Strukturaufklärung von Ballaststoff-kohlenhydraten

◆ Ballaststoffe sind – ihrem Namen zum Trotz – kein überflüssiger Ballast in der Nahrung. Der positive Einfluss von Ballaststoffen auf die Gesundheit steht in engem Zusammenhang mit den chemischen Strukturen ihrer Komponenten. Die Strukturaufklärung der Ballaststoffkomponenten und der Einfluss der Strukturen auf die physiologischen Effekte ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Polysaccharide in Ballaststoffen und ihr Einfluss auf das Darmmilieu

◆ Gemäß einer kürzlich erneut überprüften Definition für Ballaststoffe[1)] bestehen diese aus essbaren Pflanzenteilen oder analogen Kohlenhydraten, die resistent gegen Verdauung und Absorption im menschlichen Dünndarm sind und im Dickdarm teilweise oder vollständig fermentiert werden. Neben anderen positiven physiologischen Effekten haben Ballaststoffkohlenhydrate unterschiedlichste Wirkungen auf die Physiologie und Funktion des Darms. Das spiegelt die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der Poly- und Oligosaccharide wider.

Eine zentrale Rolle in der heutigen Ballaststoffforschung spielt die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen der Mikroorganismenflora im Dickdarm und den Ballaststoffkohlenhydraten. Durch Fermentation der Kohlenhydrate erhöht sich die Bakterienmasse und damit auch das Stuhlvolumen.[2)] Doch das ist nicht der einzige Effekt, den der Fermentationsprozess von Polysacchariden im Dickdarm hat. Aufgrund der komplexen Natur der Mikroorganismenflora im Dickdarm und mangelnder oder ungenauer Strukturinformationen übe die Substrate wird die Bedeutung von Bakterienwachstum und -metabolismus bislang jedoch nur unzureichend verstanden. Die Verstoffwechselung der Kohlenhydrate durch die Mikroorganismenflora kann die Zusammensetzung derselben verändern,[3)] was sich in ihrer metabolischen Aktivität ausdrückt (z. B. durch reduzierte Bildung von genotoxischen und tumorfördernden Substanzen sowie von Carcinogenen).[4)]

Besonderes Interesse gilt der physiologischen Bedeutung der von Mikroorganismen gebildeten kurzkettigen Fettsäuren (Acetat, Propionat und Butyrat), die einen direkten Einfluss auf die Darmmukosa haben. Größte Aufmerksamkeit kommt dabei zur Zeit dem Butyrat zu, das als wichtigstes luminales Substrat von der Mukosa oxidiert wird. Butyrat vermindert das Wachstum von Tumorzellen und induziert ihre Differenzierung und Apoptose.[5–7)]

Eine zentrale Komponente des Fermentationsprozesses ist das Substratangebot. Je nach chemischer Struktur und Lignifizierungsgrad der Kohlenhydrate werden die Substrate vollständig oder nur partiell fermentiert.[8,9)] Auch das Verhältnis der gebildeten kurzkettigen Fettsäuren zueinander hängt von den Substraten ab. Aus der Abhängigkeit des Fermentationsprozesses von der Substratstruktur folgt auch in Zukunft die Notwendigkeit der detaillierten Strukturaufklärung und -charakterisierung der Komponenten von Bal-

◆ NMR-Spektroskopie in der Kohlenhydratchemie

Zur Strukturanalyse von Kohlenhydraten werden vor allem die folgenden zweidimensionalen NMR-Techniken eingesetzt:

- (H,H)-COSY (Correlated Spectroscopy)
- RCT (Relayed-Coherence-Transfer)-(H,H)-COSY
- TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)
- HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)
- Gradient-Selected-HMQC-TOCSY
- Gradient-Selected-HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
- NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy)
- ROESY (Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy)

Das routinemäßig angewendete (H,H)-COSY-Experiment dient der Zuordnung der Protonensignale in den komplexen Spektren der Oligo- und Polysaccharide. Ausgehend von eindeutig zugeordneten Signalen (zumeist die Signale der anomeren Protonen) werden Korrelationen zwischen skalar gekoppelten Protonen erkannt. Die Strukturanalyse von Kohlenhydraten ist ein Hauptanwendungsgebiet von RCT-(H,H)-COSY- und TOCSY-Experimenten, mit denen im Gegensatz zum (H,H)-COSY-Experiment auch Korrelationspeaks von nicht skalar gekoppelten Protonen erhalten werden. Mit Hilfe dieser Experimente ist es möglich, die Protonensignale eines Oligosaccharids den Monosaccharideinheiten zuzuordnen. Alternativ zum TOCSY-Experiment kann auch seine eindimensionale Variante, das Selective-TOCSY- oder HOHAHA (Homonuclear Hartmann-Hahn)-Experiment, eingesetzt werden. Das HMQC- und vor allem das Gradient-Selected-HMQC-TOCSY-Experiment sind bei eindeutig zugeordneten Protonenresonanzsignalen eine große Zuordnungshilfe für ^{13}C-Resonanzsignale. Die Sequenzanalyse, die Bestimmung der glykosidischen Bindungen und Ringgrößen kann mit Hilfe des Gradient-Selected-HMBC-Experiments erfolgen. NOESY- bzw. ROESY-Experimente kommen bei der Aufklärung der Konstitution und der in Lösung vorliegenden Konformation komplexer Moleküle zum Einsatz.

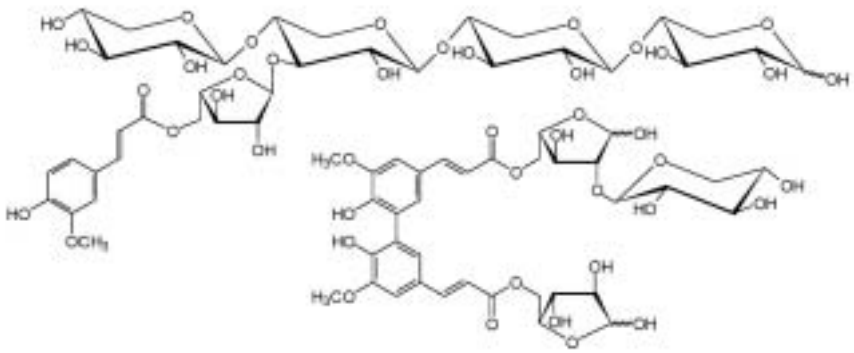

*Abb. 1. **Strukturen des größten bisher isolierten Ferulasäure-Oligosaccharids aus Getreidearabinoxylanen[20] (oben) und eines nach saurer Hydrolyse identifizierten Diferulasäure- Oligosaccharids, welches die Cross-link-Funktion von Diferulasäuren zeigt[21] (unten).***

laststoffen. Strukturaufklärung ist nur der erste Schritt zum Verständnis der Wechselwirkungen im Dickdarm; im zweiten Schritt müssen diese Wechselwirkungen in Zusammenhang mit definierten Strukturmerkmalen des Substrates in Verbindung gebracht werden – ein Weg, der bereits langsam beschritten wird.[10)]

Strategien in der Strukturanalyse von Polysacchariden aus Ballaststoffen

◆ Die Fragen nach der Natur, der Sequenz und den Bindungen der Zuckerbausteine, deren anomeren Konfigurationen und Ringgrößen sowie nach dem Vorkommen von Nicht-Zucker-Komponenten wie Acetate, Sulfate oder Ferulate in Ballaststoffen können mit vielen Analysetechniken beantwortet werden, wobei die spektroskopischen Methoden dominieren. Grundsätzlich kann das gereinigte Polysaccharid oder isolierte Oligosaccharide nach Partialhydrolyse untersucht werden. Eine Alternative ist die Analyse der Bausteine nach Totalhydrolyse, z. B. die Methylierungsanalyse oder die reduktive Spaltung. Häufig führen nur Kombinationen dieser Verfahren zum Erfolg.

In der aktuellen Strukturaufklärung werden am häufigsten Oligosaccharide untersucht, die in möglichst übersichtlicher Weise aus dem Polysaccharid gewonnen werden. Die gebräuchlichsten Fragmentierungsmethoden sind dabei die partielle saure Hydrolyse sowie der enzymatische Abbau. Zur enzymatischen Hydrolyse von Ballaststoffpolysacchariden bieten sich z. B. endo-Xylanasen (zur Hydrolyse von Arabinoxylanen), Lichenasen (zur Hydrolyse von mixed-linked β-Glucanen) sowie endo-Polygalacturonasen allein oder in Kombination mit Pektinmethylesterasen (zur Hydrolyse von einigen Pektinen) an. Zum teilweisen Abbau von Arabinanseitenketten in Pektinen wird auch eine Kombination aus endo-Arabinanase und β-Arabinofuranosidase eingesetzt. Die saure Hydrolyse von Polysacchariden nutzt die unterschiedliche Säurestabilität von glycosidischen Bindungen. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen ist es ebenfalls möglich, die saure Partialhydrolyse ohne Spaltung möglicher Esterbindungen zu Nicht-Kohlenhydratkomponenten durchzuführen.[11)]

Nach Isolierung der Hydrolyseprodukte (z. B. mit Gelpermeations- oder Ionenaustauschchromatographie) werden deren Strukturen analysiert. Hier kommt eine Kombination aus ein- und mehrdimensionalen NMR-Experimenten mit massenspektrometrischen Methoden zum Einsatz. Neben der eindimensionalen ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektroskopie sind in der Strukturaufklärung der Oligo- und Polysaccharide vor allem die mehrdimensionalen Experimente von großer Bedeutung (siehe Kasten auf S. 361). Einige gehören inzwischen für den NMR-Spektroskopiker zum Alltag und finden auch als Folge des gesteigerten Interesses an der Strukturaufklärung Einzug in die Lebensmittelchemie. In letzter Zeit wurden durch Anwendung von NMR auf hydrolytisch erhaltene Oligosaccharide die Strukturen vieler Ballaststoffpolysaccharide aufgeklärt: So konnten z. B. Cui et al. nach Partialhydrolyse mit Lichenase ein β-Glucan aus Weizenkleie detailliert beschreiben.[12)]

Problematisch für die Identifizierung von isolierten Oligosacchariden mit NMR-Spektroskopie ist jedoch häufig, dass nur sehr geringe Mengen isoliert werden können. NMR-Untersuchungen sind dann mit extrem langen Messzeiten verbunden oder nicht möglich. Um dieses Problem zu lösen, werden NMR-Methoden entwickelt, die sehr geringe Probenmengen in akzeptabler Zeit handhaben: So identifizierten Broberg et al. enzymatisch erhaltene Arabinoxylanoligosaccharide nach ionenchromatographischer Trennung im analytischen Maßstab mit ein- und zweidimensionaler ^{1}H-NMR-Spektroskopie.[13)] Dank der Nanoprobe-NMR-Methodik benötigten sie nur 3 bis 18 µg Substrat (bei Molekulargewichten zwischen 569 und 1229) um DQF (Double Quantum Filtered)-COSY-, TOCSY- und ROESY-Spektren in weniger als 24 Stunden zu erhalten.

Neben der NMR-spektroskopischen Untersuchung von hydrolytisch erhaltenen Oligosacchariden werden gereinigte, lösliche Polysaccharide auch direkt NMR-spektroskopisch charakterisiert. Auch diese Möglichkeit der Strukturcharakterisierung wird verstärkt eingesetzt, beispielsweise zur Ermittlung von Arabinoxylanstrukturen.[14–16)] Die Spektren von Polysacchariden sind sehr komplex. Zur Bestimmung von Strukturdetails dient daher bevorzugt die Untersuchung von Oligosacchariden.

Bei einigen Materialien ist die Probenvorbereitung für die hochauflösende NMR-Spektroskopie problematisch, z. B. wenn diese wie einige Pektine in Wasser sehr viskose Lösungen bilden. Zur Strukturcharakterisierung solcher Polysaccharide verwenden z. B. Sinitsya et al. die Festkörper-NMR-Spektroskopie (^{13}C-Cross Polarization/Magic Angle Spinning-NMR).[17)]

Strukturaufklärung von Kohlenhydraten mit Massenspektrometrie

◆ Im Gegensatz zur Strukturaufklärung von Proteinen, werden Fast Atom Bombardment (FAB)-MS und Electrospray Ionization (ESI)-MS in der Lebensmittelchemie viel häufiger lediglich zur Bestimmung des Molekulargewichts eingesetzt und die Möglichkeit zur Sequenzierung bei der Strukturaufklärung von Kohlenhydraten außer Acht gelassen. Dabei bieten sich diese Methoden auch zur Sequenzierung von underivatisierten und vor allem von derivatisierten (permethylierten, peracetylierten) Kohlenhydraten an. FAB-MS ist zwar – im Vergleich zu MALDI- und ESI-MS – relativ unempfindlich, hat aber den Vorteil, dass man sowohl Informationen über das Molekulargewicht als auch über Sequenzen erhält.[18] MALDI-TOF-MS ist sehr viel empfindlicher und benötigt etwa 1 pmol des underivatisierten Oligosaccharids,[13] liefert jedoch nur sehr wenige Fragmentionen.

Auch eine der neuesten Entwicklungen der Massenspektrometrie wird bisher vor allem in der Strukturaufklärung von Proteinen und Glycoproteinen angewendet: MALDI-Q-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Quadrupole-Time of Flight-Mass Spectrometry), mit der MS/MS-Analysen im fmol-Maßstab durchgeführt werden können.[19]

Identifizierung von Phenolcarbonsäure-Cross-links

◆ Große Fortschritte werden in der Strukturaufklärung der Arabinoxylane erreicht: Insbesondere die Bindung von Phenolcarbonsäuren und deren Dimerisierungsprodukten an die Arabinoxylane wird derzeit intensiv erforscht. Dimere Phenolcarbonsäuren, vor allem Diferulasäuren, fungieren als Arabinoxylan-Cross-links.[20–23] Dadurch können sie die physikochemischen[24,25] und folglich ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Arabinoxylanen beeinflussen. So zeigte die Arbeitsgruppe von Ralph, dass Diferulasäure-Cross-links sowohl Ausmaß als auch Geschwindigkeit des enzymatischen Abbaus von Polysacchariden herabsetzen.[26] Lequart et al. identifizierten nach enzymatischer Partialhydrolyse das bisher größte aus Arabinoxylanen isolierte Ferulasäure-Oligosaccharid: Es besteht aus Ferulasäure sowie einer Arabinose- und vier Xyloseeinheiten (Abbildung 1, oben).[27] Identifiziert wurde die Verbindung mit zweidimensionaler NMR-Spektroskopie und MALDI-TOF-MS. Die Cross-link-Eigenschaften von Ferulasäuredimeren konnten durch die Isolierung und Identifizierung zweier Diferulasäure-Arabinoxylan-Oligosaccharide nach saurer Partialhydrolyse nachgewiesen werden (Abbildung 1, unten).[28]

Das Interesse an der Quervernetzung von Polysacchariden (und von Polysacchariden mit Proteinen) über Phenolcarbonsäure-Cross-links ist momentan groß. Über Diferulasäuren verknüpfte Polysaccharide beeinflussen nicht nur die ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Ballaststoffen, sondern sind neuerdings auch für andere Bereiche der Lebensmittelchemie von großem Interesse: Vermutlich erhalten Phenolcarbonsäure-Cross-links die Textur von Gemüse und Früchten während des Kochvorgangs.[29] Außerdem beeinflussen sie teigrheologische und Backeigenschaften.[30] Auch für den Brauprozess können sie von Bedeutung sein[31] und natürlich auch für die Eigenschaften von Hydrokolloiden.[32] Dementsprechend konzentrieren sich aktuelle Arbeiten nicht mehr nur auf die Polysaccharide der häufig untersuchten Pflanzen aus den Familien der Poaceae und Chenopodiaceae, sondern auch auf die Phenolcarbonsäure-Polysaccharide aus Pflanzen anderer Familien wie den Bromeliaceae, zu denen z. B. die Ananas (*Ananas comosus* Merr.) gehört.[33]

Mirko Bunzel
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
Universität Hamburg
Bunzel@lc.chemie.uni-hamburg.de

1) *L. Prosky,* Biofactors *2000,* 12, *289.*
2) *H. L. Chen et al.,* Am. J. Clin. Nutr. *1998,* 68, *711.*
3) *S. Silvi et al.,* J. Appl. Microbiol. *1999,* 86, *521.*
4) *I. R. Rowland et al.,* Carcinogenesis *1998,* 19, *281.*
5) *W. Scheppach et al.,* Eur. J. Cancer *1995,* 31A, *1077.*
6) *S. Archer et al.,* Surgery *1998,* 124, *248.*
7) *J. Wang, E. A. Friedman,* Gastroenterology *1998,* 114, *940.*
8) *L. V. Glitsø et al.,* J. Sci. Food Agric. *2000,* 80, *1211.*
9) *S. Karppinen et al.,* J. Sci. Food Agric. *2000,* 80, *1469.*
10) *K. M. J. van Laere et al.,* J. Agric. Food Chem. *2000,* 48, *1644.*
11) *L. Saulnier et al.,* Carbohydr. Res. *1995,* 272, *241.*
12) *W. Cui et al.,* Carbohydr. Polym. *2000,* 41, *249.*
13) *A. Broberg et al.,* Carbohydr. Res. *2000,* 38, *375.*
14) *M. Nilsson et al.,* Carbohydr. Polym. *2000,* 41, *397.*
15) *S.M. Ragaee et al.,* J. Agric. Food Chem. *2001,* 49, *2437.*
16) *G. Dervilly et al.,* J. Agric. Food Chem. *2000,* 48, *270.*
17) *A. Sinitsya et al.,* J. Carbohydr. Chem. *1998,* 17, *279.*
18) *A. Dell,* Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., *1987,* 45, *19.*
19) *A. Shevchenko et al.,* Anal. Chem. *2000,* 72, *2132.*
20) *J. Ralph et al.,* J. Chem. Soc. Perkin Trans. *1994,* 1 *3485.*
21) *M. Bunzel et al.,* J. Agric. Food Chem. *2000, 48, 3166.*
22) *J. H. Grabber et al.,* J. Agric. Food Chem. *2000,* 48, *6106.*
23) *M. Bunzel et al.,* J. Sci. Food Agric. *2001,* 81, *653.*
24) *M. E. F. Schooneveld-Bergmans et al.,* Carbohydr. Polym. *1999,* 38, *309.*
25) *A. Oosterveld et al.,* Carbohydr. Polym. *2001,* 44, *9.*
26) *J. H. Grabber et al.,* J. Sci. Food. Agric. *1998,* 77, *193.*
27) *C. Lequart et al.,* Carbohydr. Res. *1999,* 319, *102.*
28) *L. Saulnier et al.,* Carbohydr. Res. *1999,* 320, *82.*
29) *A. J. Parr et al.,* J. Sci. Food Agric. *1996,* 71, *501.*
30) *E. Labat et al.,* Cereal Chem. *2000,* 77, *823.*
31) *D. Hernanz et al.,* J. Agric. Food Chem. *2001,* 49, *4884.*
32) *D. Georget et al.,* J. Sci. Food Agric. *1999,* 79, *481.*
33) *B. G. Smith, P. J. Harris,* Phytochemistry *2001,* 56, *513.*