-4 sowie des assoziierten Glykoproteins MD-2 [86]. Dies führt zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 beta (IL-1β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α), welche wiederum eine zellvermittelte Makrophagen-Aktivierung, die Aktivierung diverser Immunzellen sowie die Freisetzung weiterer Zytokine bewirken [85, 87, 88].
In Folge der durch LPS ausgelösten und den TLR-4 Rezeptor vermittelten Immunantwort kommt es somit indirekt zur Ausschüttung von Zytokinen, die als Immunmodulatoren sowie als Entzündungsmediatoren wirken. Insbesondere TNF-α stellt einen zentralen Regulator des Immunsystems dar und ist neben der Zellproliferation und -regeneration u.a. an der Ausbildung von Entzündungen beteiligt. Aufgrund der durch TNF-α ausgelösten Entzündungsprozesse kann es neben Fieber, Infektionen und Apoptose auch zu Autoimmunreaktionen wie Morbus Crohn oder Rheuma kommen. Die Entwicklung hemmender Medikamente ist daher ein zentraler Bestandteil verschiedener Studien. Schwerpunkte liegen sowohl auf der Bioaktivität und immunmodulatorischen Wirkungen von Oligosacchariden.
Versuchsreihen mit *„dietary fibers“* zeigten, dass sowohl im darmassoziierten lymphatischen Gewebe als auch in den mesenterialen Lymphknoten immunmodulatorische Wirkungen herbeigeführt werden können. Beispielsweise führte die Zugabe von Fructooligosacchariden zu einer vermehren Ausschüttung von IFN-γ und IL-4 sekretierenden Zellen. Das Verabreichen von β-Glucanen aus Hafer bewirkte einen vermehrten Anstieg von Makrophagen [10].
Hansen et al. (2013) konnten die Herabregulation von IFN-γ und IL-1β in Mäusen nachweisen, welche eine 10-%ige Xylooligosaccharid-supplementierte Nahrung erhielten (DP 2-6)[11]. Chen et al. (2012) beschreiben eine Verringerung der TNF-α, IL-6 und IL-1β Sekretion durch eine Behandlung von LPS-stimmulierten RAW264.7 Zellen mit kommerziellen Xylo- oligosacchariden [12]. Genaue Angaben bezüglich der Zusammensetzung und Struktur der verwendeten Xylooligosaccharide finden sich in keiner der beiden Untersuchungen.

In der Fachliteratur sind zudem Studien bezüglich der Prävention von Biofilmen und pathogenen Adhäsionen durch (Xylo)-Oligosaccharide zu finden. Beispielsweise inhibieren Fucosyl- und Xylooligosaccharide die Adhäsion von *Campylobacter jejuni* respektive *Listeria monocytogenes* [14, 15]. Al-Ghazzewi und Tester (2014) berichten, dass u.a. Maltodextrine, Inulin, Galaktooligosaccharide sowie Glucomannan-Hydrolysate die Adhäsion von *Escherichia coli* an menschlichen Epithelzellen inhibieren [89].
Der Einsatz von Oligosacchariden stellt eine mögliche Alternative zu Antibiotika dar. Sie inhibieren die Adhäsion des Bakteriums ohne dieses zu töten und die Ausbildung von Stressfaktoren und Resistenzen zu forcieren. Darüber hinaus konnte in einigen Fällen die Ausbildung von Biofilmen unterdrückt werden, welche den Mikroorganismen als Schutzbarriere vor Antibiotika oder einer Immunabwehr dienen [13].

3 Material und Methoden

In diesem Kapitel wird auf die im Rahmen der Dissertation angewandten Arbeitsabläufe und Methoden eingegangen. Übersichtstabellen der verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte sind im Anhang zu finden.

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Probenpuffer:	75 mM NaCl, 50 mM Na-Acetat; pH 5 (mit HCl eingestellt)
Natriumacetat-Puffer:	50 mM Natriumacetat; pH 5 (mit HCl eingestellt)
Citrat-Puffer:	0,5 M Citonensäure; pH 3,8 (mit HCl eingestellt)
Citrat-Phosphat-Puffer:	17,9 ml Citronensäure (0,1 M) + 32,1 ml Na_2HPO_4 (0,2 M) ad 100 ml; pH 6,0
Paley-Puffer:	12,8 mM Na_2HPO_4, 11,5 mM KH_2PO_4, 50,0 mM NaCl, 3,8 mM NaN_3; pH 6,80
PBS Puffer:	13,8 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4; pH 7,2
Hank´s Lösung:	100 ml HANK´S [3] (Sigma) + 4,75 ml $NaHCO_3$ ad 1000 ml
RPMI Lösung:	100 ml RPMI1640 [4] (Merck) + 2 ml PS/Glu (Seromed)

3.1.2 *Trichoderma reesei* QM9414

Der zur Gewinnung der Enzyme α-L-Arabinofuranosidase, Acetyl-Xylan-Esterase und Ferulasäure-Esterase kultivierte Pilz *Trichoderma reesei* QM9414 stammt von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ No.: 769; ATCC 26921).
Es handelt sich dabei um eine Cellulase überproduzierende Mutante des Wild-Typs QM6a (ATCC 13631), welche sich durch eine zwei- bis vierfach höhere Menge an sekretierten Proteinen und Enzymen im Vergleich zum Wild-Typ auszeichnet [43].

[3] Hanks´ Balanced Salt Solution (10x), Zusammensatzung siehe Anhang S. 116
[4] RPMI-1640 Medium, kommerzielles Zellkulturmedium für human und tierische Zellen

3.1.3 Haferspelzen

Die verwendeten Haferspelzen wurden von der Firma H. & J. Brüggen KG (Lübeck) zur Verfügung gestellt. Sie wurden mit der Schneidemühle SM 300 und einem Sieb der Größe 0,50 mm zerkleinert. Das Vermahlen der Haferspelzen erfolgte bei RT und einer Drehzahl von 3000 rpm unter Verwendung einer Zyklon-Sauger-Kombination, welche ein Überhitzen des Mahlguts verhindert.

3.1.4 Rapsmehl

Sowohl in Untersuchungen von Gattinger et al. (1990) als auch am CIB konnte durch den Zusatz von Rapsmehl die Sekretion xylanolytischer Enzyme induziert werden [56, 60].
Daher wurde neben selbst extrahierten Haferspelzen-Xylan auch Rapsmehl für die Induktion der xylanolytischen Enzyme eingesetzt. Hierbei handelt es sich um Null-Raps, welcher bei der Prophyta GmbH (Malchow/Poel) erworben und bei 15 °C mit Hilfe einer Ölpresse (IBG Monforts, CA 500; Stufe 2) zu Pellets verarbeitet wurde.
Das Zerkleinern der Rapspellets zu Rapsmehl erfolgte mit Hilfe eines Stabmixers (Stabmixer turbo; BRAUN). Das Mahlgut wurde solange auf Stufe 4 des Stabmixers zerkleinert, bis ein augenscheinlich homogenes Mehl vorlag.

3.1.5 Wiesenschwingel

Studien von Smith et al. (1991) zeigten, dass der Zusatz von Wiesenschwingel die Sekretion xylanolytischer Enzyme induziert. [53]
Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Wiesenschwingel-Pflanzen wurden im Herbst 2015 selbst geerntet (Mecklenburg Vorpommern). Anschließend wurden die Pflanzen für fünf Tage bei 60 °C getrocknet und auf eine Größe von 0,75 mm zerkleinert.
Ferner kam nebst der Wiesenschwingel-Pflanze Saatgut der Firma Revierberatung Wolmersdorf GmbH & Co. KG zum Einsatz. Dieses wurde nach zweitägiger Trocknung bei 60 °C ebenfalls auf eine Größe von 0,75 mm zerkleinert.
Das Vermahlen erfolgte in beiden Fällen mit der Schneidemühle SM 300 bei einer Drehzahl von 1500 rpm unter Verwendung einer Zyklon-Sauger-Kombination, welche ein Überhitzen des Mahlguts verhindert.

3.2 Kultivierung von *Trichoderma reesei* QM9414

Um die für eine Modifikation notwendigen xylanolytischen Enzyme möglichst aus einem Produktionsstamm isolieren zu können, wurde der Pilze *Trichoderma reesei* QM9414 ausgewählt. Die Kultivierung des Pilzes *Trichoderma reesei* QM9414 verlief zunächst in 200 ml Schüttelkolben als Batch-Fermentation. Zur Induktion der α-L-Arabinofuranosidase, Acetyl-Xylan-Esterease und Ferulasäure-Esterase-Sekretion kamen neben Haferspelzen-Xylan auch Rapsmehl sowie Wiesenschwingel und Wiesenschwingelsaat zum Einsatz.
Bei sämtlichen Fermentationen diente Glukose (5 g/l) als schnell verstoffwechselbare Kohlenstoffquelle.

3.2.1 Nährmedien

50xSpurenelement-Lösung:

- 0,250 g/l $FeSO_4$ x 7 H_2O
- 0,085 g/l $MnSO_4$ x H_2O
- 0,070 g/l $ZnSO_4$ x 7 H_2O
- 0,100 g/l $CaCl_2$ x 2 H_2O

Mineralsalzlösung:

- 2,8 g/l $(NH_4)_2SO_4$
- 4,0 g/l KH_2PO_4
- 0,6 g/l $MgSO_4$ x 7 H_2O
- 0,8 g/l $CaCl_2$ x 2 H_2O

Vorkultur-Medium nach Mandels-Andreotti: pH 5,0

- 500 ml/l Mineralsalzlösung
- 480 ml/l Phosphat-Citrat-Puffer (0,1 M)
- 20 ml/l Spurenelement-Lösung (50x)
- 0,3 g/l Harnstoff
- 1,0 g/l Pepton
- 15,0 g Glukose

Fermentations-Medium: pH 4,0

- 20,0 ml/l Spurenelement-Lösung (50x)
- 0,5 ml/l Tween 80l
- 2,8 g/l $(NH_4)_2SO_4$
- 4,0 g/l KH_2PO_4
- 1,0 g/l $MgSO_4$ x 7 H_2O
- 0,5 g/l NaCl
- 1,0 g/l Pepton
- 5,0 g/l Glukose
- 10 g/l Induktor / 2. Kohlenstoffquelle (Xylan, Rapsmehl oder Wiesenschwingel)

3.2.2 Inokulum

Der Stamm *Trichoderma reesei* QM9414 wurde zunächst auf Schrägagarröhrchen sowie Agarplatten mit PDA-Agar aufgetragen. Nach einer 72-stündigen Inkubation bei 24 °C im Brutschrank erfolgte mit den gewonnenen Sporen ein Animpfen neuer Schrägagarröhrchen und Agarplatten (mit PDA-Agar). Diese inkubierten bei einer Temperatur von 28 °C für die Dauer von 6 Tagen und wurden anschließend dem Tageslicht ausgesetzt, um die Sporen-Ausbildung anzuregen.
Zur Gewinnung einer Sporensuspension wurden die entwickelten Sporen mit 10 ml einer 20 %-igen Tween 20-NaCl (0,9 %) -Lösung versetzt und mit Hilfe einer sterilen Öse von der Agarfläche abgelöst. Die Lagerung der Sporensuspension fand bei 6 °C im Kühlschrank statt.

3.2.3 Ansetzen der Vorkultur

Das Ansetzen der Vorkultur erfolgte in einem Nährmedium nach Mandels-Andreotti [41] (Zusammensetzung siehe Nährmedien, Seite 23) .
In sterilen 500 ml Erlenmeyerkolben wurden 200 ml des Mandels-Andreotti-Mediums mit einem entsprechenden Volumen an Sporensuspension angeimpft, um eine Konzentration von 10^6 Sporen pro Milliliter [39, 57] zu erhalten. Die anschließende Inkubation der Vorkultur verlief über einen Zeitraum von 96 h bei 28 °C und 200 rpm [90].

3.2.4 Schüttelkolben-Fermentation

Die Schüttelkolben-Fermentationen dienten dazu, eine geeignete Kohlenstoffquelle zur Induktion der Enzyme α-L-Arabinofuranosidase, Acetyl-Xylan-Esterase und Ferulasäure-Esterase festzulegen. So wurde eine Versuchsreihe mit fünf verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glukose, Xylan, Rapsmehl sowie gemahlener Wiesenschwingel und gemahlene Wiesenschwingelsaat) bei einem pH-Wert von 4,0 durchgeführt. Glukose diente dabei als Referenzprobe, da es laut Fachliteratur die Expression xylanolytischer Enzyme nicht induziert, sondern in vielen Fällen sogar unterdrückt [91, 92].
Zum Start der Fermentation erfolgte ein Animpfen im Verhältnis 1:10 Vorkultur zu Medium. Die einzelnen Schüttelkolben-Ansätze umfassten ein Volumen von 200 ml und wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Fermentationen verliefen bei einer Temperatur von 28 °C über einen Zeitraum von zehn Tagen.
Um die Entwicklung der Enzym-Sekretion verfolgen zu können, wurde nach 48, 72, 124, 144, 168, 216 und 240 Stunden die Proteinkonzentration sowie die Aktivität der Xylanase, α-L-Arabinofuranosidase, Acetyl-Xylan-Esterase und Ferulasäure-Esterase aus dem Überstand der Kulturbrühe bestimmt. Um mögliche Matrixeffekte des Kulturüberstandes zu minimieren wurden die Proben bei 6 °C zur Abtrennung des Mycels und Bestandteilen des Nährmediums 20 min bei 5697 x g zentrifugiert (7000 rpm; Rotor: F15-8x50cy).
Im Zuge erster Voruntersuchungen [56] zeigte sich, der Proteinbestimmungen nach Lowry und Bradford, dass Komponenten des Kulturübestandes noch erhebliche Störeffekte hervorriefen. Da die Proteinkonzentrationen nach Bradford konstanter war, beziehen sich die nachstehenden Ergebnisse auf die Bestimmung nach Bradford.
Die Schüttelkolben-Fermentation erfolgte in zwei Versuchsreihen mit jeweils zwei Ansätzen pro Induktor (4-fach Bestimmung für jeden Induktor), um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Nach Abschluss der Fermentationen wurde das Myzel durch eine 20-min Zentrifugation bei 6 °C und 9 x g (7000 rpm; Rotor: F12S-6x500Lex) abgetrennt. Die Ausfällung der sekretierten Proteine verlief als 1-stufige Ammoniumsulfat-Fällung (85 % Sättigung). Zur Abtrennung des Präzipitates wurde der Fällungsansatz für 15 min bei 9 x g (Rotor: F12S-6x500Lex) und 6 °C zentrifugiert und die erhaltenen Präzipitate bei -20 °C gelagert.
Eine weitere Aufarbeitung der ausgefällten Proteine fand nicht statt, da sich der Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Charakterisierung der Xylooligosaccharide und deren möglicher Anwendungen in der Biomedizin richtete. Die enzymatische Hydrolyse der Xylane erfolgte unter Verwendung einer kommerziellen endo-1,4-β-Xylanase, welche preiswert und mit einer hohen Aktivität ($\geq$2500 U/g) erhältlich war.

3.3 Gewinnung von Xylan und Xylooligosacchariden

3.3.1 Basische Extraktion am Rückfluss

Hierzu wurden 46 g gemahlene Haferspelzen in einem Dreihalskolben mit 850 ml Reinstwasser und Natronlauge (5 %-ig (w/v)) versetzt und eine Stunde bei 90 °C am Rückflusskühler extrahiert. Nach Beendigung der Extraktion wurde die Suspension auf RT abgekühlt und durch Zugabe eines entsprechenden Volumens an Salzsäure (20 %-ig (v/v)) auf einen definierten pH-Wert (siehe Tab. 3.1) eingestellt.
Zur Abtrennung der Haferspelzen erfolgte eine Membran-Filtration (Porenweite: 200 µm; Hydro-Bios) und bei einigen Extraktions-Ansätzen (siehe Tab. 3.1) eine 20-min Zentrifugation bei 9 x g (Rotor: F12S-6x500Lex; 7000 rpm).
Das im Überstand vorliegende Xylan wurde durch Zugabe von Ethanol (EtOH) oder Isopropanol (IPA) im Verhältnis 1:2 ausgefällt. Um eine möglichst vollständige Fällung zu erzielen, wurde der Prozess über Nacht bei 8 °C durchgeführt.
Anschließend wurde das Präzipitat über eine 10 µm Membran abfiltriert und mit dem gleichen Volumen an frischem Lösemittel versetzt. Die Suspension wurde über Nacht bei 8 °C im Ex-Kühlschrank präzipitiert. Abschließend folgte die Abtrennung des Präzipitats mit Hilfe einer 10 µm Membran sowie die Trocknung im Vakuumtrockenschrank bei 30 °C und 50 mbar bis zur Massenkonstanz.

Tabelle 3.1: Übersicht diverser Xylanextraktionen am Rückfluss - XE RF

Probenbezeichnung	Extraktionslösung	pH-Wert	Variation
XE RF 1	5 % (w/v) NaOH	6,0	
XE RF 2		5,5	
XE RF 3A		5,5	
XE RF 3B		5,5	IPA-Fällung
XE RF 4A		4,5	
XE RF 4B		4,5	IPA-Fällung
XE RF 5A	5 % (w/v) NaOH	5,5	pH-Einstellung vor Zentrif.
XE RF 5B			pH-Einstellung nach Zentrif.
XE RF 6A			pH-Einstellung vor Zentrif.
XE RF 6B			
XE RF 9	5 % (w/v) NaOH + 5 % (w/v) H_2O_2	5,5	pH-Einstellung mit Eisessig
XE RF 10			
XE RF 11A	Reinstwasser	5,5	
XE RF 11B			

3.3.2 Extraktion im Autoklaven

Folgende Ansätze dienten zur Extraktion im Autoklaven:

- 5 % Haferspelzen (w/v): 30 g in 570 ml 0,1 M NaOH
- 10 % Haferspelzen (w/v): 60 g in 540 ml Reinstwasser

Die gemahlene Haferspelzen wurden in einer 2 Liter Flasche mit dem jeweiligen Extraktionslösung versetzt und bei 121 °C im Autoklav extrahiert. Nach Beendigung der Extraktion wurde die Suspension auf RT abgekühlt und durch Zugabe eines entsprechenden Volumens an Salzsäure (20 %-ig (v/v)) auf einen pH-Wert von 5,5 oder 6,5 eingestellt.
Die anschließende Aufarbeitung der Suspension erfolgte wie in Kapitel 3.3.1.

Tabelle 3.2: Übersicht diverser Xylanextraktionen im Autoklaven - XE AK

Probenbezeichnung	Extraktionslösung	pH-Wert	Variation
XE AK 29A	0,1 M NaOH	5,5	5 % Haferspelzen (w/w)
XE AK 29B		6,5	
XE AK 30A		5,5	
XE AK 30B		6,5	
XE AK 31A		5,5	
XE AK 31B		6,5	
XE AK 33	Reinstwasser	5,5	10 % Haferspelzen (w/w)
XE AK 34		5,5	
XE AK 35		5,5	
XE AK 36		5,5	

3.3.3 Xylan - Delignifizierung

3.3.3.1 Bleichen mit Wasserstoffperoxid

Um das Lignin im Xylan weitestgehend zu entfernen, wurde die Xylan-Probe XE RF 2 (Tab. 3.1) einem Bleichschritt nach Saake et al. und Puls et al. [29, 67] unterzogen:

- 6 % (w/v) NaOH
- 4 % (v/v) H_2O_2
- 10 % (w/v) Xylan

Nach 2 h bei 80 °C am Rückfluss (250 ml Dreihalskolben) wurde die Lösung auf RT abgekühlt, der pH-Wert mit Eisessig auf 5,5 eingestellt und das Xylan durch Zugabe des dreifachen Volumens an Ethanol ausgefällt. Die Aufarbeitung der Suspension erfolgte wie in Kapitel 3.3.1. Das erhaltene Produkt wird im Folgenden als XBl 1 respektive XBl 2 bezeichnet (zwei separate Ansätze).

3.3.3.2 Enzymatische Delignifizierung

Neben der Wasserstoffperoxid-Behandlung erfolgte eine enzymatische Delignifizierung mittels Lignin Peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) und Manganese Peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13).
Es handelt sich hierbei um ligninolytische Enzyme aus Basidiomyceten. Im Fall der LiP wird die oxidative Spaltung von β-O-4-Ether- sowie C_α-C_β-Bindungen katalysiert [93, 94]. Die MnP oxidiert in Anwesenheit von H_2O_2 Mn^{2+}-Ionen zu Mn^{3+}-Ionen, welche in Form von Chelatkomplexen stabilisiert werden und wiederum als Mediator bei der Oxidation von phenolischen Strukturen wirken [93, 95].

Tabelle 3.3: Herstellerangaben zu den Enzymen LiP und MnP

	pH-Optimum	T.-Optimum	Quelle	Hersteller
LiP	3,0	30 °C	keine Angaben	Sigma-Aldrich, 42603
MnP	4,5	25 °C	*Nematoloma frowardii*	Sigma-Aldrich, 41563

Das über Nacht in Citrat-Puffer (pH 3,8) suspendierte Xylan (1,0 g in 27,7 ml) wurde mit:

- je 1,0 ml LiP und MnP (0,071 U/ml) sowie
- 0,3 ml H_2O_2 (0,4 M) versetzt und gut durchmischt.

Anschließend erfolgte eine 2-stündige Inkubation bei 28 °C und 650 rpm (Thermomixer) sowie ein Abbruch der Reaktion durch thermische Denaturierung (15 min bei 99 °C und 650 rpm).
Die Suspension wurde auf RT abgekühlt und der pH-Wert mit NaOH auf 4,5 eingestellt. Abschließend erfolgte die Aufarbeitung der Suspension wie in Kapitel 3.3.1. Die erhaltenen Produkte werden im Folgenden als „XLMP 1-4“ bezeichnet (vier separate Ansätze). Als Ausgangssubstanz diente das Xylan XE RF 2.

3.3.4 Enzymatische Hydrolyse von Xylan

Die enzymatische Hydrolyse von Xylan erfolgte unter Verwendung einer kommerziellen endo-1,4-β-Xylanase (EC 3.2.1.8) aus *Thermomyces lanuginosus*, exprimiert in *A. oryzae*. Das Enzym, welches an einem Trägermaterial gebunden vorlag, wurde vor jedem Versuch frisch in Probenpuffer (pH 6,0) suspendiert (25 U/ml).
Da seitens des Herstellers keine Angaben bzgl. des Temperatur-Optimums vorlagen, fanden die ersten Hydrolysen bei 30 °C respektive 50 °C statt.

Tabelle 3.4: Herstellerangaben zur Xylanase X2753

	pH-Optimum	Temperatur	Aktivität	Hersteller
Xylanase	4-6	„up to 75 °C“	≥ 2500 FXU (W)/g [5]	Sigma-Aldrich, X2753

In ersten Versuchsreihen wurden 250 mg Xylan über Nacht in 12 ml Probenpuffer (pH 6,0) suspendiert und anschließend mit 200 µl Xylanase-Lösung (25 U/ml) versetzt.
Die Inkubation verlief zunächst für 16, 24 sowie 48 h bei 30 °C respektive 50 °C und 650 rpm. Daraufhin wurde die Reaktion durch thermische Denaturierung (15 min bei 90 °C) gestoppt und die einzelnen Probenansätze 5 min bei 600 rpm zentrifugiert (EBA 20, Rotor: E1624). Die festen Rückstände wurden nach einer Trocknung bei 70 °C ausgewogen und die Überstände bis zur chromatographischen Aufreinigung bei -8 °C gelagert.

Nachfolgende Hydrolysen liefen stets wie folgt ab:
500 mg Xylan wurden über Nacht in 24 ml Probenpuffer suspendiert und anschließend mit 400 µl Xylanase-Lösung (25 U/ml) versetzt. Nach 24-stündiger Inkubation bei 50 °C und 650 rpm erfolgte das Stoppen der Reaktion durch thermische Denaturierung (15 min bei 90 °C). Die Probenansätze wurden 5 min bei 600 rpm zentrifugiert (EBA 21,Rotor: E1416), die festen Rückstände nach einer Trocknung bei 70 °C ausgewogen und die Überstände bis zur chromatographischen Aufreinigung bei -8 °C gelagert.

[5] Fungal Xylanase Units (Wheat)

3.4 Fraktionierung von Xylan-Proben

3.4.1 Fraktionierung mittels SEC

Zur Charakterisierung des Elutionsprofils und Separation ausgewählter Xylan-Proben wurden diese mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC) untersucht.
Sämtliche Versuchsreihen verlief an einem NGC™Chromatography System (BIO RAD, D). Als Eluent diente in fast allen Versuchen Reinstwasser, wobei in einzelnen Versuchsreihen auch Natriumacetat verwendet wurde (s. Anmerkung Ergebnisse).
Die Detektion verlief mit einem Brechungsindex-Detektor (Smartline RI, Knauer, D) und einem UV-Detektor (BIO RAD, D) bei einer Wellenlänge von λ = 280 nm.
Für die Kalibrierung kamen Dextran-Standards (5 kDa, 25 kDa, 50 kDa, 80 kDa und 150 kDa; Sigma, CH) sowie ein 1,4-β-D-Xylopentaose Standard (X5, Megazyme, IRE) zum Einsatz.

Die Separation der Xylan-Hydrolysate erfolgte an einem LKB P-500 FPLC System (Pharmacia, USA) unter Verwendung einer Sephadex LH-20 Säule (s. 3.4.2) mit Reinstwasser als Eluent.
Für die Detektion wurden ein Brechungsindex-Detektor (RI8110, ERC) sowie ein UV-Detektor (Pharmacia, USA) bei einer Wellenlänge von λ = 279 nm verwendet.

3.4.1.1 SEC I: Sephacryl S-400 HR

Die Sephacryl S-400 16/60 Fertig-Säule (GE Healthcare, USA) besteht aus einem vernetzten Copolymer aus Allyldextran and N,N-Methylenebis-acrylamid.
Der angegebene Trennbereich für Dextran liegt zwischen einer relativen molaren Masse von 10-2.000 kDa und eignet sich zur Auftrennung von nieder- bis hochmolekularen Polysacchariden wie Xylan. Das Säulen-Volumen beträgt 120 ml.
Nach der Filtration über einen 0,45 µm sowie 0,20 µm Spritzenvorsatzfilter wurden 500 µl Probe auf die mit Reinstwasser äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte bei einem Fluss von 0,6 ml/min und wurde nach 184 ml beendet (Fraktionsvolumen: 2,0 ml).

3.4.1.2 SEC II: Superdex™75 prep

Die Superdex 75™prep Säule (16x340 mm) wurde selbst gepackt. Als Matrix dient quervernetzte Dextran-Agarose, die extra für semi-präparative Gelfiltrationen mit Flussraten bis zu 1,5 ml/min ausgelegt ist. Der Trennbereich für Dextrane liegt zwischen einer relativen molaren Masse von 500-30.000 Da.
Auf die mit Reinstwasser äquilibrierte Säule wurden 5,0 ml Probe (0,45 µm und 0,20 µm filtriert) aufgetragen und mit einem Fluss von 1,0 ml/min über einen Zeitraum von 114 min eluiert (~ 114 ml). Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 1,0 ml aufgefangen.

3.4.2 Fraktionierung der Xylooligosaccharide an Sephadex LH-20

Bei Sephadex LH-20 handelt es sich um ein quervernetztes, hydroxypropyliertes Dextran, dessen Trennleistung aus einer Kombination von Gelpermeation und hydrophoben Wechselwirkungen beruht. Der Trennbereich liegt laut Herstellerangaben zwischen 100-5000 Da.
Nach einer 0,45 µm Filtration erfolgte die direkte Aufgabe der Proben auf die mit Reinstwasser äquilibrierte, selbst gepackte Säule (90x2,6 cm). Die Elution verlief für 20 h bei einem Fluss von 0,5 ml/min. Das Volumen der aufgefangenen Fraktionen betrug 15 ml.

3.4.3 Fraktionierung der Xylooligosaccharide mittels AEC

Die Fraktionierung der Oligosaccharide erfolgte mittels Anionenaustausch-Chromatographie an einem Dionex ICS 5000 System mit AS-AP Autosampler und Single Pump Modul (Thermo Fisher Scientific, USA). Für die Auftrennung wurde die semipräparative CarboPac PA200sp Säule (Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet. Das Material dieser Säule wurde speziell für die Auftrennung von neutralen Oligosacchariden entwickelt [96]. Es handelt sich hierbei um ein Trägermaterial aus Ethylvinylbenzol, das zu 55 % mit Divinylbenzol quervernetzt ist und quartäre Ammoniumionen als funktionelle Gruppen trägt (Partikelgröße: 5,5 µm). Als Eluenten dienten Reinstwasser (A und C), 0,2 M NaOH (B) sowie 0,1 M NaOH in 1,0 M NaOAc (D). Die Elution verlief bei einer Temperatur von 30 °C mit folgenden Gradienten:

Tabelle 3.5: Gradientenverlauf - Oligosaccharid-Methode

Zeit [min]	**Fluss** [ml/min]	**A** [%]	**B** [%]	**C** [%]	**D** [%]	**curve**
0,0	3,0	41,3	17,5	41,2	0,0	5
8,0	3,0	37,5	25,0	37,5	0,0	5
30,0	3,0	34,3	25,0	34,4	6,3	5
48,0	3,0	12,5	25,0	32,5	10,0	5
53,0	3,0	12,5	25,0	12,5	50,0	8
53,1	3,0	12,5	25,0	12,5	50,0	8
58,0	3,0	41,3	17,5	41,2	0,0	5
63,0	3,0	41,3	17,5	41,2	0,0	5

Die lyophilisierten Proben wurden in Reinstwasser gelöst, über einen 0,20 µm Spritzenvorsatzfilter (Nylon; Satorius, D) filtriert und aufgegeben. Die Detektion verlief mit einem elektrochemischen Detektor (ED) von Thermo Fisher Scientific (USA).
Für die Kalibrierung wurden 1,4-β-D-Xylobiose (X2), -Xylotriose (X3), -Xylotetraose (X4), -Xylopentaose (X5) und -Xylohexaose (X6) von Megazyme (IRE) benutzt.

3.5 Charakterisierung der Xylane und Xylooligosaccharide

3.5.1 Dünnschichtchromatografie

Stationäre Phase: Fertigplatten Alugram SIL G/UV254, Macherey-Nagel (D)
Mobile Phase: n-Butanol/Essigsäure/Aceton/Wasser (10:4:2:4)

Die Dünnschichtchromatografie erfolgte über eine Laufzeit von 90-95 min. Zur Detektion wurden die DC-Platten in eine Naphthoresorcin-Lösung getaucht und anschließend auf einer Heizplatte bei 100 °C erhitzt, bis die Substanz-Spots gut zu erkenne waren. Diese Nachweisreaktion ist sowohl empfindlich als auch spezifisch, so ergeben sich bei Ketosen rote und bei Aldosen blaue Substanz-Spots.

3.5.2 Totalhydrolyse

Die Aufspaltung der Xylan-Proben in ihre Monosaccharide erfolgte mit einer 2-stufige Totalhydrolyse nach Saake et al. (2004) und einer US Vorschrift (NREL LAP[6]) [29, 97].

200 mg Probe wurden in einem Reagenzglas mit 2 ml 72 %iger Schwefelsäure versetzt und gut durchmischt. Die Vorhydrolyse verlief für 1 h bei 30 °C im Wasserbad und wurde durch Zugabe von 6 ml deionisiertem Wasser gestoppt.
Anschließend erfolgte das Überführen der Probe mit insgesamt 50 ml deionisiertem Wasser in eine 100 ml Flasche sowie eine 40-minütige Nachhydroylse bei 121 °C im Autoklav.
Das erhaltene Hydrolysat wurde über einen Filtertiegel aus Borosilikatglas (Porosität 2, 30 ml; Fisher Scientific GmbH, D) filtriert und in einem Messkolben mit deionisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
Der Rückstand wurde säurefrei gewaschen, bis zur Massenkonstanz getrocknet und ausgewogen (Klason-Lignin, siehe 3.5.3). Das Filtrat diente zur Kohlenhydratanalyse (3.5.4) sowie zur Bestimmung des sauer löslichen Lignins (siehe 3.5.3).

3.5.3 Bestimmung des Ligninanteils

Das Klason-Lignin (sauer unlösliches Lignin) wurde nach TAPPI T222 om-02 [98] und einer NREL LAP Methode[7] [97] aus dem säurefrei gewaschenen Rückstand nach Trocknung gravimetrisch erfasst.
Die Bestimmung des sauer löslichen Lignins erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von λ = 205 nm nach TAPPI UM250 [99] und einer NREL LAP Methode [97]. Als Referenz diente eine mit Lignin ermittelte Kalibrierkurve.

[6] National Renewable Energy Laboratory, 2011

3.5.4 Analyse der Monosaccharid-Zusammensetzung

Für die quantitative Analyse der Xylanhydrolysate kam eine Anionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung des Dionex ICS 5000 Systems zum Einsatz. Die Detektion der Monosaccharide verlief mit einem elektrochemischen Detektor (Thermo Fisher, USA).
Als Säulensystem dienten die analytische CarboPac PA200 (3x250 mm; Thermo Fisher, USA) in Kombination mit der CarboPac PA200 Vorsäule (3x50 mm; Thermo Fisher, USA). Das Material dieses Säulensystem wurde speziell für die Auftrennung von neutralen Oligo- und Monosacchariden entwickelt [96].
Die Trennung der Monosaccharide erfolgte bei einem Fluss von 0,1 ml/min und einer Temperatur von 30 °C mit dem folgenden Gradienten:

Tabelle 3.6: Gradientenverlauf - Monosaccharidanalyse

Zeit [min]	**A: 0,1 M NaOH** [%]	**B: Reinstwasser** [%]	**C: 0,7 M NaOH** [%]
0,00	15,0	85,0	0,0
15,00	10,0	90,0	0,0
20,00	5,0	95,0	0,0
26,00	0,0	83,0	17,0
36,00	0,0	80,0	20,0
36,01	0,0	0,0	100,0
45,00	0,0	0,0	100,0
45,01	15,0	85,0	0,0
70,00	15,0	85,0	0,0

3.5.5 Bestimmung des Acetylierungsgrades von Xylan

Zur Bestimmung des Acetylierungsgrades der Xylan-Proben wurden zunächst 20 mg Probe unter Rühren über Nacht (etwa 12 h) in 20 ml Reinstwasser suspendiert.
Von dieser Proben-Lösung wurde 1 ml in ein Reagenzglas überführt und mit 1 ml Hydroxylaminhydrochlorid (2 M) sowie 1 ml NaOH (3,5 M) versetzt, gemischt und 2 min inkubieren lassen. Unter diesen Bedingungen wurden die veresterten Carboxylgruppen in Hydroxaminsäure überführt. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1 ml HCl (4 M).
Anschließend wurde 1 ml Eisen (III)-Lösung zugegeben, die Probe durchmischt und 2-minütiger Inkubation die Extinktion bei einer Wellenlänge von λ = 520 nm vermessen. Die zuvor entstandenen Hydroxaminsäuren bilden mit Eisen(III)-Ionen einen unlöslichen roten Komplex, dessen Intensität bei λ = 520 nm sein Maximum aufweist. Die Berechnung des Acetylierungsgrades erfolgte anhand einer mit β-D-Glucose-Pentaacetat ermittelten Kalibrierkurve [100, 101].

3.5.6 Extraktion und Quantifizierung der Ferulasäure

Die Methode zur Bestimmung des Ferulasäureanteils basiert auf den Methoden von Vansteenkiste et al. (2004) und Buksa et al. (2012) [65, 102]:
20 mg Probe wurden mit 5,0 ml Natronlauge versetzt und 2 h bei RT unter Lichtausschluss und Stickstoff rühren lassen. Anschließend wurde die Lösung mit Salzsäure auf pH 2,0 einstellt.
Es erfolgten zwei Extraktionen der wässrigen Phase mit Ethylacetat. Beide Ethylacetat-Phasen wurden vereint und über Nacht mit Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet.
Die erhaltenen Extrakte wurden unter Stickstoff eingedampft und der Rückstand in 1,5 ml Methanol:Reinstwasser (70:30) aufgenommen.

Die Quantifizierung der Ferulasäure erfolgte über eine Ultimate 3000 HPLC Anlage (Thermo Fisher, D) mittels UV-Detektor bei λ = 320 nm. Für die Trennung kam eine LiChrosorb RP-18 Säule (4x250 mm, 5 µm; Merck, D) zum Einsatz.
Als Eluenten für die HPLC wurden 50 mM Natriumacetat Puffer pH 4,5 (Eluent A) sowie 100 % Acetonitril (Eluent B) verwendet. Die Elution verlief bei 25 °C und einem Fluss von 1,0 ml/min über folgenden A/B-Gradienten: 85/15 zu 77/23 in 12,5 min, 77/23 zu 60/40 in 1,5 min, 60/40 zu 85/15 in 5,0 min und 85/15 für 4,0 min.

3.5.7 FT-IR Spektroskopie

2-3 mg Probe wurden mit 300 mg frisch getrocknetem KBr zu einem Pressling verarbeitet und an einem Vector 22 FT-IR Spektrometer von Bruker (USA) vermessen. Sämtliche Messungen erfolgten im mittleren Infrarot-Bereich von 4.000 - 400 cm^{-1} mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} und 32 Scans. Zur Auswertung wurde die Opus 6.5 software verwendet (Bruker, USA).

3.5.8 Molmassenverteilung der Xylan-Proben

Die Untersuchung der Molmassen der Xylan-Proben erfolgte mittels Gelpermeations-Chromatographie (GPC) gekoppelt mit Brechungsindex-, Viskositäts- und Lichtstreu-Detektion.
Durch die Kombination dieser drei Verfahren ist es möglich das Brechungsindexinkrement (dn/dc-Wert), die intrinsische Viskosität η sowie die Molmasse zu ermitteln. Da die Probenbestandteile nach ihrem hydrodynamischen Volumen aufgetrennt werden, ergibt sich eine Molmassenverteilung [103, 104].

$$\text{Gewichtsmittel } M_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i} \qquad \text{Zahlenmittel } M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i}$$

$$\text{Zentrifugenmittel } M_z = \frac{\sum n_i M_i^3}{\sum n_i} \qquad \text{Polydispersität (PD)} = \frac{M_w}{M_n}$$

Die Xylan-Proben wurden über Nacht in Paley buffer (pH 6,8) suspendiert (β = 2,5 mg/ml) und die nicht gelösten Bestandteile durch 5-minütige Zentrifugation bei 6000 rpm (EBA 20, Rotor: E1624) abgetrennt, bei 70 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet und ausgewogen. Abschließend erfolgte eine Filtration mit 0,2 µm Cellulose-Acetat Filtern, welche ebenfalls bei 70 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet und ausgewogen wurden.

Die Proben wurden mit einem GPC-System mit angeschlossenem Triple-Detektor (Viscotek TDA 302, Malvern, USA) und UV Detector (Viscotek 2600, Malvern, USA) untersucht.
Alle Messungen verliefen für 61 min bei 35 °C und einer Flussrate von 0,7 ml/min. Die Winkeleinstellungen des Detektors betrugen 90° (RALS) und 7° (LALS). Zur Trennung der Xylan-Proben wurden analytische TSKgel G3000, G4000 und G5000 PWxL Säulen (Tosoh, D) in Reihe geschaltet. Jede Xylan-Probe wurde 4-fach vermessen. Die Kalibration erfolgte mit den Polyethylene Oxide Standards TDS-PEO 22 k und 19 k (Malvern, USA).
Aus den Chromatogrammen der Brechungsindices (RI), der RALS-/LALS-Signale und der Viskositäts-Signale (DP/IP) wurden unter Verwendung der Omnisec 5.02 Software (Malvern, USA) die molekularen Parameter der Xylan-Proben berechnet. Das Setzen der Integrationsgrenzen erfolgte manuell.

3.5.9 ESI-MS Messungen

Die massenspektrometrischen Untersuchungen der Xylooligosaccharide erfolgten an einem amaZoneX Instrument mit gekoppeltem Quadrupol (Bruker, USA). Als Ionisationsverfahren kam die Elektrospray-Ionisation zum Einsatz (ESI-MS) . Sämtliche Messungen verliefen im positiven Modus bei einer Spannung von 140 V. Der Massenbereich war wie folgt eingestellt: Ultrascan Scan-Start: 100 m/z Scan-Ende: 3000 m/z. Es wurde im „Enhanced Resolution“ Modus gemessen, Angaben bzgl. der Akkumulationszeit und weiteren variierten Parametern sind den jeweiligen „Display-Reports“ im Anhang ab Seite 122 zu entnehmen.
Vor der Injektion wurden die Proben in ANC/Reinstwasser (50:50, v/v) mit 0,5 mM NaAc verdünnt. Da kein geeignetes Säulen-System für eine Vorauftrennung der Probe im Institut vorrätig war, erfolgte eine direkte Probenaufgabe mittels einer Spritze.
Für die Auswertung wurde die Compass DataAnalysis 4.0 Software (Bruker, USA) verwendet.

3.5.10 NMR Spektroskopie

1,5 mg Xylooligosaccharid-Probe wurden zwei Mal in 150 µl D_2O suspendiert und gefriergetrocknet. Kurz vor der NMR-Messung wurde die Probe in 200 µl D_2O gelöst. Die Messung verliefen bei 25 °C an einem Avance III 500 MHz Spektrometer (Bruker, USA) mit einem Helium gekühltem inversen TCI-Cryoprobenkopf. Zur Auswertung wurde die TopSpin 3.5 Software verwendet. Die Experimente erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Thorsten Biet (NMR-Abteilung, Universität zu Lübeck).

3.6 Bioanalytische Methoden

3.6.1 Aktivitätstest der Enzyme

Die Aktivität der aus *Trichoderma reesei* QM9414 sekretierten Enzyme wurde unter Verwendung der chromogenen Substrate 4-Nitrophenyl-α-L-Arabinofuranoside (4-NPA; Sigma, CH), 4-Nitrophenyl acetate (4-NPAc; Sigma, CH), 4-Nitrophenyl β-xylotrioside (4-NPX; Megazyme, IRE) respektive 4-Nitrophenyl trans-ferulate (4-NP-t-FE; Carbosynth, UK) bestimmt.
Bei Anwesenheit aktiver Enzyme kommt es zu einer enzymatischen Hydrolyse des farblosen Substrates zu 4-Nitrophenol und dem jeweiligen Spaltungsprodukt. Eine anschließende Deprotonierung überführt das entstandene 4-Nitrophenol in dessen anionische Form (4-Nitrophenolat). Aufgrund des auxochromen Sauerstoff-Atoms der 4-Nitrophenolat-Form ergibt sich eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von λ = 320 nm zu λ = 410 nm (bathochromer Effekt). Diese Farbvertiefung ermöglicht die photometrische Bestimmung der Enzym-Aktivität, indem die Zunahme der 4-Nitrophenolat-Konzentration bei λ = 410 nm gemessen wird.

Der entwickelte Assay zur Bestimmung der α-L-Arabinofuranosidase-Aktivität basiert auf dem Testsystem von Bischoff et al. (2011) [105] sowie auf eigenen Voruntersuchungen am CIB [56]. Die Bestimmung der Xylanase-Aktivität erfolgte ebenfalls nach diesem Testsystem.
Der Reaktions-Ansatz beinhaltete folgende Komponenten: 0,25 mM 4-NPA bzw. 4-NPX, 50 µl Probe und 175 µl Probenpuffer (pH 5) und wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Mikrotiterplatte:

Probenpuffer:	175 µl,	pH 5,0
Probe:	50 µl	
Substrat:	25 µl	

4-NPA/4-NPX-Stammlösung: 2,50 mM

Es wurden jeweils mindestens zwei Ansätze mit nativen Enzymproben und ein Ansatz mit einer denaturierten Enzymprobe (dient als Blindwert) getestet.
Die Reaktion verlief für 30 min bei 50 °C und wurde durch Zugabe von 70 µl eiskalter 1 M Na_2CO_3 gestoppt. Unmittelbar danach erfolgte die Quantifizierung via UV bei einer Wellenlänge von λ = 410 nm (Eon Microplate-Reader, BioTek Instruments, USA).

Der entwickelte Assay zur Bestimmung der Acetyl-Xylan-Esterase sowie Ferulasäure-Esterase-Aktivität basiert auf dem Aktivitätest, die in der Literatur beschrieben sind [49, 52, 106, 107]. Der Reaktions-Ansatz beinhaltete folgende Komponenten: 0,25 mM 4-NPAc bzw. 4-NP-t-FE, 50 µl Probe und 175 µl Citrat-Phosphat-Puffer, pH 6,0. Im Fall des Ferulasäure-Esterase-Assays zeigte sich, dass eine Zugabe von 2,5 % Triton-X eine Verbesserung der Substrat-Löslichkeit nach sich zog [106, 107]. Beide Assays wurden in Mikrotiterplatten durchgeführt.

Mikrotiterplatte:

Puffer: 175 µl, pH 6,0

Probe: 50 µl

Substrat: 25 µl

4-NPAc/4-NP-t-FE-Stammlösung: 2,50 mM

Es wurden jeweils mindestens zwei Ansätze mit nativen Enzymproben und ein Ansatz mit einer denaturierten Enzymprobe (dient als Blindwert) getestet.
Die Reaktion verlief für 30 min bei 40 °C. Unmittelbar danach erfolgte die Quantifizieurng via UV bei einer Wellenlänge von λ = 410 nm (Eon Microplate-Reader, BioTek Instr., USA).

Die nach diesem Test-System ermittelte Aktivität entspricht der Menge an Enzym die 1 µmol 4-Nitrophenol pro Zeiteinheit freisetzt. Zur Berechnung der 4-Nitrophenol bzw. 4-Nitrophenolat-Konzentration diente eine Kalibrierreihe, mit Hilfe derer die Volumen-Aktivität der Enzyme U = µmol / (ml · min) berechnet werden kann.

3.6.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden das Verfahren nach Bradford angewandt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer mit Rinderserumalbumin (BSA) ermittelten Kalibrierkurve.

Je nach Proteingehalt der untersuchten Proben, lag die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Kalibrierkurve in einem Konzentrationsbereich von 0,01 - 0,4 mg/ml respektive 0,1 - 1 mg/ml. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden in einer Kunststoff-Einmalküvette jeweils 100 µl Probe mit 2 ml Farbreagenz versetzt und nach 5 min Inkubationszeit die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mittels polynomischer Regression zweiten Grades.

3.6.3 Immunmodulierung (TNF-alpha)

Hinsichtlich der potentiellen immunmodulatorischen Wirkung von Xylooligosacchariden wurde die Sekretion des Tumornekrosefaktor-α (TNF-alpha) bzw. deren Hemmung durch Xylooligosaccharide untersucht. Die Tests erfolgten im Forschungszentrum Borstel – Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften - nach einer internen SOP.
Grundlage für die Testmethode ist die Stimulation von humanen mononukleären Zellen (MNC) mit Lipopolysacchariden (LPS). Die Isolierung der MNC erfolgte aus dem Vollblut gesunder Spender, welches zur Gerinnungshemmung mit Heparin versetzt ist.
Das Vollblut wurde 1:2 mit Hank´s Pufferlösung verdünnt, mit Ficoll überschichtet und 30 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert (Dichtegradientenzentrifugation).
Anschließend fand ein zweimaliges waschen der abgetrennten MNC mit Hank´s Pufferlösung sowie ein Waschschritt mit RPMI Medium statt.
Für die Stimulationstests wurden die MNC in RPMI Medium resuspendiert (5 x 10^6 Zellen/ml), jeweils 200 µl dieser MNC-Lösung pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte pipettiert (10^6 Zellen/ml) und mit den jeweiligen Stimulanzien (LPS, Probe oder LPS + Probe) versetzt, welche ebenfalls in RPMI Medium gelöst waren. Die anschließende Inkubation der Zellen verlief für 4 h bei 37 °C.
In das Medium sekretiertes TNF-alpha wurden über einen Sandwich ELISA mit anti-TNF-alpha-AK beschichteten Mikrotiterplatte nachgewiesen. Hierzu fand zunächst eine 16-stündige Inkubation der Platten mit dem Medium und einem anti-TNF-alpha-AK-Peroxidase-Konjugat statt. Anschließend wurden die freien AK-Konjugate mittels Waschschritten entfernt, 3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidin (TMB) sowie H_2O_2 zugegeben und der Reaktionsansatz 15 min inkubieren lassen. Nach dem stoppen der TMB-Peroxidase-Reaktion durch Zugabe von 1 M H_2SO_4 erfolgte das Messen der Absorption bei einer Wellenlänge von λ = 450 nm und die Berechnung der TNF-alpha-Konzentration anhand einer Kalibrierreihe.

Die in Tabelle 3.7 aufgelisteten Proben wurden jeweils mit und ohne den Zusatz von 4,3 ng/ml LPS *S. enterica* R60 untersucht. Die Stimulationstests erfolgten als Dreifachbestimmung mit dem Vollblut von drei verschiedenen Spendern.

Tabelle 3.7: Übersicht der untersuchten Proben und den jeweiligen Konzentrationen

Probenbezeichnung	Probe ohne LPS	Probe mit 4,3 ng/ml LPS
Xylan XE RF 1	160 µg/ml	160 µg/ml
Xylan XE RF 2	140 µg/ml	140 µg/ml
LH-20 Fraktion 13	40 µg/ml	40 µg/ml
LH-20 Fraktion 14	40 µg/ml	40 µg/ml
LH-20 Fraktion 15	40 µg/ml	40 µg/ml
LH-20 F 14 ICS Peak 13	40 µg/ml	40 µg/ml
LH-20 F 14 ICS Peak 13B	20 µg/ml	20 µg/ml
LH-20 F 15 ICS Peak 5	40 µg/ml	40 µg/ml

3.6.4 Xylooligosaccharid-Effekte auf Wachstum und Biofilmbildung von *Staphylococcus epidermidis* 1457

Die Untersuchungen zur Wirkung von Xylooligosacchariden auf das Wachstum sowie die Biofilmbildung von *Staphylococcus epidermidis* 1457 erfolgte am CIB (Lübeck).
Es handelt sich hierbei um ein gram-positives pathogenes Bakterium der Familie der *Staphylococcacea*, welches in der Lage ist sich an Kunststoffoberflächen anzuheften und einen Biofilm auszubilden [108, 109].
Als Negativkontrolle wurde die Biofilm-und PNAG-negative, isogene Mutante *Staphylococcus epidermidis* 1457 M10 verwendet. Alle Versuchsreihen wurden in dialysiertem TSB Medium (Tryptic Soy Broth; BD™) bei pH 6,8 und 37 °C durchgeführt.

Herstellerangaben zum TSB-Medium:

- 17,0 g/l pankreatisch abgebautes Casein
- 3,0 g/l papainisch abgebautes Soja
- 2,5 g/l Dextrose
- 5,0 g/l NaCl
- 2,5 g/l K_2HPO_4

Zur Vorbereitung der Versuchsreihen wurden die Zellen frisch aus einer Kryokultur entnommen und in einer Übernachtkultur angezogen. Im Anschluss erfolgte eine 2-stündige Vorkultur.
Daraufhin wurden die Zellen in eine Mikrotiterplatte überführt und für 24 h unter leichtem Schütteln inkubiert (Synergy HT Reader).
Zur Bestimmung des Zellwachstums fand alle 10 min eine OD-Messung bei einer Wellenlänge von 600 nm statt.
Nach 24 h wurde der Zellüberstand abpipettiert, der an der Mikrotiterplatte haftende Biofilm mit Kristallviolett angefärbt und nach einem Waschschritt mit PBS die Absorption bei einer Wellenlänge von 495 nm gemessen.
Die Ansätze zur Untersuchung der Xylooligosaccharid-Wirkung verliefen unter Zusatz der LH-20 Fraktionen 14 und 15 in den Konzentrationen 8,75 µg/ml, 17,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml.

Das folgende Fließdiagramm in Abbildung 3.1 gibt einen Überblick der experimentellen Arbeiten und Strategie dieser Promotionsarbeit.

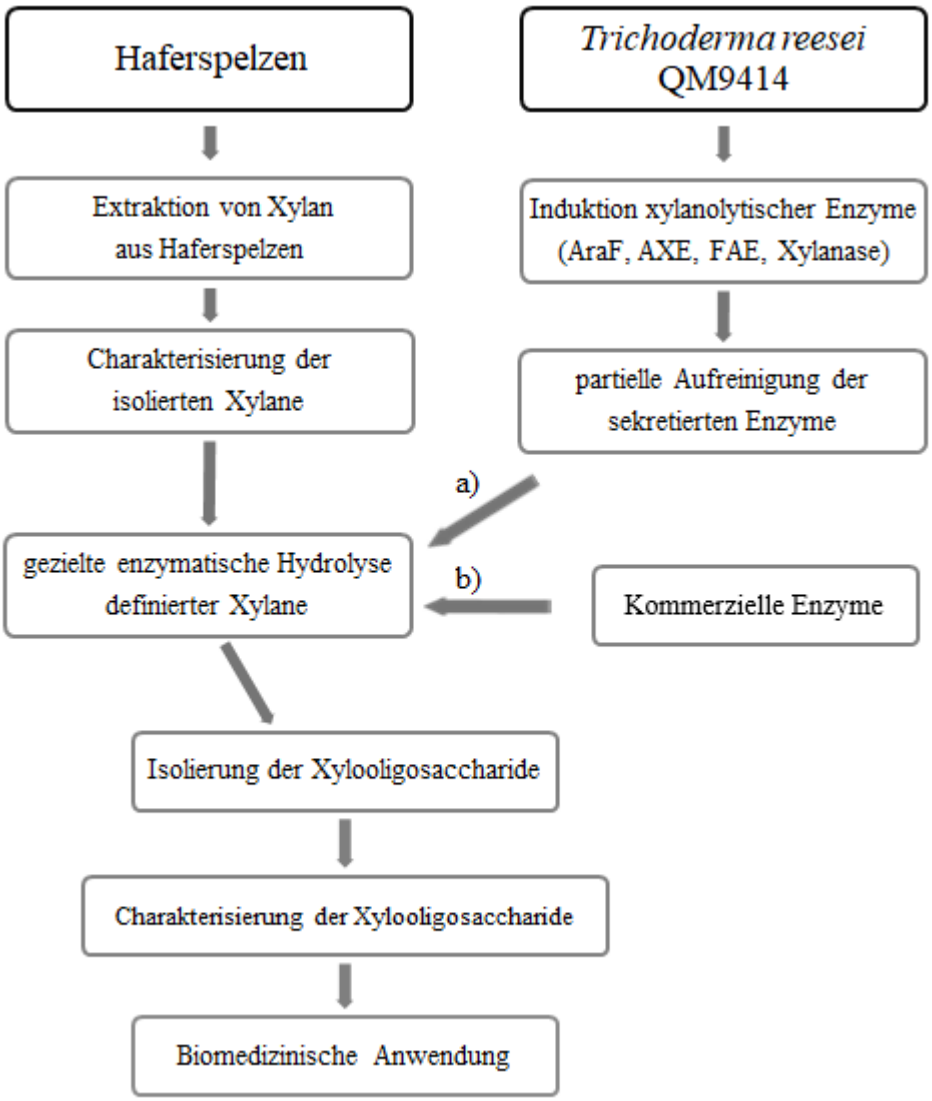


Abbildung 3.1: Strategie der experimentellen Arbeit

Ein Aspekt dieser Arbeit war die Gewinnung xylanolytischer Enzyme aus dem Pilz *Trichoderma reesei* QM9414 für die gezielte spezifische Hydrolyse von Xylan. Hierzu zählten α-L-Arabinofuranosidasen, Xylanasen, Acetyl-Xylan-Esterasen sowie Ferulasäure-Esterasen, welche zu Beginn der experimentellen Arbeit nicht kommerziell in Reinform zur Verfügung standen (Variante a) im Fließdiagramm).

Da jedoch kommerzielle Enzympräparationen auf den Markt kamen, die eine hohe Reinheit (keine Kontamination mit anderen hydrolytischen Enzymen) sowie hohe spezifische Aktivitäten zeigten, war eine Aufarbeitung der Enzyme aus *T. reesei* QM9414 nicht mehr notwendig.

Die enzymatische Hydrolyse der Xylane erfolgte unter Verwendung einer kommerziellen endo-1,4-β-Xylanase mit einer Aktivität von ≥2500 U/g (Variante b) im Fließdiagramm).

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit waren Isolierung und Charakterisierung von Haferspelzen-Xylan sowie Herstellung, Charakterisierung und Anwendung von Xylooligosacchariden.
Oligosaccharide sind heute bei der Suche nach therapeutischen Hemmstoffen ein wichtiger Bestandteil von Forschung und Entwicklung. Insbesondere bei Infektionskrankheiten stellt die zunehmende Antibiotikaresistenz von Bakterien ein globales klinisches Problem dar.
Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist die Anreicherung der Enzyme α-L-Arabinofuranosidase, Acetyl-Xylan-Esterase und Ferulasäure-Esterase aus dem Pilz *Trichoderma reesei* QM9414. Diese Enzyme sollen der Gewinnung und Modifizierung von Xylooligosacchariden dienen und standen zu Beginn der Untersuchungen nicht kommerziell zur Verfügung.

Zur Charakterisierung der Xylane erfolgte die Bestimmung der Monosaccharid-Zusammensetzung und des Ligninanteils. Zudem wurden der Ferulasäureanteil sowie der Acetylierungsgrad analysiert. Ferner fanden begleitende Untersuchungen mittels FT-IR Spektroskopie statt, da anhand der spezifischen Transmissionsbanden bestimmte Molekülgruppen nachgewiesen werden können. Darüber hinaus erfolgten Bestimmung der Molmassen isolierter Xylan-Proben mit unterschiedlichen SEC-Methoden.

Im Hinblick auf die Untersuchung von Xylooligosacchariden aus Haferspelzen wurden sowohl die in den isolierten Xylanen enthaltenen Xylooligosaccharide getrennt als auch Xylane enzymatisch zu Oligomeren hydrolysiert. Die enzymatische Hydrolyse erfolgte unter Verwendung einer kommerziellen endo-1,4-β-Xylanase (EC 3.2.1.8) mit einer Aktivität von $\geq$2500 U/g. Mittels gezielter Hydrolyse und Separation (SEC, AEC) wurden Xylooligosaccharid-Fraktionen mit definiertem Polymerisationsgrad hergestellt. Die Charakterisierung der Struktur mittels NMR und MS sollte Aufschluss bezüglich möglichen Substituenten (Arabinose, Ferulasäure) geben.
Hinsichtlich der möglichen Anwendung von Xylooligosacchariden wurden Stimmulationstests (TNF-α) an MNCs untersucht. Grundlage waren Ergebnisse in der Literatur bezüglich der Bioaktivität und immunmodulatorischen Wirkungen, die jedoch mit Xylooligosaccharid-Gemischen erzielt wurden.
Ferner wurde die Wirkung von Xylooligosacchariden auf das Wachstum und die Biofilmbildung von pathogenen *Staphylococcus epidermidis* 1457 untersucht. Es wird beschrieben, dass (Xylo)-Oligosaccharide die Adhäsion von Bakterien potentiell inhibieren ohne diese zu töten und die Ausbildung von Stressfaktoren und Resistenzen zu forcieren. Auch ist die Hemmung der Biofilmsynthese, welche den Mikroorganismen als Schutzbarriere vor Antibiotika oder einer Immunabwehr dient, dokumentiert [13].

4.1 Enzym-Expression aus *Trichoderma reesei* QM9414

Ziel der Kultivierungsexperimente von *T. reesei* QM9414 war es, einen geeigneten Induktor zur Expression und Sekretion von α-L-Arabinofuranosidase, Acetyl-Xylan- und Ferulasäure-Esterase zu finden. Die Entwicklung der Xylanase-Sekretion wurde ebenfalls verfolgt.
Als mögliche Induktoren wurden Haferspelzen-Xylan, Rapsmehl, gemahlener Wiesenschwingel (WS) und Wiesenschwingelsaatgut (WSS) untersucht. Glukose diente aufgrund der nicht induzierenden Wirkung auf die Expression xylanolytischer Enzyme als Referenz [91, 92].

Die Entwicklung der Enzym-Sekretion wurde nach 48, 72, 124, 144, 168, 216 und 240 Stunden durch Bestimmung der Enzym-Aktivität sowie der Proteinkonzentration aus dem Überstand verfolgt. Hierzu erfolgte eine direkte Probenahme aus den einzelnen Schüttelkolben.
Die ermittelten Aktivitäten und Proteinkonzentrationen der vier Enzyme sind in den folgenden Diagrammen in Abhängigkeit von der Fermentationsdauer dargestellt.

Expression und Sekretion von α-L-Arabinofuranosidase

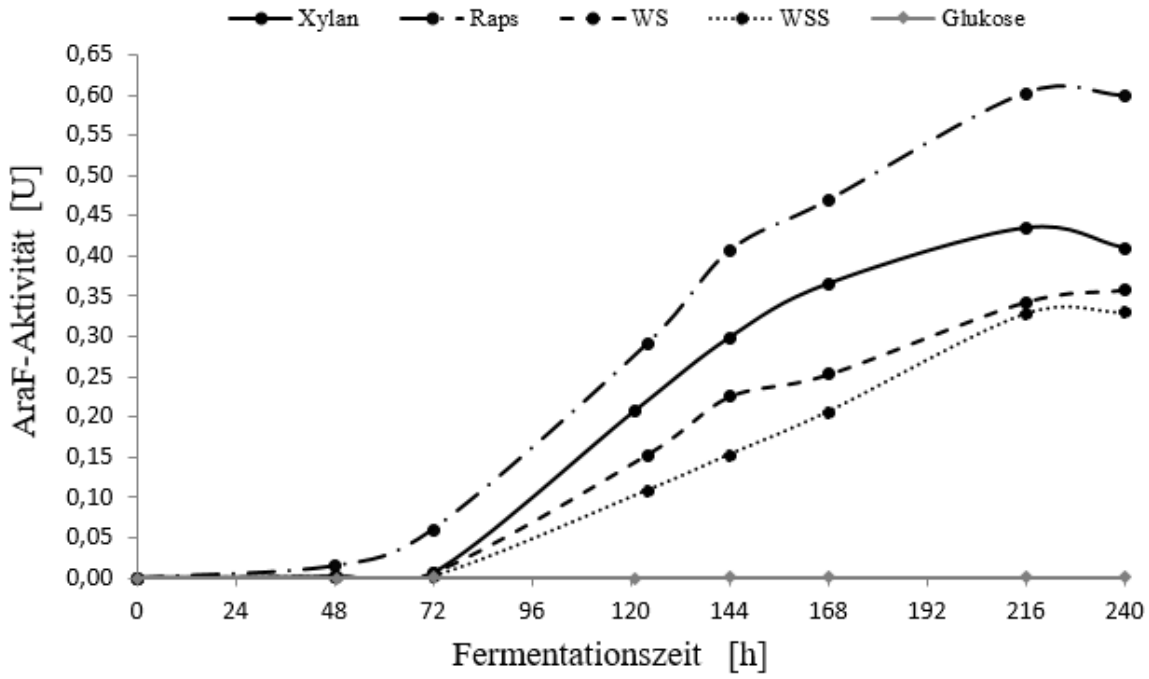


Abbildung 4.1: Entwicklung der AraF-Aktivität aus *T. reesei* im Verlauf der Fermentation mit fünf Substraten zur Enzym-Induktion

Wie aus Abbildung 4.1 zu entnehmen ist, steigt die Aktivität der α-L-Arabinofuranosidase bei dem Glukose-Ansatz kaum an. Es wird maximal ein Wert von 0,0013 U erreicht.
Im Fall der Rapsmehl-Fermentation ist zwischen 72 und 216 Stunden ein signifikanter Anstieg der Aktivität auf 0,60 U zu erkennen. Danach flacht die Zunahme deutlich ab und die Aktivität stagniert bei einem Maximal-Wert von ca. 0,60 U.

Der Xylan-Ansatz weist einen deutlich geringeren Anstieg der Aktivität von 0,36 U nach 168 Stunden und einen Maximalwert von 0,43 U nach 216 Stunden auf. Ab einer Fermentationsdauer von 216 - 240 Stunden zeichnet sich schließlich eine Reduktion der Aktivität ab.
Die Fermentationen mit gemahlenem Wiesenschwingel und Wiesenschwingelsaatgut zeigen im Vergleich zu Rapsmehl binnen der ersten 144 Stunden einen um den Faktor 1,8 bzw. 2,6 geringeren Anstieg der Aktivität auf 0,23 U respektive 0,15 U auf. Nach 216 Stunden erreichen beide Ansätze eine maximale Aktivität von etwa 0,32 U.

Expression und Sekretion von Acetyl-Xylan-Esterase

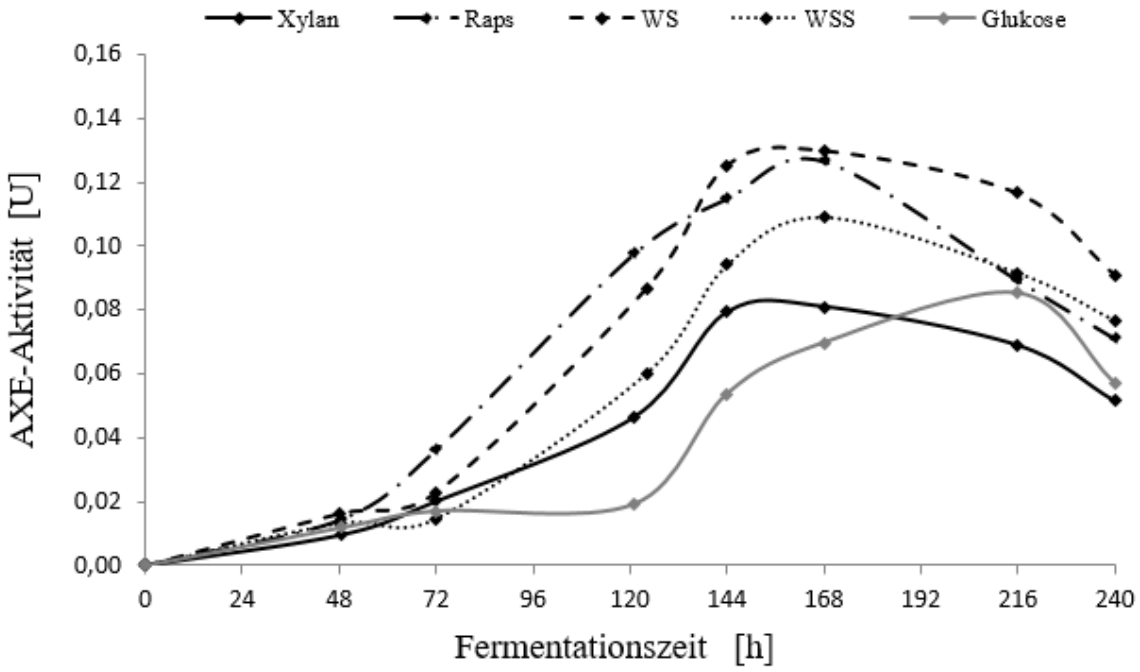


Abbildung 4.2: Entwicklung der AXE-Aktivität aus *T. reesei* im Verlauf der Fermentation mit fünf Substraten zur Enzym-Induktion

Es zeigt sich, dass die Ansätze mit Rapsmehl und gemahlenen Wiesenschwingel mit 0,13 U nach 168 Stunden den stärksten Anstiege der AXE-Aktivität aufweisen (Abb. 4.2). Im weiteren Verlauf sinkt die Aktivität auf einen Wert von 0,07 U respektive 0,09 U ab.
Im Fall der Xylan-Induktion ist in den ersten 144 Stunden ein Anstieg der Aktivität auf 0,08 U zu erkennen. Anschließend stagniert die Aktivität zunächst und fällt ab einer Fermentationsdauer von über 168 Stunden auf etwa 0,06 U ab.
Die WSS-Induktion weist anfangs einen ähnlichen Anstieg der Aktivität auf wie der Xylan-Ansatz, erreicht jedoch, mit 0,10 U nach 168 Stunden, ein deutlich höheres Maximum. Nach über 168 Stunden sinkt die Aktivität auf einen Wert von 0,07 U.
Bei der Fermentation mit Glukose zeichnet sich nach 120 Stunden eine Zunahme der Aktivität ab, welche nach 216 Stunden ihr Maximum mit 0,08 U erreicht und anschließend auf 0,06 U abfällt. Die Sekretion der Acetyl-Xylan-Esterase kann prinzipiell bei allen Induktionsstoffen nachgewiesen werden.

Expression und Sekretion von Ferulasäure-Esterase

Der Verlauf der ermittelten Ferulasäure-Esterase-Aktivität in Abhängigkeit von der Fermentationsdauer zeigt, dass die Aktivität der Ferulasäure-Esterase ebenfalls bei allen fünf Induktoren ansteigt (Abb. 4.3).

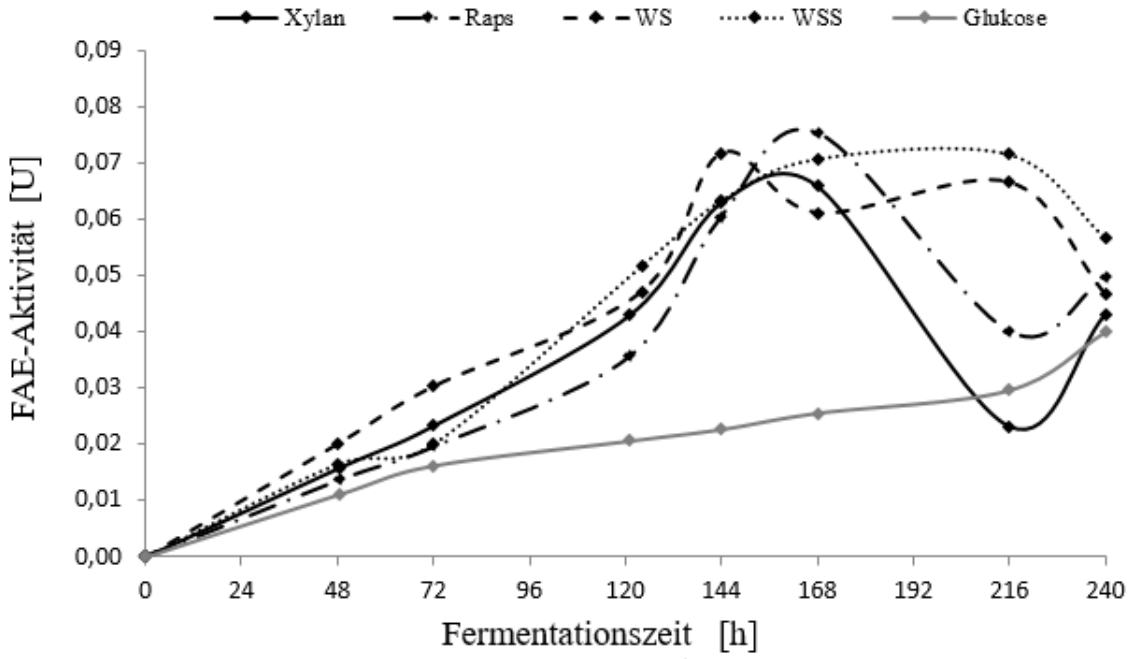


Abbildung 4.3: Entwicklung der FAE-Aktivität aus *T. reesei* im Verlauf der Fermentation mit fünf Substraten zur Enzym-Induktion

Im Fall der Glukose-Fermentation steigt die Aktivität stetig an und erreicht nach 240 Stunden etwa 0,04 U. Bei den übrigen Ansätzen zeichnet sich ein deutlich stärkerer Anstieg der Aktivität ab. So ergibt sich nach 144 - 168 Stunden im Schnitt eine Aktivität von 0,07 U.
Es fällt auf, dass die Aktivität bei Xylan und Rapsmehl als Induktor nach 216 Stunden zunächst sehr stark abfällt (auf 0,023 U respektive 0,040 U), um anschließend wieder auf etwa 0,043 U bzw. 0,046 U anzusteigen.
Die Ansätze mit gemahlenen Wiesenschwingel und -saatgut weisen nach 216 Stunden noch eine Aktivität von 0,067 U und 0,071 U auf. Diese sinkt zum Ende der Fermentation auf 0,047 U repektive 0,057 U.

Expression und Sekretion von Xylanasen

Um zu überprüfen, ob die verwendeten Induktoren auch die Sekretion von Xylanasen induzieren, wurde die zeitliche Entwicklung der Xylanase-Aktivität ebenfalls untersucht (siehe Abbildung 4.4).

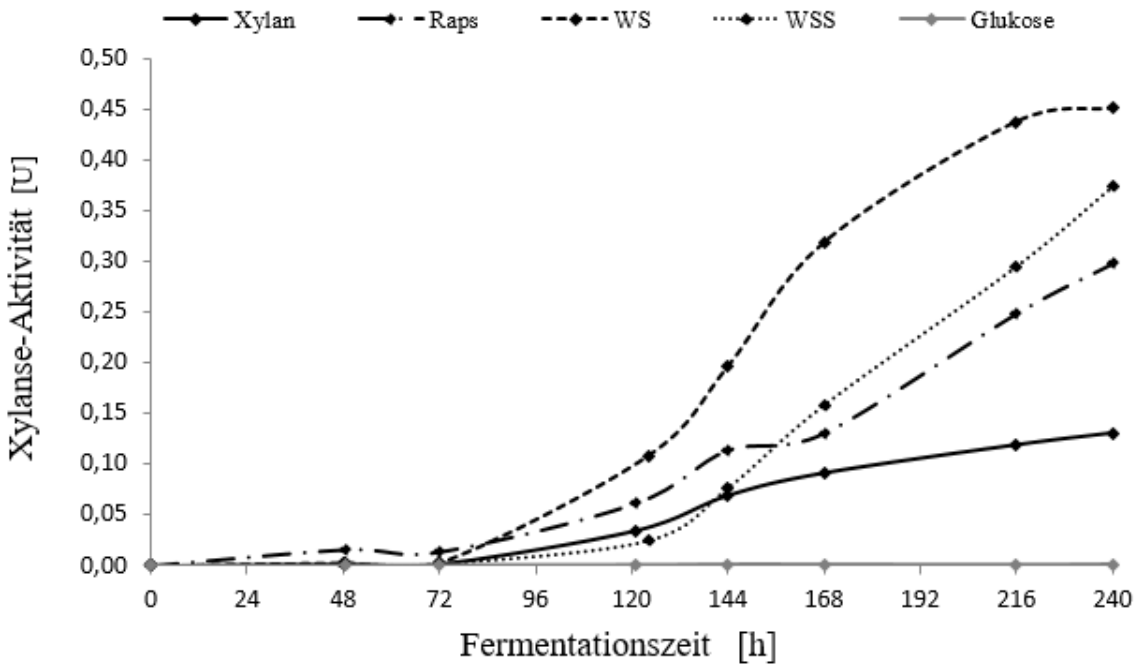


Abbildung 4.4: Entwicklung der Xylanase-Aktivität aus *T. reesei* im Verlauf der Fermentation mit fünf Substraten zur Enzym-Induktion

Es zeigt sich, dass die Aktivität der Xylanase bei dem Glukose-Ansatz kaum ansteigt (Maximalwert: < 0,0015 U).

Die Fermentationen mit Rapsmehl und gemahlenem Wiesenschwingelsaatgut weisen nach 120 Stunden einen deutlichen Aktivitäts-Anstieg auf, welche bis zum Ende der Fermentation anhält. Es wird eine maximale Aktivität von 0,30 U respektive 0,37 U erreicht.

Im Fall von gemahlenem Wiesenschwingel ist zwischen 120 und 216 Stunden ein signifikanter Anstieg der Aktivität auf 0,44 U zu erkennen. Danach flacht die Zunahme ab und die Xylanse-Aktivität stagniert bei einem Maximal-Wert von ca. 0,45 U.

Im Vergleich zu den Fermentationen mit Rapsmehl und Wiesenschwingel weist der Xylan-Ansatz mit 0,13 U nach 240 Stunden aber einen deutlich geringeren Anstieg der Aktivität auf.

Zeitlicher Verlauf der Proteinkonzentration

Die zeitlichen Verläufe der Proteinkonzentration nach Bradford sind in Abbildung 4.5 in Abhängigkeit von der Fermentationsdauer dargestellt.

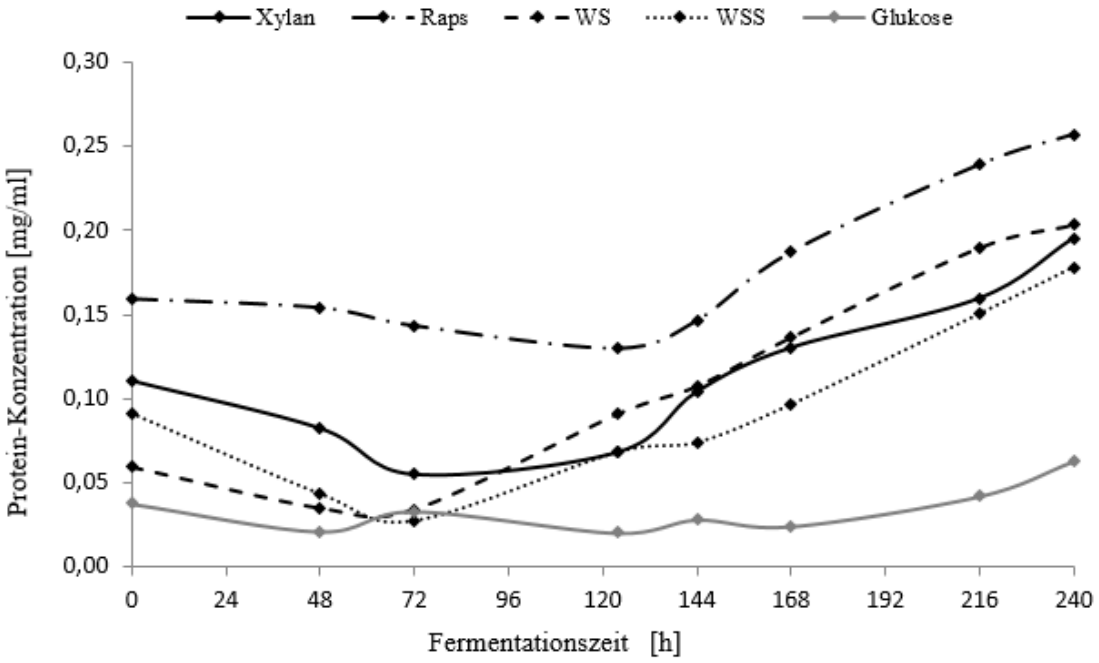


Abbildung 4.5: Entwicklung der Proteinkonzentration im Verlauf der Fermentation von *T. reesei*

Die Fermentation mit Glukose lässt nach einer anfänglichen Abnahme zunächst nur einen leichten Anstieg der Proteinkonzentration erkennen. Nach einer Fermentationsdauer von 240 Stunden wird eine Proteinkonzentration von maximal 0,063 mg/ml erreicht.
Der Xylan-Ansatz zeigt nach 72 Stunden einen Abfall der Proteinkonzentration von 0,111 mg/ml auf 0,055 mg/ml. Anschließend nimmt die Proteinkonzentration deutlich zu und weist mit 0,195 mg/ml einen fast dreifach so hohen Endproteingehalt auf als der Glukose- Ansatz.
Im Fall der Rapsmehl-Fermentation zeichnet sich in den ersten Stunden ein leichter Abfall der Proteinkonzentration ab. Nach über 120 Stunden steigt die Proteinkonzentration auf einen Maximalwert von 0,257 mg/ml an.
Bei den Ansätze mit gemahlenen Wiesenschwingel und -saatgut ist innerhalb der ersten 72 Stunden ebenfalls eine Abnahme der Proteinkonzentration zu erkennen. Im weiteren Verlauf steigt diese auf ein Endproteingehalt von 0,203 mg/ml respektive 0,178 mg/ml an.

Nach Abschluss der Fermentationen wurde der Kulturüberstand wie in Kapitel 3.2.4 auf Seite 25 beschrieben aufgearbeitet und die ausgefällten Proteine bei -20 °C gelagert.
Eine weitere Aufarbeitung der ausgefällten Proteine fand im Rahmen dieser Arbeit nicht statt, da kommerzielle Enzympräparationen auf den Markt kamen. Diese zeigten eine hohe Reinheit (keine Kontamination mit anderen Enzymen) sowie hohe spezifische Aktivitäten.
Die enzymatische Hydrolyse der Xylane erfolgte daher unter Verwendung einer kommerziellen endo-1,4-β-Xylanase mit einer hohen Aktivität (≥2500 U/g).

4.2 Isolierung & Charakterisierung von Haferspelzen-Xylan

Zur Extraktion des Haferspelzen-Xylans erfolgten sowohl wässrige neutral als auch alkalische Extraktionen bei 121 °C im Autoklav (AK) sowie bei 90 °C am Rückfluss (RF). Darüber hinaus wurden einige Proben einer enzymatischen (LiP/MnP) bzw. H_2O_2-Behandlung unterzogen. In Abbildung 4.6 sind beispielhaft einige ausgewählte Xylan-Proben dargestellt.

(a) Xylan XE RF 2 (b) Xylan XBl (c) Xylan LiP (d) Xylan XE AK 31

Abbildung 4.6: Darstellung ausgewählter Xylan-Proben: (a) XE RF 2: alkalische Extraktion am Rückfluss, (b) XBl: XE RF 2 nach H_2O_2-Behandlung, (c) XLMP: XE RF 2 nach LiP/MnP-Behandlung, (d) XE AK 31: alkalische Extraktion im Autoklav

Es ist klar zu erkennen, dass die Xylan-Proben mit H_2O_2-Nachbehandlung (XBl) respektive enzymatischer Nachbehandlung mit LiP/MnP (XLMP) eine deutlich hellere Färbung aufweisen als das alkalisch extrahierte Ausgangs-Xylan XE RF 2. Gleiches gilt für die mit 5 % (w/v) NaOH und 5 % (w/v) H_2O_2 extrahierten „XE RF 9/10“. Die mit Reinstwasser extrahierten Xylan-Proben „XE AK 29-36“ und „XE RF 11A/B“ sind geringfügig heller als die alkalisch extrahierten Proben „XE RF 1-6“ und besitzen eine weichere Textur.

Im Zuge der verschiedenen Extraktionen zeigte sich, dass die Ausbeuten an Produkt variieren. So weisen die alkalisch am Rückfluss extrahierten Proben mit Abstand die höchsten Ausbeuten auf, wobei der Zusatz von H_2O_2 (RF 9/10) die Ausbeuten um etwa 15 % geringer ausfallen lässt. Die Wahl des Fällungsmittels (RF 3A-4B) bewirkt keinen signifikanten Unterschied, während der Zeitpunkt der pH-Einstellung einen erheblichen Einfluss nach sich zieht (RF 5A-6B). Wurde der pH-Wert bereits vor der Zentrifugation auf 5,5 eingestellt, ergeben sich nunmehr 22-27 % statt >40 % Ausbeute.
Den stärksten Einfluss auf die Ausbeute haben sowohl die Wahl des Extraktionsmittels als auch die Wahl der Methode. Beispielsweise ergeben sich bei der Extraktion mit Reinstwasser lediglich Ausbeuten von 3,4 ± 0,4 % (AK 33-36) respektive 5,1 ± 0,3 % (RF 11A/B). Im Fall der alkalisch im Autoklav extrahierten Proben ist die Ausbeute mit 5,6 ± 0,3 % (AK 29-31 A) bis 6,4 ± 0,6 % (AK 29-31 B) ebenfalls um ein Vielfaches geringer als bei den alkalisch am Rückfluss extrahierten Xylan-Proben (RF 1-6).

Tabelle 4.1: Ausbeuten der Xylanextraktionen am Rückfluss (RF) oder Autoklav (AK) bezogen auf die Haferspelzen-Einwaage

Probe	Extraktion	Variation	Ausbeute
XE RF 1		pH 6,0 / EtOH-Fällung	49,2 ± 1,6 %
XE RF 2		pH 5,5 / EtOH-Fällung	46,0 ± 1,5 %
XE RF 3A	5,4 % (w/v) Haferspelzen	pH 5,5 / EtOH-Fällung	44,0 ± 1,5 %
XE RF 3B	5 % (w/v) NaOH	pH 5,5 / IPA-Fällung	45,5 ± 1,5 %
XE RF 4A		pH 4,5 / EtOH-Fällung	42,1 ± 1,6 %
XE RF 4B		pH 4,5 / IPA-Fällung	44,5 ± 1,6 %
XE RF 5A		pH 5,5 vor Zentrif.	22,3 ± 2,2 %
XE RF 5B	5,4 % (w/v) Haferspelzen	pH 5,5 nach Zentrif.	40,6 ± 1,9 %
XE RF 6A	5 % (w/v) NaOH	pH 5,5 vor Zentrif.	27,9 ± 2,3 %
XE RF 6B		pH 5,5 keine Zentrif.	43,7 ± 2,0 %
XE RF 9 XE RF 10	5,4 % (w/v) Haferspelzen 5 % (w/v) NaOH / H_2O_2	pH 5,5	38,1 ± 0,8 %
XE RF 11A XE RF 11B	5,4 % (w/v) Haferspelzen Reinstwasser	pH 5,5	5,1 ± 0,3 %
XE AK 29-31 A	5 % Spelzen (w/w)	pH 5,5	5,6 ± 0,3 %
XE AK 29-31 B	0,4 % (w/v) NaOH	pH 6,5	6,4 ± 0,6 %
XE AK 33-36	5 % Spelzen (w/w) Reinstwasser	pH 5,5	3,4 ± 0,4 %

4.2.1 Chemische Zusammensetzung der Xylan-Proben

Zur ersten Charakterisierung der Xylan-Proben erfolgte die Untersuchung des Ligninanteils und der Monosaccharid-Zusammensetzung. Es fiel auf, dass die isolierten Proben Glukose enthielten, was auf eine Kontamination mit Cellulose deutet.

Wie aus Tabelle 4.2 zu entnehmen ist, weisen die im Autoklav, mit Reinstwasser extrahierten Proben „XE AK 33-36“ mit etwa 22-24 % einen deutlich höheren Ligninanteil auf als die alkalisch extrahierten Proben „XE AK 29-31“. Diese enthalten im Schnitt 14-17 % Lignin.

Weiterhin fällt auf, dass die Xylan-Proben „XE AK 33-36„ einen nahezu doppelt so hohen Glukoseanteil besitzen. Die Anteile an Xylose, Galaktose und insbesondere Arabinose sind hingegen deutlich geringer als bei den Proben „XE AK 29-31“.

Bei den Xylan-Proben „XE RF“ ergibt sich ein ähnliches Bild (siehe Tabelle 4.3). So liegt der Ligninanteil der mit Reinstwasser extrahierten Proben „XE RF 11A/B„ bei 24,40 % respektive 22,70 %, während die alkalisch extrahierten Proben „XE RF 1-6B“ im Schnitt etwa 10 % Lignin aufweisen. Durch die Vorbehandlung mit H_2O_2 („XE RF 9/10“) ergeben sich noch etwas geringere Ligninanteile von etwa 7 %.

Der Glukoseanteil der Proben „XE RF 11A/B“ ist mit 35 % um ein Vielfaches höher als der Glukoseanteil alkalisch extrahierter Xylan-Proben (3-7 %). Dafür ist jedoch der Anteil an Xylose (34 %) um den Faktor 1,2-1,8 geringer im Vergleich zu den Proben „XE RF 1-6B“.

Tabelle 4.2: Monosaccharid-Zusammensetzung und Ligninanteil der bei 121 °C im Autoklav extrahierten Xylan-Proben „XE AK“

Probe	**Xylose**	**Arabinose**	**Glukose**	**Galaktose**	**Lignin**
	% (w/w) bezogen auf Einwaage				
XE AK 29 A	36,99	9,89	17,63	3,98	14,16
XE AK 29 B	34,86	9,45	15,55	4,02	15,99
XE AK 30 A	38,47	10,44	18,16	4,24	15,61
XE AK 30 B	37,31	8,71	14,55	3,64	16,97
XE AK 31 A	41,27	11,06	13,39	4,49	15,88
XE AK 31 B	42,45	11,33	13,79	4,69	15,10
XE AK 33	32,15	3,23	31,30	1,90	24,50
XE AK 34	33,07	3,14	33,27	2,03	21,96
XE AK 35	32,85	3,18	33,50	2,00	23,16
XE AK 36	33,11	2,99	34,56	1,80	21,37

Tabelle 4.3: Monosaccharid-Zusammensetzung und Ligninanteil der bei 90 °C am Rückfluss extrahierten Xylan-Proben „XE RF“

Probe	**Xylose**	**Arabinose**	**Glukose**	**Galaktose**	**Lignin**
	% (w/w) bezogen auf Einwaage				
XE RF 1	57,06	9,28	5,88	3,15	9,95
XE RF 2	56,63	9,19	5,32	3,16	10,35
XE RF 3A	61,15	9,89	6,13	3,33	11,15
XE RF 3B	60,20	9,82	6,05	3,34	11,55
XE RF 4A	55,99	11,80	6,97	3,85	9,41
XE RF 4B	44,29	7,13	4,00	2,32	9,58
XE RF 5A	44,44	8,10	2,99	4,13	8,78
XE RF 5B	41,27	7,40	4,39	3,26	9,35
XE RF 6A	48,71	8,24	2,96	4,02	11,03
XE RF 6B	46,03	8,22	3,86	3,59	10,27
XE RF 9	45,31	8,58	11,17	4,35	6,93
XE RF 10A	43,56	8,58	10,20	4,42	7,10
XE RF 10B	42,40	8,15	9,38	4,41	7,39
XE RF 11 A	34,39	4,33	35,32	1,76	24,40
XE RF 11 B	33,47	4,16	34,98	1,93	22,70

Neben der Vorbehandlung mit H_2O_2 wurden sowohl eine H_2O_2-Nachbehandlung (XBl) als auch eine enzymatischer Nachbehandlung mit LiP/MnP (XLMP) an der Xylan-Probe „XE RF 2“ erprobt. Tabelle 4.4 gibt einen Überblick über die Resultate.

Tabelle 4.4: Monosaccharid-Zusammensetzung und Ligninanteil der „XE RF 2“ Variationen

Probe	**Xylose**	**Arabinose**	**Glukose**	**Galaktose**	**Lignin**
	% (w/w) bezogen auf Einwaage				
XE RF 2	56,63	9,19	5,32	3,16	11,35
XBl^{+}	57,03	9,89	6,13	3,33	6,39
XLMP^{++}	55,70	9,82	6,05	3,34	6,41

$^{+}$ Wiederholung der H_2O_2-Nachbehandlung (XBl) n=2
$^{++}$ Wiederholung der LiP/MnP-Behandlung (XLMP) n=4

Es zeigt sich, dass beide Methoden eine Verringerung des Ligninanteils nach sich ziehen. So weisen die Proben XBl und XLMP etwa 44 % weniger Lignin auf als das Ausgangs-Xylan „XE RF 2“. Eine Veränderung der Monosaccharid-Zusammensetzung ist nicht ersichtlich, lediglich der Anteil an Glukose hat sich von 5,32 % auf 6,13 % respektive 6,05 % erhöht.

Prozentuale Monosaccharid-Zusammensetzung der Xylan-Proben

Abbildung 4.7 und 4.8 geben einen detaillierten Überblick der prozentualen Monosaccharid-Zusammensetzung diverser Xylan-Proben bezogen auf den Gesamtkohlenhydratgehalt.

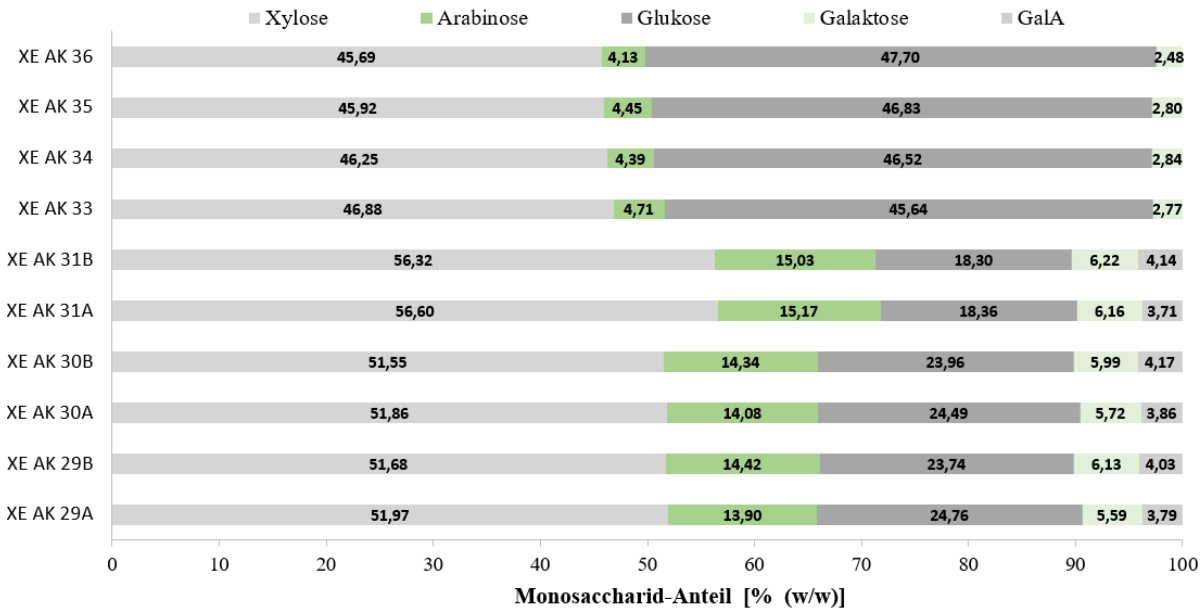


Abbildung 4.7: Prozentuale Monosaccharid-Zusammensetzung der bei 121 °C im Autoklav extrahierten Xylan-Proben „XE AK“ bezogen auf den Gesamtkohlenhydratgehalt; „XE AK 29-31“: alkalisch extrahiert; „XE AK 33-36“: mit Reinstwasser extrahiert

Sowohl die Proben „XE AK“ als auch die Proben „XE RF“ bestehen zu einem sehr hohen Anteil aus Xylose, während die Anteile an Arabinose und Galaktose im Schnitt deutlich geringer ausfallen. Der Glukoseanteil hingegen schwankt je nach Extraktionsmittel- und bedingung. Während der Anteil der alkalisch bei 121 °C extrahierten Proben „AK 29-31“ bei 18-24 % liegt, weisen die Proben „RF 1-6“ etwa 5-10 % auf. Bei den alkalisch mit H_2O_2 extrahierten Proben „RF 9/10“ beträgt der Glukoseanteil etwa 15 %. In den mit Reinstwasser extrahierten Xylan-Proben hingegen liegen der Anteil an Glukose (46 %) und Xylose (45 %) nah beieinander.

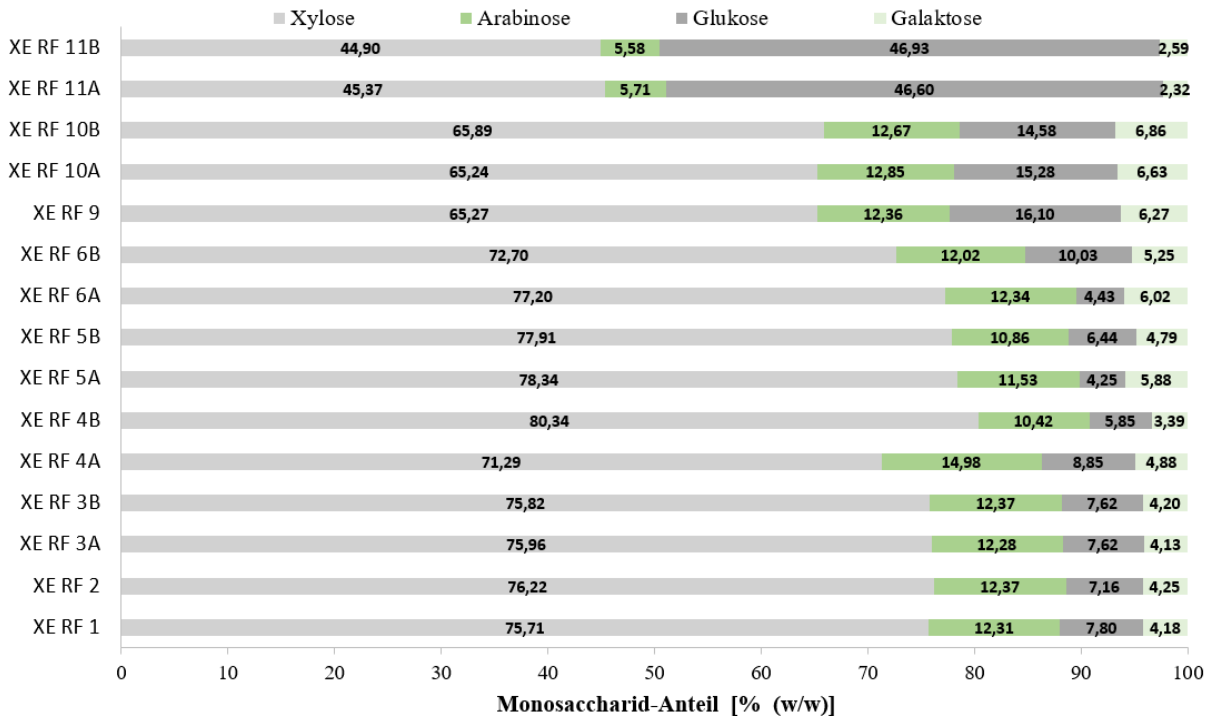


Abbildung 4.8: Prozentuale Monosaccharid-Zusammensetzung der bei 90 °C am Rückfluss extrahierten Xylan-Proben „XE RF“ bezogen auf den Gesamtkohlenhydratgehalt; „XE RF 1-6B“: alkalisch extrahiert; „XE RF 9/10“: alkalisch mit mit H_2O_2 extrahiert; „XE RF 11A/B“: mit Reinstwasser extrahiert

Acetylierungsgrad der Xylan-Proben

Neben Monosaccharid-Zusammensetzung und Ligninanteil wurden die Xylan-Proben u.a. hinsichtlich des Acetylierungsgrades untersucht. Auf Grund der geringen Löslichkeit der Probe in Reinstwasser erfolgte die Bestimmung des Acetylierungsgrades immer aus gut durchmischten Suspensionen. Ferner fanden Versuchsreihen statt, bei denen die Xylan-Proben in 0,5 M NaOH suspendiert wurden, da die Löslichkeit dadurch erhöht werden konnte.

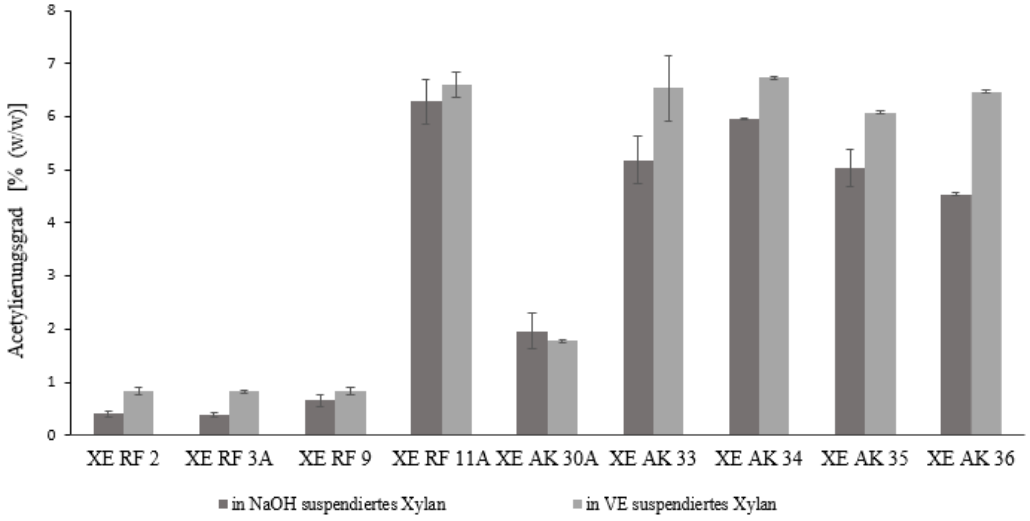


Abbildung 4.9: Acetylierungsgrad diverser Xylan-Proben bezogen auf die Gesamtmasse; grau: Proben gelöst in 0,5 M NaOH, hell grau: Proben gelöst in Reinstwasser (VE); n=2

In Abbildung 4.9 ist vergleichsweise der Acetylierungsgrad von in 0,5 M NaOH bzw. Reinstwasser suspendierten Proben dargestellt. Wie sich zeigt, ist der Acetylierungsgrad der alkalisch extrahierten Xylan-Proben (RF 2/3A/9, AK 30A) um Faktor 10-11 geringer ist als der mit Reinstwasser extrahierten Xylan-Proben (RF 11A, AK 33-36). Dabei fällt auf, dass die Probe „AK 30A“ einen deutlich höheren Acetylierungsgrad aufweist als die Proben „RF 2/3A/9“.
Beim Vergleich der unterschiedlich suspendierten Proben ergibt sich für die in 0,5 M NaOH suspendierten Proben im Schnitt ein geringerer Acetylierungsgrad. Eine alkalische Behandlung führt demnach zur Abspaltung der Acetylgruppen.

Um zu ermitteln wie hoch der Acetylierungsgrad der vorliegenden Xylan-Proben (ohne Abspaltung) ist, wurden für weitere Messungen in Reinstwasser suspendierte Proben verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.10 dargestellt und decken sich mit den vorigen Daten.
Der Acetylierungsgrad der alkalisch extrahierten Xylan-Proben (RF 2/3A/9, AK 30A) ist deutlich geringer ist als der Acetylierungsgrad der mit Reinstwasser extrahierten Xylan-Proben (RF 11A, AK 33-36). Dabei scheint die Vorbehandlung mit H_2O_2 (RF 9) keinen signifikanten Einfluss auf den Acteylierungsgrad zu haben. So weisen sowohl die Probe RF 9 als auch die rein alkalisch extrahierten Xylan-Proben RF2/3A einen Acteylierungsgrad von etwa 0,84 ± 0,01 % auf.

Hinsichtlich der enzymatisch nachbehandelten Proben XLMP ergeben sich unterschiedliche Tendenzen. So weisen die Ansätze A/B mit 1,43 ± 0,14 % einen höheren Acteylierungsgrad auf als das Ausgangs-Xylan RF 2 (0,84 ± 0,01 %), die Ansätze C/D mit 0,58 ± 0,14 % hingegen einen etwas geringeren.

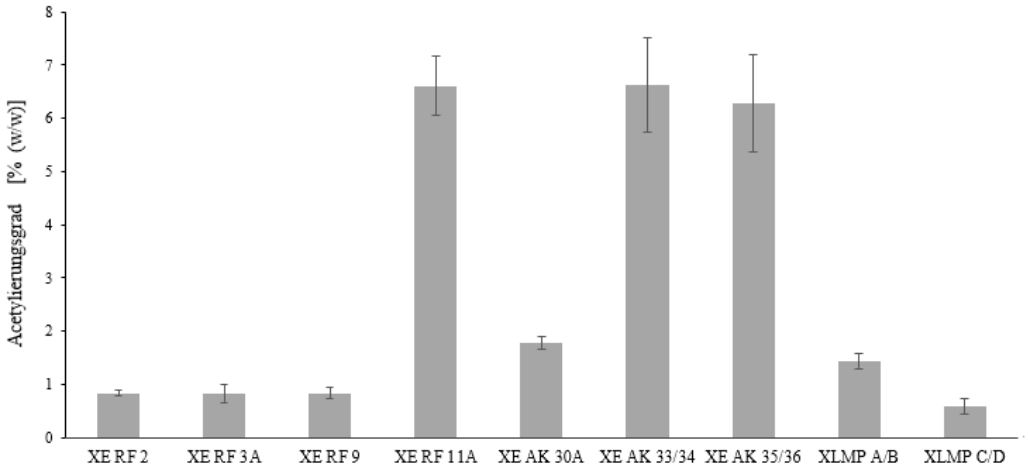


Abbildung 4.10: Acetylierungsgrad diverser Xylan-Proben bezogen auf die Gesamtmasse; Proben gelöst in Reinstwasser; n=6

Ferulasäuregehalt der Xylan-Proben

Der ermittelte Ferulasäuregehalt diverser Xylan-Proben bezogen auf die Gesamtmasse ist der Abbildung 4.11 zu entnehmen. Wie deutlich zu erkenne ist, konnte in den mit H_2O_2 vor- und nachbehandelten Xylan-Proben kaum Ferulasäure-Seitengruppen nachgewiesen werden (0,004 ± 0,001 %). Im Fall der Proben XLMP ist keine freie Ferulasäure nachweisbar.
Die alkalisch extrahierten Xylan-Proben „RF 1-6“ sowie „AK 30A“ weisen einen Ferulasäuregehalt von 0,018 ± 0,002 % auf. Im Vergleich dazu besitzen die mit Reinstwasser extrahierten Xylan-Proben „AK 33-36“ und „RF 11A/B“ einen um Faktor 8,4 höheren Ferulasäuregehalt von 0,15± 0,01 % bzw. 0,16 ± 0,01 % auf.

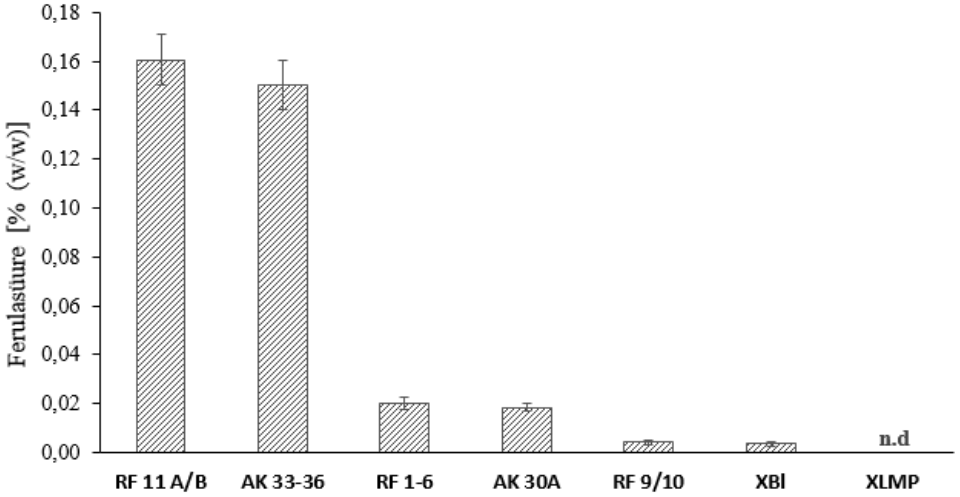


Abbildung 4.11: Ferulasäuregehalt diverser Xylan-Proben bezogen auf die Gesamtmasse; n=4

4.2.2 Xylan-Nachweis mittels FT-IR

Zur qualitativen Untersuchung der Xylan-Proben während der Extraktion fanden FT-IR Messungen im Bereich von 4.000-400 cm^{-1} statt. Anhand der spezifischen Transmissionsbanden können bestimmte Molekülgruppen des Xylans nachgewiesen werden.
Abbildung 4.12 stellt beispielhaft das FT-IR Spektrum der Xylan-Probe „XE RF 2“ dar. Die Transmission in % ist gegen die Wellenzahl in cm^{-1} aufgetragen.

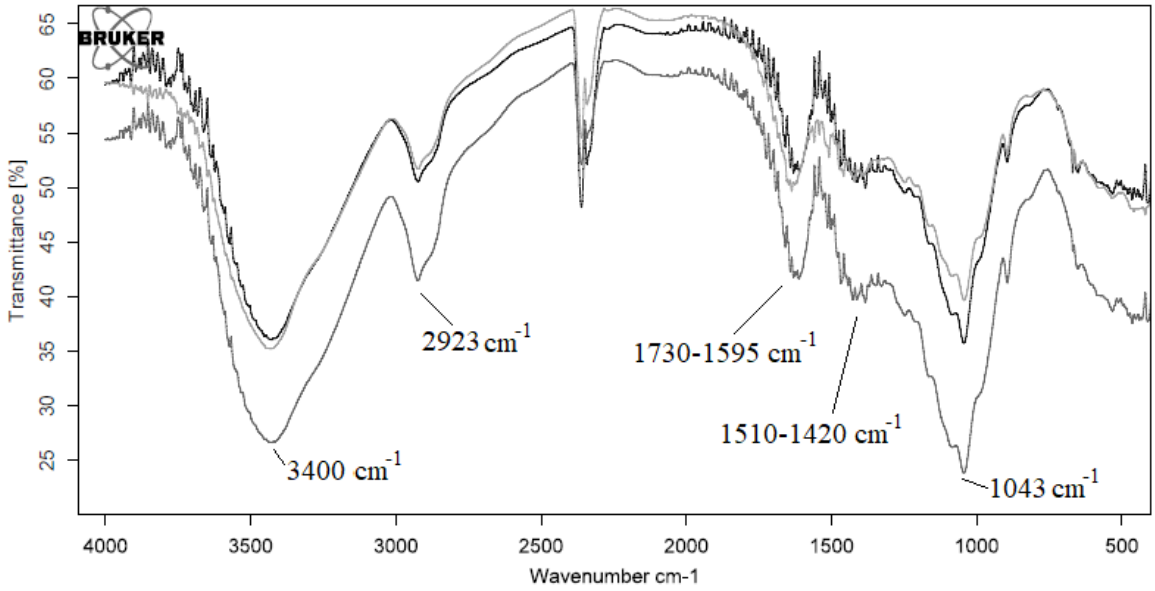


Abbildung 4.12: FT-IR Spektrum der Xylan-Probe „XE RF 2“, dreifache Messung als KBr-Pressling

Das FT-IR Spektrum zeigt eine stark ausgeprägte Banden im Bereich von 3400 cm^{-1}, welche auf die Anwesenheit von Hydroxyl-Gruppen deutet. Darüber hinaus sind die für Heteroxylane typischen Transmissionsbanden bei 2923 cm^{-1} (CH_2 Schwingung), 1460 cm^{-1} (CH_2 Ringschwingung), 1000-1200 cm^{-1} (C-OH, C-O-C und C-C Schwingungen) und 894 cm^{-1} (CH Ringschwingung) zu erkennen. Im Bereich von 1000-1200 cm^{-1} ist die Bande bei 1043 cm^{-1} am stärksten ausgeprägt, welche auf C-OH Streckschwingung zurückgeführt werden kann. Das Spektrum weist zudem schwache Banden bei 1595 cm^{-1}, 1510 cm^{-1} und 1420 cm^{-1} auf. Diese deuten auf die Anwesenheit phenolische Gruppen aus Lignin oder Ferulasäure.

Für die mit Reinstwasser extrahierte Probe „RF 11A“, die enzym. behandelte Probe „XLMP“ sowie für die mit H_2O_2 behandelten Proben „XBl“ und „RF 10A“ ergeben sich ebenfalls Transmissionsbanden bei 3400 cm^{-1}, 2923 cm^{-1}, 1044 cm^{-1} und 894 cm^{-1}.
Im Fall der Xylan-Proben „XLMP“ und „XBl“ (siehe Abb. 4.13) zeigt das FT-IR Spektrum im Bereich von 1000-2000 cm^{-1} deutlich weniger, dafür aber klarer ausgeprägte Bande auf. Beispielsweise sind die für Ester typischen Transmissionsbanden bei 1720-1730 cm^{-1} lediglich in den unbehandelten Xylan-Proben zu erkennen.
Die durch Umgebungs-CO_2 verursachte Transmissionsbande im Bereich von 2360 cm^{-1} ist aufgrund des Messaufbaus in allen FT-IR Spektren zu sehen.

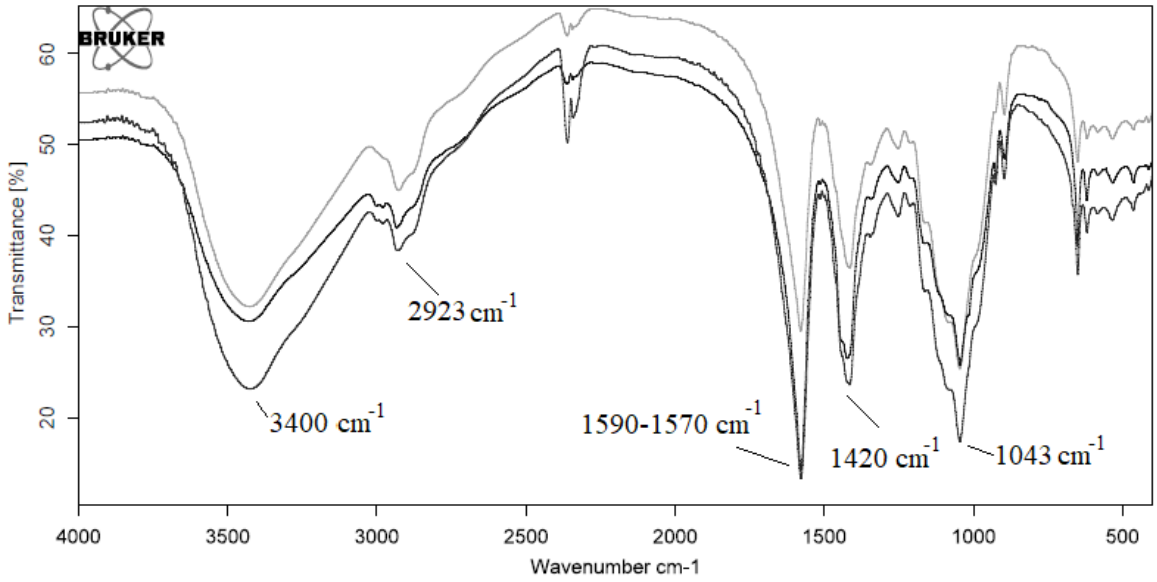


Abbildung 4.13: FT-IR Spektrum der Xylan-Probe „XBl“, dreifache Messung als KBr-Pressling

Insgesamt weisen die FT-IR Spektren der verschiedenen Xylan-Proben ein sehr ähnliches Muster an Transmissionsbanden sowie ähnlich ausgeprägte Intensitäten dieser Banden auf. Die Methode ist zur Identifizierung des Xylans während der Extraktion gut geeignet. Tabelle 4.5 gibt einen Überblick der ermittelten Transmissionsbanden und der über Literaturvergleiche [36, 74, 110–112] zugeordneten Schwingungen der möglichen Molekülgruppen.

Tabelle 4.5: Zuordnung der ermittelten FT-IR Transmissionsbanden zu entsprechenden Schwingungen von Molekülgruppen

Wellenzahl (cm^{-1})	Schwingung	mögliche Molekülgruppe
894 cm^{-1}	C-H Ringschwingung	CH-Ringgruppe
1000-1200 cm^{-1}	C-OH / C-O-C Schwingung	OH-Gruppe / glykosid. Bindung
	C-C Ringschwingung	Ringsysteme
1043 cm^{-1}	C-OH Streckschwingung	OH-Seitengruppe
1420 cm^{-1}	CH Deformationsschwingung	C-H in phenol. Gruppen
1460 cm^{-1}	sym. CH_2 Ringschwingung	Pyranose
1510 cm^{-1}	C=C Ringschwingung	phenol. Ringsysteme
1595 cm^{-1}	C=C / CH Ringschwingung	phenol. Ringsysteme
1710-1725 cm^{-1}	C=O Streckschwingung	C=O-Gruppe / Ester
2923 cm^{-1}	sym./asym. CH_2 Streckschwingung	C-CH_2
3430 cm^{-1}	-OH Streckschwingung	gebundene OH-Gruppe

4.2.3 Molmassen der Xylan-Proben

Zur Bestimmung der Molmassenmittelwerte und -verteilung erfolgten Untersuchungen mittels Gelpermeations-Chromatographie (GPC) mit Dreifachdetektion. Bei der Probenvorbereitung zeigte sich, dass die Xylan-Proben nicht vollständig in dem notwendigen Paley Puffer (pH 6,8) löslich waren (β = 1 mg/ml). Dies deutet auf eine Bildung von Aggregaten.
Die Chromatogramme der Brechungsindices (RI) der Xylan-Proben wiesen drei Peaks auf. Der erste Peak erstreckt sich über ein Elutionsvolumen von 16-26 ml bzw. 16-28 ml, während die beiden hinteren Peaks ein Retentionsvolumen von 30-32 ml respektive 35,5-36,5 ml umfassen. Im Anhang auf Seite 119 sind zwei Original-Chromatogramme dargestellt (Abb. 6.1).

In den folgenden Abbildungen sind Zahlenmittel (Mn), Gewichtsmittel (Mw) und die Molmasse an der Peakspitze (Mp) der Xylan-Proben graphisch aufgetragen.

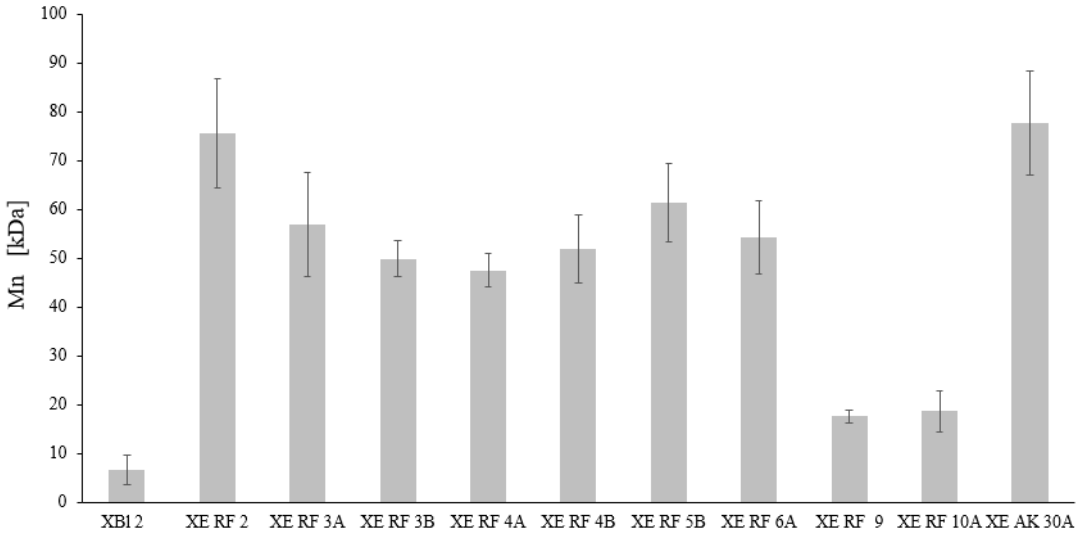


Abbildung 4.14: GPC Daten I: Zahlenmittel Mn [kDa] diverser Xylan-Proben, n=4

Es fällt auf, dass die mit H_2O_2 behandelten Xylan-Proben (XBl, RF 9/10A) mit 6,6 kDa bzw. 17,6-18,7 kDa ein deutlich geringeres Zahlenmittel aufweisen als die unbehandelten Xylan-Proben, deren Zahlenmittel zwischen 49,85-77,67 kDa liegt.
Im Hinblick auf das Gewichtsmittel und die Molmasse an der Peakspitze ist diese Tendenz nicht mehr stark ausgeprägt. So liegt das Gewichtsmittel für die Xylan-Probe RF 9 bei 119,4 kDa, für RF 10A bei 188,5 kDa und für XBl 2 bei 261,4 kDa. Die restlichen Xylan-Proben weisen ein Gewichtsmittel von 261,7-458,1 kDa auf.
An der Peakspitze ergeben sich für Probe XBl 2 eine Molmasse von 7,0 kDa und für die Proben RF 9/10A eine Molmasse von 38,1 kDa respektive 44,8 kDa. Die Molmasse der unbehandelten Proben beträgt 54,0-78,7 kDa.

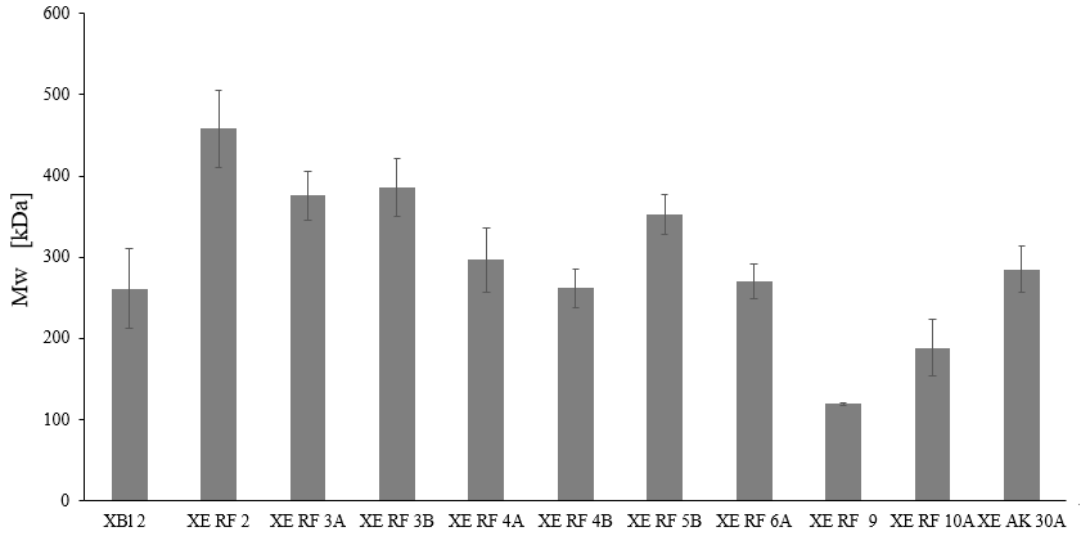


Abbildung 4.15: GPC Daten II: Gewichtsmittel Mw [kDa] diverser Xylan-Proben, n=4

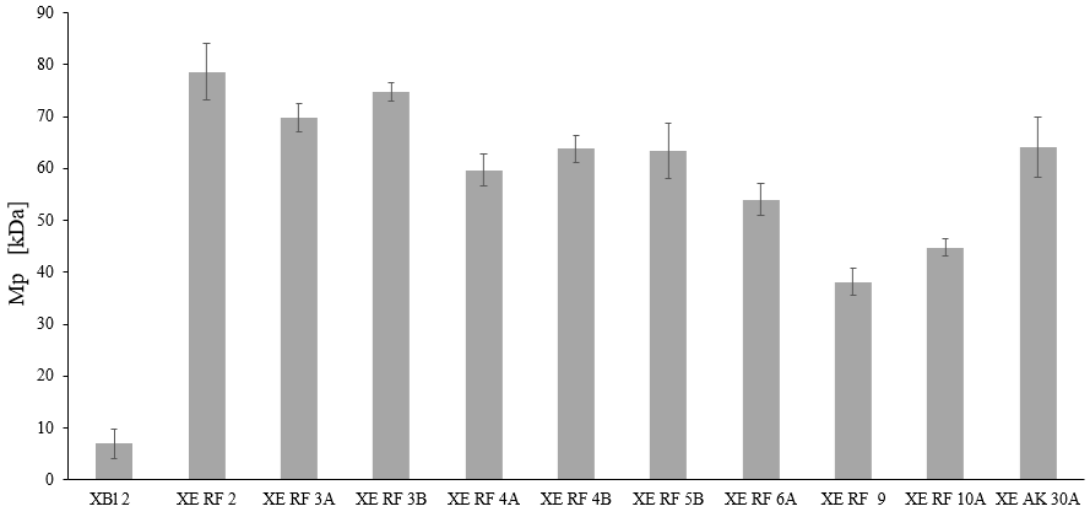


Abbildung 4.16: GPC Daten III: Molmasse an der Peakspitze Mp [kDa] diverser Xylan-Proben, n=4

Beim Vergleich von Mn und Mp zeigt sich, dass die Xylan-Proben RF 3A, RF 4A/B, AK 30 und insbesondere RF 3B, RF 9 sowie 10A ein um den Faktor 1,3-2,4 höhere Molmasse an der Peakspitze besitzen. Im Fall der Xylan-Proben RF 2, RF 5B, RF 6A als auch XBl 2 liegen Mn und Mp nah beieinander.

Insgesamt ergeben sich für die Xylan-Proben sehr hohe Molmassen sowie eine sehr breite Molmassenverteilung. Die berechneten Polydispersitäten (PD) belaufen sich auf:

	AK 30A	**RF 2-6**	**RF 9/10A**
PD $= \left[\frac{M_w}{M_n}\right]$	3,66	4,97-7,76	6,79-10,08

4.2.4 Semipräparative SEC von Xylan-Proben

Mehrere Xylan-Proben wurden mittels SEC an Sephacryl S-400 oder Superdex 75 prep hinsichtlich ihrer Elution analysiert. Ferner sollte die Polydispersität der Xylan-Proben durch Fraktionierung an Superdex 75 prep verringert werden.
Da sich die Proben nur zu einem sehr gingen Teil in Reinstwasser oder Puffersystemen lösten (45-50 %), erfolgten die SEC-Messungen standardmäßig mit in 0,5 M NaOH gelösten Proben, welche zu etwa 95 % gelöst waren.

Es zeigte sich, ähnlich wie bei den Daten aus Kapitel 4.2.3, dass die SEC-Chromatogramme der Xylan-Proben mehrere Peaks im RI-Signal aufweisen. Auch im UV-Signal sind mehrere Peaks zu erkennen, welche zum Teil mit den Peaks im RI-Signal korrelieren.
In Abbildung 4.17 ist beispielhaft ein Elutionsprofil der Xylan-Probe „XE RF 2“ an Sephacryl S-400 dargestellt. Das RI-Signal (schwarz) und das UV-Signal bei λ = 280 nm (grau) sind in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen aufgetragen.

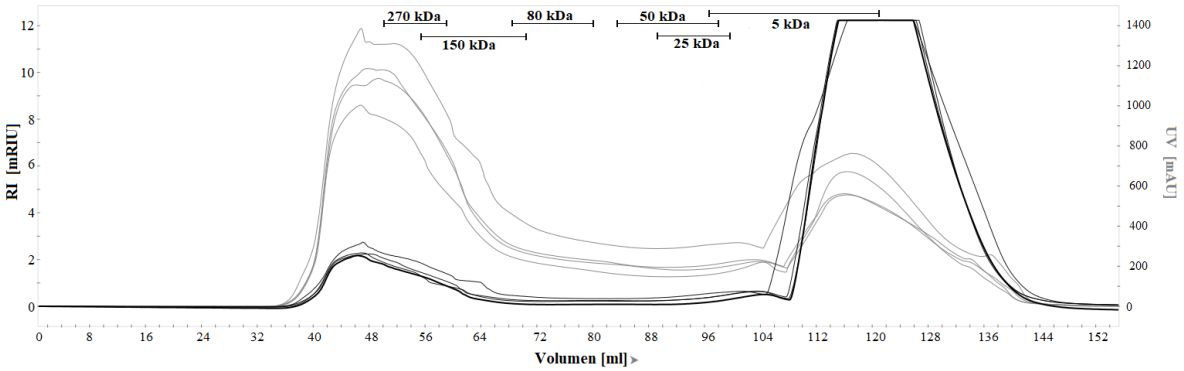


Abbildung 4.17: S-400 Chromatogramm von „XE RF 2“ gelöst in 0,5 M NaOH; v_0 = 35 ml; RI: schwarz; UV: grau, λ = 280 nm; Probe vierfach vermessen

Sowohl das RI- als auch das UV-Signal lassen die Ausbildung von zwei Peaks im Bereich von 36-65 ml respektive 105-140 ml erkennen. Die ermittelten Molmassen der Xylan-Proben liegen somit hauptsächlich zwischen 80 kDa und >270 kDa sowie ≤5 kDa.
Es fällt auf, dass der UV-Peak im Bereich von 36-65 ml mit 1.000-1.400 mAU am stärksten ausgeprägt ist, während der RI-Peak am stärksten im Bereich von 104-140 ml ausgeprägt ist (>12 mRIU). Insgesamt ergibt sich eine sehr breite Molmassenverteilung.
In Versuchsreihen mit Glycin-NaOH (pH 9,0) und PBS-Puffer (pH 7,2) als Lösungsmittel ergaben sich sowohl im UV- als auch im RI-Signal Doppelpeaks im Bereich von 84-130 ml, wobei sich lediglich 47 % der Xylan-Probe gelöst hatten.

Da der Trennbereich der Sephacryl S-400 Säule, wie in Abb. 4.17 zu sehen, nicht für eine ausreichende Auftrennung der Probenbestandteile unter 25 kDa geeignet war, fanden weitere Messungen an einer mit Superdex 75 prep gepackten Säule statt. Ein Chromatogramm der alkalisch extrahierten Xylan-Probe „XE RF 2“ ist beispielhaft in Abb. 4.18 dargestellt.

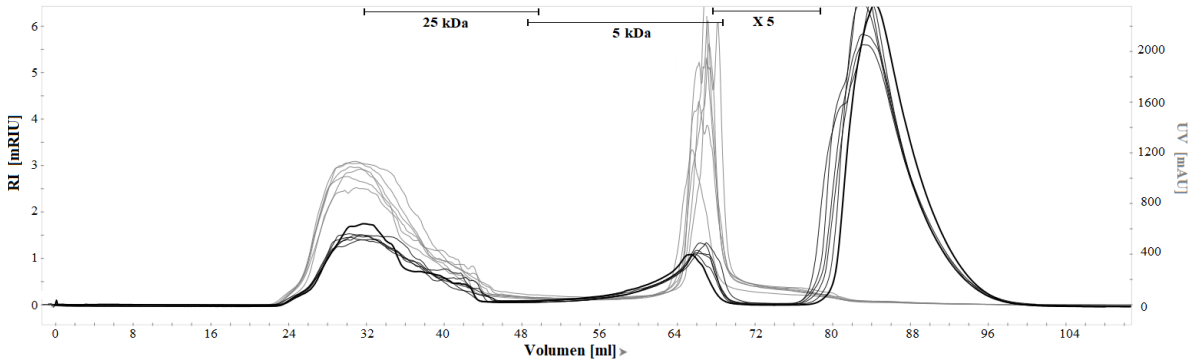


Abbildung 4.18: Superdex 75 prep Chromatogramm von „XE RF 2“ gelöst in 0,5 M NaOH; v_0 = 18 ml; RI: schwarz, UV: grau, λ = 280 nm; Probe sechsfach vermessen

Für das UV-Signal ergeben sich stark ausgeprägte Peaks im Bereich von 22-44 ml und 62-70 ml, während das RI-Signal Peaks im Bereich 22-44 ml, 58-70 ml und 77-96 ml erkennen lässt.
Es zeigt sich, dass die UV- und RI-Signale der Probenbestandteile mit Molmassen >25 kDa Peaks in einem konstanten Verhältnis und Elutionsvolumen (22-44 mlk) aufweisen.
Für Probenbestandteile mit Molmassen ≥5 kDa korrelieren die Signale zwischen 62-70 ml und Bestandteile mit Molmassen <678 Da (X5) weisen lediglich ein RI-Signal auf, welches jedoch um den Faktor 3-4 stärker ist als die übrigen RI-Signale.

Zum Vergleich ist in Abbildung 4.19 ein Chromatogramm der enzymatisch nachbehandelten Xylan-Probe „XLMP“ zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Probenbestandteile früher eluieren. Sowohl das RI- als auch das UV-Signal weisen einen Peak im Bereich von 18-28 ml auf, wobei das RI-Signal sehr gering ausfällt. Im weiteren Verlauf ergeben sich für das RI-Signal noch zwei deutlich stärker ausgeprägte Peaks im Bereich von 40-60 ml respektive 66-90 ml.
Das UV-Signal zeigt dagegen nur noch einen Peak im Bereich von 54-68 ml.

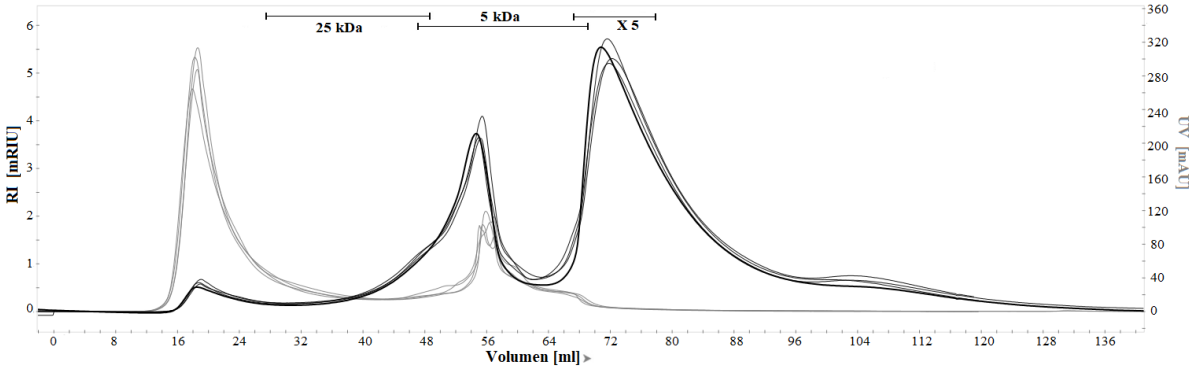
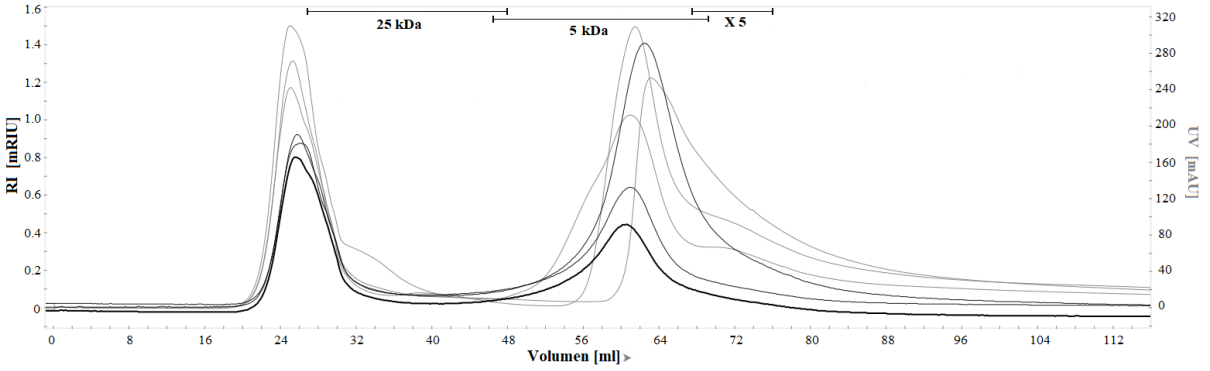


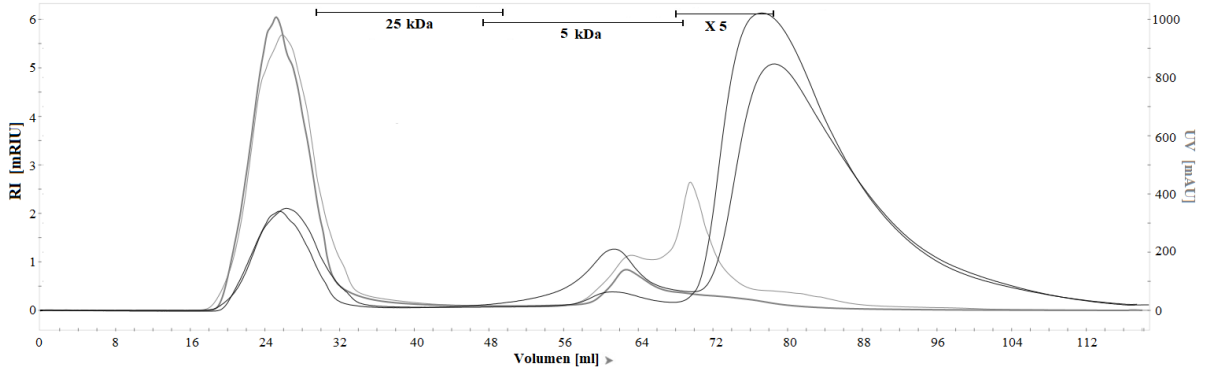
Abbildung 4.19: Superdex 75 prep Chromatogramm von XLMP gelöst in 0,5 M NaOH; v_0 = 18 ml; RI: schwarz, UV: grau, λ = 280 nm; Probe vierfach vermessen

Um zu untersuchen, in welchem Maße sich das Resuspendieren bzw. Lösen der Probe oder der Eluent auf das Elutionsprofil auswirken, fanden SEC-Messungen an Superdex 75 prep unter folgenden Bedingungen statt:

(a) „XE RF 2“ gelöst in Reinstwasser; Eluent: Reinstwasser
(b) „XE RF 2“ Rückstand von (a) gelöst in 0,5 M NaOH; Eluent: Reinstwasser
(c) „XE RF 2“ gelöst in 0,5 M NaOH mit 1 % Triton-X (v/v); Eluent: Reinstwasser
(d) „XE RF 2“ gelöst in 0,5 M NaAc; Eluent: NaAc



(a)

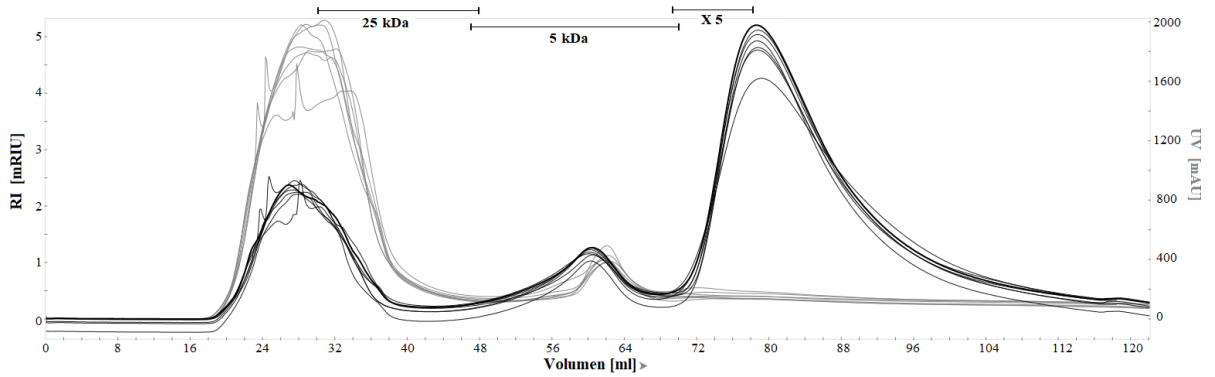


(b)

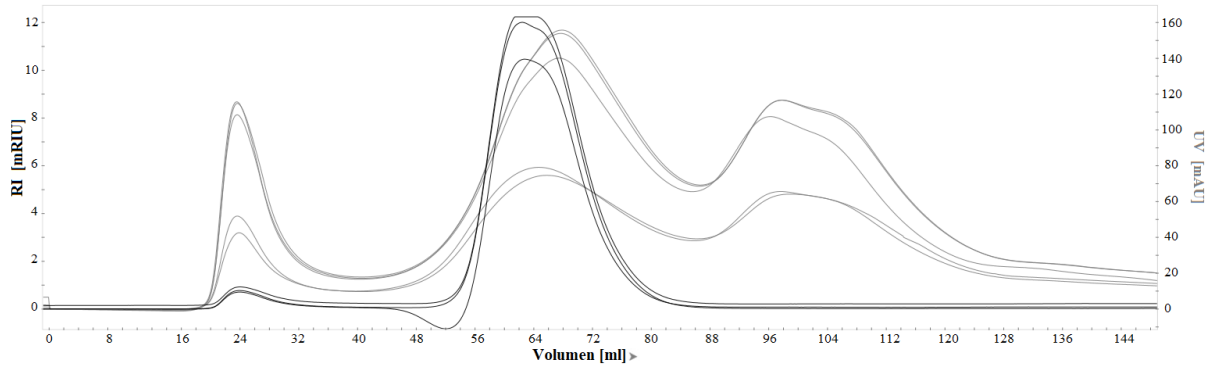
Abbildung 4.20: Superdex 75 prep Chromatogramme der Versuchsreihen (a) „XE RF 2“ gelöst in Reinstwasser, vierfach vermessen und (b) Rückstand gelöst in 0,5 M NaOH, zweifach vermessen; RI: schwarz, UV: grau, λ = 280 nm

Das Chromatogramm der in Reinstwasser gelösten Xylan-Probe (Abb. 4.20 (a)) zeigt sowohl im RI- als auch im UV-Signal zwei Peaks im Bereich von 20-32 ml respektive 52-74 ml, die Ausbildung eines dritten RI-Peaks ist nicht zu erkennen. Aufgrund der geringen Löslichkeit der Xylan-Probe in Reinstwasser fallen beide Signale deutlich geringer aus als bei den Messungen der in 0,5 M NaOH gelösten Probe. Im Fall des in 0,5 M NaOH resuspendierten Rückstandes (Abb. 4.20 (b)) ergeben sich ähnliche Elutionsprofile wie bei den standardmäßig in 0,5 M NaOH gelösten Proben. Allerdings erstreckt sich der 2. UV-Peak über ein breiteres Elutionsvolumen und bildet z.T. einen Doppelpeak aus.

Wie aus Abbildung 4.21 (a) zu entnehmen ist, bewirkte der Zusatz von 1 % Triton-X (v/v) keinen signifikanten Unterschied im Verlauf des RI-Signales. Beim UV-Signal ergeben sich im Vergleich zu der in 0,5 M NaOH gelösten Probe dagegen Unterschiede in der Intensität. So ist die Signalintensität des 2. Peaks deutlich geringer als die Intensität des 1. Peaks.
Das Elutionsprofil der mit NaAc (pH 5) behandelten Xylan-Probe weicht deutlich von den anderen ab (Abb. 4.21 (b)). So weist das RI-Signal einen sehr geringen Peak im Bereich von 22-32 ml sowie einen stark ausgeprägten Peak im Bereich von 54-78 ml auf. Das UV-Signal zeigt drei Peaks im Bereich von 20-34 ml, 50-86 ml sowie 86-124 ml.



(a)



(b)

Abbildung 4.21: Superdex 75 prep Chromatogramme der Versuchsreihen (a) „XE RF 2“ gelöst in 0,5 M NaOH mit 1 % Triton-X (v/v), siebenfach vermessen und (b)„XE RF 2“ gelöst in 0,5 M NaAc, fünffach vermessen; RI: schwarz, UV: grau, λ = 280 nm

Insgesamt zeigte sich, dass die Löslichkeit der Proben in 0,5 M NaOH am höchsten war und die Elutionsprofile dieser Proben die stärksten RI-Signale im Bereich von 22-44 ml (> 25 kDa) aufweisen. Ein Zusatz von 1 % Triton-X (v/v) bewirkte keinen signifikanten Unterschied.
Aufgrund dessen fand die Fraktionierung der Xylan-Proben mittels SEC mit 0,5 M NaOH als Lösungsmittel und Reinstwasser als Eluent statt. Die vereinten Fraktionen im Bereich von 58-70 ml wurden mittels HPAEC hinsichtlich ihrer (Xylo)-Oligosaccharid-Zusammensetzung untersucht und die vereinten Fraktionen 20-42 (22-44 ml) einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen (siehe 4.3 Abb. 4.24).

4.3 Charakterisierung von Xylooligosacchariden

Die enzymatische Hydrolyse der Xylan-Proben „XE RF 1“ und „XE RF 2“ erfolgte mit einer endo-1,4-β-Xylanase aus *Thermomyces lanuginosus*.
Es zeigte sich, dass auch nach 48 h Inkubationszeit noch etwa 33 % der im Puffer suspendierten Xylans als festes Pellet vorlagen. Die Überstände wurden anschließend über eine semipräparative LH-20 Säule aufgetrennt, wobei zwischen den verschiedenen Ansätzen keine signifikanten Unterschiede im Elutionsprofil zu erkennen waren.
Im Folgenden sind beispielhaft zwei LH-20 Chromatogramme dargestellt. UV- und RI-Signal sind in Abhängigkeit der Fraktionsnummer von rechts nach links aufgetragen.

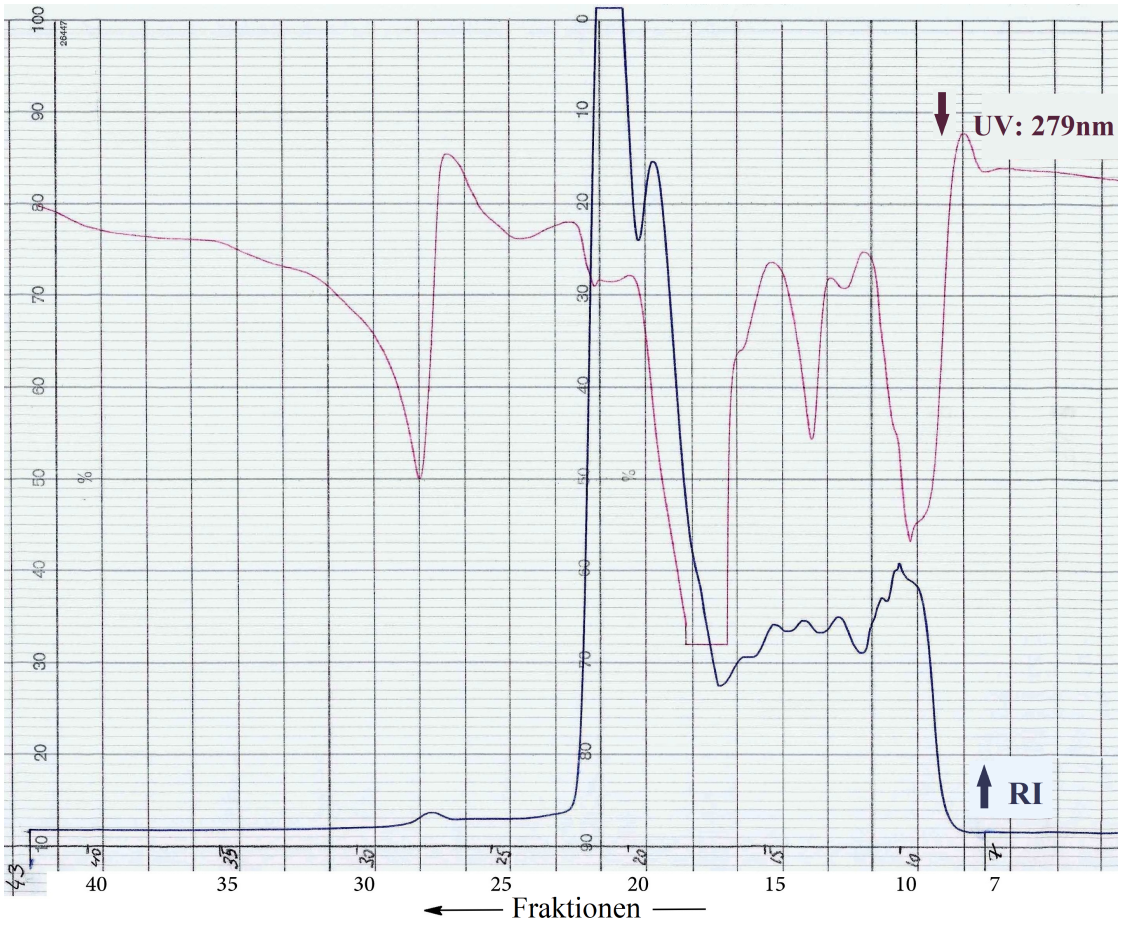


Abbildung 4.22: LH-20 Chromatogramm von Xylan XE RF 1 nach enzymatischer Hydrolyse mittels endo-1,4-β-Xylanase; RI: blau, von unten nach oben aufgetragen; UV: rot, λ = 279 nm, von oben nach unten aufgetragen

Wie aus Abbildung 4.22 und 4.23 zu entnehmen ist, ergibt sich für die untersuchten Xylan-Hydrolysate ein sehr ähnliches Elutionsprofil. Auch die übrigen, hier nicht dargestellten, LH-20 Chromatogramme zeigen nahezu deckungsgleiche Elutionsprofile. Dies beweist eine hohe Reproduzierbarkeit der LH-20-Chromatographien.

Das RI-Signal erstreckt sich über Fraktion 9-22 sowie Fraktion 28 und weist zunächst einen rapiden Anstieg auf ein lokales Maximum auf. Dieses sinkt ab Fraktion 11 um etwa 30 % ab und pendelt sich z.T. auf ein etwas geringeres oder ein wieder ähnlich hohes RI-Signal ein.
Ab Fraktion 18 steigt das RI-Signal nochmal um den Faktor 3,5 an, weist zwischen Fraktion 20 und 21 ein Maximum auf und sinkt im Anschluss auf Basislinienniveau ab.

Das UV-Signal zeigt insbesondere in Fraktion 9-11, 14-15 und 17-20 deutliche Steigungen auf. Insgesamt erstreckt sich das UV-Signal von Fraktion 9-22. Darüber hinaus weisen alle LH-20 Chromatogramme ein ausgeprägtes UV-Signal im Bereich von Fraktion 28 auf, während das RI-Signal in diesem Bereich sehr gering ist.

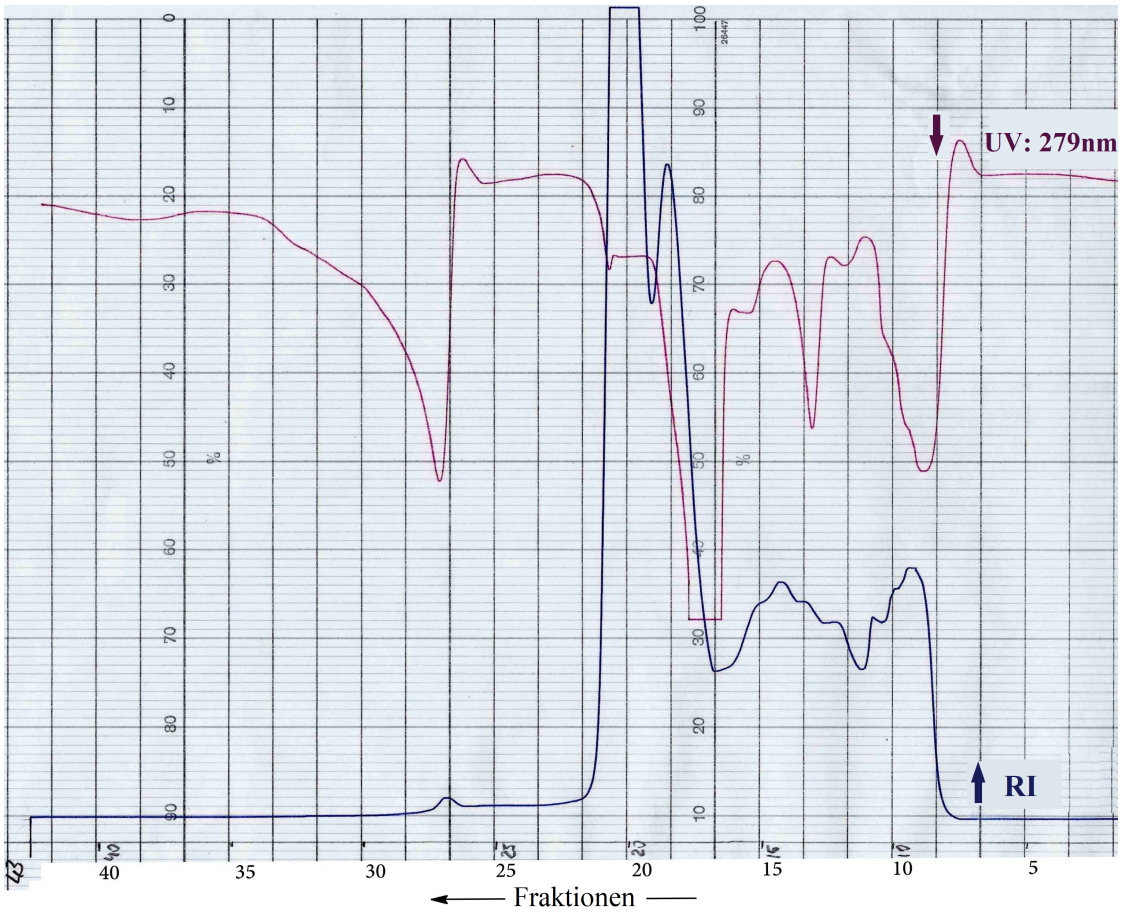


Abbildung 4.23: LH-20 Chromatogramm von Xylan XE RF 2 nach enzymatischer Hydrolyse mittels endo-1,4-β-Xylanase; RI: blau, von unten nach oben aufgetragen; UV: rot, λ = 279 nm, von oben nach unten aufgetragen

Neben den Xylan-Proben wurden ferner auch die vereinten Fraktionen 20-42 (≡ 22-44 ml) der SEC-Trennungen von „XE RF 1“ und „XE RF 2“ (Superdex 75 prep, siehe Abb. 4.24) enzymatisch hydrolysiert. Im Vergleich zu den Hydrolysaten der Xylan-Proben waren im Fall der Superdex 75 prep Fraktionen etwa 80 % des Proben-Materials löslich.

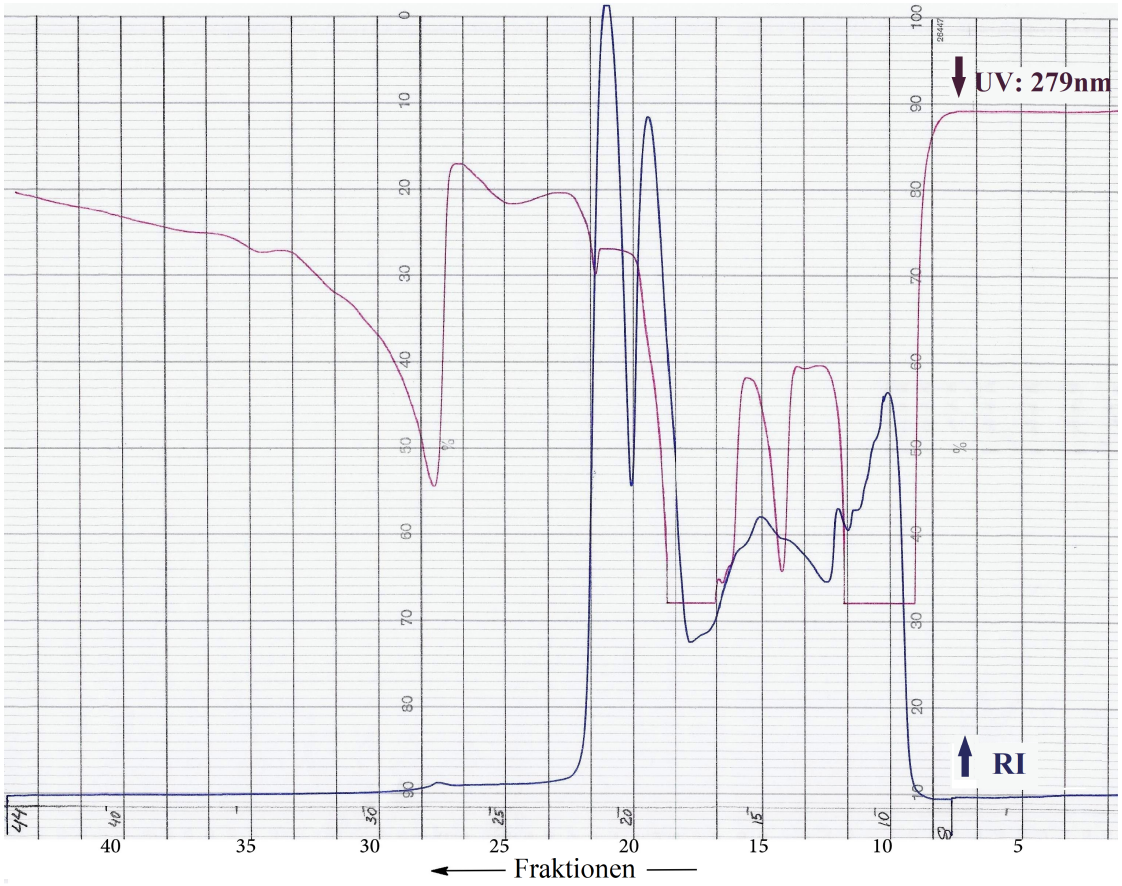


Abbildung 4.24: LH-20 Chromatogramm von XE RF 1 und 2 - Superdex 75 prep F 20-42 nach enzymatischer Hydrolyse; RI: blau, von unten nach oben aufgetragen; UV: rot, λ = 279 nm, von oben nach unten aufgetragen

Das Elutionsprofil weist sowohl für das UV-Signal als auch RI-Signal einen ähnlichen Verlauf auf wie das der Xylan-Probe (Abb. 4.24). Allerdings ergeben sich im Vergleich zur Xylan-Probe deutlich höhere RI-Signale für die Fraktionen 9-17, während das RI-Signal der Fraktionen 20 und 21 geringer ausfällt. Die Intensität des UV-Signals ist über das ganze Elutionsprofil hinweg deutlich stärker ausgeprägt als bei den Xylan-Proben.

Dünnschichtchromatografie

Die Zusammensetzung der LH-20 Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatografie (DC) untersucht. Als Vergleichssubstanzen dienten zum einen Xylobiose (X2), -triose (X3), -tetraose (X4), -pentaose (X5) und -hexaose (X6), zum anderen Arabinose (Ara), Xylose (Xyl), Glukose (Glc), Galaktose (Gal) sowie Saccharose (Sac).
Die Zuordnung der Spots erfolgte anhand der ermittelten R_f-Werte (Verhältnis von Laufstrecke der Substanz zur Laufmittelfront) und Färbung.
Abbildung 4.25 zeigt beispielhaft DCs zur Untersuchung der LH-20 Fraktionen 10-20.

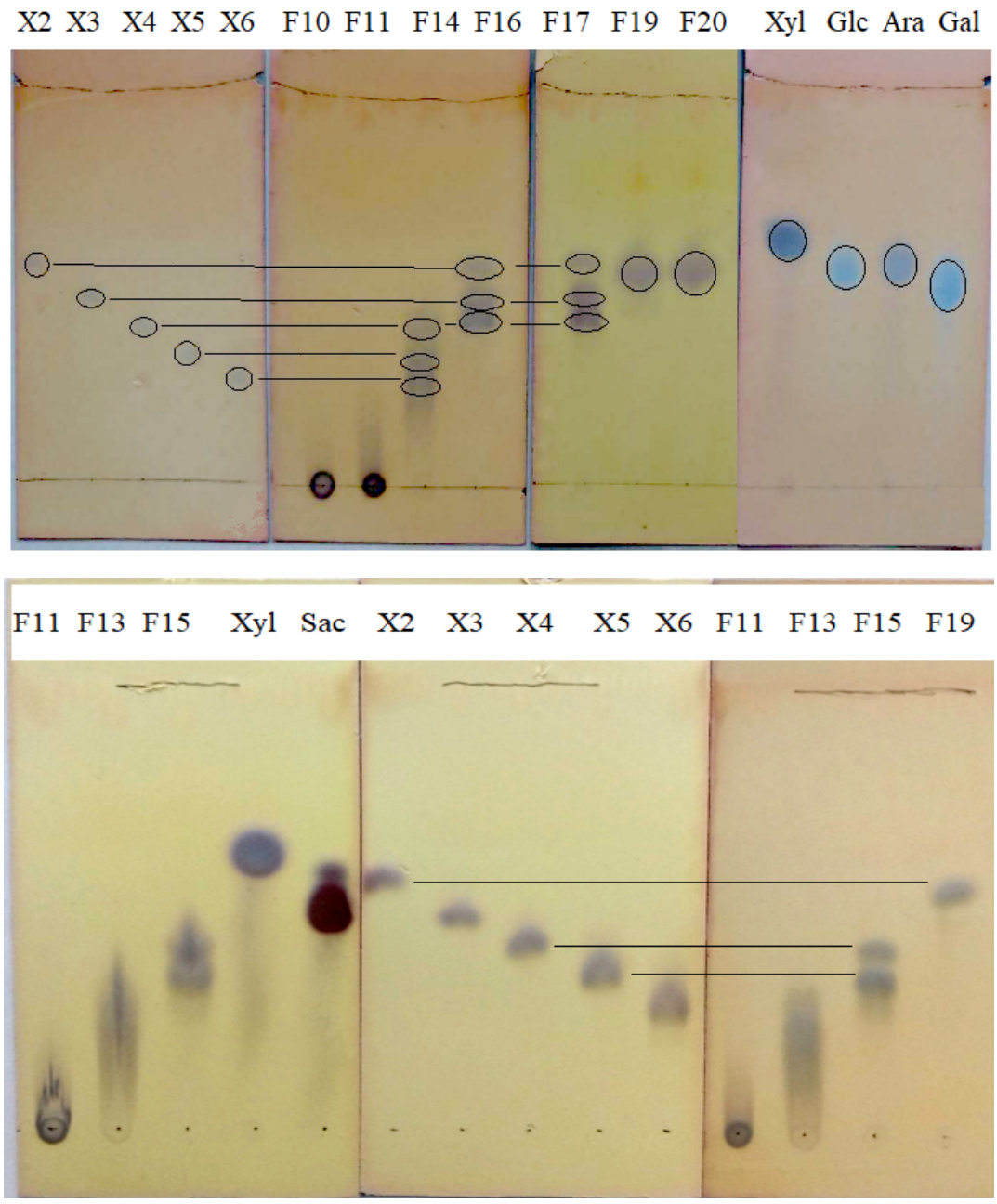


Abbildung 4.25: Beispiel-DCs: Proben nach LH-20 Trennung (Abb. 4.22 Fraktion 10-20) im Vergleich zu Xylooligosaccharid-Std. DP2-6 und Monosaccharid-Std.; zur besseren Erkennbarkeit der Spots wurde der Kontrast manuell verändert

Die LH-20 Fraktionen 10 und 11 weisen lediglich einen Spot auf der Basislinie auf und konnten somit nicht zugeordnet werden. Bei den Fraktionen 10, 11 und 12 ist davon auszugehen, dass es sich um Oligosaccharide mit einem deutlich höheren DP handelt.
Fraktion 13 zeigt einen recht breiten Spot unterhalb des Xylohexaose-Standards auf, welcher auf Oligosaccharide größer DP 6 weist. In der Fraktion 14 lassen sich eindeutig Xylotetraose, -pentaose und-hexaose, in der Fraktion 15 Xylotriose, -tetraose sowie -pentaose nachweisen. Bei den Fraktionen 16 und 17 weisen die Spots auf Xylobiose, -triose und -tetraose, während Fraktion 18 Xylobiose sowie Xylotriose zugeordnet werden kann.
Für Fraktion 19 und 20 ergibt sich jeweils ein Spot nahe des Xylobiose-Standards, für die Fraktionen 21 und 22 Spots auf Höhe des Xylose-Standards.

Tabelle 4.6 gibt einen Überblick, der in den LH-20 Fraktionen mittels DC nachgewiesenen Xylooligosaccharide und Xylose:

Tabelle 4.6: Übersicht der in den LH-20 Fraktionen mittels DC nachgewiesenen Xylooligosaccharide und Monosaccharide

	Xylose	**Xylooligosaccharide**				
		DP 2	**DP 3**	**DP 4**	**DP 5**	**DP 6**
Fraktion 10	-	-	-	-	-	-
Fraktion 11	-	-	-	-	-	-
Fraktion 12	-	-	-	-	-	-
Fraktion 13	-	-	-	-	-	-
Fraktion 14	-	-	-	+	+	+
Fraktion 15	-	-	+	+	+	-
Fraktion 16	-	+	+	+	-	-
Fraktion 17	-	+	+	+	-	-
Fraktion 18	-	+	+	-	-	-
Fraktion 19	-	+	-	-	-	-
Fraktion 20	-	+	-	-	-	-
Fraktion 21	+	-	-	-	-	-
Fraktion 22	+	-	-	-	-	-
Fraktion 28	-	-	-	-	-	-

Untersuchung der LH-20 Fraktionen mittels HPAEC

Die jeweils vereinten LH-20 Fraktionen 10-25 wurden mittels Hochleistungs-Anionenaustausch-chromatographie (HPAEC) hinsichtlich ihrer Zusammensetzung an Oligosacchariden (3.4.3) und Monosacchariden (3.5.4) untersucht. Die Detektion der Oligo- und Monosaccharide erfolgte mit einem elektrochemischen Detektor (ED).
Abbildung 4.26 zeigt beispielhaft die HPAEC Chromatogramme der LH-20 Fraktionen 11,12 und 13 im Vergleich zu den Xylooligosaccharid-Standards DP2-6.

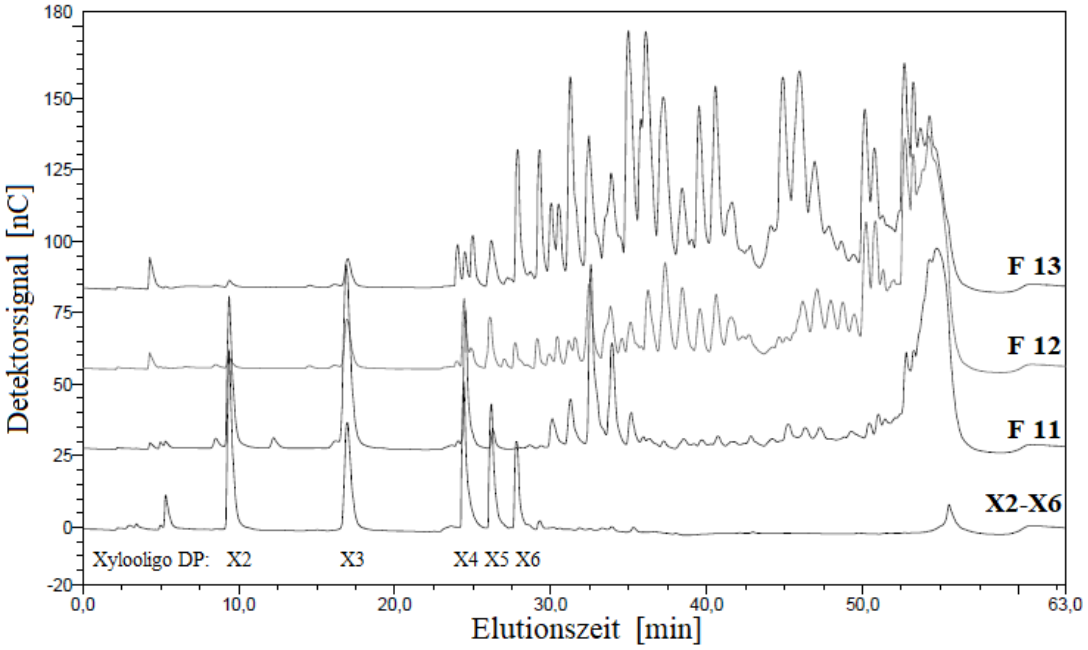


Abbildung 4.26: HPAEC Chromatogramme der LH-20 Fraktionen 11-13 im Vergleich zu den Xylooligosaccharid-Standards DP2-6

Für Fraktion 11 und 12 ergeben sich Signale im Bereich von DP 2-6 sowie Oligosacchariden größer DP 6, welche jedoch geringer ausfallen als bei den nachfolgenden Fraktionen. Ferner sind im Verlauf des 2. NaOAc-Gradienten stark ausgeprägte Signal zu erkennen. Die Fraktion 13 zeigt dagegen deutlich stärker ausgeprägte Signale im Bereich von Oligosacchariden.

Auch Fraktion 14 (Abb. 4.27) und Fraktion 15 (Abb. 4.28 (a)) zeigen neben den Signale für Xylooligosaccharide mit DP3-6 stark ausgeprägte Signale im Bereich von Oligosacchariden größer DP6. Im Vergleich dazu ergeben sich für Fraktion 16 (Abb. 4.28) (b)) vermehrt ausgeprägte Signale im Bereich von Xylooligosacchariden mit DP2-6.
Es fällt auf, dass die Intensität des ED-Signales im Verlauf des 2. NaOAc-Gradienten von Fraktion 11 bis Fraktion 16 stetig abnimmt. Ein breites Spektrum an Oligosacchariden größer DP6 ist insbesondere in Fraktion 13-15 zu finden.

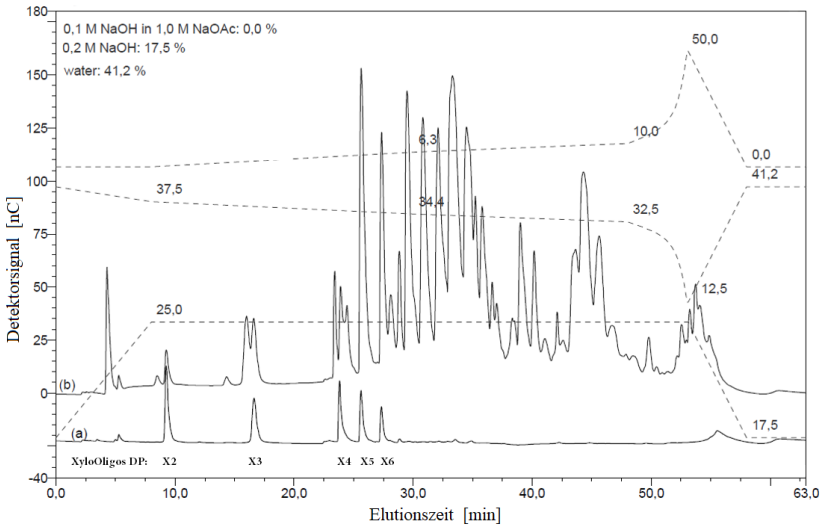
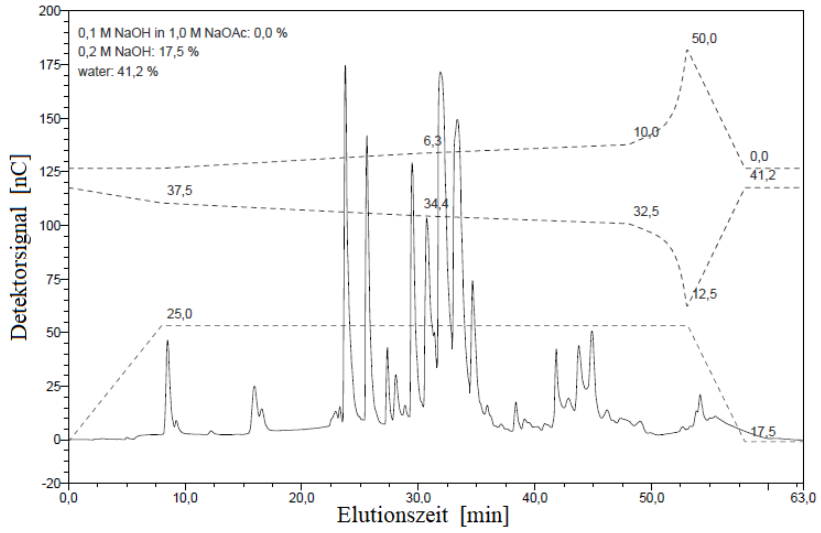
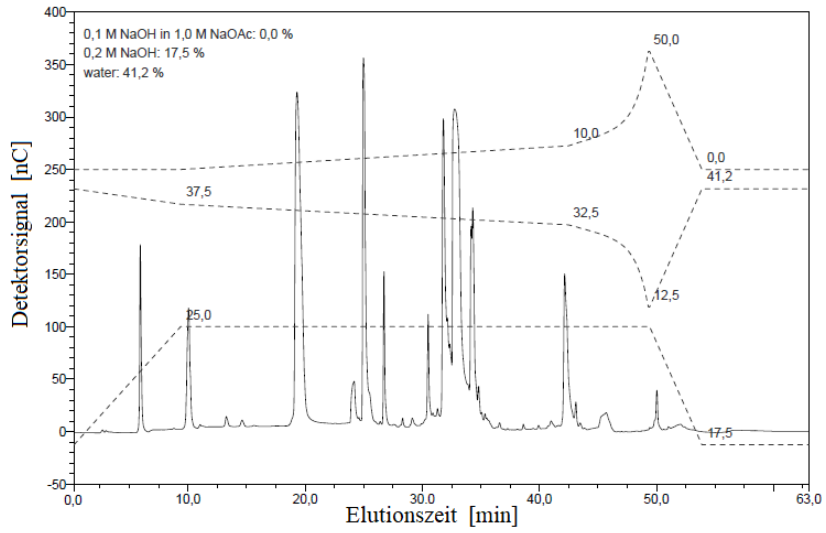


Abbildung 4.27: HPAEC Chromatogramm der LH-20 Fraktion 14 im Vergleich zu den Xylooligosaccharid-Standards DP2-6



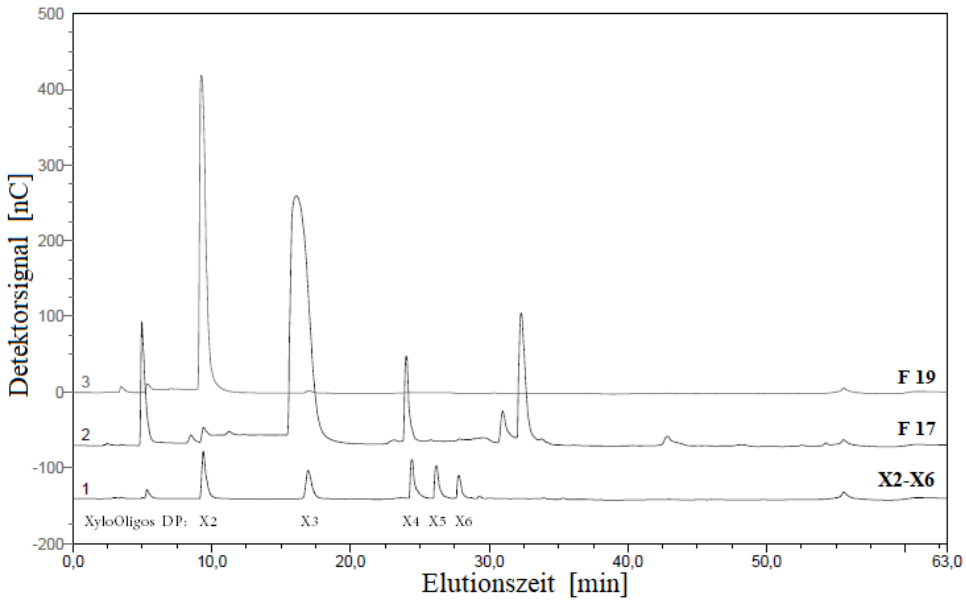
(a)



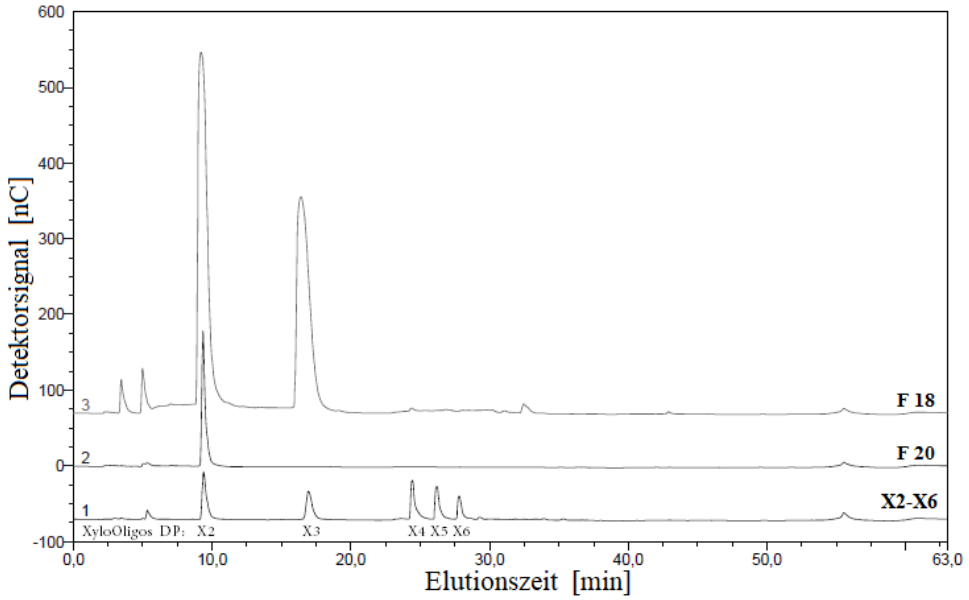
(b)

Abbildung 4.28: HPAEC Chromatogramme der a) LH-20 Fraktion 15 und b) LH-20 Fraktion 16

Die HPAEC Chromatogramme der LH-20 Fraktionen 17-20 sind in Abbildung 4.29 im Vergleich zu den Xylooligosaccharid-Standards DP2-6 dargestellt.



(a)



(b)

Abbildung 4.29: HPAEC Chromatogramme der a) LH-20 Fraktionen 17 und 19 , b) LH-20 Fraktionen 18 und 20 im Vergleich zu den Xylooligosaccharid-Standards DP2-6

Fraktion 17 weist neben einem sehr stark ausgeprägtem Signal für Xylotriose, ein Signal für Xylotetraose sowie vereinzelte Signale für Oligosacchariden größer DP4 auf.
Für Fraktion 18 ergeben sich deutliche Signale für Xylobiose und -tetraose, während Fraktion 19 und 20 ausschließlich ein Xylobiose-Signal aufweisen.

In Abbildung 4.30 sind beispielhaft HPAEC Chromatogramme der LH-20 Fraktionen 23, 24 und 25 im Vergleich zum AGX-Standrad (Arabinose/Galactose/Xylose) aufgetragen.

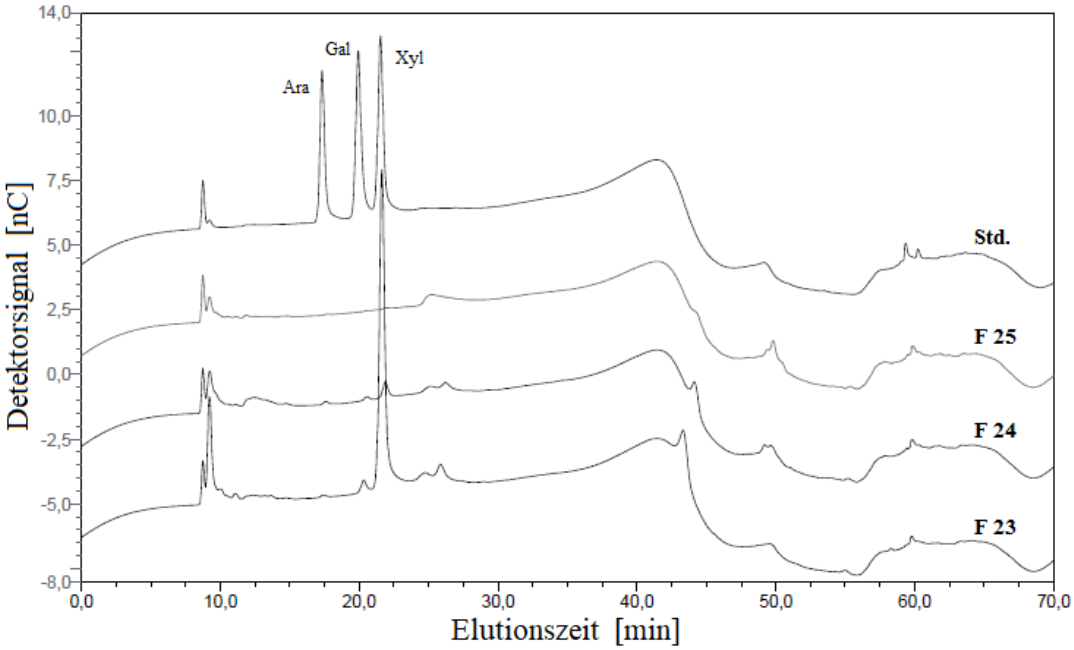


Abbildung 4.30: HPAEC Chromatogramme der LH-20 Fraktionen 23-25 im Vergleich zum AGX-Std.

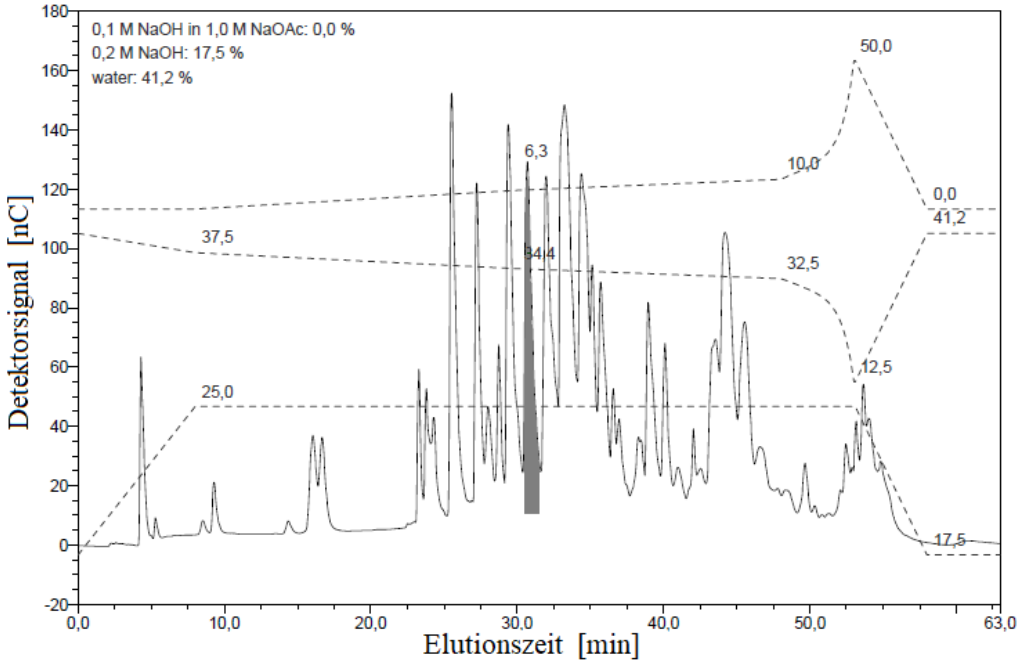
In Fraktionen 21 konnten keine Xylooligosaccharide, dafür jedoch Xylose detektiert werden. Fraktion 24 zeigt lediglich ein kaum detektierbares Signal im Bereich von Xylose, während in Fraktion 25 weder Oligo- noch Monosaccharide nachgewiesen werden konnten. Arabinose konnte in keiner Fraktion nachgewiesen werden.

Wie sich zeigt, weisen die Fraktionen 11-16 eine große Bandbreite an Oligosacchariden auf. In Fraktion 10 konnten, mit Ausnahme eines sehr breiten Signals im Verlauf des 2. NaOAc-Gradienten (D:10-50 %; Spülschritt), kaum Signale ermittelt werden.

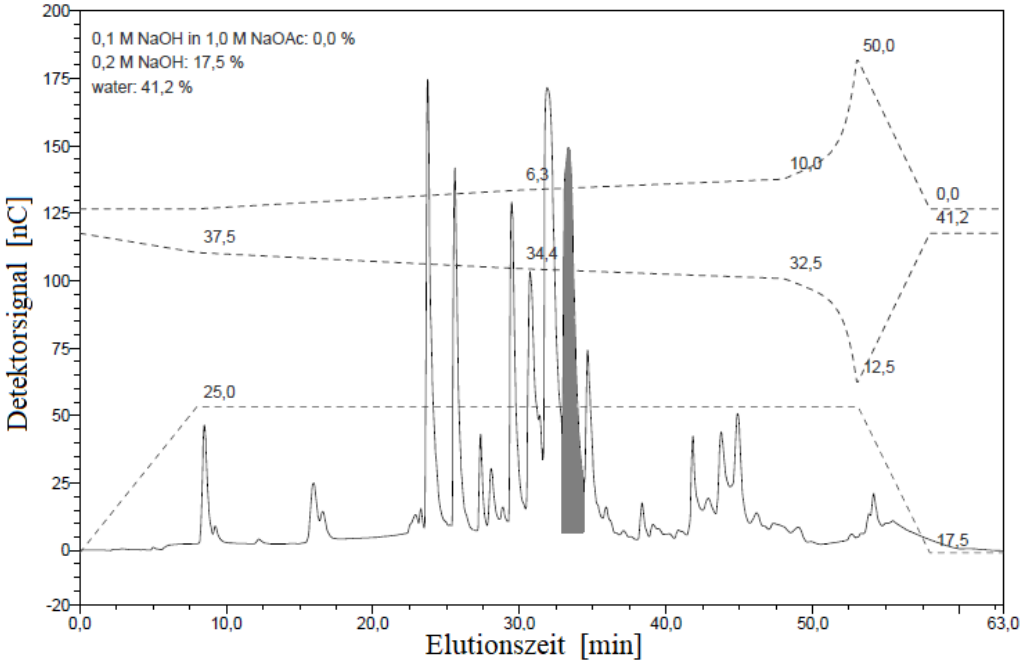
Tabelle 4.7: Übersicht der in den LH-20 Fraktionen mittels HPAEC nachgewiesenen Mono- und Xylooligosaccharide

	Xylose	**Xylooligosaccharide**					
		DP2	**DP3**	**DP4**	**DP5**	**DP6**	**>DP6**
Fraktion 11+12	-	+	+	+	+	+	+
Fraktion 13	-	-	-	+	+	+	+
Fraktion 14+15	-	-	+	+	+	+	+
Fraktion 16	-	+	+	+	+	+	+
Fraktion 17	-	-	+	+	-	-	-
Fraktion 18	-	+	+	-	-	-	-
Fraktion 19+20	-	+	-	-	-	-	-
Fraktion 21-23	+	-	-	-	-	-	-

Um eine Charakterisierung der Xylooligosaccharide zu ermöglichen wurden ausgewählte Probenbestandteile anhand des ED-Signal händisch aufgefangen.
Hierzu zählten die in Abbildung 4.31 (a) und (b) grau markierten Peaks, im folgenden als „LH-20 F14 - ICS P 13“ (RT: 30,8 min) bzw. „LH-20 F15 - ICS P 5“ (RT: 33,3 min) bezeichnet (RT (X6): 27,1 min). Es ist anzumerken, dass die jeweiligen Probenbestandteile unmittelbar nacheinander eluieren und die ED-Signale z.T. direkt ineinander übergehen, da der NaOAc-Gradient zur Separation der Xylooligosaccharide sehr flach ist.



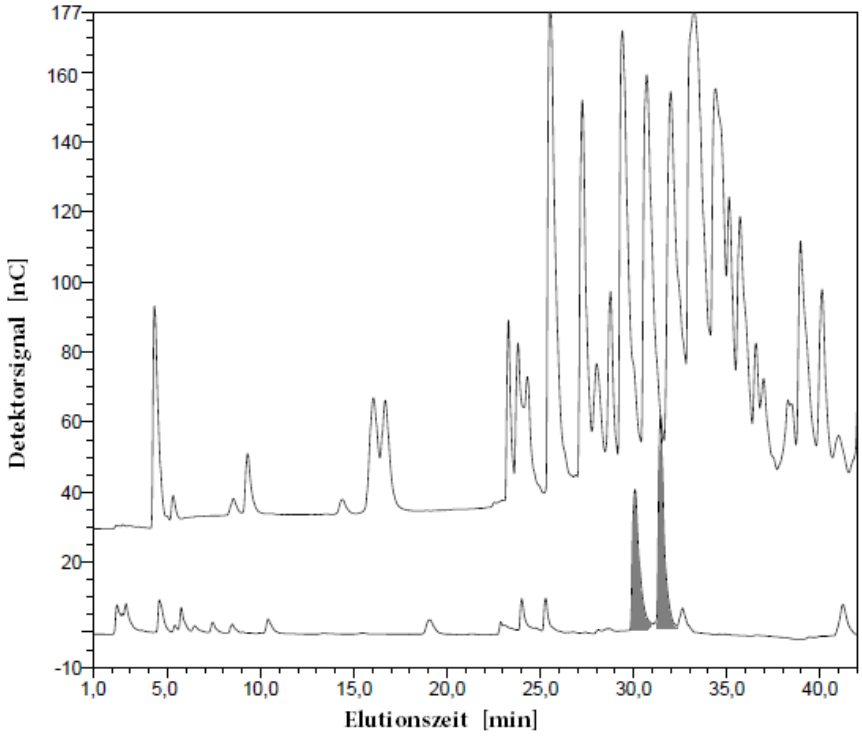
(a)



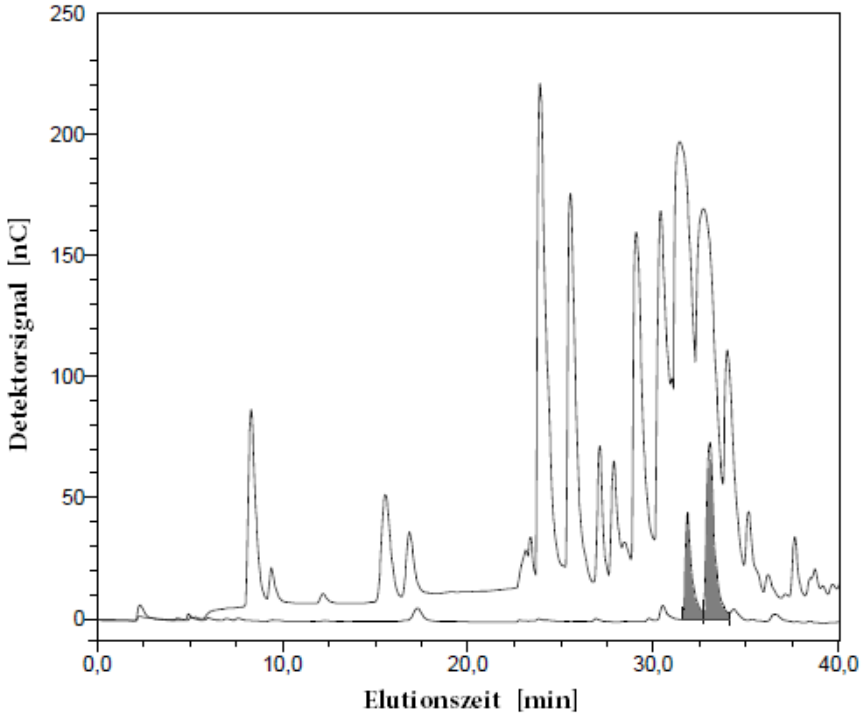
(b)

Abbildung 4.31: HPAEC Chromatogramm: (a) LH-20 Fraktion 14 und (b) LH-20 Fraktion 15; die grau gekennzeichneten Probenbestandteile wurden aufgefangen

Wie in Abbildung 4.32 zu sehen, konnten in den reinjizierten Proben nicht nur die jeweils ausgewählten HPAEC-Peaks detektiert werden. Neben den unmittelbar zuvor oder danach eluierten Probenbestandteile konnten insbesondere in der Probe „LH-20 F14 - ICS P 13“ schwache Signale für Probenbestandteilen mit einer deutlich geringeren Retentionszeit detektiert werden.



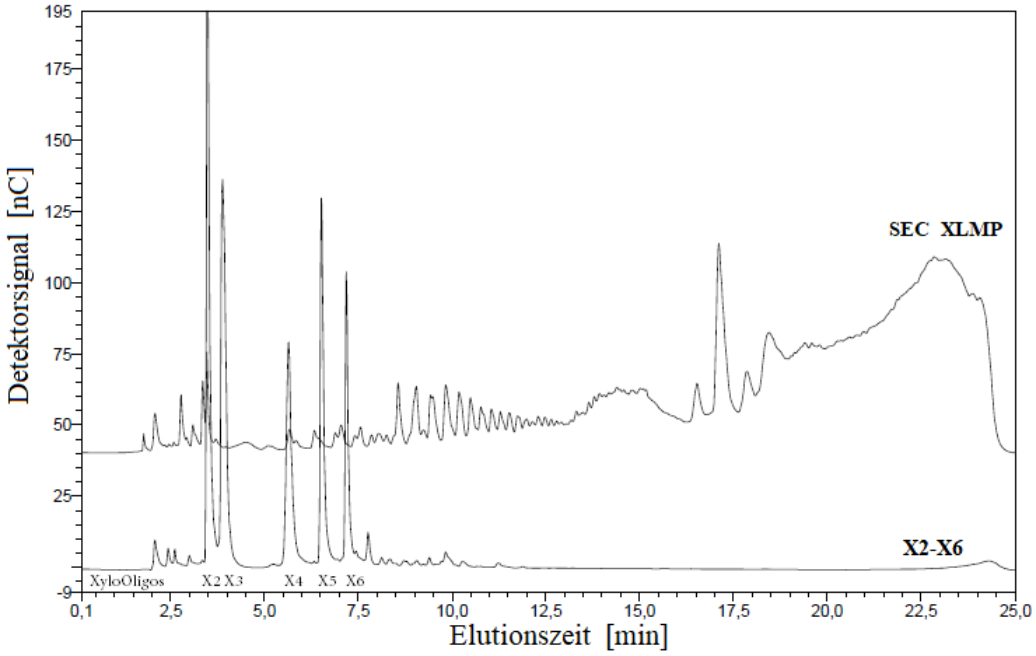
(a)



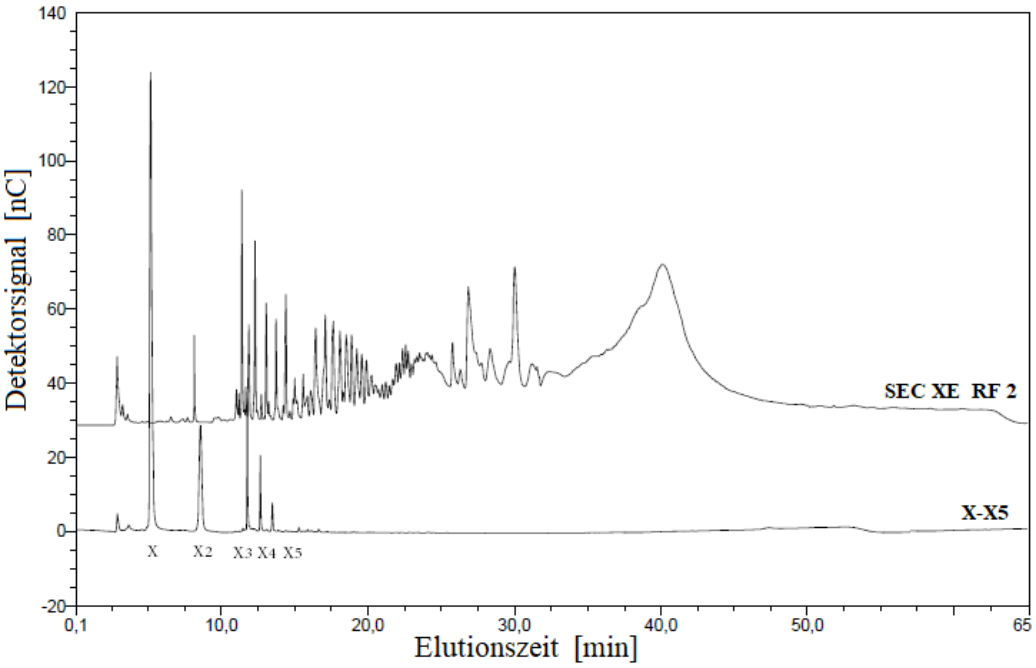
(b)

Abbildung 4.32: HPAEC Chromatogramm der reinjizierten ICS Peaks: (a) LH-20 F14 - ICS P 13 und (b) LH-20 F15 - ICS P 5

Neben den LH-20 Fraktionen (Xylan-Hydrolysate) wurden ferner die vereinten Superdex 75 prep Fraktionen 56-68 (≡ 58-70 ml) mittels HPAEC hinsichtlich ihrer (Xylo)-Oligosaccharid-Zusammensetzung untersucht. Abbildung 4.33 zeigt bespielhaft die Elutionsprofile der SEC-Fraktionen der Xylan-Proben „XLMP“ und „XE RR 2“. Es handelt sich dabei um Voruntersuchungen hinsichtlich der Fraktionierung von Xylooligosacchariden.
In beiden HPAEC-Chromatogrammen konnten vereinzelt Signale für (Xylo)-Oligosaccharide detektiert werden.



(a)



(b)

Abbildung 4.33: HPAEC Chromatogramme der Superdex 75 prep Fraktionen 56-68 der Xylan-Proben: (a) XLMP: enzymatisch behandelt, und (b) XE RF 2: alkalisch extrahiert

4.3.1 ESI-MS-Spektren

Im Folgenden sind zunächst beispielhaft ESI-MS-Spektren der LH-20 Fraktionen 13-16 abgebildet. Die Aufnahme der Spektren erfolgte im positiven Modus.
Trotz fehlender Vortrennung konnten einzelne Komponenten eindeutig als Natrium-Addukte ($[M+Na]^+$, $[M+2Na]^+$) detektiert und nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die LH-20 Fraktionen eine weite Bandbreite an Signalen von m/z 269-1361 hervorrufen. Bei dem Signal mit m/z 409 handelt es sich um eine Kontamination im Spektrometer.

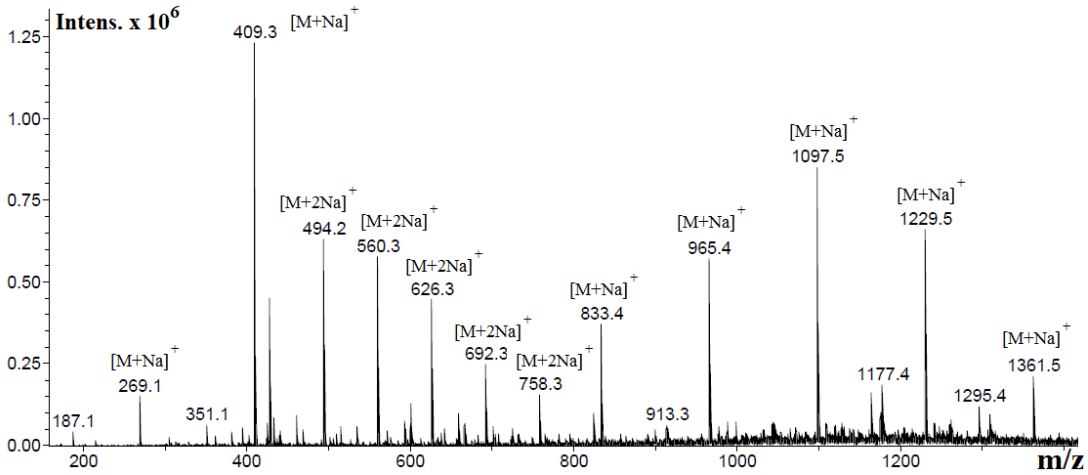


Abbildung 4.34: ESI-MS Spektrum der LH-20 Fraktion 13 (100 µg/ml); tune 1000

Das in 4.34 abgebildete ESI-MS Spektrum der LH-20 Fraktion 13 weist als Hauptkomponenten die Quasi-Molekülionen m/z 1097 ($C_{40}H_{66}O_{33}$+Na) und m/z 1229 (bzw. $C_{45}H_{74}O_{37}$+Na) auf. Darüber hinaus wurden Natrium-Addukte mit m/z 833, 965 und 1361 $[M+Na]^+$ sowie m/z 494, 560, 626 und 692 $[M+2Na]^+$ detektiert.
Abbildung 4.35 stellt beispielhaft ein ESI-MS Spektrum der LH-20 Fraktion 14 dar. Als Hauptkomponente kann ein Quasi-Molekülion mit m/z 833 $[M+Na]^+$ ausgemacht werden, welches formal der Summenformel $C_{30}H_{50}O_{25}$+Na entspricht. Des Weiteren ergeben sich Natrium-Addukte bei m/z 701, 965 und 1097 $[M+Na]^+$ sowie m/z 428, 494 und 560 $[M+2Na]^+$.

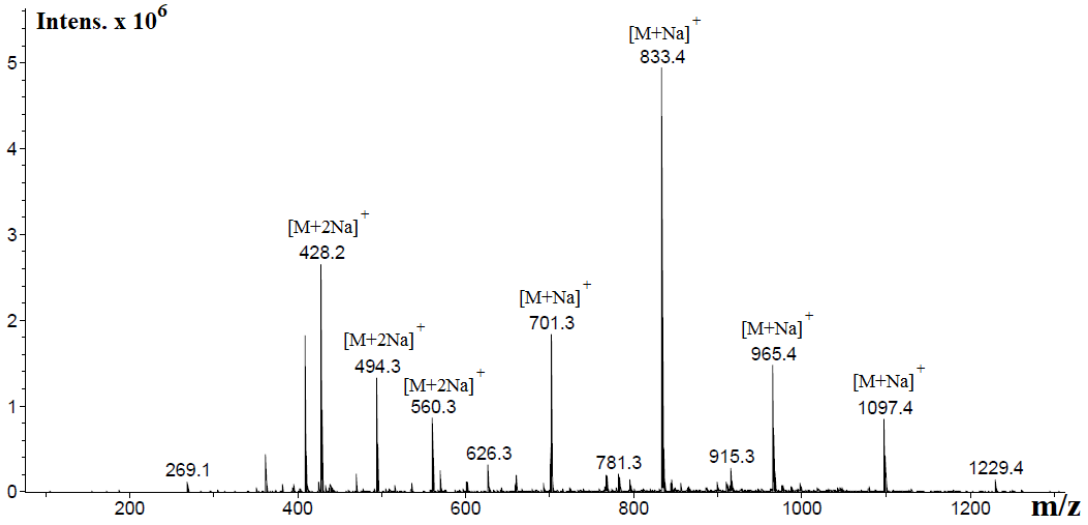


Abbildung 4.35: ESI-MS Spektrum der LH-20 Fraktion 14 (100 µg/ml); tune 1000

Für die LH-20 Fraktion 15 (s. Seite 62) konnten Quasi-Molekülionen mit einem m/z 701 $[M+Na]^+$ und m/z 833 $[M+Na]^+$ als Hauptkomponenten detektiert werden (Abb. 4.36). Dies entspricht einer Summenformel von $C_{25}H_{42}O_{21}$+Na respektive $C_{30}H_{50}O_{25}$+Na. Ferner weist das Spektrum Signale bei m/z 569 und 965 $[M+Na]^+$ als auch bei m/z 362, 428 und 494 $[M+2Na]^+$ auf.

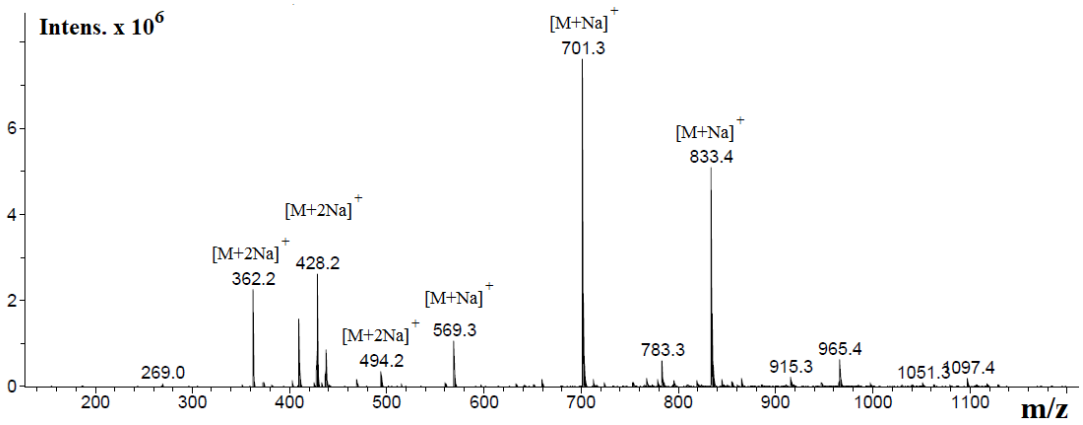


Abbildung 4.36: ESI-MS Spektrum der LH-20 Fraktion 15 (100 µg/ml); tune 1000

Das ESI-MS Spektrum der LH-20 Fraktion 16 (s. Seite 62) zeigt ebenfalls zwei Hauptkomponenten (Abb. 4.37). Dabei handelt es sich um die Quasi-Molekülionen mit einem m/z 437 $[M+Na]^+$ und m/z 701 $[M+Na]^+$, welche einer Summenformel von $C_{15}H_{26}O_{13}$+Na bzw. $C_{25}H_{42}O_{21}$+Na entsprechen. Darüber hinaus ergeben sich Natrium-Addukte bei m/z 305, 409, 569 und 965 $[M+Na]^+$ sowie m/z 362 $[M+2Na]^+$.

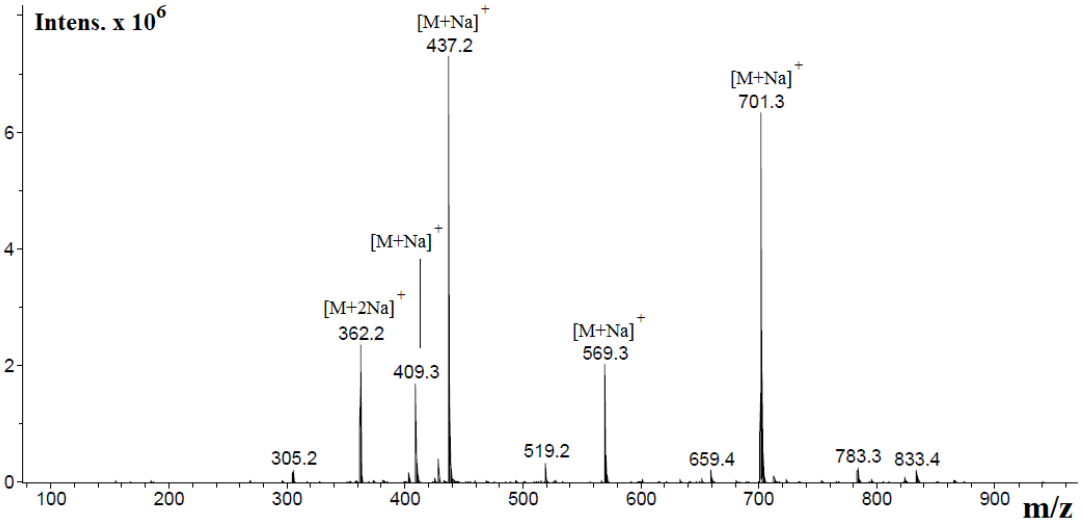


Abbildung 4.37: ESI-MS Spektrum der LH-20 Fraktion 16 (117 µg/ml); tune 1000

Zusätzlich zu den ESI-MS Untersuchungen der LH-20 Fraktionen wurden beispielhaft einzelne Quasi-Molekülionen der Fraktion 13, 14 und 16 (s. Seite 62) mittels ESI-MS/MS untersucht, um deren Zuordnung anhand des Fragmentierungsmusters verifizieren zu können. In Abbildung 4.38, 4.39 und 4.40 sind beispielhaft Spektren der jeweiligen MS2-Daten dargestellt.

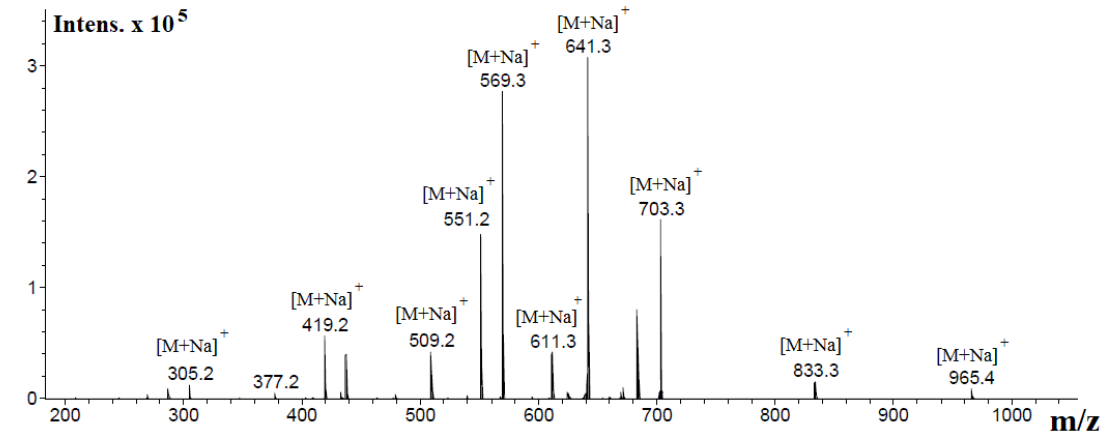


Abbildung 4.38: ESI-MS/MS Spektrum 701 m/z der LH-20 Fraktion 14; tune 1000

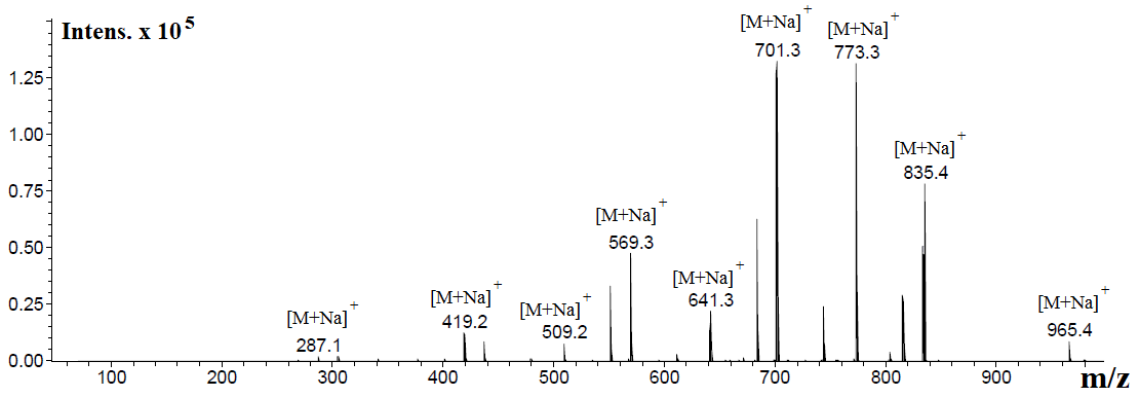


Abbildung 4.39: ESI-MS/MS Spektrum 833 m/z der LH-20 Fraktion 16; tune 701

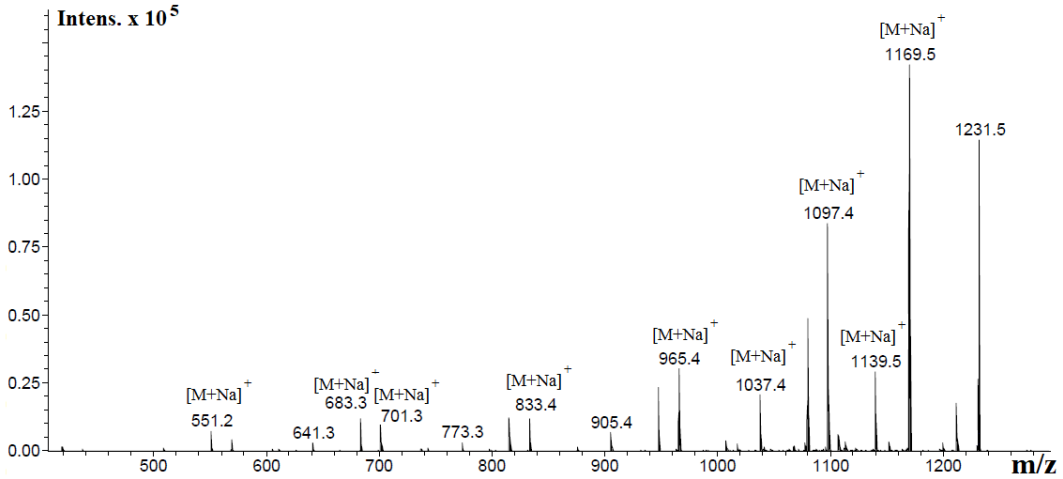


Abbildung 4.40: ESI-MS/MS Spektrum 1229 m/z der LH-20 Fraktion 13; tune 1000

In allen drei ESI-MS/MS Spektren sind Ionenserien zu erkennen, die eine Differenz von m/z 132 aufweisen, wie z.B.: m/z 1229 - 1097 - 965 - 833 - 701 - 569 - 437 - 305.

Ferner ergeben sich Ionenserien mit einer Differenz von m/z 150 wie: m/z 1229 - 1099, m/z 965 - 815, m/z 833 - 683, m/z 701 - 551, m/z 569 - 419 oder m/z 437 - 287.

Beide Fragmentierungsmuster entsprechen der für Xylooligosaccharide typischen Y,B- und Z,C-Ionenserien. [80, 81, 113]

Darüber hinaus konnten sowohl Ionenserien mit einer Differenz von m/z 60 (m/z 701 - 641, m/z 569 - 509) als auch Ionenserien mit einer Differenz von m/z 90 (m/z 1229 - 1139, m/z 701 - 611) detektiert werden.

Insgesamt konnten in den ESI-MS-Spektren folgende Signale detektiert werden:

Tabelle 4.8: Zuordnung der als Natrium-Addukte ermittelten ESI-MS-Daten der LH-20 Fraktionen 13-16; Natrium-Addukte in **fett** wurden via ESI-MS/MS untersucht

		F 13	**F 14**	**F 15**	**F 16**	Summenformel
$[M+Na]^+$	305 m/z	-	-	-	+	$C_{10}H_{18}O_9$+Na
$[M+2Na]^+$	362 m/z	-	-	+	+	$C_{25}H_{42}O_{21}$+2Na
$[M+2Na]^+$	428 m/z	+	++	+	-	$C_{30}H_{50}O_{25}$+2Na
$[M+Na]^+$	437 m/z	-	-	+	++	$C_{15}H_{26}O_{13}$+Na
$[M+2Na]^+$	494 m/z	+	+	+	-	$C_{35}H_{58}O_{29}$+2Na
$[M+2Na]^+$	560 m/z	+	+	+	-	$C_{40}H_{66}O_{33}$+2Na
$[M+Na]^+$	569 m/z	-	+	+	+	$C_{20}H_{34}O_{17}$+Na
$[M+2Na]^+$	626 m/z	+	+	-	-	$C_{45}H_{74}O_{37}$+2Na
$[M+2Na]^+$	692 m/z	+	-	-	-	$C_{50}H_{82}O_{41}$+2Na
$[M+Na]^+$	**701 m/z**	+	+	++	++	$C_{25}H_{42}O_{21}$+Na
$[M+Na]^+$	**833 m/z**	+	++	++	+	$C_{30}H_{50}O_{25}$+Na
$[M+Na]^+$	965 m/z	+	+	+	+	$C_{35}H_{58}O_{29}$+Na
$[M+Na]^+$	**1097 m/z**	++	+	-	-	$C_{40}H_{66}O_{33}$+Na
$[M+Na]^+$	**1229 m/z**	++	+	-	-	$C_{45}H_{74}O_{37}$+Na
$[M+Na]^+$	**1361 m/z**	+	+	-	-	$C_{50}H_{82}O_{41}$+Na

- nicht in der jeweiligen Fraktion detektiert
+ in der jeweiligen Fraktion detektiert
++ als ein Hauptpeak der jeweiligen Fraktion detektiert

Daraus ergeben sich folgende Strukturvorschläge für die als Natrium-Addukte detektierte Komponenten der LH-20 Fraktionen:

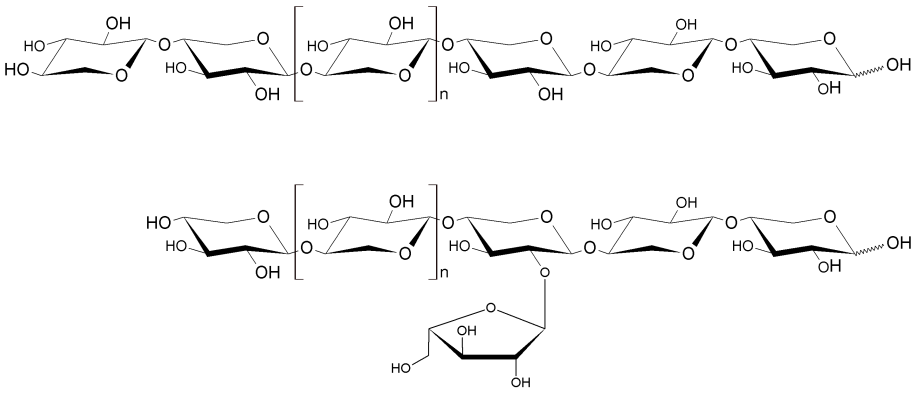


Abbildung 4.41: Strukturvorschläge für (m/z 833): $C_{30}H_{50}O_{25}$, n=1; (m/z 1097): $C_{40}H_{66}O_{33}$, n=3; (m/z 1229): $C_{45}H_{74}O_{37}$, n=4

Neben den LH-20 Fraktionen wurden die mit HPAEC aufgetrennten Xylooligosaccharide „LH-20 F14 - ICS P 13“ und „LH-20 F15 - ICS P 5“ mittels ESI-MS, MS2 und MS3 untersucht. Die einzelnen Spektren sind im Folgenden dargestellt.

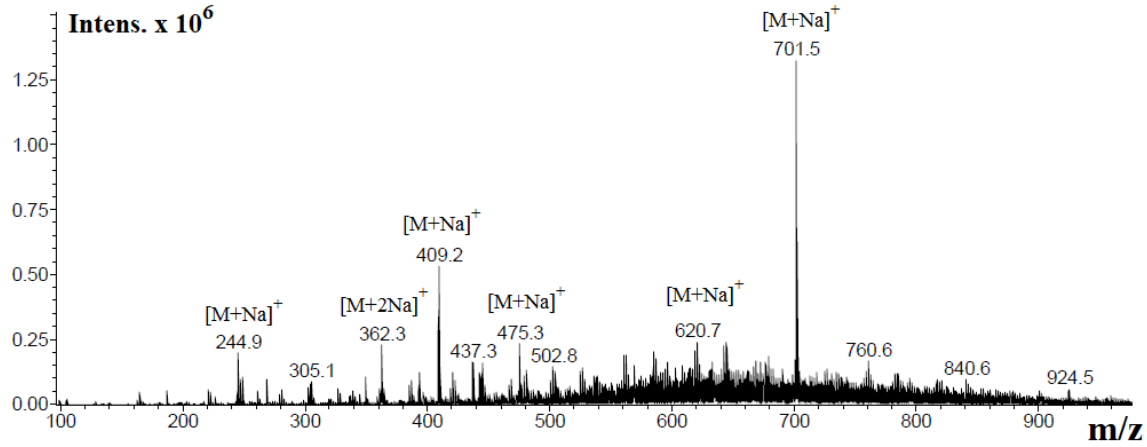


Abbildung 4.42: ESI-MS Spektrum der Probe „LH-20 F14 - ICS P 13“

Wie aus Abbildung 4.42 zu entnehmen, kann für die Probe „LH-20 F14 - ICS P 13“ ein Quasi-Molekülion mit m/z 701.5 $[M+Na]^+$ als Hauptkomponente im ESI-MS Spektrum detektiert werden. Es fällt auf, dass das vorliegende Ion einen um m/z 0.2 höheren Wert aufweist als das Quasi-Molekülion der LH-20 Fraktionen (m/z 701.3). Darüber hinaus ergeben sich Natrium-Addukte bei m/z 244.9, 437.3, 475.3 und 620.7 $[M+Na]^+$ sowie m/z 362.3 $[M+2Na]^+$.
Nach einer weiteren Fragmentierung des Quasi-Molekülion 701.5 m/z $[M+Na]^+$ konnten Natrium-Addukte bei m/z 244.9, 457.3, 591.5, 657.5 und 683.5 $[M+Na]^+$ ermittelt werden (MS2, Abb. 4.43). Das Ion bei m/z 683.5 weist mit Abstand die größte Intensität auf und entspricht einem Verlust von m/z 18, was auf die Abspaltung von H_2O deutet.
Die für Xylooligosaccharide typische Y,B- und Z,C-Ionenserie, welche dem Fragmentierungsmuster der LH-20 Fraktionen zugrunde lag, ist nicht zu erkennen.

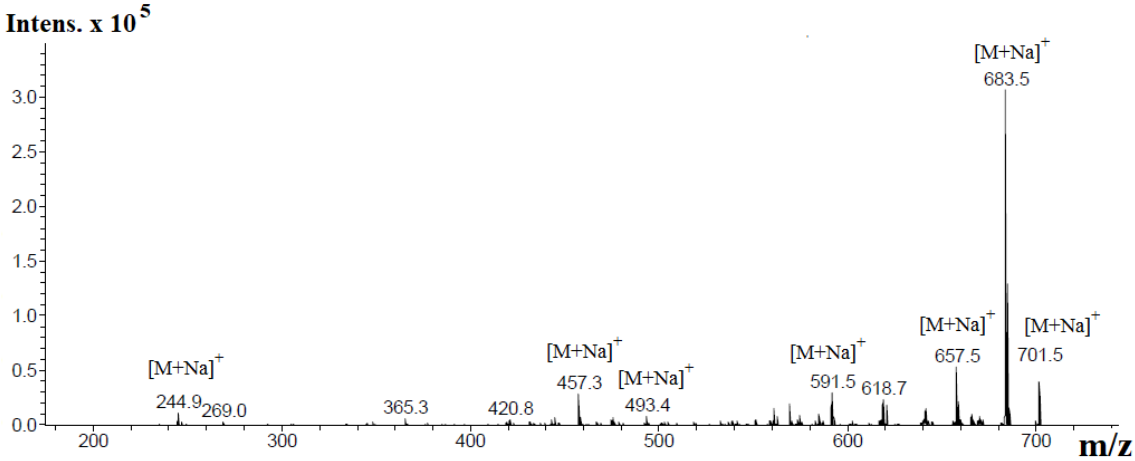


Abbildung 4.43: ESI-MS/MS Spektrum 701 m/z der Probe „LH-20 F14 - ICS P 13“

Das ESI-MS Spektrum der Probe „LH-20 F15 - ICS P 5“ weist als Hauptkomponenten die Quasi-Molekülionen m/z 701.6 $[M+Na]^+$ und m/z 362.3 $[M+2Na]^+$ auf. Ferner liegen Signale mit m/z 269.1, 475.4, 569.3 und 833.3 $[M+Na]^+$ sowie m/z 428.2 $[M+2Na]^+$ vor.
Im Vergleich zu den Quasi-Molekülion m/z 701.3 $[M+Na]^+$ der LH-20 Fraktionen ergibt sich mit m/z 701.6 $[M+Na]^+$ auch hier ein höhere m/z-Wert (Δ m/z 0.3), welcher nicht in die Xylooligosaccharid-Serie passt. Eine genauere Betrachtung des Signals zeigt, dass die Ausbildung einer Schulter für m/z 701.23 $[M+Na]^+$ erkennbar ist.

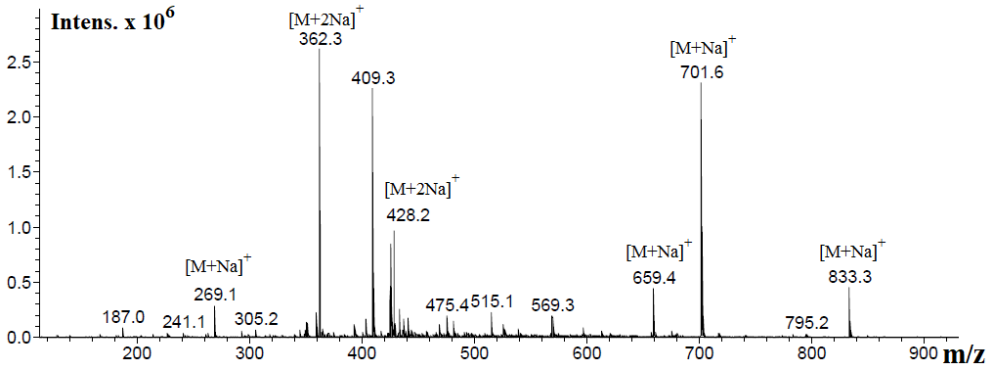


Abbildung 4.44: ESI-MS Spektrum der Probe „LH-20 F15 - ICS P 5“

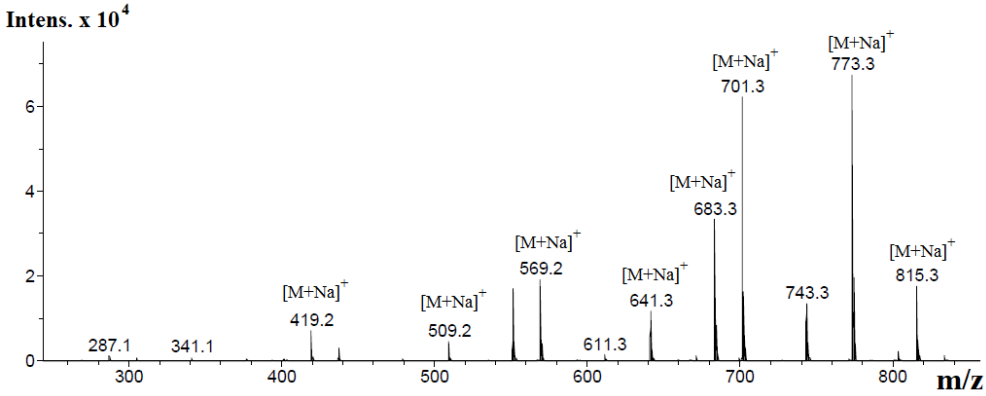


Abbildung 4.45: ESI-MS/MS Spektrum 833 m/z der Probe „LH-20 F15 - ICS P 5“

Ebenso wie bei Probe „LH-20 F14 - ICS P 13“ ist im Fragmentierunsmuster von m/z 701.6 nicht die für XO typische Y,B- und Z,C-Ionenserie zu erkennen. Stattdessen konnten erneut Natrium-Addukte bei m/z 457.4, 569.2, 591.6, 641.3, 657.6 und 683.6 $[M+Na]^+$ ermittelt werden, wobei das Quasi-Molekülion mit m/z 683.6 die höchste Intensität aufwies.
Im Fall des Quasi-Molekülion m/z 362.3 $[M+2Na]^+$ ergibt sich im MS2 zunächst das Quasi-Molekülion m/z 701.6, welches im MS3 zu m/z 365.4, 457.4. 591.6, 675.6 und 683.6 $[M+2Na]^+$ fragmentiert. Die Ionen bei m/z 683.6 und 675.6 handelt es sich je um einen Verlust von m/z 18, was auf die Abspaltung von H_2O deutet.
Das ebenfalls in Probe „LH-20 F15 - ICS P 5“ enthaltene Quasi-Molekülion m/z 833.3 $[M+Na]^+$ hingegen zeigt, wie in Abbildung 4.45 zu sehen, die typische Y,B- und Z,C-Ionenserie. So sind im ESI-MS/MS Spektrum Ionenserien mit einer Differenz von m/z 132 (m/z 833 - 701 - 569 - 437) und m/z 150 (m/z 833 - 683, 701 - 551, 569 - 419) zu erkennen. Ferner ergeben sich Signale mit einer Differenz von m/z 60 (m/z 833 - 773, 701 - 641).

4.3.2 NMR von Xylooligosacchariden

Die Probe „LH-20 Fraktion 15 - ICS Peak 5“ wurde beispielhaft mittels NMR Spektroskopie untersucht, um einen ersten Überblick hinsichtlich der Xylooligosaccharid-Struktur zu erhalten. Aufgrund der geringen Probemenge war keine aussagekräftig interpretierbare Integration möglich, zudem liegt keine Kalibration vor. Die NMR-Daten eignen sich demnach nur für eine erste Orientierung. Abbildung 4.46 zeigt einen Ausschnitt des HSQC-Spektrums.

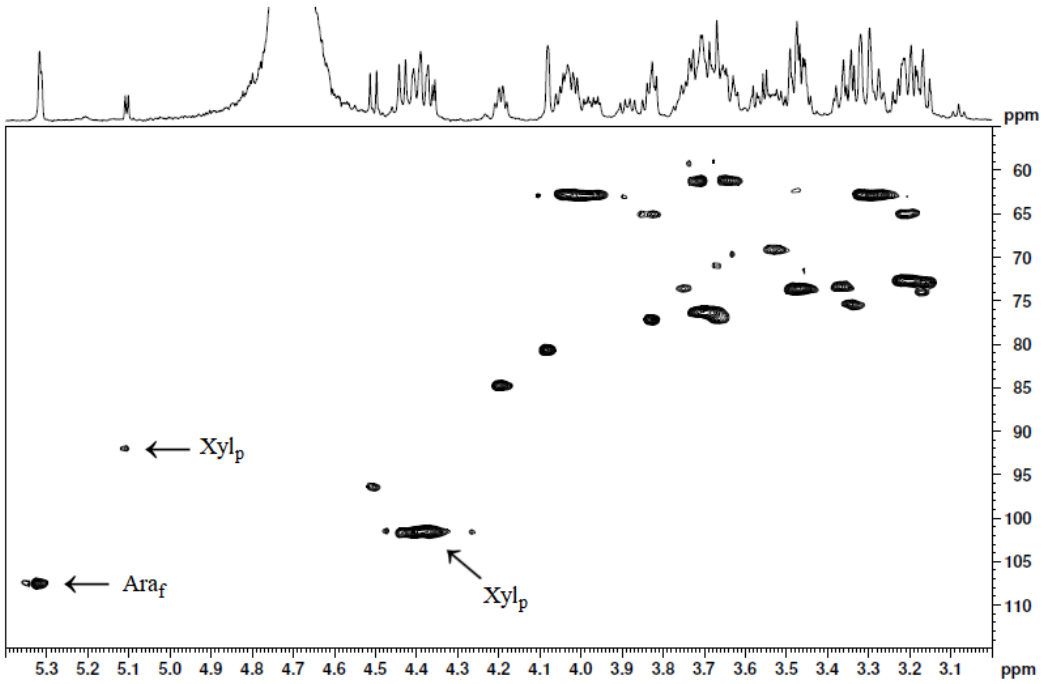


Abbildung 4.46: HSQC-Spektrum der LH-20 F 15 P 5;chemische Verschiebung in ppm

Die Aufspaltung der Korrelationspeaks bei 5,11 / 91,9 ppm und 4,50 / 96,4 ppm deuten auf eine α- und β-Anomerie der reduzierenden Xylopyranose-Einheit. Durch Integration der Peaks lässt sich das Anomeren-Verhältnis für α:β auf etwa 40:60 schätzen.
Des Weiteren ergeben sich im Bereich von 4,39 / 101,5 ppm Korrelationspeaks für die endo-Xylopyranosen (Xyl$_{pe}$) und die terminale Xyopyranose (Xyl$_{pt}$, nicht reduzierendes Ende). Der Korrelationspeak bei 5,32 / 107,6 ppm kann einer Arabinofuranose (Ara$_f$) zugeordnet werden.

Tabelle 4.9: LH-20 F 15 ICS Peak 5: chemische Verschiebung in ppm

	α-L-Ara*f*	α-D-Xyl*p*, reduzierend	β-D-Xyl*p*, reduzierend	β-D-Xyl*p*
H-1	5.32	5.11	4.50	4.39
C-1	107.6	91.9	96.4	101.5

4.4 Biomedizinische Untersuchungen

Sowohl klinische Infektionskrankheiten als auch die zunehmende Antibiotikaresistenz von Bakterien sind globale Probleme, welche immer weiter im Fokus von Forschung und Entwicklung stehen. Neben der Untersuchung diverser Infektionserreger stellt die Suche nach therapeutischen Hemmstoffen einen Schwerpunkt vieler Studien dar.
Mehrere Veröffentlichungen in Bezug auf Bioaktivität sowie prebiotischer Wirkung von Oligosaccharide zeigen, dass diese immunmodulatorische Wirkungen besitzen [8, 9] und der Zusatz von Xylooligosacchariden eine Verringerung der IFN-γ, TNF-α, IL-6 und IL-1β Sekretion hervorruft [10–12]. Jedoch waren die untersuchten Xylooligosaccharid-Gemische nicht charakterisiert. Als Polymerisationsgrad wurde DP2-6 angegeben.
In der Literatur sind zudem antimikrobielle, anti-biofilm sowie anti-adhäsive Wirkungen von Xylooligosaccharid-Gemischen beschrieben [14, 15]. Der Einsatz von Oligosacchariden stellt eine mögliche Alternative zu Antibiotika dar. Sie inhibieren die Adhäsion des Bakteriums ohne dieses zu töten und die Ausbildung von Stressfaktoren und Resistenzen zu forcieren. Darüber hinaus konnte in einigen Fällen die Ausbildung von Biofilmen unterdrückt werden, welche den Mikroorganismen als Schutzbarriere vor Antibiotika oder einer Immunabwehr dienen [13].
Im Rahmen dieser Arbeit sollten mittels gezielter enzymatischer Hydrolyse von Xylan und anschließender chromatographischer Trennung (SEC, AEC) Xylooligosaccharid-Fraktionen mit definiertem DP hergestellt werden. Die isolierten Xylooligosaccharide sollten ferner hinsichtlich potentieller Anwendungen in der Biomedizin untersucht werden.

4.4.1 Immunmodulatorische Effekte

Im Hinblick auf immunmodulatorische Effekte von Xylan oder Xylooligosacchariden wurden im Forschungszentrum Borstel Stimulationsversuche an humanen mononukleären Zellen (MNC) durchgeführt und die Konzentration an sekretiertem TNF-alpha bestimmt (siehe Kapitel 3.6.3).
Ziel war es, zu untersuchen, ob der Zusatz von Xylan- respektive Xylooligosacchariden die durch LPS stimulierte Sekretion von TNF-alpha hemmt.
Die Versuchsreihen erfolgten sowohl in Kombination mit LPS *S. enterica* R60 als auch ohne den Zusatz von LPS, um zu überprüfen ob die Proben bereits aufgrund von Kontaminationen mit Endotoxinen die Sekretion von TNF-alpha stimulieren.
Neben den Xylan-Proben „XE RF 1“ und „XE RF 2“ wurden folgende Xylooligosaccharid-Fraktionen untersucht: LH-20 Fraktion 13 (DP5-10), LH-20 Fraktion 14 (DP4-9) und LH-20 Fraktion 15 (DP3-7). Ferner erfolgten Versuchsreihen unter Zusatz der isolierten Xylooligosaccharide „LH-20 Fraktion 14 - ICS Peak 13“, „LH-20 Fraktion 14 - ICS Peak 13B“ und „LH-20 Fraktion 15 - ICS Peak 5“.

In Abbildung 4.47 sind die ermittelten TNF-alpha Konzentrationen der verschiedenen Stimulationstests dargestellt.

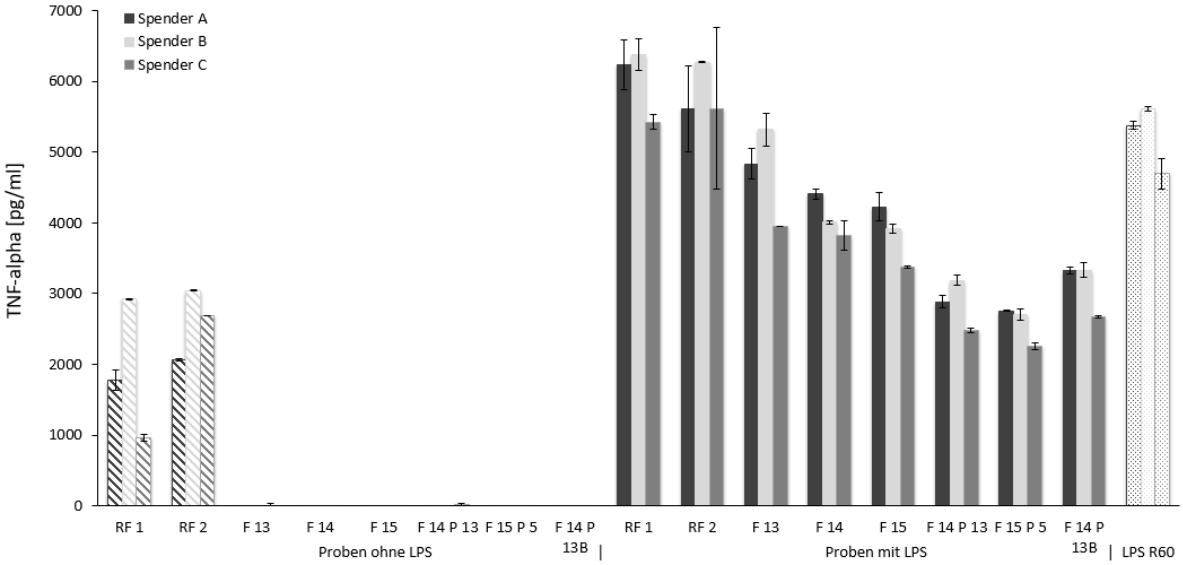


Abbildung 4.47: Einfluss von Xylan- und Xylooligosaccharid-Proben auf die TNF-alpha Sekretion von MNCs; mit und ohne den Zusatz von LPS *S. enterica* R60

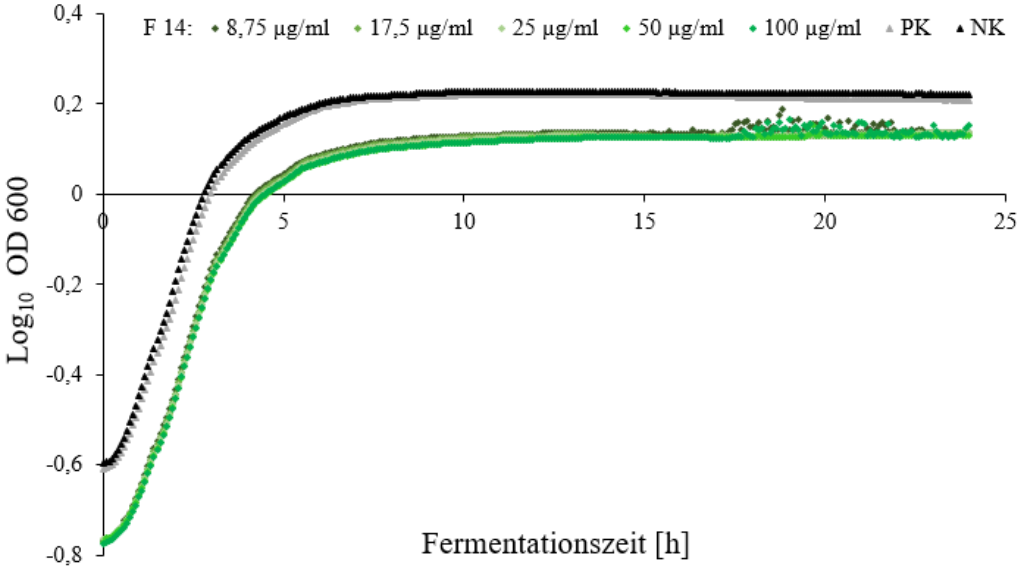
Es ist deutlich zu erkennen, dass die LH-20 Fraktionen 13-15 sowie die isolierten Xylooligosaccharide „LH-20 Fraktion 14 - ICS Peak 13“, „LH-20 Fraktion 14 - ICS Peak 13B“ und „LH-20 Fraktion 15 - ICS Peak 5“ keine Sekretion von TNF-alpha stimulieren.
Bei den Xylan-Proben „XE RF 1“ und „XE RF 2“ konnte hingegen eine TNF-alpha Konzentration zwischen 1000 und 3000 pg/ml ermittelt werden. Diese Proben stimulieren somit auch ohne die Anwesenheit von LPS R60 die Sekretion von TNF-alpha.
Die Positivkontrolle LPS R60 weist eine TNF-alpha Konzentration von 4700-5600 pg/ml auf.

Im Fall der Stimulationsversuche mit LPS R60 in Kombination mit den Xylan- respektive Xylooligosaccharid-Proben fallen die ermittelten TNF-alpha Konzentration je nach Probe sehr unterschiedlich aus.
Der Zusatz der isolierten Xylooligosaccharide „LH-20 Fraktion 14 - ICS Peak 13“, „LH-20 Fraktion 14 - ICS Peak 13B“ und „LH-20 Fraktion 15 - ICS Peak 5“ bewirkt eine deutlich Verringerung der TNF-alpha Konzentration (2250-3320 pg/ml) im Vergleich zur Positivkontrolle.
Unter Zusatz der LH-20 Fraktionen 14 und 15 ergeben sich mit 3370 und 4400 pg/ml ebenfalls TNF-alpha Konzentrationen, welche unter dem Wert der Positivkontrolle liegen. Die durch LPS stimulierte Sekretion von TNF-α konnte demnach gehemmt werden.
Bei der LH-20 Fraktion 13 hingegen ergibt sich mit 4000-5300 pg/ml eine TNF-alpha Konzentration im Wertebereich der Positivkontrolle.
Die Stimulationsversuche mit den Xylan-Proben „XE RF 1“ und „XE RF 2“ in Kombination mit LPS R60 weisen mit Abstand die höchsten TNF-alpha Konzentrationen auf (5400-6400 pg/ml).

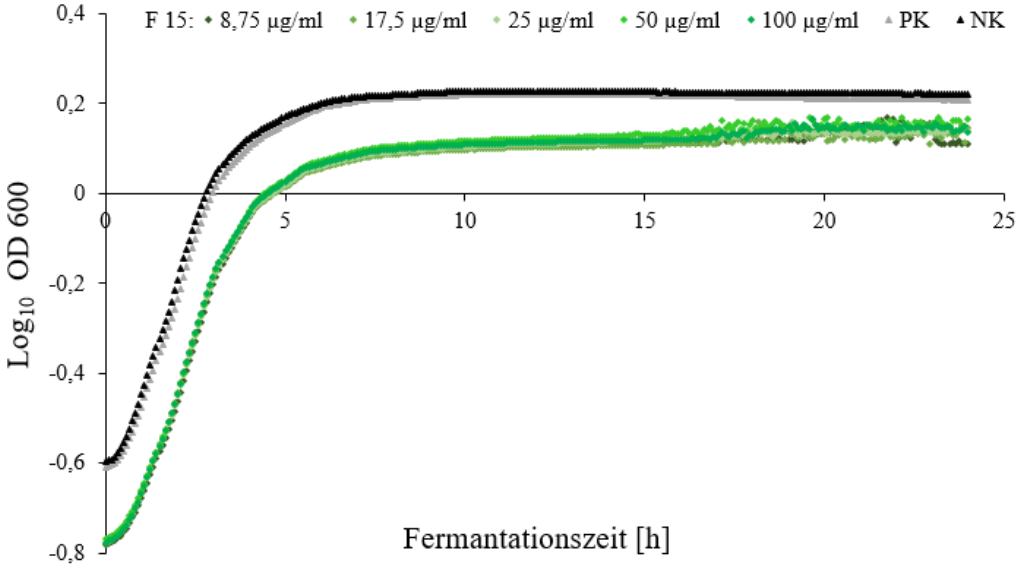
4.4.2 Effekte auf Zellwachstum und Biofilmbildung

Aufgrund der beschriebenen antimikrobiellen, anti-biofilm sowie anti-adhäsiven Wirkungen von Xylooligosacchariden [14, 15], wurde der Effekt dieser Verbindungen auf das Zellwachstum und die Biofilmbildung des pathogenen *Staphylococcus epidermidis* 1457 untersucht.
Die in der Literatur untersuchten Proben wiesen einen Polymerisationsgrad von DP<10 auf. Daher verliefen die Versuchsreihen unter Zusatz der LH-20 Fraktionen 14 (DP4-9) und 15 (DP3-7) in den Konzentrationen 8,75 µg/ml, 17,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml.

Im Folgenden ist das Zellwachstum von *Staphylococcus epidermidis* 1457 in Abhängigkeit von der Fermentationszeit halblogarithmisch dargestellt.



(a)



(b)

Abbildung 4.48: Wachstum von *S. epidermidis* 1457 unter Zusatz von LH-20 Fraktion a) 14 und b) 15 bestimmt über OD600; PK: Positivkontrolle *S. epidermidis* 1457; NK: Negativkontrolle biofilm-negative Mutante *S. epidermidis* 1457 M10

Wie in Abbildung 4.48 zu sehen, weisen die mit LH-20 Fraktionen 14 und 15 versetzten Zellen einen nahezu identischen Anstieg der optischen Dichte auf, unabhängig von der Konzentration an Xylooligosacchariden.
Unter Zusatz der LH-20 Fraktionen 14 (DP4-9) ergibt sich eine Wachstumsrate von 0,251 h^{-1}. Die mit LH-20 Fraktionen 15 (DP3-7) versetzten Zellen haben eine Wachstumsrate von 0,248 h^{-1}. Im Vergleich dazu weist die Positivkontrolle (*S. epidermidis* 1457) eine Wachstumsrate von 0,248 h^{-1} auf und die Negativkontrolle (biofilm-negative Mutante *S. epidermidis* 1457 M10) eine Wachstumsrate von 0,253 h^{-1}.

Die nach 24 h gebildete Masse an Biofilm, gemessen über die Absorption bei λ = 495 nm, ist in Abbildung 4.49 dargestellt.

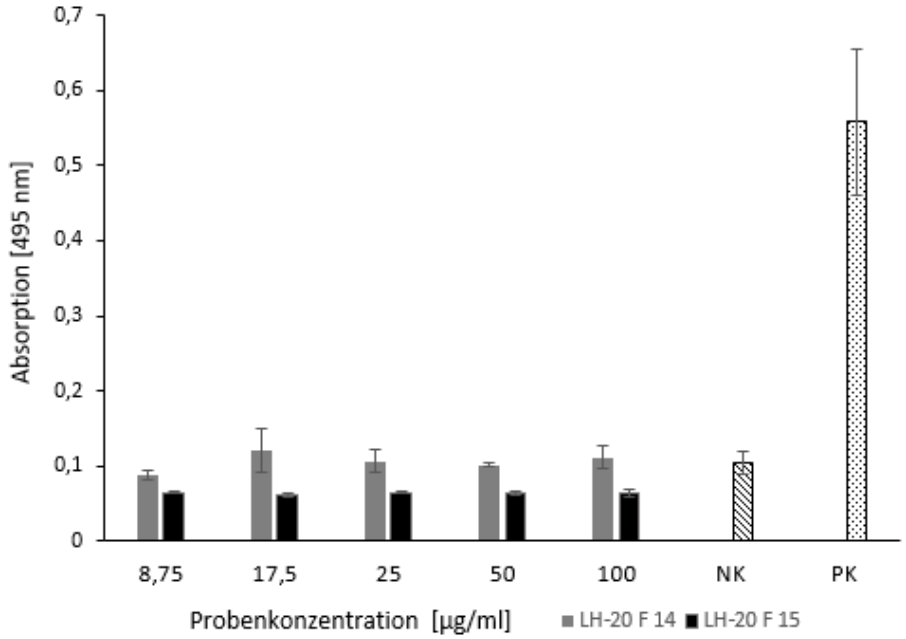


Abbildung 4.49: Biofilmbildung von *S. epidermidis* 1457 unter Zusatz von LH-20 Fraktion 14 (grau) und LH-20 Fraktion 15 (schwarz); PK: Positivkontrolle *S. epidermidis* 1457; NK: Negativkontrolle biofilm-negative Mutante *S. epidermidis* 1457 M10

Es zeigt sich, dass die Positivkontrolle mit 0,559 AU die höchste Absorption und damit die stärkste Biofilmbildung aufweist. Für die Negativkontrolle, welche keinen Biofilm bildet, resultiert eine Absorption von 0,1 AU.
Auch die mit LH-20 Fraktionen versetzten Zellen weisen sehr geringe Absorptionswerte auf. So ergeben sich für die Versuchsreihen mit Fraktion 14 Werte im Bereich von 0,09-0,12 AU und mit Fraktion 15 Werte im Bereich von 0,064 AU. Unter Zusatz von Xylooligosacchariden kann somit keine Biofilmbildung nachgewiesen werden, eine Konzentrationsabhängigkeit dieser Wirkung ist nicht zu erkennen.

5 Diskussion

Polysaccharide wie Xylane fallen als biogene Nebenprodukte bei der Verarbeitung von Einjahrespflanzen in der Agrar- und Lebensmittelindustrie in großen Mengen an. Bei der Herstellung von Haferflocken sind es Haferspelzen. Dies sind verholzte Hüllblätter der Haferkörner, welche etwa 25 bis 30 % des Gewichts von Hafer ausmachen [1, 29].
Mit 35 bis 40 % der Gesamtmasse weisen Haferspelzen einen sehr hohen Xylananteil auf. Aufgrund der relativ geringen Lignifizierung eignen sich zudem einfache Extraktionen oder Hydrolysen zur Isolierung des Xylans oder Xylooligosacchariden. [3, 4, 29].
Das aus Haferspelzen isolierte Xylan wurde bisher nur in Hinblick auf die Bildung von Hemicellulose-Pasten oder zur Anwendung in der Holz-und Papierindustrie untersucht [4, 5].
Weiterhin wurden Xylanhydrogele hinsichtlich Quellverhalten, Partikelgröße sowie der Verkapselung und Freisetzung von Proteinen untersucht [33].
Neben dem Einsatz als Hydrogel oder Werkstoffzusatz gibt es erste Untersuchungen in Richtung Bioaktivität [8, 9] und immunmodulatorischer Wirkung [10–12] von Poly- und Oligosacchairden. Jedoch waren die verwendeten Xylooligosaccharid-Gemische nicht charakterisiert.

Ziel dieser Promotionsarbeit waren Isolierung und Charakterisierung von Haferspelzen-Xylan sowie biomedizinische Anwendung definierter Xylooligosaccharide.
Im Verlauf der Arbeit sollten für die Hydrolyse des Xylans die Enzyme Xylanase, α-L-Arabinofuranosidase, Acetyl-Xylan-Esterase sowie Ferulasäure-Esterase aus dem Pilz *Trichoderma reesei* QM9414 angereichert werden, da diese zum Zeitpunkt nicht kommerziell zur Verfügung standen.

Zur Charakterisierung der Xylan-Proben wurden die Monosaccharid-Zusammensetzung sowie die Modifizierungen mit Lignin, Ferulasäure und Acetylgruppen bestimmt.
Ferner fanden qualitative Untersuchungen der Xylan-Proben mittels FT-IR Spektroskopie statt, da anhand der spezifischen Transmissionsbanden bestimmte Molekülgruppen des Xylans nachgewiesen werden können.
Die Molmassen der Xylan-Proben wurden mit unterschiedlichen SEC-Methoden bestimmt.

Die Gewinnung von Xylooligosacchariden aus Haferspelzen erfolgte durch enzymatische Hydrolyse von Xylan unter Verwendung einer kommerziellen endo-1,4-β-Xylanase (EC 3.2.1.8) mit einer Aktivität von ≥2500 U/g.
Die Hydrolysate wurden anschließend separiert, um Xylooligosaccharid-Fraktionen mit definiertem Polymerisationsgrad zu erhaltenen. Die Charakterisierung der Struktur sollte Aufschluss bezüglich möglichen Substituenten (Arabinose, Ferulasäure) geben.
Hinsichtlich der Anwendungspotentiale von Xylooligosacchariden in der Biomedizin wurden immunmodulatorische Wirkungen ausgewählter Xylooligosaccharid-Fraktionen untersucht.
Da Oligosaccharide zudem potentielle antimikrobielle Wirkungen zeigen, erfolgten Untersuchungen bezüglich der Hemmung von Wachstum und Biofilmbildung des pathogenen *Staphylococcus epidermidis* 1457.

5.1 Enzym-Expression aus *Trichoderma reesei* QM9414

Ein Aspekt dieser Arbeit war die Expression xylanolytischer Enzyme wie Xylanasen, Acetyl-Xylan-Esterasen, Ferulasäure-Esterasen und α-L-Arabinofuranosidasen, welche zur Gewinnung und Modifizierung von Xylooligosacchairden erforderlich sind.
Diverse xylanolytische Enzyme werden aus Moderfäulepilzen wie *Aspergillus* spp. oder *Trichoderma* spp expremiert und sekretiert. Mit Hilfe der Induktoren Haferspelzen-Xylan und Wiesen-Schwingel konnte die Sekretion von Xylansen, α-L-Arabinofuranosidasen, Acetyl-Xylan-Esterasen sowie Ferulasäure-Esterasen aus *T. reesei* QM9414 induziert werden [53].
Im Vergleich zu *Aspergillus* spp. weisst *T. reesei* QM9414 aber eine deutlich geringere Protease-Aktivität auf [53].
α-L-Arabinofuranosidasen wurden am CIB bereits aus dem Pilz *Trichoderma reesei* QM9414 isoliert. Dabei stellte sich heraus, dass die höchsten Aktivitäten mit Haferspelzen-Xylan und Rapsmehl als Induktor erzielt werden konnten [56].
Der Pilz *Trichoderma reesei* QM9414 wurde daher für die Expression und Sekretion xylanolytischer Enzyme ausgewählt. Als mögliche Induktor kamen neben Haferspelzen-Xylan auch Rapsmehl, gemahlener Wiesenschwingel (WS) und gemahlenes Wiesenschwingelsaatgut (WSS) zum Einsatz (β = 10 g/l). Glukose diente aufgrund der nicht induzierenden Wirkung auf die Expression xylanolytischer Enzyme als Referenz-Substrat [91, 92].
Alle Schüttelkolben-Fermentationen verliefen als Batchverfahren bei einer Temperatur von 28 °C über einen Zeitraum von zehn Tagen. Die Entwicklung der Enzym-Sekretion wurde nach 48, 72, 124, 144, 168, 216 und 240 Stunden durch Bestimmung der Enzym-Aktivität sowie der Proteinkonzentration aus dem Überstand kontrolliert.

Die ermittelten Aktivitäten zeigen, dass eine Fermentation mit Glukose keine Induktion der Enzyme Arabinofuranosidase (AraF) und Xylanase bewirkt. Im Gegensatz dazu erfordert die Verwertung von Haferspelzen-Xylan, Rapsmehl und Wiesenschwingel die Expression und Sekretion von AraF und Xylanasen.
Beim Vergleich der Entwicklung der verschiedenen Aktivitäten fällt auf, dass die Xylanase-Sekretion bei den Fermentationsansätzen mit Haferspelzen-Xylan mit 0,13 U deutlich geringer ausfällt als bei den Ansätzen mit Rapsmehl (0,30 U). Auch die Wiesenschwingel-Ansätze führen zu einem stärkeren Anstieg der Xylanase-Aktivität als in Fermentationsansätzen mit Haferspelzen-Xylan. Die maximalen Aktivitäten liegen zwischen 0,37-0,45 U.
Wenngleich das aus Haferspelzen extrahierte Xylan den vermutlich leichter zugänglichen Induktor darstellt, scheinen sowohl das Rapsmehl als auch der Wiesenschwingel in diesem Fall als stärkerer Induktor zu fungieren.
In den Untersuchungen von Smith et al. (1991) bewirkte dagegen Haferspelzen-Xylan eine um den Faktor 1,3 höhere Xylanase-Sekretion als der verwendete Wiesenschwingel [53].

Im Fall der AraF-Aktivität zeigt sich eine ähnliche Tendenz. Die Fermentationsansätze mit Wiesenschwingel weisen mit 0,20-0,25 U nach 168 h einen deutlich geringeren Anstieg der Aktivität auf als die Fermentationsansätze mit Haferspelzen-Xylan (0,36 U).
Nach einer Fermentationsdauer von 216 h stagnieren die Aktivitäten bei 0,32 U (WS) respektive 0,43 U (Xylan). Der Zusatz von Rapsmehl bewirkt mit 0,60 U eine um den Faktor 1,5 stärkere Zunahme der Aktivität hervorruft als der Zusatz von Haferspelzen-Xylan (0,43 U).
Die stärkere Induktion liegt an der Sterilisation des Nährmediums bei 121 °C. Hierdurch könnte das Rohmaterial bereits bis zu einem gewissen Punkt aufgeschlossen und die enthaltenen Hemicellulosen damit zugänglicher als Substrat für die xylanolytischen Enzyme sein. Insbesondere das im Rapsmehl enthaltene Arabinogalactan und Arabinan zeigen eine stärkere Induktion als das Arabinoxylan aus Haferspelzen [114, 115].
Insgesamt erwiesen sich hinsichtlich Induktion und Sekretion der AraF eine Fermentationsdauer von 168-216 h für Haferspelzen-Xylan und Rapsmehl respektive 216-240 h für Wiesenschwingel als ausreichend. Mit 0,60 U ergibt sich bei dem Zusatz von Rapsmehl die höchste AraF-Aktivität, während bei Haferspelzen-Xylan und Wiesenschwingel lediglich 0,43 U bzw. 0,32 U erreicht werden.

Die ermittelten Aktivitäten der Acetyl-Xylan-Esterase fallen deutlich geringer aus, als die Aktivität der Arabinofuranosidase. Den stärksten Anstieg der Aktivität weisen die Fermentationsansätze mit Rapsmehl und gemahlenen Wiesenschwingel auf, welche nach 168 h eine Aktivität von 0,13 U zeigen.
Bei der Fermentation mit Haferspelzen-Xylan und gemahlenen Wiesenschwingelsaatgut verläuft der Anstieg der Aktivität zunächst ähnlich, ab einer Fermentationsdauer von 144 h ergibt sich jedoch ein deutlicher Unterschied. Im Fall von dem gemahlenen Wiesenschwingelsaatgut steigt die AXE-Aktivität nach 168 h auf 0,07 U, während bei dem Ansatz mit Haferspelzen-Xylan 0,06 U erreicht werden. Bei allen vier Fermentationsansätze sinkt die Aktivität nach 168 h wieder ab.
Auch der Referenz-Ansatz mit Glukose zeigt nach 120 h einen Anstieg der Aktivität. Diese steigt bis zu einer Fermentationsdauer von 216 h auf 0,08 U an und bricht anschließend wieder ein. Poutanen et al. sowie Halgasová et al. induzierten die Sektretion mit Nährmedien, die Cellulose enthielten [116, 117]. Demnach scheint die Sekretion von AXE nicht, wie beispielsweise bei der AraF oder Xylanase, von der Anwesenheit des spezifischen Substrates (hier Acetyl-Substituenten) abhängig zu sein.
Insgesamt konnten mit Rapsmehl und gemahlenen Wiesenschwingel als Induktor die höchsten AXE-Aktivitäten erzielt werden.

Im Hinblick auf die ermittelten Aktivität der Ferulasäure-Esterase (FAE) fällt auf, dass der Zusatz von Glukose wider erwarten zu einem geringen Anstiege der Volumen-Aktivität führt. Da der FAE-Assay methodisch nicht absolut sicher ist und die Proteinkonzentration beim Glukose-Ansatz vergleichsweise sehr gering ausfällt, sind Matrixeffekte nicht auszuschließen. So handelt es sich bei der FAE um ein induzierbares Enzym, welches nur bei Anwesenheit von Ferulasäure-Estern induziert und sekretiert wird [53].
Bei dem Fermentationsansatz mit Wiesenschwingel ergibt sich innerhalb der ersten 168 h ein deutlicher Anstieg der FAE Volumen-Aktivität auf 0,67 U/ml, welche bis zu einer Fermentationsdauer von 216 h stabil bleibt und anschließend wieder sinkt. Die Fermentationsansätze mit Rapsmehl und Haferspelzen-Xylan weisen innerhalb der ersten 144 h einen Anstieg der Aktivität auf 0,70 U, nach über 168 h bricht diese jedoch stark ein.
Wie von Smith et al. berichtet, scheint Wiesenschwingel für die Induktion der FAE-Sekretion geeignet [53]. So konnte in beiden Untersuchungen die Sekretion von FAE induziert werden, wobei die Aktivität bei der Verwendung von Haferpelzen-Xylan als Induktor geringer ausfiel als bei Wiesenschwingel [53].

Generell erwiesen sich Rapsmehl und Wiesenschwingel als geeignete Substrate für eine effektive Induktion der xylanolytischen Enzyme. Jedoch fallen die ermittelten Aktivitäten der Acetyl-Xylan-Esterase und insbesondere der Ferulasäure-Esterase im Vergleich zur α-L-Arabinofuranosidase deutlich geringer aus. Nach dem Verlauf der Aktivitäten zu urteilen, sollte die Fermentationsdauer 168 h nicht überschreiten.
Nach Abschluss der Fermentationen wurde der Kulturüberstand wie in Kapitel 3.2.4 auf Seite 25 beschrieben aufgearbeitet und die ausgefällten Proteine bei -20 °C gelagert.
Eine weitere Aufarbeitung der ausgefällten Proteine fand im Rahmen dieser Arbeit nicht statt, da kommerzielle Enzympräparationen auf den Markt kamen. Diese zeigten eine hohe Reinheit (keine Kontamination mit anderen Enzymen) sowie hohe spezifische Aktivitäten.
Die enzymatische Hydrolyse der Xylane erfolgte daher unter Verwendung einer kommerziellen endo-1,4-β-Xylanase mit einer hohen Aktivität ($\geq$2500 U/g).

5.2 Isolierung von Haferspelzen-Xylan

Die Isolierung von Xylan aus Hafer wurde u.a. von Westerlund et al. (1992) publiziert [118]. Seitdem wurden diverse Extraktionsmethoden an Hafer und Haferspelzen erprobt [29, 67].
Der Vergleich verschiedener Methoden zeigt, dass die Ausbeuten an ausgefälltem Material von der Wahl des Extraktionsmittels und der Methode abhängen. Beispielsweise ergeben sich bei der Extraktion mit Reinstwasser Ausbeuten zwischen 3,4±0,4 % und 5,1±0,3 % bezogen auf die Haferspelzen-Einwaage. Alkalisch bei 121 °C im Autoklav extrahierte Proben ergeben Ausbeuten von 5,6±0,3 % bis 6,4±0,6 %.
Im Vergleich dazu weisen alkalisch bei 90 °C am Rückfluss extrahierte Proben Ausbeuten > 40 % auf. Dies lässt sich zum einen darauf zurück führen, dass bei der Extraktion am Rückfluss eine kontinuierliche Durchmischung ermöglicht wurde, welcher bei der Extraktion im Autoklav nicht umsetzbar war. Zudem ist aufgrund der Lignifizierung von Haferspelzen eine alkalische Behandlung erforderlich, um die Zellwandstruktur aufzubrechen. [3, 4, 29]
Während sowohl die Variation des pH-Wertes vor der Fällung als auch die Wahl des Fällungsmittels keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbeute nach sich zogen, bewirkte die Zentrifugation nach erfolgter pH-Einstellung (pH 5,5) eine deutliche Verringerung des ausgefällten Materials. Neben dem Zusatz von organischen Lösungsmitteln wirkt sich auch die Absenkung des pH-Wertes auf die Löslichkeit der Hemicellulosen aus [4].
Eine mild alkalische Xylan-Extraktion (5 % (w/v) NaOH) bei 90 °C wurde auch von Saake et al. (2004) und Puls et al. (2006) gewählt [29, 67].

Im Hinblick auf Textur und Färbung der Xylan-Proben ist eine klare Tendenz zu erkennen. So weisen die enzymatisch und mit H_2O_2 behandelten Proben eine deutlich hellere Färbung auf als die alkalisch bei 90 °C extrahierten Proben RF 1-6. Die mit Reinstwasser oder bei 121 °C im Autoklav extrahierten Proben besitzen eine hellere Färbung als die Proben RF 1-6, dafür jedoch eine deutlich weichere Textur. Die hellere Färbung der enzymatisch oder mit H_2O_2 behandelten Proben lässt sich auf die Verringerung des Ligninanteils zurückführen. Dieser konnte im Fall der Proben XLPM und XBl von 11,4 % (Ausgangs-Xylan RF 2) auf etwa 6,4 % reduziert werden. Durch eine Vorbehandlung mit H_2O_2 verringerte sich der Ligninanteil auf etwa 7,1 % (RF 9/10). Saake et al. nutzten diese Art des Bleichens, um die Verwendung der extrahierten Xylane als Papieradditiv zu ermöglichen [29, 67].
Der von Saake et al. (2004) beschriebene Hydrolyse-Rückstand der alkalisch extrahierten Xylane deutet mit 15,4 % auf einen relativ hohen Ligninanteil [29]. Dies korreliert mit den ermittelten Werten von 8,8-11,6 % für die Proben RF 1-6. Die mit Reinstwasser extrahierten Proben RF 11A/B weisen einen deutlich höheren Ligninanteil von etwa 23,5 % auf. Im Fall der bei 121 °C im Autoklav extrahierten Proben AK 29-36 ergeben sich bis zu 24,5 %.
Dies bestätigt, dass eine Durchmischung sowie eine alkalische Behandlung das Aufbrechen der Zellwandstruktur begünstigen, welche durch kovalente Verknüpfungen zwischen Hemicellulosen und Lignin stabilisiert ist.

5.3 Charakterisierung von Haferspelzen-Xylan

Als erste Charakterisierung der Xylan-Proben erfolgte eine Untersuchung der Monosaccharid-Zusammensetzung. Der Xyloseanteil der mit Reinstwasser extrahierten Proben RF 11A/B und AK 33-36 liegt mit etwa 45 % deutlich unter den Literaturwerten für Haferspelzen, ebenso wie der Xyloseanteil der alkalisch bei 121 °C extrahierten Proben AK 29-31 (52-56 %).
Die alkalisch bei 90 °C extrahierten Proben RF 1-6 weisen mit 72-78 % einen Xyloseanteil im Bereich der Literaturwerte [29–31] auf.
Der Anteil an Galaktose ist mit etwa 2,6 % für die mit Reinstwasser und 4,2-6,8 % für die alkalisch extrahierten Proben um den Faktor 1,9 respektive 3-4,9 höher als in der Literatur [30, 31] und deutet auf die Anwesenheit von Arabinogalaktan hin. So konnten Göllner et al. Arabinogalaktane mit einem Ara/Gal-Verhältnis von 1:2 aus Hafer extrahieren [119, 120].
Bezüglich des Arabinoseanteils zeigt sich eine ähnliche Tendenz im Vergleich der wässrig und alkalisch extrahierten Proben. So weisen RF 11A/B und AK 33-36 etwa 4,5-5,6 % Arabinose auf, wohingegen die Proben RF 1-10 und AK 29-31 deutlich höhere Arabinoseanteile von 11-13 % bzw. 14-15 % besitzen. In der Literatur liegen die Werte bei 9,6-11,7 % [29–31].
Der Glukoseanteil schwankt je nach Extraktionsmittel- und bedingung. In den wässrig extrahierten Proben ist der Anteil an Glukose mit 46 % mit Abstand am höchsten. Die Verunreinigung mit Cellulose oder dessen Abbauprodukten ist demnach sehr groß, was eine Ursache für die beschriebene weichere Textur der Proben sein könnte.
Während der Glukoseanteil der Proben AK 29-31 bei 18-24 % liegt, weisen die Proben RF 9/10 etwa 15 % und die Proben RF 1-6 zwischen 5-10 % Glukose auf. Letztere korrelieren mit den in der Literatur angegebenen Werten von 7,3-13,4 % [29–31].

Für die untersuchten Haferspelzen-Xylane ergeben sich folgende Ara/Xyl-Verhältnisse bezogen auf den Gesamtkohlenhydratgehalt:

	RF 1-6	**RF 9/10**	**RF 11A/B**	**AK 29-31**	**AK 33-36**
Ara:Xyl	1:6,0	1:5,2	1:8,0	1:3,7	1:10,4

Unter Berücksichtigung des Arabinoseanteils im Arabinogalaktan (Ara/Gal 1:2 [119, 120]) lassen sich folgende Ara/Xyl-Verhältnisse berechnen:

	RF 1-6	**RF 9/10**	**RF 11A/B**	**AK 29-31**	**AK 33-36**
Ara:Xyl	1:7,1	1:7,0	1:10,5	1:4,7	1:14,7

Es zeigt sich, dass die mit Reinstwasser extrahierten Xylane das höchste Ara/Xyl-Verhältnis aufweisen. Im Vergleich zur Literatur ergeben sich insbesondere bei den Proben AK 33-36 deutlich höhere Werte. Das Ara/Xyl-Verhältnis der alkalisch extrahierten Proben AK 29-31 fällt mit Abstand am geringsten aus und liegt unterhalb der Literaturwerte, während die alkalisch extrahierten Proben RF 1-6 und RF 9/10 Ara/Xyl-Verhältnisse im Bereich der Literaturwerte für Haferspelzen-Xylane besitzen.

So lag das Ara/Xyl-Verhältnis für die von Saake et al. (2004) beschriebenen alkalisch extrahierten Haferspelzen-Xylane bei etwa 1:5,9-1:6,4, wobei in den Proben keine Galaktose nachgewiesen wurde [29]. Die von Ramirez et al. (2008) und Sarbu et al. (2003) untersuchten kommerziellen Haferspelzen-Xylane enthielten 1,2-1,4 % Galaktose. Bezogen auf den Gesamtkohlenhydratgehalt lassen sich für die beschriebenen Xylane ein Ara/Xyl-Verhältnis von 1:8,2-1:8,5 berechnen. Unter Berücksichtigung des Arabinoseanteils im Arabinogalaktan ergibt sich ein Ara/Xyl-Verhältnis von 1:8,9 - 1:9,1 [30, 31].
Beim Vergleich mit den Literaturwerten ist anzumerken, dass Ramirez et al. (2008) und Sarbu et al. (2003) kommerziell erworbene Xylane von Sigma (USA) für ihre Analysen nutzten. Sowohl die Extraktionsbedingungen als auch die Qualität der Xylane sind somit schwer zu vergleichen.

Neben der Monosaccharid-Zusammensetzung wurde auch der Acetylierungsgrad ermittelt, welcher bei den alkalisch extrahierten Proben mit 0,84-1,96 % deutlich geringer ausfällt als bei den wässrig extrahierten Proben (4,54-6,29 %). Ursache ist die Verseifung der Acetylgruppen während der alkalischen Extraktion. Die isolierten Xylan-Proben waren nur zu 45-50 % in Reinstwasser oder Puffersystemen (pH 5-6) löslich. Es ist daher anzunehmen, dass die Abspaltung der Acetylgruppen die Löslichkeit der Proben verringert.

Im Hinblick auf den Ferulasäuregehalt der verschiedene Proben ergeben sich sehr gering Werte. Die wässrig extrahierten Proben weisen mit 0,15± 0,01 % (AK 33-36) bzw. 0,16 ± 0,01 % (RF 11A/B) den mit Abstand höchsten Ferulasäuregehalt auf, während die rein alkalisch extrahierten Proben RF 1-6 und AK 30A nur etwa 0,018 % ± 0,002 % Ferulasäuren besitzen. Bei den mit H_2O_2 behandelten Proben XBl und XE RF 9/10 liegt der Ferulasäuregehalt mit 0,004 ± 0,001 % nah an der Nachweisbarkeitsgrenze und im Fall der enzymatisch behandelten Probe XLMP war der Ferulasäuregehalt nicht mehr detektierbar.
Vansteenkiste et al. berichten von einem wässrig extrahierten Xylan aus Weizen mit einem Ferulasäuregehalt von 0,22 % [102].
Im Vergleich dazu fällt der ermittelte Ferulasäuregehalt der wässrig extrahierten Xylan-Proben mit etwa 0,155 ± 0,01 % um den Faktor 1,4 geringer aus. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass in Hafer weniger Ferulasäure nachgewiesen werden konnte als in Weizen [121, 122].
Der geringe Ferulasäuregehalt der übrigen Xylan-Proben ist u.a. auf die Abspaltung der Ferulasäureester unter alkalischen Bedingungen zurück zuführen [74]. Ferner begünstigt die Behandlung mit Peroxiden und Enzymen zur Delignifizierung der Xylan-Proben die Abspaltung der Ferulasäureester. So nimmt der Ferulasäuregehalt der Xylan-Proben einhergehend mit der Verringerung des Ligningehalts ab. Dies bestätigt die Annahme, dass Lignin kovalent mit Phenolsäuren wie Ferulasäure verknüpft ist, welche wiederum mit α-L-Arabinofuranosyl-Substituenten der Xylane verestert sind.
Neben der Abspaltung der Ferulasäureester ist zudem die oxidative Ausbildung von Ferulasäure-Dimeren möglich, wodurch keine freie Ferulasäure nachgewiesen werden kann.

Die Isolierung der Xylane wurde anhand von FT-IR Spektroskopie während der Extraktion verfolgt. In allen Spektren sind die für Heteroxylane typischen Transmissionsbanden bei 2923 cm^{-1} (CH_2 Schwingung), 1460 cm^{-1} (CH_2 Ringschwingung, Pyranose), 1000-1200 cm^{-1} (C-OH, C-O-C und C-C Schwingungen) und 894 cm^{-1} (CH Ringschwingung) zu erkennen. Im Bereich von 1000-1200 cm^{-1} ist die Bande bei 1043 cm^{-1} am stärksten ausgeprägt, welche auf C-OH Streckschwingung von C4 bzw. C3 gebundenen Hydroxylgruppen zurückgeführt werden kann [36, 110–112].
Somit konnte bewiesen werden, dass in sämtlichen Proben Xylane vorliegen. Darüber hinaus zeigen die FT-IR Spektren typische Banden für phenolische Substanzen wie Lignin (1420 cm^{-1}, 1510 cm^{-1} und 1595 cm^{-1}).
Beim Vergleich der verschiedenen oxidativ behandelten Xylan-Proben fällt auf, dass die behandelten Xylane „XLMP“ und „XBl“ im Bereich von 1000-2000 cm^{-1} deutlich weniger, dafür aber klarer ausgeprägte Bande aufweisen. Beispielsweise sind die für Ester typischen Transmissionsbanden bei 1720-1730 cm^{-1} lediglich in den unbehandelten Xylane zu erkennen. Dies korreliert mit dem ermittelten Ferulasäuregehalt der verschiedenen Xylan-Proben [74, 110].

Molmassen und Molmassenverteilung der Xylan-Proben

Die Molmassen-Bestimmung der Proben erfolgte mittels Größenausschluss-Chromatographie. Sowohl im Zuge der Untersuchungen an TSKgel (M_r: ≤50 kDa-1.000 kDa), Sephacryl S-400 (M_r: 10-2.000 kDa) und Superdex 75 prep (M_r: 500-30.000 Da) zeigte sich, dass die Elutiuonsprofile der Xylan-Proben drei Peaks im RI-Signal aufwiesen. Dies sowie die weite Überlappung der RI- und RALS/LALS-Signale im hochmolekularen Bereich deuteten auf eine sehr breite Molmassenverteilung hin.
Die Elutionsprofile ergeben sehr hohe Molmassen. So liegt das Gewichtsmittel für die mit H_2O_2 behandelten Proben RF 9/10A sowie XBl 2 zwischen 119,4-261,4 kDa und das der unbehandelten Xylan-Proben zwischen 261,7-458,1 kDa. An der Peakspitze beträgt die Molmasse der Xylan-Proben RF 9/10A und XBl 2 etwa 38,1-44,8 kDa respektive 7,0 kDa. Die unbehandelten Proben weisen eine Molmasse von 54,0-78,7 kDa auf.
Im Hinblick auf das Zahlenmittel fällt auf, dass die Proben XBl und RF 9/10A mit 6,6 kDa bzw. 17,6-18,7 kDa ein deutlich geringere Werte aufweisen als die unbehandelten Xylan-Proben. Deren ermitteltes Zahlenmittel liegt zwischen 49,9-77,7 kDa.
Insgesamt ergeben sich für die mit H_2O_2 behandelten Xylan-Proben geringere Molmassen als für die unbehandelten Proben. Darüber hinaus weisen die mit H_2O_2 behandelten Xylan-Proben höhere Polydispersitäten auf, was auf die deutlich höheren Gewichtsmittel M_w im Vergleich zu den Zahlenmittel M_n zurück zu führen ist.

	AK 30A	**RF 2-6**	**RF 9/10A**
PD $= \left[\frac{M_w}{M_n}\right]$	3,66	4,97-7,76	6,79-10,08

Da es sich bei den mittels GPC-TDA ermittelten Zahlen- und Gewichtsmittel um gemittelte Molmassen handelt, sind diese nur bedingt mit den SEC-Messungen an Sephacryl S-400 und Superdex 75 prep zu vergleichen. Lediglich die Molmasse an der Peakspitze stellt keinen Mittelwert da, ist jedoch weniger exakt und reproduzierbar.
Ferner fanden SEC-Messungen an Sephacryl S-400 und Superdex 75 prep standardmäßig mit 0,5 M NaOH als Lösungsmittel und Reinstwasser als Eluent statt. Dabei zeigte sich, dass die Xylan-Proben sowohl Bestandteile mit einer Molmasse von 25 kDa bis >270 kDa sowie Bestandteil mit einer Molmasse ≤ 5 kDa besitzen. Der Zusatz von 1 % Triton-X (v/v) in 0,5 M NaOH bewirkte keinen signifikanten Unterschied im Verlauf des RI-Signales.
In Versuchsreihen mit Reinstwasser und verschiedenen Puffer-Systemen (pH 5-9) an Sephacryl S-400 ergaben sich weit ausgedehnte Doppelpeaks im Bereich von 80 kDa bis ≤ 5 kDa. Dazu ist anzumerken, dass sich lediglich 45-50% der Xylan-Proben gelöst hatten und die Elutionsprofile somit nur die Größenverteilung der gelösten Bestandteile abbilden.
Gleiches gilt für die Versuchsreihen mit Reinstwasser und Natriumacetat an Superdex 75 prep, welche Elutionsprofile mit zwei RI-Peaks im Bereich von ≥ 25 kDa bis ≤ 5 kDa und zwei bis drei UV-Peaks im Bereich von ≥ 25 kDa bis ≤ 5 kDa aufwiesen.
Aufgrund der geringen Löslichkeit der Xylan-Proben in wässrigen Systemen kann zudem sowohl bei den Versuchsreihen mit 0,5 M NaOH als auch bei den Versuchsreihen mit Puffer-Systemen nicht ausgeschlossen werden, dass es beim Lösen der Xylan-Proben zur Ausbildung von Aggregaten kommt.

In der Literatur variieren die ermittelten Molmassen deutlich. Puls et al. beschreiben ein mild alkalisch extrahiertes Haferspelzenxylan mit einem MW von 25-30 kDa. Die Proben wurden in DMSO gelöst und unter Verwendung der SEC-Säulen GRAM 30, 100, 3000 (8x300 mm) bei 60 °C vermessen [29, 67].
Sarbu et al. untersuchten die Molmasse eines kommerziell erworbenen Haferspelzen-Xylans unter verschiedenen pH-Bedingungen (pH 9-12,5) an einer Sephacryl S-400 Säule. Die ermittelten Molmassen variierten deutlich und nehmen mit steigendem pH-Wert zu. Der PD-Wert wurde mit 1,2-1,3 angegeben und die ermittelten Molmassen lagen bei 65-90 kDa (pH 9) bzw. 120-150 kDa (pH 12,5) [30]. Da pflanzliche Biopolymere i.d.R. sehr heterogen und stark verzweigt sind, erscheinen diese Wertebereiche recht schmal. Insbesondere der PD-Wert von pflanzliche Biopolymeren liegt aufgrund der breiten M_w und M_n-Verteilung oft deutlich höher.
Im Vergleich zu den Literaturwerten liegen die ermittelten PD-Werte insbesondere bei den enzymatisch oder mit H_2O_2 behandelten Xylan-Proben deutlich höher. Dies lässt sich durch die höheren Gewichtsmittel M_w im Vergleich zu den Zahlenmittel M_n erklären.
Die Molmasse der verschiedenen Xylan-Proben deckt sich weitestgehend mit der Literatur, insgesamt weisen die Proben jedoch eine breitere Molmassenverteilung auf. Darüber hinaus ergeben sich im Gegensatz zu den in der Literatur veröffentlichten Chromatogrammen der Brechungsindices (RI) z.T. deutliche Doppelpeaks oder bis zu drei Peaks im Verlauf des RI-Signals.

Im Hinblick auf das UV-Signal der Superdex 75 prep Chromatogramme zeigt sich, dass dieses im Bereich von ≥ 25 kDa und im Bereich von 5 kDa Peaks aufweist. Diese korrelieren mit den Peaks im Verlauf des RI-Signals, was auf hochmolekulare bzw. niedermolekulare Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe deutet.
Im Bereich von ≤ 5 kDa liegen hingegen teilweise nur UV-Signale oder teilweise nur RI-Signale vor. Bei letzterem handelt sich um niedermolekulare Kohlenhydrate ohne Lignin, Ferulasäure- oder *p*-Cumarsäure-Substituenten, während das UV-Signal von niedermolekularen phenolischen Komponenten herrührt.

5.4 Isolierung von Xylooligosacchariden

Um ausreichende Mengen Xylooligosaccharide aus Xylan-Gemischen für eine Charakterisierung zu gewinnen, sollten zunächst Xylan-Proben an Superdex 75 semipräparativ fraktioniert, angereichert und gefriergetrocknet werden. Jedoch waren die erhaltenen Proben nur zu 15 % in Reinstwasser löslich und zeigten nur schwache Signale von Xylooligosacchariden. Insgesamt waren die HPAEC-ED Signale etwaiger in den Xylan-Proben enthaltener Xylooligosaccharide nicht reproduzierbar.

Die Isolierung von Xylooligosacchariden erfolgte nach enzymatischen Hydrolysen der Xylan-Proben „XE RF 1“ und „XE RF 2“ unter Verwendung einer kommerziellen endo-1,4-β-Xylanase mit einer hohen Reinheit (keine Kontamination mit anderen hydrolytischen Enzymen) und hohen Aktivität (≥2500 U/g).
Da in der Literatur sowohl die Inkubationszeit (24 h, 72 h) als auch die Temperatur (30 °C, 50 °C) verschiedener Xylanase-Assays variieren, fanden zunächst Vorversuche bei unterschiedlichen Bedingungen (16, 24 und 48 h Inkubation bei 30/50 °C) statt [77, 123]. Die Hydrolysate wurden im Anschluss mittels einer semipräparativen LH-20 Säule vorfraktioniert.
Im Zuge der ersten Versuchsreihen zeigte sich, dass die Elutionsprofile der verschiedenen Xylan-Hydrolysate an LH-20 keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Da das Temperatur-Optimum von Xylanasen zumeist mit 45-65 °C angegeben wurde [124], liefen die nachfolgenden Hydrolysen standardmäßig für 24 h bei 50 °C ab.
Eine weitere Zugabe der endo-1,4-β-Xylanase zur Steigerung der Enzymaktivität wurde nicht durchgeführt, da eine zu starke Hydrolyse der Xylane vermieden werden sollte. Ziel war es Xylooligosaccharide mit einem Polymerisationsgrad von DP4-12 oder höher herzustellen und zu fraktionieren.

5.5 Charakterisierung von Xylooligosacchariden

Im Anschluss an die Xylan-Hydrolyse wurden die Xylooligosaccharide über eine semipräparative LH-20 Säule getrennt. Die Elutionsprofile zeigen, dass in den Xylan-Hydrolysaten eine große Bandbreite an Oligosacchariden, aber auch Monosaccharide und komplexere Abbauprodukte vorliegen (siehe Kapitel 4.3). Dies wird sowohl durch DC- als auch durch HPAEC-Untersuchungen bestätigt (siehe Seite 65).

In den vorderen LH-20 Fraktionen 10, 11 und 12 konnten kaum Oligosaccharide detektiert werden. Die HPAEC-ED Chromatogramme wiesen im Verlauf des 2. NaOAc-Gradienten ein sehr breites Signal auf. Demnach befinden sich in diesen Fraktionen hochmolekulare Xylan-Abbauprodukte (Abb. 4.26 S. 67).
Fraktion 13-16 zeigen dagegen deutlich stärker ausgeprägte Signale im Elutionsbereich von Oligosacchariden. In Fraktion 13 sind vor allem Oligosacchariden größer DP 6 zu finden, allerdings enthält die Fraktion auch komplexere Xylan-Abbauprodukte (Signal im Spülschritt) sowie geringe Mengen an Xylooligosacchariden mit DP 4-6.
Im Fall der LH-20 Fraktionen 14 und 15 deuten die Signale im HPAEC-ED Chromatogramm auf ein breites Spektrum an Oligosacchariden größer DP 6 (Abb. 4.27 und 4.28 S. 68). Ferner lassen sich eindeutig Xylooligosaccharide mit DP 3-6 detektieren, welche ebenfalls mittels DC nachweisbar sind (Abb. 4.25 S. 65).
Tendenziell nimmt der Anteil an Oligosacchariden größer DP 6 von Fraktion zu Fraktion ab und verschiebt sich zu XOs mit DP 2-5. So weist Fraktion 16 besonders hohe Mengen an Xylobiose, -triose und -tetraose auf und lediglich geringe Mengen an Oligosacchariden größer DP 6. In der LH-20 Fraktion 17 konnten nur vereinzelte Signale für Oligosacchariden größer DP 4 detektiert werden, sie besteht hauptsächlich aus Xylotriose.
Dagegen liegen in Fraktion 18 bereits nur noch Xylobiose sowie -tetraose vor, in Fraktion 19 und 20 ausschließlich Xylobiose (Abb. 4.29 S. 4.29).
Die Fraktionen 21-23 beinhalten keine Xylooligosaccharide mehr, statt dessen weisen sie nur noch Xylose auf (Abb. 4.30 S. 70). Arabinose konnte nicht nachgewiesen werden, da die α-1,2- oder α-1,3-glykosidische Bindung etwaiger α-L-Arabinofuranosyl-Substituenten nicht durch endo-Xylanasen gespalten werden kann.

Massenspektrometrie von Xylooligosacchariden

Zur weiteren Beurteilung der LH-20 Fraktionen hinsichtlich ihrer Oligosaccharid-Zusammensetzung fanden Untersuchungen mittels ESI-MS statt. Einzelne Komponenten konnten eindeutig als Natrium-Addukte ($[M+Na]^+$, $[M+2Na]^+$) detektiert und nachgewiesen werden.
Es zeigte sich, dass die LH-20 Fraktionen eine weite Bandbreite an Signalen von m/z 269-1361 hervorrufen (siehe Seite 78 ff.).

Vergleiche der gewonnen MS-Daten mit der Literatur bestätigen, dass die detektierten Signale Natrium-Addukten von Xylooligosacchariden mit DP=2-10 zuzuordnen sind. So weist die Serie der Quasi-Molekülionen m/z 305, 437, 569, 701, 833, 965, 1097, 1229 und 1361 eine Differenz von 132 Da auf, welche auf den Neutralverlust einer Pentose deutet [80–82, 113].
Auf der Grundlage der Monosaccharid-Zusammensetzung der Ausgangs-Xylane sowie den Ergebnissen der DC- und HPAEC-Untersuchungen der LH-20 Fraktionen, kann dieser Neutralverlust einer Xylose-Einheit zugeordnet werden.
Insgesamt konnten in den ESI-MS-Spektren der LH-20 Fraktionen 13-16 die folgenden Xylooligosaccharide als Natrium-Addukte detektiert und zugeordnet werden:

Tabelle 5.1: Zuordnung der als Natrium-Addukte ermittelten ESI-MS-Daten der LH-20 Fraktionen 13-16, Natrium-Addukte in **fett** wurden via ESI-MS/MS untersucht

XOs	$[M+Na]^+$	$[M+2Na]^+$	**F 13**	**F 14**	**F 15**	**F 16**
DP 2	305 m/z		-	-	-	+
DP 3	437 m/z		-	-	+	++
DP 4	569 m/z		-	+	++	+
DP 5	**701 m/z**	362 m/z	+	+	++	++
DP 6	**833 m/z**	428 m/z	+	++	++	+
DP 7	965 m/z	494 m/z	+	+	+	+
DP 8	**1097 m/z**	560 m/z	++	+	-	-
DP 9	**1229 m/z**	626 m/z	++	+	-	-
DP 10	**1361 m/z**	692 m/z	+	+	-	-

$^-$ nicht in der jeweiligen Fraktion detektiert
$^+$ in der jeweiligen Fraktion detektiert
$^{++}$ als ein Hauptpeak der jeweiligen Fraktion detektiert

Aus den in Tabelle 5.1 aufgelisteten ESI-MS-Daten geht hervor, dass der Anteil an Xylooligosacchariden größer DP 6 von Fraktion 13 zu Fraktion 16 abnimmt. Im gleichen Zuge verschiebt sich die Zusammensetzung der LH-20 Fraktionen zu Xylooligosacchariden mit DP 2-5. Dieser Verlauf korreliert mit den Ergebnissen der DC- und HPAEC-Untersuchungen.

Zusätzlich zu den ESI-MS Untersuchungen der LH-20 Fraktionen 13-16 wurden beispielhaft einzelne Quasi-Molekülionen einem weiteren Fragmentierungsschritt (MS2) unterzogen, um deren Zuordnung anhand des Fragmentierungsmusters verifizieren zu können.

In sämtlichen ESI-MS/MS Spektren sind Ionenserien mit einer Differenz von m/z 132 respektive m/z 150 zu erkennen, welche der Y- und B-typ Ionenserie für Kohlenhydrate nach Domon und Costello [125] entsprechen. Der Neutralverlust von 132 Da resultiert aus dem Verlust einer freien Xylose-Einheit vom nicht reduzierenden Ende und führt zu einem Y-typ Ion. Durch den Verlust einer freien Xylose-Einheit vom reduzierenden Ende ergibt sich ein Neutralverlust von 150 Da, welcher ein B-typ Ion liefert. Diese Y,B-Ionenserie ist typisch für Xylooligosaccharide [80–82, 113].
Ferner entstehen bei der Fragmentierung von Xylooligosacchariden typischerweise sogenannte ^{0,2}A und ^{0,3}A cross-ring Fragmente, die einem Verlust von 60 Da respektive 90 Da entsprechen. Es handelt sich hierbei um Spaltungen innerhalb des Xylopyranoserings, welche auf eine 1,4-glykosidische Verknüpfung der Xylopyranosen weisen [81, 113].
Die Differenzen von m/z 60 bzw. m/z 90 lassen sich auch in den ESI-MS/MS Spektren der fragmentierten Quasi-Molekülionen m/z 701, 833, 1097, 1229 und 1361 finden.
Die von Reis et al. beschriebenen Ionenserien für acetylierte Xylooligosaccharide, wie z.B. m/z 347, 479 oder 611 [82], sind nicht in den vorliegenden ESI-MS/MS Spektren zu sehen. Ebenso wenig konnten Ionenserien mit Differenzen von/z 58 (MeGlcA) und m/z 44 (GlcA) [80, 81] detektiert werden.

Bei den vorliegenden Oligosacchariden handelt es sich um β-1,4-glykosidisch verknüpfte Xylooligosaccharide. Die ESI-MS und ESI-MS/MS Daten zeigen weder Acetyl-Gruppen noch auf (Methyl)-Glucuron- säure-Substituenten. Daher bestehen die LH-20 Fraktionen aus neutralen Xylooligosacchariden. Hinsichtlich der Substitution mit α-L-Arabinofuranosyl-Resten geben die ESI-MS/MS Daten keinen Aufschluss. So waren die Fragmentierungsmuster der Xylooligosaccharid Standards 1,4-β-D-Xylotetraose und 2^3-α-L-Arabinofuranosyl-xylotriose nicht voneinander zu unterscheiden.
Im Folgenden sind Strukturvorschläge für die als Natrium-Addukte detektierten Komponenten der LH-20 Fraktionen dargestellt:

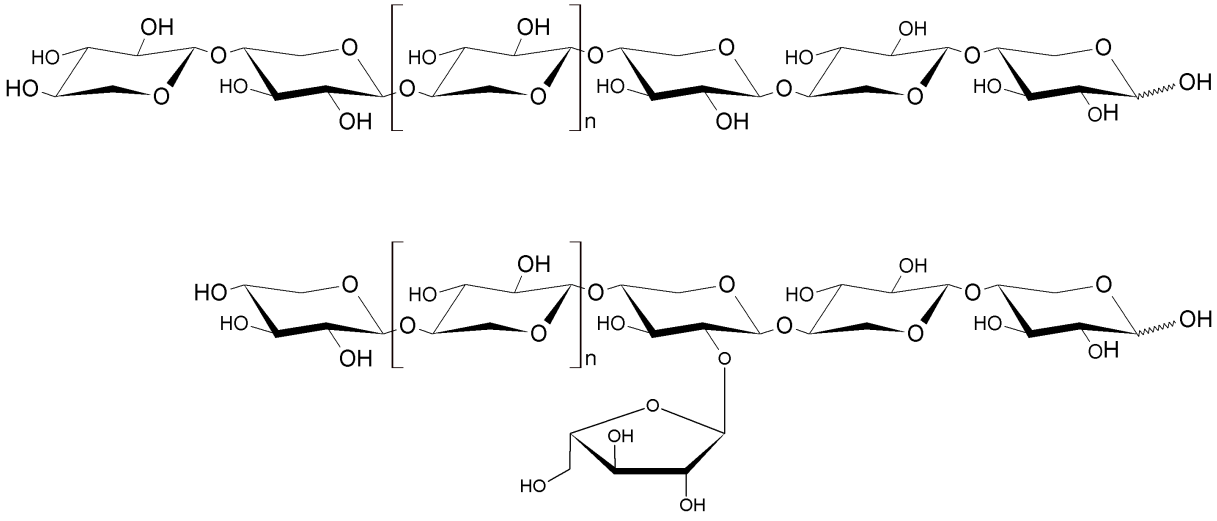


Abbildung 5.1: Strukturvorschläge für die Xylooligosaccharide mit DP 6: $C_{30}H_{50}O_{25}$, n=1; DP 8: $C_{40}H_{66}O_{33}$, n=3; DP 9: $C_{45}H_{74}O_{37}$, n=4

Die angereicherten und via HPAEC aufgetrennten Proben „LH-20 F14 - ICS P 13“ und „LH-20 F15 - ICS P 5“ (Abb. 4.31 S. 71) wurden ebenfalls mittels ESI-MS, MS2 sowie MS3 untersucht (siehe S. 78 ff.).
Dabei fiel auf, dass die Hauptsignale der ESI-MS Spektren mit m/z 701.5 und 701.6 $[M+Na]^+$ einen um m/z 0.2 respektive m/z 0.3 höheren Wert aufweisen als das Quasi-Molekülion der LH-20 Fraktionen (m/z 701.3)
Nach einer weiteren Fragmentierung dieser Quasi-Molekülion (MS2) war aber nicht die für Xylooligosaccharide typische Y,B- und Z,C-Ionenserie zu erkennen. Stattdessen konnten Natrium-Addukte bei m/z 244.9, 457.4, 569.2, 591.6, 641.3, 657.6 und 683.6 $[M+Na]^+$ ermittelt werden, wobei das Quasi-Molekülion mit m/z 683.6 die höchste Intensität aufwies.
Im Fall des Quasi-Molekülion m/z 362.3 $[M+2Na]^+$, welches die zweite Hauptkomponente der Probe „LH-20 F15 - ICS P 5“ darstellt, ergab sich im MS2 zunächst wie erwartet das Quasi-Molekülion m/z 701.6. Dieses fragmentierte im MS3 zu m/z 365.4, 457.4. 591.6, 675.6 und 683.6 $[M+2Na]^+$ und zeigte somit nicht die für Xylooligosaccharide typische Y,B- und Z,C-Ionenserie. Folglich handelt es sich bei diesen Probenbestandteilen nicht um Xylooligosaccharide. Bei den Ionen m/z 683.6 und m/z 675.6 ergibt sich jeweils ein Verlust von m/z 18, was auf die Abspaltung von H_2O deutet. Insgesamt konnte das Fragmentierungsmusters des Quasi-Molekülion m/z 701.6 auch über diverse Literaturvergleiche nicht zugeordnet werden.

Neben diesen Hauptsignalen sind zudem Signale mit geringerer Intensität bei m/z 569.3, 701.2 (Schulter) sowie m/z 833.3 zu finden, welche im ESI-MS/MS Spektrum die für Xylooligosaccharide typische Y,B- und Z,C-Ionenserie zeigen. So sind im ESI-MS/MS Spektrum Ionenserien mit einer Differenz von m/z 132 und m/z 150 (Neutralverlust) zu erkennen. Ferner ergeben sich die für ^{0,2}A und ^{0,3}A cross-ring Fragmente typischen Signale mit einer Differenz von m/z 60.
In der Probe „LH-20 F15 - ICS P 5“ sind somit Xylooligosaccharide mit DP 5-6 enthalten. Allerdings fällt die Signalintensität dieser Bestandteile im ESI-MS deutlich geringer aus, als die Signalintensität der unbekannten Probenbestandteile (m/z 701.6).

NMR von Xylooligosacchariden

Die NMR-Daten der Probe „LH-20 F15 - ICS P 5“ weisen auf die Anwesenheit von Xylopyranosen (4,39 / 101,5 ppm) [79, 126, 127]. Darüber hinaus ergeben sich im HSQC Korrelationspeaks bei 5,32 pm/107,6 ppm, welche einer Arabinofuranose (Araf) zugeordnet werden kann [77, 78].
Ebenso wie die MS-Daten geben die NMR-Daten keinen Hinweis auf Acetyl-Gruppen oder (Methyl)-Glucuronsäure-Substituenten. Ferulasäuren sowie Polyphenole konnten ebenfalls nicht detektiert werden [79, 126, 127].
Insgesamt geben die NMR-Daten einen eindeutigen Hinweis auf das Vorliegen von neutralen Xylooligosacchariden mit Arabinofuranose-Substituenten.

Unter Berücksichtigung von NMR- und ESI-MS-Daten konnten in der Probe „LH-20 F15 - ICS P 5“ neutrale Xylooligosaccharide mit Arabinofuranose-Substituenten und einem DP von 4-6 nachgewiesen werden. Im Folgenden sind beispielhaft Strukturvorschläge dargestellt:

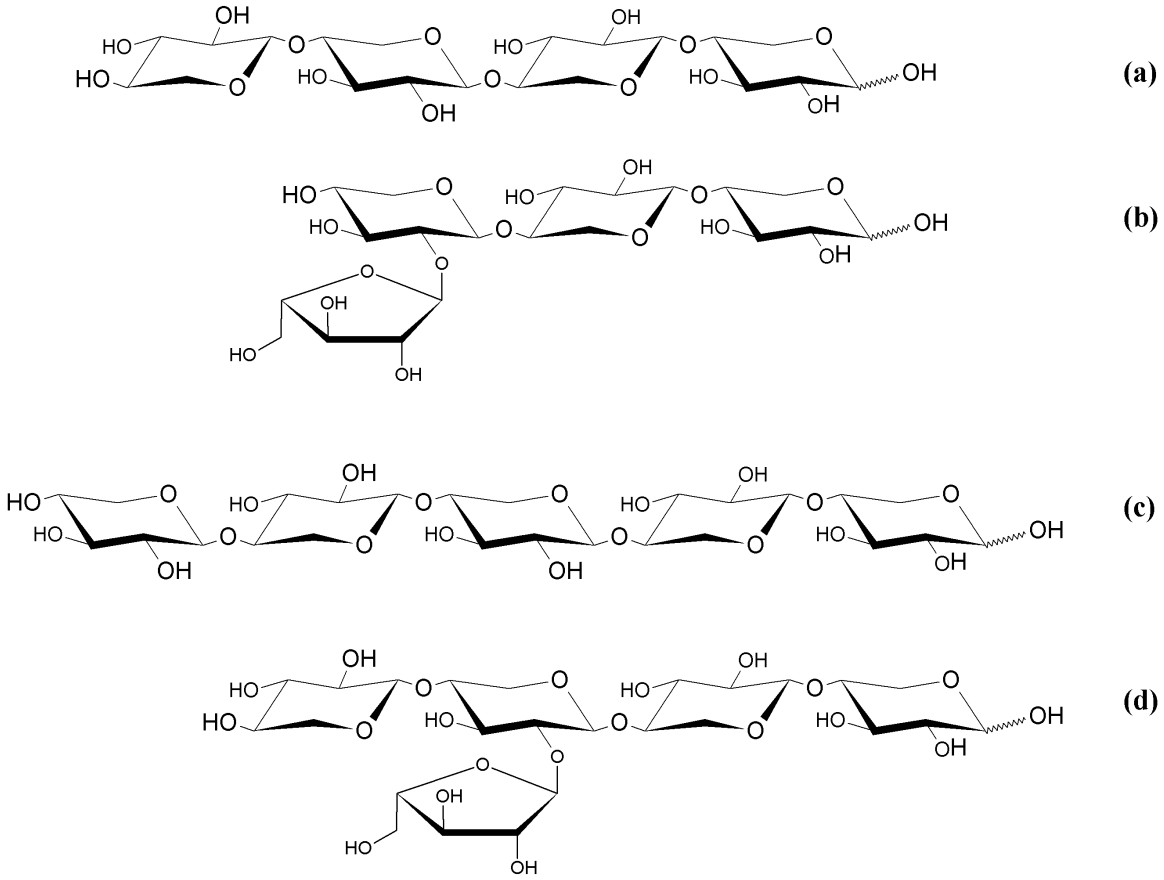


Abbildung 5.2: Strukturvorschläge für die in der Probe „LH-20 F15 - ICS P 5“ enthaltenen Xylooligosaccharide: (a) 1,4-β-D-Xylotetraose, (b) 2^3-α-L-Arabinofuranosyl-xylotriose, (c) 1,4-β-D-Xylopentaose, (d) 2^3-α-L-Arabinofuranosyl-xylotetraose

5.6 Biomedizinische Anwendungen

Immunmodulatorische Effekte

Hinsichtlich der Anwendung von Xylooligosacchariden untersuchten Hansen et al. sowie Chen et al. immunmodulatorische Effekte. Hansen et al. (2013) konnten die Herabregulation von IFN-γ und IL-1β in Mäusen nachweisen, welche eine 10 %ig supplementierte Nahrung erhielten (DP 2-6) [11]. Chen et al. (2012) beschreiben eine Verringerung der TNF-alpha, IL-6 und IL-1β Sekretion durch eine Vor-und Nachbehandlung von LPS-stimulierten RAW264.7 Zellen mit kommerziellen Xylooligosacchariden (95P) [12].

Dies lässt die Vermutung nahe, dass auch die aus Haferspelzen-Xylan gewonnenen Xylooligosaccharide immunmodulatorische Effekte bewirken könnten. Daher wurden im Forschungszentrum Borstel Stimulationsversuche an humanen mononukleären Zellen (MNC) durchgeführt und die Sekretion von TNF-alpha bestimmt. Die Stimulation der MNCs erfolgte zum einen mit den reinen Xylan respektive Xylooligosaccharid Proben und zum anderen in Kombination mit LPS *S. enterica* R60.
Es zeigte sich, dass sowohl die in den LH-20 Fraktionen 13-15 enthaltenen Xylooligosaccharide (DP 3-10) als auch die via HPAEC aufgetrennten Xylooligosaccharide keine Sekretion von TNF-alpha stimulieren. Der Zusatz der Xylan-Proben „RF 1“ und „RF 2“ bewirkte hingegen eine deutlich Sekretion von TNF-alpha.
Ferner ergaben sich für „RF 1“ und „RF 2“ positive Reaktionen im Limulus-Amöbozyten-Lysat Assay (LAL-Assay) was auf eine Verunreinigung mit Endotoxinen deutet.
Aufgrund der Störanfälligkeit des LAL-Assays ist jedoch keine eindeutige Kontrolle bzgl. einer Endotoxin-Verunreinigung möglich. So ist u.a. bekannt, dass β-D-Glucane positiv im LAL-Assay reagieren [128].

Im Fall der Stimulationsversuche mit LPS R60 in Kombination mit Xylan respektive Xylooligosacchariden fielen die Resultate sehr unterschiedlich aus.
Während die via HPAEC aufgetrennten Xylooligosaccharide (LH-20 F 14 - ICS P 13, LH-20 F 15 - ICS P 5) eine deutliche Verringerung der TNF-alpha Sekretion nach sich zogen, zeigten die LH-20 Fraktionen ausgehen von Fraktion 15 zu Fraktion 13 tendenziell weniger starke Auswirkungen. Demnach scheint eine weitere Auftrennung der Xylooligosaccharide die immunmodulatorischen Wirkungen zu begünstigen. Dass die LH-20 Fraktionen nur bedingt die Sekretion von TNF-alpha hemmen, könnte u.a. mit der heterogenen Zusammensetzung der Proben zusammen hängen.
Im Gegensatz zu den Xylooligosacchariden bewirkte der Zusatz der Xylan-Proben „RF 1“ und „RF 2“ keine Verringerung der durch LPS R60 induzierten TNF-alpha Sekretion. Statt dessen ergaben sich bei dieser Versuchsreihe die mit Abstand höchsten TNF-alpha Konzentrationen. Dies ist darauf zurück zu führen, dass gewisse Bestandteile dieser Proben die Sekretion von TNF-alpha stimulieren.

Hemmung der Biofilmbildung durch Xylooligosaccharide

Neben der immunmodulatorischen Wirkung sind in der Fachliteratur u.a. Studien bezüglich der Prävention von Biofilmen und pathogenen Adhäsionen durch (Xylo)-Oligosaccharide zu finden. Beispielsweise inhibieren Fucosyl-und Xylooligosaccharide die Adhäsion von *Campylobacter jejuni* respektive *Listeria monocytogenes* [14, 15]. Al-Ghazzewi und Tester berichten, dass u.a. Maltodextrine, Inulin, Galaktooligosaccharide sowie Glucomannan-Hydrolysate die Adhäsion von *Escherichia coli* an menschlichen Epithelzellen inhibieren [89].
Der Einsatz von Oligosacchariden stellt eine mögliche Alternative zu Antibiotika dar. Sie inhibieren die Adhäsion des Bakteriums ohne dieses zu töten und die Ausbildung von Stressfaktoren und Resistenzen zu forcieren. Darüber hinaus konnte in einigen Fällen die Ausbildung von Biofilmen unterdrückt werden, welche den Mikroorganismen als Schutzbarriere vor Antibiotika oder einer Immunabwehr dienen [13].

Im Rahmen der Anwendungs-Untersuchungen wurde daher der Einfluss angereicherter Xylooligosaccharide auf das Zellwachstum und die Biofilmbildung von *Staphylococcus epidermidis* 1457 untersucht. Es handelt sich hierbei um ein gram-positives Bakterium der Familie der *Staphylococcacea*, welches in der Lage ist sich an Kunststoffoberflächen anzuheften und einen Biofilm auszubilden. Dies führt nach medizinischen Eingriffen bei Implantatträgern oft zu chronischen, fremdkörperassozierten Infektionen [108, 109].

Im Hinblick auf das Zellwachstum zeigte sich, dass der Zusatz der angereicherten Xylooligosaccharide LH-20 Fraktion 14 und 15 zu keiner signifikanten Änderung der Wachstumsrate führt. Eine Konzentrationsabhängigkeit der Xylooligosaccharid-Wirkung ist nicht zu erkennen. Die Ausbildung eines Biofilms konnte unter Zusatz der LH-20 Fraktionen 14 und 15 nicht nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass die in den LH-20 Fraktionen 14 und 15 enthaltenen Xylooligosaccharide (DP 3-10) eine hemmende Wirkung auf die Ausbildung adhäsiver Biofilme haben ohne das Zellwachstum komplett zu unterdrücken.
Folglich könnte beispielsweise der Zusatz von Xylooligosacchariden in der Beschichtung von Implantaten die Ausbildung adhäsiver Biofilme inhibieren. Ohne diese Schutzbarriere würden die Mikroorganismen vom Immunsystem erkannt und abgewehrt werden.
Dies stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, die Ausbreitung pathogener Mikroorganismen zu hemmen und den Ausbruch chronischer Infektionen zu verringern.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit waren die Isolierung und Charakterisierung von Haferspelzen-Xylan sowie die Herstellung und Untersuchung von Xylooligosacchariden. So stellen Oligo-saccharide bei der Suche nach therapeutischen Hemmstoffen einen Schwerpunkt diverser Studien dar.
Denn insbesondere bei Infektionskrankheiten stellt die zunehmende Antibiotikaresistenz von Bakterien ein globales klinisches Problem dar.
Im Verlauf der Arbeit sollten zudem xylanolytische Enzyme für die gezielte spezifische Hydrolyse von Xylan aus dem Pilz *Trichoderma reesei* QM9414 angereichert werden. Hierzu zählten α-L-Arabinofuranosidasen, Xylanasen, Acetyl-Xylan-Esterasen sowie Ferulasäure-Esterasen.

Im Zuge verschiedener Schüttelkolben-Fermentationen konnte die Sekretion der xylanolytischen Enzyme α-L-Arabinofuranosidase, Acetyl-Xylan-Esterase sowie Ferulasäure-Esterase aus dem Pilz *Trichoderma reesei* QM9414 induziert werden.
Dabei stellte sich heraus, dass der Zusatz von Rapsmehl und Wiesenschwingel insbesondere im Fall der α-L-Arabinofuranosidase zum höchsten Anstieg der Aktivität führt. Eine Kombination von Rapsmehl und Wiesenschwingel als Induktor scheint für die Induktion der xylanolytischen Enzyme am effektivsten. Insgesamt erwies sich eine Fermentationsdauer von 168 h als am geeignetsten, um eine maximale Aktivität der xylanolytischen Enzyme zu gewährleisten.
Nach Abschluss der Fermentationen und die sekretierten Proteine mit Ammoniumsulfat ausgefällt und bei -20 °C gelagert. Eine weitere Aufarbeitung der Proteine fand nicht statt, da kommerzielle Enzympräparationen auf den Markt kamen. Diese zeigten eine hohe Reinheit (keine Kontamination mit Fremdaktivitäten) sowie hohe spezifische Aktivitäten.

Anhand diverser Xylan-Extraktionen konnte gezeigt werden, dass eine milde alkalische Extraktion (5 % (w/v) NaOH) bei 90 °C die höchsten Ausbeuten erzielt. Im Gegensatz zu den wässrig extrahierten Xylan-Proben enthalten diese einen deutlich geringeren Anteil an Acetyl- und Ferulasäure-Substituenten, welche durch die alkalische Behandlung abgespalten wurden.
Darüber hinaus fällt der Lignin-Anteil der alkalisch extrahierten Xylan-Proben etwa um den Faktor zwei geringer aus. Sowohl eine enzymatisch als auch eine Behandlung mit Peroxid führten zu einer weiteren Verringerung des Ligninanteils.
Die Monosaccharid-Zusammensetzung der Xylan-Proben schwankt je nach Extraktionsmittel- und bedingung. In den wässrig extrahierten Proben ist der Anteil an Glukose mit 46 % und Xylose mit 45 % etwa gleich hoch, während bei den alkalisch extrahierten Proben der Xylose-Anteil überwiegt (AK 29-31: 52-56 %Xyl, 18-24 % Glu; RF 1-6: 72-78 % Xyl, 5-10 % Glu).

Die isolierten Xylan-Proben weisen insgesamt sehr hohe Molmassen sowie eine sehr breite Molmassenverteilung auf. Mittels Größenausschluss-Chromatographie konnten die Probenbestandteile teilweise separiert werden. Dabei zeigte sich, dass die Xylan-Proben sowohl Bestandteile mit einer Molmasse von 25 kDa bis >270 kDa sowie Bestandteil mit einer Molmasse $\leq$ 5 kDa besitzen.

Der Vergleich von UV- und RI-Signalen deutet auf das Vorliegen hochmolekularer sowie niedermolekularer Lignin-Kohlenhydrat-Komplexe. Darüber hinaus weisen die einzelnen RI-Peaks auf niedermolekulare Kohlenhydrate ohne phenolische Substituenten und die einzelnen UV-Peaks auf niedermolekulare phenolische Komponenten.

Die alkalisch extrahierten Proben „RF 1“ und „RF 2“ wurden mittels enzymatischer Hydrolyse unter Verwendung einer kommerziellen endo-1,4-β-Xylanase zu Oligosacchariden hydrolysiert. Nach einer chromatographischen Auftrennung der Hydrolysate, konnten in einzelnen Fraktionen eindeutig Xylooligosaccharide mit DP2-10 nachgewiesen werden.
Es handelt sich um β-1,4-glykosidisch verknüpfte Xylooligosaccharide, deren Polymerisationsgrad im Laufe der Fraktionsanzahl abnimmt.
Die ESI-MS und ESI-MS/MS Daten weisen weder auf Acetyl-Gruppen noch auf (Methyl)-Glucuronsäure-Substituenten, sodass die gemessenen Proben aus neutralen Xylooligosacchariden bestehen.

Die angereicherten und via HPAEC aufgetrennten Proben „LH-20 F14 - ICS P 13“ und „LH-20 F15 - ICS P 5“ zeigten im ESI-MS Hauptsignale, deren Fragmentierungsmuster im ESI-MS/MS nicht der für Xylooligosaccharide typischen Y,B- und Z,C-Ionenserie entsprechen.
In der Probe „LH-20 F15 - ICS P 5“ konnten Xylooligosaccharide mit einem Polymerisationsgrad von DP 5-6 nachgewiesen werden.
Die NMR-Daten der Probe „LH-20 F15 - ICS P 5“ weisen auf die Anwesenheit von Xylopyranosen sowie Arabinofuranosen. Insgesamt geben die NMR- und ESI-MS-Daten einen eindeutigen Hinweis auf das Vorliegen von neutralen Xylooligosacchariden mit Arabinofuranose-Substituenten.

Hinsichtlich möglicher Anwendungen der aus Haferspelzen-Xylan isolierten und angereicherten Xylooligosaccharide konnten in biomedizinischen Untersuchungen folgende Wirkungen beobachtet werden:
Sowohl die in den LH-20 Fraktionen 13 bis 15 enthaltenen Xylooligosaccharide (DP3-10) als auch die via HPAEC aufgetrennten Xylooligosaccharide bewirkten in den Stimulationsversuchen mit MNCs keine Sekretion von TNF-alpha und sind demnach frei von Endotoxinen.
Im Fall der Stimulationsversuche in Kombination mit LPS R60 zogen insbesondere die via HPAEC aufgetrennten Xylooligosaccharide eine Verringerung der TNF-alpha Konzentration nach sich. Folglich hemmen die aus Haferspelzen-Xylan isolierten Xylooligosaccharide die durch Endotoxine hervorgerufene TNF-alpha Sekretion, wobei diese immunmodulatorischen Wirkungen durch eine weitere Auftrennung der Xylooligosaccharide begünstigt werden.
Im Hinblick auf die Untersuchungen zur Wirkung auf *Staphylococcus epidermidis* 1457 zeigte sich, dass die in den LH-20 Fraktionen 14 und 15 enthaltenen Xylooligosaccharide (DP3-10) eine hemmende Wirkung auf die Ausbildung adhäsiver Biofilme haben ohne das Zellwachstum komplett zu unterdrücken. Sie wirken somit nicht antimikrobiell, weisen jedoch anti-adhäsive Wirkungen auf.

Literaturverzeichnis

[1] D. Kahlke, J. Puls, and B. Saake. Method for preparing oat husk for xylan production. *WO2006008136 A1*, 2006.

[2] B. Saake, N. Erasmy, S. Lebioda, and J. Puls. Extraction and purification of xylan as a raw material for the chemical industry. *BFH-Nachrichten*, 4, 2003.

[3] B. Saake. Züchterische Veränderung der Spelzen von Sommerhafer (*Avena sativa*) sowie deren stoffliche Verwertung als nachwachsender Rohstoff. *Arbeitsbericht - Johann Heinrich von Thuenen-Institut*, 3:1–33, 2010.

[4] U. Drechsler, K. Hettrich, and F. Loth. Stabile Hemicellulose-Paste, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung. *Patent, EP1902069 A1*, 2006.

[5] J. Puls and B. Saake. Xylan, ein neuartiges Papieradditiv. *Arbeitsbericht - Johann Heinrich von Thuenen-Institut*, pages 1–74, 2010.

[6] C. M. Berlanga-Reyes et al. Maize Arabinoxylan Gels as Protein Delivery Matrices. *Molecules*, 14:1475–1482, 2009.

[7] A. L. Martinez-Lopez, E. Carvajal-Millan, J. Lizardi-Mendoza, and Y. L. Lòpez. The Peroxidase/H_2O_2 System as a Free Radical-Generating Agent for Gelling Maize Bran Arabinoxylans: Rheological and Structural Properties. *Molecules*, 16:8410–8418, 2011.

[8] A. A. Aachary and S. G. Prapulla. Xylooligosaccharides as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(1):2–16, 2011.

[9] I. Jain, V. Kumar, and T Satyanarayana. Xylooligosaccharides: an economical prebiotic from agroresidues and their health benefits. *Indian Journal of Experimental Biology*, 53(3):131–142, 2015.

[10] P.D. Schley and C. J. Field. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *British Journal of Nutrition*, 87:221–230, 2002. Supplement S2.

[11] C. H. F. Hansen et al. Dietary Xylooligosaccharide Downregulates IFN-γ and the Low-Grade Inflammatory Cytokine IL-1β Systemically in Mice. *The Journal of Nutrition*, 143(4):533–540, 2013.

[12] H. H. Chen, Y. K. Chen, H. C. Chang, and S. Y. Lin. Immunomodulatory Effects of Xylooligosaccharides. *Food Science and Technology Research*, 18(2):195–199, 2012.

[13] O. Rendueles, J. B. Kaplan, and J.-M. Ghigo. Antibiofilm polysaccharides. *Environmental Microbiology*, 15(2):334–346, 2013.

[14] D. Cozens and R. C. Read. Anti-adhesion methods as novel therapeutics for bacterial infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10(12):1457–1468, 2012. PMID: 23253323.

[15] T. Ebersbach et al. Xylo-oligosaccharides inhibit pathogen adhesion to enterocytes *in vitro* . *Research in Microbiology*, 163(1):22 – 27, 2012.

[16] H. W. Heldt. *Pflanzenbiochemie, 2. Auflage*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 1999.

[17] E.W. Weiler and L. Nover. *Allgemeine und molekulare Botanik*. Thieme Verlag, 2008.

[18] L. G. Smith. Plant cell division: building walls in the right places. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2:33–39, 2001.

[19] P. H. Raven, R. F. Evert, and H. Curtis. *Biologie der Pflanzen*. de Gruyter, Berlin New York, 1985.

[20] J. Ralph et al. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2):29–60, 2004.

[21] UKY. University of kentucky odyssey - green energy. http://www.research.uky.edu/odyssey/winter07/green_energy.html, Juni 2013. [Online; 9-November-2017].

[22] A. Ebringerovà and T. Heinze. Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties 1. *Macromolecular Rapid Communications*, 21:542–556, 2000.

[23] Iuliana Spiridon and Valentin I. Popa. Chapter 13 - Hemicelluloses: Major Sources, Properties and Applications . In Mohamed Naceur Belgacem and Alessandro Gandini, editors, *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, pages 289 – 304. Elsevier, Amsterdam, 2008.

[24] B. C. Saha. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30:279–291, 2003.

[25] A. Sunna and G. Antranikian. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17:39–67, 1997.

[26] A. Ebringerovà, Z. Hromàdkovà, and T. Heinze. Hemicelluloses. *Advances in Polymer Science*, 186:1–67, 2005.

[27] T. Koseki, M. Okuda, S. Sudoh, Y. Kizaki, K. Iwano, and H. Matsuzawa. Role of Two α-L-Arabinofuranosidases in Arabinoxylan Degradation and Characteristics of the Encoding Genes from Shochu Koij Molds, *Aspergillus kawachii* and *Aspergillus awamori*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96:232–241, 2003.

[28] Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung. Längsschnitt durch ein Getreidekorn. http://shop.aid.de/6207/laengsschnitt-durch-ein-getreidekorn. [Online; 21-November-2017].

[29] B. Saake, N. Erasmy, Th. Kruse, E. Scbmekal, and J. Puls. Isolation and Characterization of Arabinoxylan from Oat Spelts. *ACS Symposium Series - Hemicelluloses: Science and Technology*, 864:52–65, 2004.

[30] A. Sarbu, F. Goncalves, and M. N. de Pinho. Oat spelts xylan molecular mass estimation by size exclusion chromatography. *Carbohydrate Polymers*, 53(3):297 – 304, 2003.

[31] F. Ramìrez, J. Puls., V. Zùniga, and B. Saake. Sorption of corn cob and oat spelt arabinoxylan onto softwood kraft pulp. *Holzforschung*, 62:329–337, 2008.

[32] A. B. Hernandez-Espinoza et al. Lycopene/Arabinoxylan Gels: Rheological and Controlled Release Characteristics. *Molecules*, 17:2428–2436, 2012.

[33] A. F. A. Chimpahango. *Development of enzyme technology for modification of functional properties of xylan biopolymers*. PhD thesis, University of Stellenbosch, 2010.

[34] K. S. Mikkonen et al. Arabinoxylan structure affects the reinforcement of films by microfibrillated cellulose. *Cellulose*, 19:467–480, 2012.

[35] K. Hettrich et al. Derivatization and Charcterization of xylan from oat spelts. *Macromolecular Symposia*, 232:85–92, 2006.

[36] J. S. Stevanic et al. Arabinoxylan/nanofibrillated cellulose composite films. *Journal of Materials Science*, 47:6724–6732, 2012.

[37] Hans Bisswanger. *Enzyme - Struktur, Kinetik und Anwendungen*. Wiley-VCH, 2015. [Online; 12-September-2017].

[38] Janne Jaenis, Juha Rouvinen, Pirjo Vainiotalo, Ossi Turunen, and Valery L. Shnyrov. Irreversible thermal denaturation of trichoderma reesei endo-1,4-β-xylanase ii and its three disulfide mutants characterized by differential scanning calorimetry. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42(1):75 – 80, 2008.

[39] S.I. McCrae, K.M. Leith, A.H. Gordon, and T.M. Wood. Xylan-degrading enzyme system produced by the fungus *Aspergillus awamori*: isolation and characterization of a feruloyl esterase and a p-coumaroyl esterase. *Enzyme Microb. Technol*, 16:826–834, 1994.

[40] M. Sundberg and K. Poutanen. Purification and properties of two acetylxylan esterases of *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 13:1–11, 1991.

[41] Kevin Pichler. Von nachwachsenden Rohstoffen zu wertvollen Synthesebausteinen. *BMWF: Matura- und Bakkalaureatsarbeiten im Rahmen des Programms Sparkling Science*, 1:1–48, 2009.

[42] B. Seiboth, C. Ivanova, and V. Seidl-Seiboth. *Trichoderma reesei*: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels. *Biofuel Production - Recent Developments and Prospects*, pages 309–340, 2011.

[43] R. Peterson and H. Nevalainen. *Trichoderma reesei* RUT-C30 - thirty years of strain improvement. *Microbiology*, 158:58–68, 2012.

[44] V. Seidl et al. The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. *BMC Genomics*, 9, 2008.

[45] G. Sheir-Neiss and B. S. Montenecourt. Characterization of the secreted cellulases of *Trichoderma reesei* wild type and mutants during controlled fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 20:46–53, 1984.

[46] D. Martinez, R. M. Berka, B. Henrissat, M. Saloheimo, and M. Arvas. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*, 26:553–560, 2008.

[47] ATCC. *Trichoderma reesei* atcc 26921. http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/26921.aspx?geo_country=de. [Online; 30.September-2017].

[48] D. Haab, K. Hagspiel, K. Szakmary, and C. P. Kubicek. Formation of the extracellular proteases from *Trichoderma reesei* QM 9414 involved in cellulase degradation. *Journal of Biotechnology*, 16:187–198, 1990.

[49] F.J.M. Kormelink, B. Lefebvre, F. Strozyk, and A.G.J. Voragen. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology*, 27(3):267 – 282, 1993.

[50] T Koseki et al. An *Aspergillus awamori* acetylesterase: purification of the enzyme, and cloning and sequencing of the gene. *Biochem. J.*, 326(2):485–490, 1997.

[51] K. Poutanen, M. Sundberg, H. Korte, and J. Puls. Deacetylation of xylans by acetyl esterases of *Trichoderma reesei* . *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33(5):506–510, 1990.

[52] P. Biely, G. L. Cote, L. Kremnicky, D. Weisleder, and R. V. Greene. Substrate specificity of acetylxylan esterase from *Schizophyllum commune*: mode of action on acetylated carbohydrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1298(2):209 – 222, 1996.

[53] D. C. Smith, K. M. Bhat, and T. M. Wood. Xylan-hydrolysing enzymes from thermophilic and mesophilic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(4):475–484, 1991.

[54] K. Rumbold et al. Purification and Properties of a Feruloyl Esterase Involved in Lignocellulose Degradation by *Aureobasidium pullulans* . *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9):5622–5626, 2003.

[55] T. Koseki, S. Furuse, K. Iwano, and H. Matsuzawa. Purification and Characterization of a Feruloylesterase from *Aspergillus awamori* . *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(10):2032–2034, 1998.

[56] A. Lehmann. Induktion und Anreicherung von α-L-Arabinofuranosidase aus *Trichoderma reesei* QM9414. *Masterstheses*, 2013.

[57] M. Nogawa, K. Yatsui, A. Tomioka, H. Okada, and Y. Morikawa. An α-L-Arabinofuranosidase from *Trichoderma reesei* Containing a Noncatalytic Xylan-Binding Domain. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:3964–3968, 1999.

[58] T. M. Wood and S. I. McCrae. Arabinoxylan-degrading enzyme system of the fungus *Aspergillus awamori*: purification and properties of an α-L-arabinofuranosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(4):538–545, 1996.

[59] S. Kaneko et al. Purification and Substrate Specificities of Two α-L-Arabinofuranosidases from *Aspergillus awamori* IFO 4033. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:4021–4027, 1998.

[60] L. T. Gattinger, Z. Duvnjak, and A. W. Khan. The use of canola meal as a substrate for xylanase production by *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33:21–25, 1990.

[61] G. Lopez, A. Banares-Hidalgo, and P. Estrada. Xylanase II from Trichoderma reesei QM 9414: conformational and catalytic stability to Chaotropes, Trifluoroethanol, and pH changes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(1):113–125, 2011.

[62] M. Tenkanen, J. Puls, and K. Poutanen. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(7):566 – 574, 1992.

[63] G. Dervilly, C. Leclercq, D. Zimmermann, C. Roue, J.-F. Thibault, and L. Saulnier. Isolation and characterization of high molar mass water-soluble arabinoxylans from barley and barley malt. *Carbohydrate Polymers*, 47:143–149, 2002.

[64] H. Krawczyk, T. Persson, A. Andersson, and A.-S. Joensson. Isolation of Hemicelluloses from barley husk. *Chemical Engineering Research and Design*, pages 1–13, 2007.

[65] K. Buksa, R. Ziobro, A. Nowotna, W. Praznik, and H. Gambus. Isolation, modification and characterization of soluble arabinoxylan fractions from rye grain. *European Food Research and Technology*, 235:385–395, 2012.

[66] E. Carvajal-Millan, A. Rascon-Chun, J. A. Màrquez-Escalante, and V. Micard. Maize bran gum: Extraction, characterization and functional properties. *Carbohydrate Polymers*, 69:280–285, 2007.

[67] J. Puls, N. Schröder, A. Stein, R. Janzon, and B. Saake. Xylans from oat spelt and birch kraft pulp. *Macromolecular Symposia*, 23:237–48, 2006.

[68] A. Ebringerovà and Z. Hromàdkoà. Zur Isolierung von Hemicellulosen des D-Xylantypes aus Laubhölzern. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 44:223–227, 1986.

[69] A. Ebringerovà and Z. Hromàdkoà. Alternative Verfahren zur Gewinnung von Hemicellulosen des D-Xylantypes aus Laubhölzern. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 47:355–358, 1989.

[70] Z. Benko et al. Heat Extraction of Corn Fiber Hemicellulose. In JonathanR. Mielenz, K.Thomas Klasson, WilliamS. Adney, and JamesD. McMillan, editors, *Applied Biochemistry and Biotecnology*, ABAB Symposium, pages 253–265. Humana Press, 2007.

[71] Suhara Panthapulakkal, Viktoriya Pakharenko, and Mohini Sain. Microwave Assisted Short-Time Alkaline Extraction of Birch Xylan. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(4):917–929, 2013.

[72] Z. Hromàdkoà, J. Kovàcikovà, and A. Ebringerovà. Study of the classical and ultrasound-assisted extraction of the corn cob xylan. *Industrial Crops and Products*, 9(2):101 – 109, 1999.

[73] R. Sun, J. Tomkinson, Z. C. Geng, and N. J. Wang. Comparative Studies of Hemicelluloses Solubilized during the Treatments of Maize Stems with Peroxymonosulfuric Acid, Peroxyformic Acid, Peracetic Acid, and Hydrogen Peroxide. *Holzforschung*, 54:349–356, 2000.

[74] J.L. Ren and R.C. Sun. *Hemicelluloses; In: Cereal Strwa as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels*, chapter 4, pages 73–130. Elsevier, 2010.

[75] M.J Vàzquez et al. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends in Food Science and Technology*, 11(11):387 – 393, 2000.

[76] M. J. Bowman et al. Selective chemical oxidation and depolymerization of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) xylan with oligosaccharide product analysis by mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(7):941–950, 2011.

[77] M. J. Bowman, B. S. Dien, K. E. Vermillion, and J. A. Mertens. Structural characterization of (1-2)-β-xylose-(1-3)-α-arabinose-containing oligosaccharide products of extracted switchgrass (*Panicum virgatum*, L.) xylan after exhaustive enzymatic treatment with α-arabinofuranosidase and β-endo-xylanase. *Carbohydrate Research*, 398:63 – 71, 2014.

[78] M. J. Bowman, B. S. Dien, K. E. Vermillion, and J. A. Mertens. Isolation and characterization of unhydrolyzed oligosaccharides from switchgrass (*Panicum virgatum*, L.) xylan after exhaustive enzymatic treatment with commercial enzyme preparations. *Carbohydrate Research*, 407:42 – 50, 2015.

[79] M. Chemin et al. Well-defined oligosaccharides by mild acidic hydrolysis of hemicelluloses. *European Polymer Journal*, 66:190 – 197, 2015.

[80] A. Reis, M.R.M. Domingues, A.J. Ferrer-Correia, and M.A. Coimbra. Structural characterisation by MALDI-MS of olive xylo-oligosaccharides obtained by partial acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 53(1):101 – 107, 2003.

[81] A. Reis et al. Fragmentation pattern of underivatised xylo-oligosaccharides and their alditol derivatives by electrospray tandem mass spectrometry. *Carbohydrate Polymers*, 55(4):401 – 409, 2004.

[82] Ana Reis et al. Electrospray tandem mass spectrometry of underivatised acetylated xylo-oligosaccharides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19:3589–3599, 2005.

[83] C. Manisseri and M. Gudipati. Bioactive xylo-oligosaccharides from wheat bran soluble polysaccharides. *{LWT} - Food Science and Technology*, 43(3):421 – 430, 2010.

[84] C. Grootaert et al. Comparison of prebiotic effects of arabinoxylan oligosaccharides and inulin in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, 69(2):231 – 242, 2009.

[85] W. Feist et al. Modulation of lipopolysacchalipo-induced production of tumor necrosis factor, interleukine 1, and interleukin 6 by synthetic precursor Ia of lipid A. *FEMS Microbiology Immunology*, 89:73–90, 1992.

[86] M. Guha and N. Mackman. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling*, 13(2):85 – 94, 2001.

[87] C. Nathan. Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917):846–852, 2002.

[88] C. A. Dinarello. Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118(2):503 – 508, 2000.

[89] F. H. Al-Ghazzewi and R. F. Tester. Inhibition of the adhesion of Escherichia coli to human epithelial cells by carbohydrates. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 4(1):1 – 5, 2014.

[90] D. Kristufek, R. Hodits, and C. P. Kubicek. Coinduction of α-L-arabinofuranosidase and α-D-galactosidase formation in *Trichoderma reesei* RUT C-30. *FEMS Microbiology Letters*, 115:259–264, 1994.

[91] E. Margolles-Clark, M. Ihnen, and M. Penttilae. Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Journal of Biotechnology*, 57:167–179, 1997.

[92] T. Juhasz et al. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, 40:3519–3525, 2005.

[93] R.C. Kuhad and A. Singh. *Lignocellulose Biotechnology Future Prospects*. I. K. International, New Delhi, 2007.

[94] D. W. S. Wong. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2):174–209, 2009.

[95] M. Hofrichter. Review: lignin conversion by manganese peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4):454 – 466, 2002. Recent Advances in Lignin Biodegradation.

[96] T. Zheng et al. Improved Mono-, Di- and Oligosaccharide Separation on CarboPac Columns with Lower Eluting Hydroxide Concentration. *Dionex - IC and Reagent-Free IC Posters*, pages 1–4, 2009.

[97] A. Sluiter et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP). *NREL*, pages 1–18, 2011. NREL/TP-510-42618.

[98] TAPPI. T222 om-02: Acid-insoluble lignin in wood and pulp. *Tappi Press; Atlanta, USA*, 2:1–14, 2006.

[99] TAPPI. UM250: Acid-soluble lignin in wood and pulp. *Tappi Press; USA*, 1985.

[100] R. M. McCready and R. M. Reeve. Plant Tissue Analysis, Test for Pectin Based on Reaction of Hydroxamic Acids with Ferric Ion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3(3):260–262, 1955.

[101] E. A. McComb and R. M. McCready. Determination of Acetyl in Pectin and in Acetylated Carbohydrate Polymers. *Analytical Chemistry*, 29(5):819–821, 1957.

[102] E. Vansteenkiste, C. Babot, X. Rouau, and V. Micard. Oxidative gelation of feruloylated arabinoxylan as affected by protein. Influence on protein enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 18(4):557 – 564, 2004.

[103] L. H. Tung. Method of calculating molecular weight distribution function from gel permeation chromatograms. *Journal of Applied Polymer Science*, 10(3):375–385, 1966.

[104] R. K. Kainthan, E. B. Muliawan, S. G. Hatzikiriakos, and D. E. Brooks. Synthesis, Characterization, and Viscoelastic Properties of High Molecular Weight Hyperbranched Polyglycerols. *Macromolecules*, 39(22):7708–7717, 2006.

[105] K. M. Bischoff et al. Purification and characterization of arabinofuranosidase from the corn endophyte *Acremonium zeae*. *Biotechnology Letters*, 33(10):2013–2018, 2011.

[106] V. Mastihuba, L. Kremnicky, M. Mastihubova, J.L Willett, and G. L Cote. A spectrophotometric assay for feruloyl esterases. *Analytical Biochemistry*, 309(1):96 – 101, 2002.

[107] S. Hegde, P. Srinivas, and G. Muralikrishna. Single-step synthesis of 4-nitrophenyl ferulate for spectrophotometric assay of feruloyl esterases. *Analytical Biochemistry*, 387(1):128 – 129, 2009.

[108] K. Becker, C. Heilmann, and G. Peters. Coagulase-Negative Staphylococci. *American Society for Microbiology - Clinical Microbiology Reviews*, 27(4):870–926, 2014.

[109] J. K.-M. Knobloch et al. Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis* Depends on Functional RsbU, an Activator of the sigB Operon: Differential Activation Mechanisms Due to Ethanol and Salt Stress. *American Society for Microbiology - Clinical Microbiology Reviews*, 183(8):2624–2633, 2001.

[110] M. Kacuràkovàa et al. Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies. *Food Hydrocolloids*, 13(1):35–41, 1999.

[111] D.K. Buslov et al. Infrared spectroscopic analysis of the structure of xylans. *Journal of Applied Spectroscopy*, 76(6):801–805, 2009.

[112] Melo-Silveira et al. *In Vitro* Antioxidant, Anticoagulant and Antimicrobial Activity and in Inhibition of Cancer Cell Proliferation by Xylan Extracted from Corn Cobs. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1):409–426, 2012.

[113] L. E. Matamoros Fernàndez, N. Obel, H. V. Scheller, and P. Roepstorff. Characterization of plant oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 38(4):427–437, 2003.

[114] Iqbal R. Siddiqui and Peter J. Wood. Carbohydrates of Rapeseed: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28:530–538, 1977.

[115] A. M. Pustjens, H. A. Schols, M. A. Kabel, and H. Gruppen. Characterisation of cell wall polysaccharides from rapeseed (*Brassica napus*) meal. *Carbohydrate Polymers*, 98:1650–1656, 2013.

[116] Kaisa Poutanen and Maija Sundberg. An acetyl esterase of *Trichoderma reesei* and its role in the hydrolysis of acetyl xylans. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28(4-5):419–424, 1988.

[117] N. Halgasovà, E Kutejovà, and J Timko. Purification and some characteristics of the acetylxylan esterase from *Schizophyllum commune*. *Biochem. J.*, 298(3):751–755, 1994.

[118] E. Westerlund, R. Andersson, and P. Aman. Isolation and chemical characterization of watersoluble mixed-linked β-glucans and arabinoxylans in oat milling fractions. *Carbohydrate Polymers*, 20:115–123, 1993.

[119] E.M. Göllner. *Untersuchungen zu Arabinogalactan-Proteinen aus Triticum aestivum L., Secale cereale L. und Avena sativa L.* PhD thesis, Kiel University, 2009.

[120] E. M. Göllner et al. An arabinogalactan-protein from whole grain of Avena sativa L. belongs to the wattle-blossom type of arabinogalactan-proteins. *Journal of Cereal Science*, 53(2):244 – 249, 2011.

[121] F. Sosulski, K. Krygier, and L. Hogge. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2):337–340, 1982.

[122] H. Boz. Ferulic acid in cereals - a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(1):1–7, 2015.

[123] M.A Kabel, H.A Schols, and A.G.J Voragen. Complex xylo-oligosaccharides identified from hydrothermally treated Eucalyptus wood and brewery's spent grain. *Carbohydrate Polymers*, 50(2):191 – 200, 2002.

[124] BRENDA. EC 3.2.1.8 - endo-1,4-beta-xylanase. http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.2.1.8. [Online; 12-September-2017].

[125] B. Domon and C. E. Costello. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal*, 5(4):397–409, Dec 1988.

[126] M. A. Kabel, P. de Waard, H. A. Schols, and A. G.J. Voragen. Location of O-acetyl substituents in xylo-oligosaccharides obtained from hydrothermally treated Eucalyptus wood. *Carbohydrate Research*, 338(1):69 – 77, 2003.

[127] A. Teleman et al. Characterization of acetylated 4-O-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 329:807–815, 2000.

[128] M. E. Dawson. Interference with the LAL Test and How to Address It. *LAL Update*, 22(3):1–5, 2005.

Anhang

Verwendete Materialien und Chemikalien

Tabelle 6.1: Übersicht des verwendeten Materials

Material	Hersteller/Lieferant
Nylongazen (200 µm)	Hydro-Bios, Kiel-Holtenau, D
Robu^{TM} Filtertiegel aus Borosilikatglas, 30 ml, Porosität 2	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
HiPrep Sephacryl S-400 HR 16/60	GE Healthcare, München, D
Superdex™ 75 prep	GE Healthcare, München, D
Sephadex LH-20	GE Healthcare, München, D
CarboPac PA200, 3 x 250 mm analytical column CarboPac PA200, 3 x 50 mm guard column CarboPac PA200, 3 x 250 mm analytical column CarboPac PA200, 3 x 50 mm guard column CarboPac PA200 sp, 9 x 250 mm semipreparative column	Thermo Fisher Scientific, Dionex, Dreieich, D
LiChrosorb RP-18, 4 x 250 mm	Merck, Darmstadt, D
TSKgel G3000 PWxL, 7.8 x 300 mm, 7 µm TSKgel G4000 PWxL, 7.8 x 300 mm, 10 µm TSKgel G5000 PWxL, 7.8 x 300 mm, 10 µm	Tosoh Bioscience, Griesheim, D
Cellulose-Acetat Filter 0,20 µm	Sartorius, Göttingen, D
Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm, Nylon Spritzenvorsatzfilter 0,20 µm, Nylon	Sartorius, Göttingen, D
Biotech CE Dialysis Tubing (131084), MWCO: 500-1000 D	SpectrumLabs, Frankfurt, D
Fertigplatten Alugram SIL G/UV254	Macherey-Nagel, D

Tabelle 6.2: Übersicht der verwendeten Chemikalien I

Chemikalie	Hersteller/Lieferant
D-(-)-Arabinose, » 99 %	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
D-(+)-Galaktose	Merck, Darmstadt, D
D-(+)-Glukose, » 99,5 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
D-(+)-Xylose, » 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
Xylooligosaccharid-Standards	Megazyme, Wicklow, Ireland
1,4-β-D-Xylobiose, ~ 90 %	6860-47-5, Lot I30502 + I151202
1,4-β-D-Xylotriose, ≥ 95 %	47592-59-6, Lot I40803
1,4-β-D-Xylotetraose, ~ 95 %	22416-58-6, Lot I40104 + I150604
1,4-β-D-Xylopentaose, ~ 95 %	49694-20-4, Lot I130305 + I150605
1,4-β-D-Xylohexaose, ~ 95 %	49649-21-5, Lot I121206 + 151206
2^3-α-L-Arabinofuranosyl-xylotriose, ≥95 %	152842-73-4, Loz I140504a
Dextran Std. for GPC	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
5 kDa (BCBL 4755V)	00269
12 kDa (BCBL 5423V)	00270
25 kDa (BCBL 7094V)	00271
50 kDa (BCBK 9418V)	00891
80 kDa (BCBL 8762V)	00892
150 kDa (BCP 3196V)	00893
Ferulasäure, 99 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
p-Coumaric acid, ≥ 98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
Sinapic acid, ≥ 98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
Lignin, alkli (low sulfonate)	Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
Lignin Peroxidase, #BCBN3263V	Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
Manganses Peroxidase, #BCBP1660V	Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
Xylanase X2753	Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
Essigsäure (100 %, wasserfrei), z.A.	Merck, Darmstadt, D
ortho-Phosphorsäure (85 %), z.A.	Th. Geyer, Renningen, D
Salzsäure (37 %, rauchend), z.A.	Merck, Darmstadt, D
Schwefelsäure (95 %), z.A.	Th. Geyer, Renningen, D
Wasserstoffperoxid 30 % (stab.), z.A.	Th. Geyer, Renningen, D
Acetonitril, HPLC ≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt, D
Ethanol, vergält	Th. Geyer, Renningen, D
Ethylacetat, z.A. min. 99,5 %	chemsolute, Th. Geyer, Renningen, D
Isopropanol	Travechemie, Lübeck, D
Methanol, HPLC min. 99,85 %	Th. Geyer, Renningen, D

Tabelle 6.3: Übersicht der verwendeten Chemikalien II

Chemikalie	Hersteller/Lieferant
Ammoniumsulfat, biochem.	Applichem, Darmstadt, D
Natriumacetat, z.A.	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxyd, 50-52 %, for IC	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
Natriumhydroxid (Mikrogranulat), z.A.	Th. Geyer, Renningen, D
Natriumsulfat (wasserfrei), z.A. 98,5 %	chemsolute, Th. Geyer, Renningen, D
4-Nitrophenyl acetate	Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
4-Nitrophenyl α-L-Arabinofuranoside	Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
4-Nitrophenyl β-xylotrioside	Megazyme, Wicklow, Irland
4-Nitrophenyl trans-ferulate	Carbosynth, Berkshire, UK
4-Nitrophenol, zur Synthese	Merck, Darmstadt, D
Rinderserumalbumin (BSA)	Merck, Darmstadt, D
HANK´S (H1641)	Sigma-Aldrich, Steinheim, CH
RPMI 1640 (F1415)	Merck, Darmstadt, D
PS/Glu (A2213) Ficoll (L6115) FSC (5059F)	Seromed, Biochrom, Berlin, D
Tryptic Soy Broth (211825, Lot 4090277) Soybean-Casein Digest Medium	BD™, Becton, Dickinson and Company, New Jeresy, USA
TDS-PEO-N Std. 22k (F1125) TDS-PEO-N Std. 19k (M1003)	Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK
Helium 5.0	Linde, München, D

Formulation

Tab. 39: Composition of the different buffer solutions

Substance	Dulbecco (for DPBS) (mg/l)	Earle's salts (for EBSS) (mg/l)	Hanks' salts (for HBSS) (mg/l)
NaCl	8000	6800	8000
KCl	200	400	400
Na_2HPO_4	1150	–	48
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	–	140	–
KH_2PO_4	200	–	60
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	100	–	–*
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	–	200	200*
$CaCl_2$	100	200	140
Glucose	–	1000	1000
Phenol red	–	10	10
$NaHCO_3$	–	2200	350

* In the original formulation, 100 mg/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ and 100 mg/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ are indicated.

References:

1. Earle, W.R. et al., *J. Nat. Cancer Inst.* **4**, 165 [1943]
2. Hanks, J. H. and R.E. Wallace, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **71**, 196 [1949]
3. Dulbecco, R. and M. Vogt, *J. Exp. Med.* **99**, 167 [1954]

Verwendete Geräte

Tabelle 6.4: Übersicht der verwendeten Geräte I

Geräte-Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Autoklav Systec VX-75	Systec GmbH, Wettenberg, D
Mikrozentrifuge Heraeus Fresco 17 Rotor: 75003410	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kleinzentrifuge EBA 20 (Rotor: E1624)	Hettich, Tuttlingen, D
Kleinzentrifuge EBA 21 (Rotor: E1416)	Hettich, Tuttlingen, D
Sorvall* RC 6 Plus Rotor: F12S-6x500Lex, F10S-4x1000Lex	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
Sorvall* RC 50 Plus Rotor: SH 3000 swinging bucket rotor	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
Thermo Heraeus Multifuge X3 FR Rotor: F14-6x250cy	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
Eppendorf Research® plus Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, D
Eppendorf Thermomixer compfort Aufsätze für: 15 ml, 50 ml, MTP	Eppendorf AG, Hamburg, D
NGC™Chromatography System BioFrac Fraction Collector BioLogic Workstation Model 2128 Fraction Collector UV-Detektor	BIO RAD, München, D
Smartline RI Detectro 2300	Knauer, Berlin, D
LKB PUMP P-500 FPLC LKB Uvicord SII LKB writer REC-102 LKB Multirac 2111 fraction collector	Pharmacia, Uppsala, S
RI Detectro 8110	ERC, Riemerling, D
Varian Cary 50 Bio UV/Vis-Spektrometer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Eon Microplate Spectrophotometer	BioTek Instruments, USA
Synergy HT Multi-Detection Reader	BioTek Instruments, USA
Dionex AS-AP, Autosampler ICS 5000^{+} ICS 5000 SP,	Thermo Fisher Scientific, Dionex, Dreieich, D

Tabelle 6.5: Übersicht der verwendeten Geräte II

Geräte-Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
UltiMate 3000 HPLC	Thermo Fisher Scientific, Dionex, Dreieich, D
Viscotek VE 7510 GPC Degasser Viscotek VE 5200 GPC Autosampler Viscotek VE 1122 Solvent Delivery System Viscotek Model 302 TDA Triple Detectors Array Viscotek UV Detector 2600	Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK
Bruker amaZoneX ESI-MS	Bruker, USA
Bruker Vector 22 FT-IR	Bruker, USA
Bruker AvanceVIII 500 MHz Spektrometer	Bruker, USA
Schneidmühle SM 300	RETSCH GmbH, Haan, D
Ölpresse IBG Monforts, CA 500 Typ R25-1036-110-2	IBG Monforts GmbH & Co, Mönchengladbach, D
Stabmixer turbo (600 Watt)	BRAUN, Neu-Isenburg, D

Ergänzende Diagramme und Tabellen

Tabelle 6.6: Acetylierungsgrad und Ferulasäuregehalt diverser Xylan-Proben

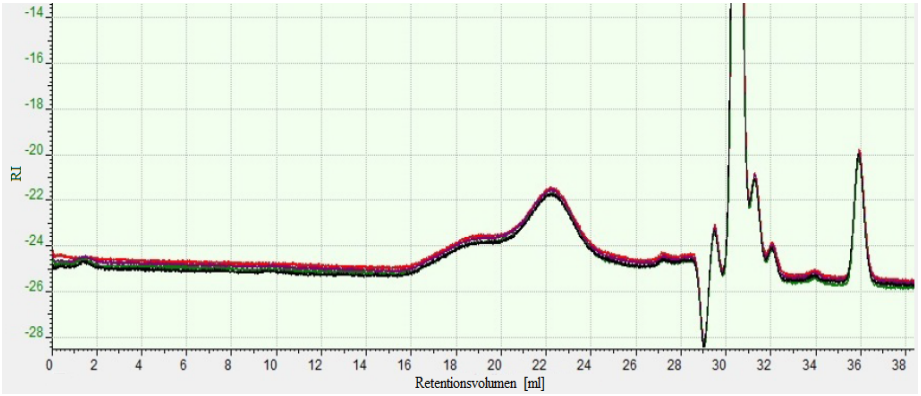
Xylan	**Acetylierungsgrad** % (w/w) bezogen auf Einwaage	**Ferulasäuregehalt**
XE RF 2	0,84 ± 0,05	0,018 ± 0,0002
XE RF 3A/B	0,82 ± 0,17	0,021 ± 0,004
XE RF 4A/B	n.e	0,017 ± 0,003
XE RF 5B	n.e.	0,021 ± 0,001
XE RF 6A	n.e.	0,024 ± 0,002
XE RF 9	0,84 ± 0,11	0,003 ± 0,0005
XE RF 10A	n.e.	0,005 ± 0,001
XE RF 11A	6,61 ± 0,56	0,162 ± 0,011
XE RF 11B	n.e.	0,159 ± 0,013
XE AK 30A	1,78 ± 0,12	0,018 ± 0,002
XE AK 33	6,53 ± 0,99	0,159 ± 0,005
XE AK 34	6,73 ± 0,70	0,160 ± 0,002
XE AK 35	6,08 ± 1,06	0,142 ± 0,005
XE AK 36	6,47 ± 1,12	0,139 ± 0,003
XBl	n.e.	0,004 ± 0,001
XLPM A	1,44 ± 0,17	n.d.
XLPM B	1,42 ± 0,14	n.d.
XLMP C	0,62 ± 0,17	n.d.
XLPM D	0,55 ± 0,03	n.d.

[n.e.] nicht ermittelt
[n.d.] nicht detektierbar (unter Nachweisgrenze)

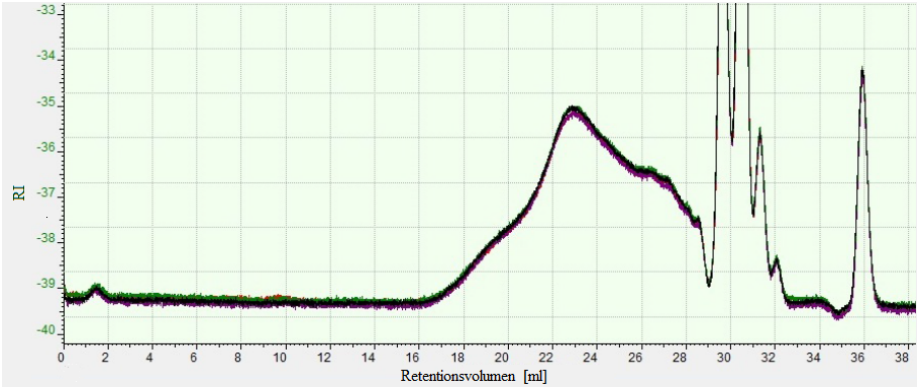
Tabelle 6.7: Datenübersicht GPC-LS

	Ret. Vol. [ml]	dn/dc [ml/g]	Mn [kDa]	Mw [kDa]	Mz [kDa]	Mp [kDa]	PD [= Mw/Mn]	IV [dl/g]	RI Area [mvml]	RALS Area [mvml]	LALS Area [mvml]	DP Area [mvml]	Wt Fr. Peak	M-H a
XBl 2	25,77 ± 0,15	0,0718 ± 0,0013	6,62 ± 3,12	261,44 ± 48,54	14161,18 ± 5738,65	6,98 ± 2,79	39,48 ± 23,76	0,23 ± 0,05	18,92 ± 0,26	9,51 ± 0,10	0,00 ± 0,00	19,05 ± 3,41	1,00 ± 0,00	0,05 ± 0,05
XE RF 2	22,15 ± 0,02	0,0615 ± 0,0027	75,63 ± 11,23	458,05 ± 47,70	4919,32 ± 731,98	78,65 ± 5,54	6,06 ± 0,46	0,45 ± 0,06	16,97 ± 0,77	19,56 ± 0,35	0,00 ± 0,00	40,52 ± 5,20	1,00 ± 0,00	0,20 ± 0,03
XE RF 3A	22,34 ± 0,02	0,0598 ± 0,0025	56,86 ± 10,56	375,97 ± 30,23	5468,53 ± 804,19	69,79 ± 2,71	6,61 ± 1,00	0,46 ± 0,05	16,31 ± 0,67	13,94 ± 0,09	0,00 ± 0,00	40,22 ± 4,37	1,00 ± 0,00	0,20 ± 0,03
XE RF 3B	22,32 ± 0,07	0,0503 ± 0,0077	49,85 ± 3,66	385,96 ± 35,32	4290,70 ± 858,39	74,75 ± 1,68	7,76 ± 0,66	0,39 ± 0,04	14,88 ± 2,29	13,51 ± 0,06	0,00 ± 0,00	36,70 ± 3,04	1,00 ± 0,00	0,21 ± 0,02
XE RF 4A	22,30 ± 0,03	0,0713 ± 0,0023	47,49 ± 3,38	296,57 ± 39,56	3028,50 ± 1135,28	59,681 ± 3,11	6,24 ± 0,98	0,50 ± 0,06	18,49 ± 0,56	16,72 ± 0,25	0,00 ± 0,00	41,32 ± 5,20	1,00 ± 0,00	0,21 ± 0,10
XE RF 4B	22,26 ± 0,04	0,0660 ± 0,0036	51,91 ± 7,01	261,76 ± 24,05	2046,97 ± 255,05	63,79 ± 2,67	5,04 ± 0,29	0,39 ± 0,01	17,38 ± 0,88	13,56 ± 0,03	0,00 ± 0,00	33,01 ± 1,36	1,00 ± 0,00	0,16 ± 0,01
XE RF 5B	22,27 ± 0,13	0,0703 ± 0,0024	61,37 ± 7,97	351,95 ± 24,70	2939,96 ± 294,84	63,40 ± 5,43	5,74 ± 0,40	0,50 ± 0,05	18,38 ± 0,60	19,08 ± 0,18	0,00 ± 0,00	42,23 ± 4,62	1,00 ± 0,00	0,21 ± 0,01
XE RF 6A	22,30 ± 0,02	0,0768 ± 0,0026	54,34 ± 7,48	269,88 ± 20,97	1999,96 ± 269,66	53,98 ± 3,10	4,97 ± 0,30	0,53 ± 0,04	24,39 ± 0,84	22,35 ± 0,07	0,00 ± 0,00	55,77 ± 4,05	1,00 ± 0,00	0,19 ± 0,01
XE RF 9	22,86 ± 0,06	0,0960 ± 0,0014	17,58 ± 1,22	119,44 ± 1,89	2284,59 ± 177,95	38,12 ± 2,58	6,79 ± 0,39	0,38 ± 0,02	27,89 ± 0,44	14,17 ± 0,15	0,00 ± 0,00	36,03 ± 1,97	1,00 ± 0,00	0,21 ± 0,03
XE RF 10A	23,02 ± 0,08	0,0860 ± 0,0016	18,70 ± 4,19	188,54 ± 34,78	6607,52 ± 1314,91	44,82 ± 1,75	10,08 ± 3,38	0,35 ± 0,04	24,82 ± 0,44	15,84 ± 0,22	0,00 ± 0,00	33,84 ± 4,86	1,00 ± 0,00	0,20 ± 0,03
XE AK 30A	22,67 ± 0,03	0,0858 ± 0,0048	77,67 ± 10,68	353,93 ± 122,58	6604,61 ± 5473,57	64,11 ± 5,89	3,66 ± 0,88	0,53 ± 0,01	22,26 ± 1,29	24,02 ± 2,92	0,00 ± 0,00	45,39 ± 1,62	1,00 ± 0,00	0,27 ± 0,03

Im Fall der Proben RF 11 und AK 33-36 war keine Auswertung der Daten möglich, da für die eluierten Probenbestandteile entweder nur RI- oder nur RALS/LALS-Daten detektiert werden konnten. Für eine Auswertung ist jedoch eine Kombination von RI- und RALS/LALS-Daten erforderlich. Bei den Proben XLPM lagen die ermittelten Daten zu weit auseinander, als dass eine aussagekräftige Auswertung der Daten möglich war.



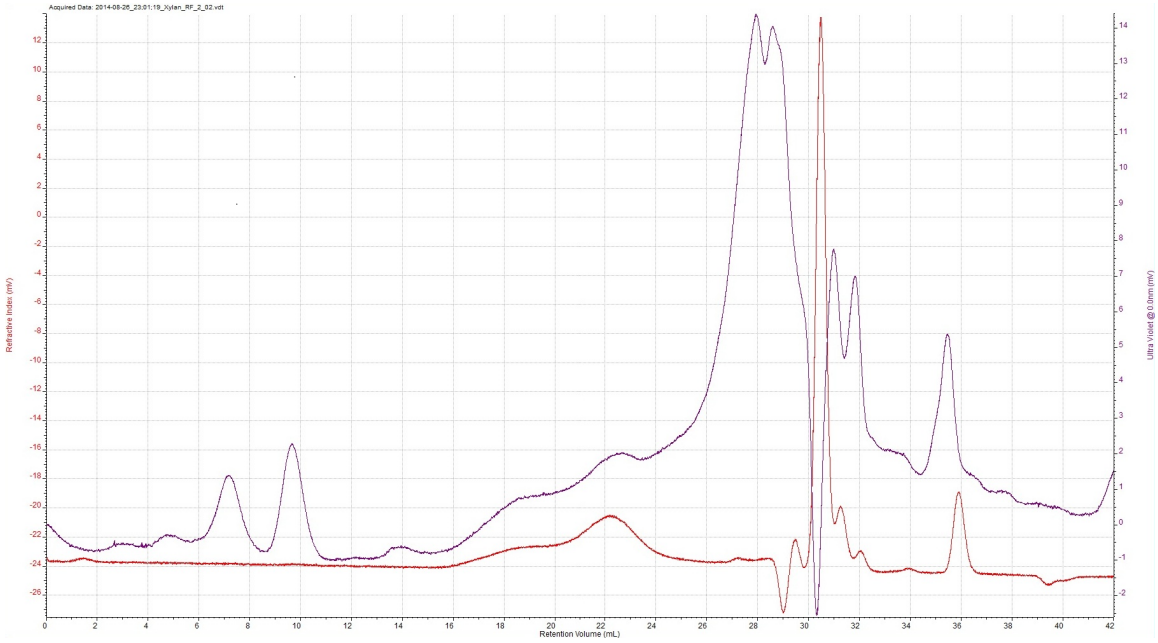
(a)



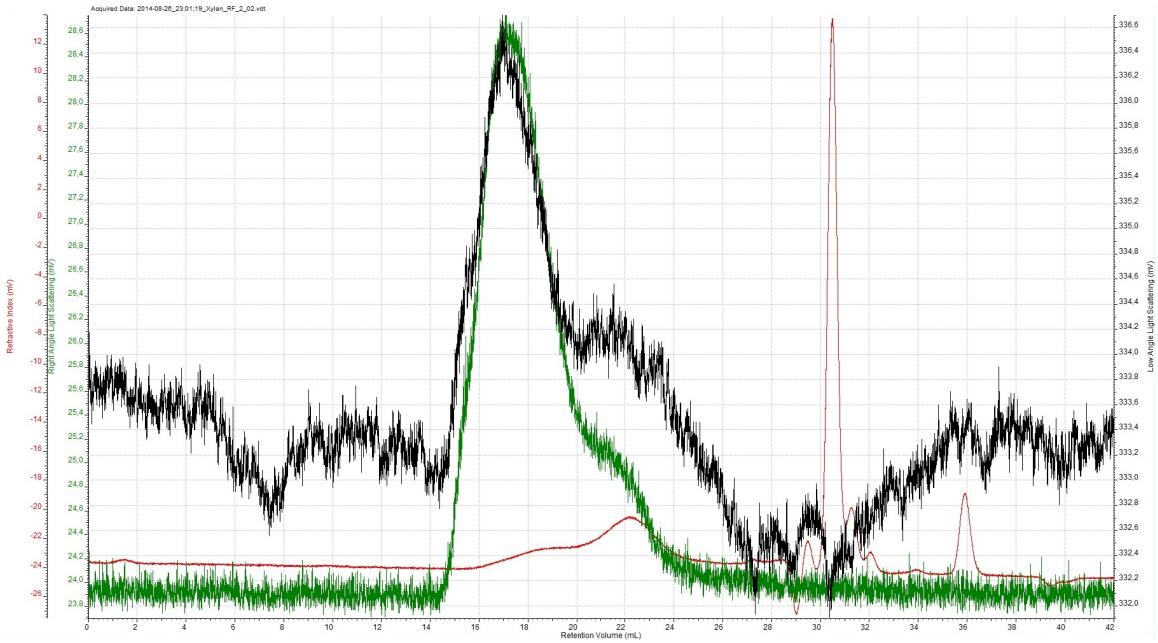
(b)

Abbildung 6.1: Darstellung der GPC-TDA RI-Signale von Probe (a) XE RF 2 und (b) XE RF 9

Quelle: „Seromed, Biochrom GmbH: Earle´s and Hanks´s balanced salts, BC catalogue“



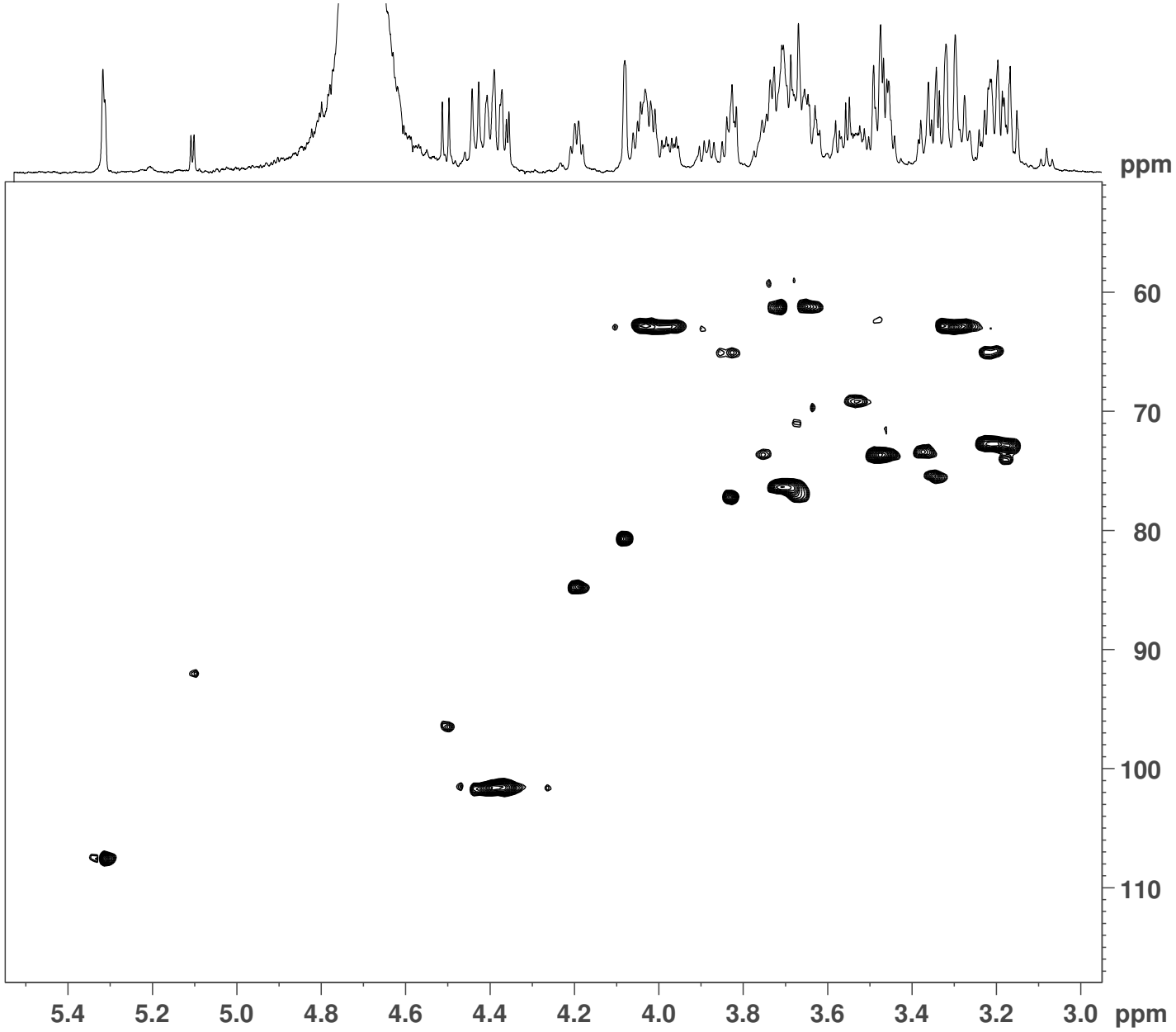
(a)



(b)

Abbildung 6.2: Darstellung der GPC-TDA Daten von Probe XE RF 2: (a) RI: rot vs UV: violett; (b) RI: rot, RALS: grün vs LALS: schwarz

LH20 F15 P5




```
Current Data Parameters
NAME      20170705LH20-F15-P5
EXPNO                      22
PROCNO                      1

F2 - Acquisition Parameters
Date_              20170707
Time                  18.36 h
INSTRUM                spect
PROBHD    Z44881_0031 (C
PULPROG     hsqcetgpsp.3
TD                     2048
SOLVENT                 D2O
NS                       32
DS                       16
SWH                7500.000 Hz
FIDRES             7.324219 Hz
AQ                 0.1365333 sec
RG                      2050
DW                    66.667 usec
DE                    50.00 usec
TE                    298.0 K
CNST2             139.0000000
D0                 0.00000300 sec
D1                 1.50000000 sec
D4                 0.00179856 sec
D11                0.03000000 sec
D16                0.00020000 sec
IN0                0.00001990 sec
TDav                        1
ZGOPTNS
SFO1              499.5523433 MHz
NUC1                       1H
P1                       9.00 usec
P2                      18.00 usec
P28          0 usec
PLW1               5.01189995 W
SFO2              125.6238885 MHz
NUC2                      13C
CPDPRG[2                  garp
P3                      15.80 usec
P14                    500.00 usec
PCPD2                   70.00 usec
PLW0         0 W
PLW2              95.00000000 W
PLW12              4.84000015 W
SPNAM[3] Crp60,0.5,20.1
SPOAL3                  0.500
SPOFFS3   0 Hz
SPW3              36.23500061 W
GPNAM[1]       SMSQ10.100
GPZ1                    80.00 %
GPNAM[2]       SMSQ10.100
GPZ2                    20.10 %
P19                    600.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD                         256
SFO1                125.6239 MHz
FIDRES             196.293976 Hz
SW                  200.007 ppm
FnMODE     Echo-Antiecho

F2 - Processing parameters
SI                        1024
SF                 499.5500000 MHz
WDW                     QSINE
SSB                         2
LB           0 Hz
GB           0
PC                      1.40

F1 - Processing parameters
SI                        1024
MC2            echo-antiecho
SF                 125.6119470 MHz
WDW                     QSINE
SSB                         2
LB           0 Hz
GB           0
```

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht und mich dabei unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinen Betreuern Herrn Prof. Dr. Uwe Englisch und Herrn Prof. Dr. Christian L. Schmidt für die fachkundige Betreuung, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die stetige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Ralf Moll verdanke ich eine großartige Unterstützung bei GPC- und MS-Messungen sowie viele geistreiche Diskussionen.

Bei Herrn Dr. Thorsten Biet bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft und Aufnahme der NMR-Spektren.

Frau Eva Ziehm danke ich für die Unterstützung bei experimentellen Versuchen und FT-IR Spektroskopie.

Bei Frau Dr. Britta Beyerlein, Katharina Gasser und Christian Grünewald bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit bezüglich der mikrobiologischen Aspekte dieser Arbeit.

Herrn Dipl.-Ing. (FH) Bernd Brinker danke ich für die stetige Unterstützung bei experimentellen Versuchen sowie für die hilfreichen Anregungen.

Besonderer Dank gilt Eva Ziehm, Christian Grünewald, Johanna Gasser und Nicole Kuhlmann für die tatkräftige praktische und mentale Unterstützung.

Ich bedanke mich bei der kompletten Arbeitsgruppe für die tolle und freundliche Arbeitsatmosphäre sowie Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie und Freunden danke ich für die Unterstützung in den verschiedensten Bereichen während des gesamten Studiums.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2014 bis Oktober 2017 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Uwe Englisch am Centrum Industrielle Biotechnologie der Fachhochschule Lübeck angefertigt. Sie erfolgte im Rahmen des Projektes „Nachhaltige Nutzung von Nebenprodukten (Haferspelzen) der Lebensmittelindustrie zur Gewinnung neuer Wertstoffe“, welches durch eine BMBF-Förderung finanziell unterstützt wurde.