

Technische Universität München

Lehrstuhl für Mikrobiologie

Enzymatische Hydrolyse von Hemicellulose zu Oligosacchariden

Matthias Linh Nam Mechelke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Erwin Grill

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Wolfgang Liebl
2. Prof. Dr. Johan Philipp Benz
3. Prof. Dr. Karl-Heinz Engel

Die Dissertation wurde am 29.11.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 26.02.2018 angenommen.

Kurzfassung

Der gezielte enzymatische Abbau der Polysaccharide aus pflanzlicher Biomasse ist für die Verzuckerung und Nutzbarmachung dieser nachwachsenden Rohstoffe für fermentative/chemisch-katalytische Produktionsverfahren von großer Bedeutung. Daneben bietet der Abbau mit Enzymen das Potential zur Herstellung präbiotisch wirksamer Oligosaccharide aus niedrigwertigen Bioraffinerie-Nebenprodukten. Solche Oligosaccharide können für eine Verbesserung des Darmmikrobioms von Mensch und Tier eingesetzt werden und stellen damit eine attraktive Ressource für die Entwicklung neuer Produkte in der Futtermittel-, Lebensmittel- und Healthcare-Industrie dar.

In dieser Arbeit wurde eine *Toolbox* von 96 Enzymen erstellt, mit der Oligosaccharide mit potentiell präbiotischen Eigenschaften aus den Hemicellulosen Arabinoxylan (Xylooligosaccharide – XOS, Arabinoxylooligosaccharide – AXOS) und Glucomannan (Glucomannooligosaccharide – GMOS) hergestellt werden können. Die untersuchten Enzyme stammten hierbei aus den thermophilen, saccharolytischen Bakterien *Clostridium thermocellum*, *Clostridium sterco-rarium*, *Herbinix hemicellulosilytica*, *Herbivorax saccincola* und *Clostridium cellulosi* und zeigen hierdurch eine hohe Thermostabilität. Bei der Charakterisierung der Enzyme dieser *Toolbox* wurden verschiedene Substrat- und Produktspezifitäten beschrieben: So wurde zwischen GH10- und GH11-Xylanasen, aber auch innerhalb der GH10-Xylanasen, eine unterschiedliche Fähigkeit der Enzyme zur Hydrolyse von AXOS ermittelt. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den untersuchten α -Arabinofuranosidasen, welche je nach Enzym eine unterschiedliche Eignung für die Hydrolyse von einfach- und doppelt-arabinosylierten AXOS zeigten. Auch bei der Hydrolyse von Glucomannan mittels β -Glucanasen und β -Mannanasen konnten, je nach verwendeter Enzymaktivität und Glycosidhydrolasefamilie, verschiedene Produktspektren unterschieden werden. Diese Enzymcharakterisierung bildet somit die Basis für eine Enzymsammlung, mit welcher gezielt für präbiotische Anwendungen angepasste Oligosaccharidpräparationen hergestellt werden können. Als Grundlage für die detaillierte Charakterisierung der hergestellten Oligosaccharidmischungen diente eine Kombination verschiedener Methoden, darunter Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD), Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Refraktionsindex-Detektor (HPLC-RI) und Dünnschichtchromatographie (DC). Ein systematischer Vergleich der Methoden zeigte, dass die HPAEC-PAD trotz einer vergleichsweise niedrigen Signalstabilität die höchste Sensitivität und Trennleistung für die Analyse von Oligosacchariden aufwies.

Zusätzlich wurde die Herstellung von XOS, AXOS und GMOS vom Mikroliter- (100 µL) in den Liter-Maßstab (1,0 bzw. 4,5 L) hochskaliert und eine präparative Anreicherung der Oligosaccharide mittels Querstromfiltration, sukzessiver Resolubilisierung mit Ethanol-Wasser-Gemischen, HPLC-RI und Größenausschlusschromatographie (SEC) durchgeführt.

Abstract

The targeted enzymatic degradation of polysaccharides from plant biomass is of major significance for the saccharification and utilization of these renewable raw materials for fermentative/chemical-catalytic production processes. In addition, polysaccharide hydrolysis using enzymes offers the potential for producing valuable prebiotic oligosaccharides from low-value biorefinery by-products. Such oligosaccharides can then be used for an improvement of the gut microbiome of humans and animals and thus represent an attractive resource for the development of new products in the feed, food, and healthcare industry.

In this thesis, a toolbox of 96 enzymes was created which can be used to produce oligosaccharides with potential prebiotic properties from the hemicelluloses arabinoxylan (xylooligosaccharides – XOS, arabinoxylooligosaccharides – AXOS) and glucomannan (glucomannooligosaccharides – GMOS). The investigated enzymes were obtained from the thermophilic, saccharolytic bacteria *Clostridium thermocellum*, *Clostridium stercorarium*, *Herbinix hemicellulosilytica*, *Herbivorax saccincola* and *Clostridium cellulosi* and therefore showed high thermostability. During the characterization of the enzymes diverse new substrate and product specificities were described: The ability to hydrolyze AXOS differed between GH10 and GH11 xylanases but also among GH10 xylanases. A similar picture emerged from characterization of the investigated α -arabinofuranosidases, which showed differences in the enzymes' abilities to hydrolyze single- and twofold-substituted AXOS. Furthermore, using β -glucanases and β -mannanases for the hydrolysis of glucomannan, various product patterns were observed depending on the enzymes' activity and glycoside hydrolase family affiliation. The diversity of substrate and product specificity of the enzyme toolbox hence serves as the basis for a platform for the targeted production of oligosaccharide preparations optimized for prebiotic applications. The detailed characterization of the produced oligosaccharide mixtures was based on a combination of various methods, including high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD), high performance liquid chromatography with a refractive index detector (HPLC-RI) and thin layer chromatography (DC). A systematic comparison of these methods showed that HPAEC-PAD, despite a comparably low signal stability, showed the highest sensitivity and separation capacity for the analysis of oligosaccharides.

In addition, the preparation of XOS and AXOS as well as GMOS was scaled up from microliter (100 μ L) to the liter scale (1.0 and 4.5 L, respectively) and a preparative purification of oligosaccharides using crossflow filtration, successive resolubilization using ethanol-water-mixtures, HPLC-RI and size exclusion chromatography (SEC) was performed.

Publikationen

Mechelke, M., Herlet, J., Benz, J.P., Schwarz, W.H., Zverlov, V.V., Liebl, W., Kornberger, P., 2017. HPAEC-PAD for oligosaccharide analysis – Novel insights into analyte sensitivity and response stability. *J. Anal. Bioanal. Chem.* <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0678-y>.

Mechelke, M., Koeck, D. E., Broecker, J., Roessler, B., Krabichler, F., Schwarz, W. H., Zverlov, V. V.; Liebl, W., 2017. Characterization of the arabinoxylan-degrading machinery of the thermophilic bacterium *Herbinix hemicellulosilytica* - six new xylanases, three arabinofuranosidases and one xylosidase. *J. Biotechnol.* 257: 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.023>.

Heinze, S., **Mechelke, M.**, Kornberger, P., Liebl, W., Schwarz, W.H., Zverlov, V.V, 2017. Identification of endoxylanase XynE from *Clostridium thermocellum* as the first xylanase of glycoside hydrolase family GH141. *Sci. Rep.* 7(1): 11178. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11598-y>.

Leis, B., Held, C., Bergkemper, F., Dennemarck, K., Steinbauer, R., Reiter, A., **Mechelke, M.**, Moerch, M., Graubner, S., Liebl, W., Schwarz, W.H., Zverlov, V.V., 2017. Comparative characterization of all cellulosomal cellulases from *Clostridium thermocellum* reveals high diversity in endoglucanase product formation essential for complex activity. *Biotechnol. Biofuels.* 10: 240. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0928-4>.

Angelov, A., Vu Thuy, T. P., Uebelacker, M., Brady, S., Leis, B., Pill, N., Brolle, J., **Mechelke, M.**, Moerch, M., Henrissat, B., Liebl, W., 2017. A metagenome-derived thermostable β -glucanase with an unusual module architecture which defines the new glycoside hydrolase family GH148. *Sci. Rep.* 7(1): 17306. <https://doi:10.1038/s41598-017-16839-8>.

Koeck, D.E., **Mechelke, M.**, Zverlov, V.V., Liebl, W., Schwarz, W.H., 2016. *Herbivorax saccincola* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic, anaerobic, thermophilic bacterium isolated via *in sacco* enrichments from a lab-scale biogas reactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66 (11): 4458-4463. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001374>.

Beiträge zu Fachtagungen

Mechelke, M., 2015. A toolbox of thermostable enzymes for the valorization of plant biomass: specific degradation to products of higher value. ProBio-Conference – Making more of Bioeconomy R&D Results. Vortrag. Brüssel, Belgien.

Ripollés, C., Gómez, M.C., Latorre, M., Gallur, M., **Mechelke, M.**, Liebl, W., Schwarz, W, 2016. Valorization of hemicellulose oligomers for functional food applications. 14th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp. Vortrag. Autrans, Frankreich.

Mechelke, M., 2016. ValorPlus: Development of closed-loop biorefineries. Session: Bioeconomy policies: Building up Europe. Biospain-Conference. Eingeladener Vortrag. Bilbao, Spanien.

Benz, J.P., **Mechelke, M.**, Herlet, J., 2017. HPAEC-PAD – Perfekt für Groß- und Klein(e) Zucker). Ionenchromatographie-Seminar, Thermo Fisher Scientific. Eingeladener Vortrag. Freising, Deutschland.

Vorwort

Mein erster Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl für die Möglichkeit, meine Dissertation zu einem so interessanten Thema am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München durchführen zu dürfen. Zusätzlich danke ich Dr. Wolfgang Schwarz und Dr. Vladimir Zverlov, für den Aufbau einer so vielfältigen Arbeitsgruppe mit einem so tollen Arbeitsklima. Ich habe mich in meiner Arbeit durch das perfekte Zusammenspiel dieser drei, ihrer engagierten Betreuung und ihrem offenen Ohr bei fachlichen aber auch privaten Fragen stets sehr gut aufgehoben gefühlt.

Das Absolvieren der Doktorarbeit zu einer so komplexen und breiten Fragestellung war nur durch die hervorragende Unterstützung und Zusammenarbeit von vielen Menschen möglich. Mein Dank gilt insbesondere meinen Kollegen Dr. Daniela Köck, Dr. Björn Andreeßen, Dr. Petra Kornberger, Dr. Claudia Held, Dr. Benedikt Leis, Dr. Waldemar Hauf, Dr. Georg Schmid, Jonathan Herlet, Jannis Bröker, Simon Heinze, Alexander Pechtl, Matthias Mörch, Regina Rettenmaier, Patricia Krähe, Sabrina Sigl, Maria Übelacker, Kornelia Garus und Sibylle Schadhauer, aber auch den vielen Studenten, mit denen ich zusammenarbeiten durfte, vor allem Florian Krabichler, Benjamin Rößler, Julius Glanz und Jurik Mutter.

Besonders hervorheben möchte ich hierbei die Leistung von Jona und Petra, aber auch von Prof. Dr. Philipp Benz, ohne die die Etablierung der HPAEC-PAD- und HPLC-Analytik nicht möglich gewesen wäre, Simon und Dani, für ihre hervorragende Vorarbeit im Vorfeld meiner Dissertation, und Jannis, welcher sich wacker mit mir durch die vielen ValorPlus-Berichte und ValorPlus-Meetings inklusive Milestones, Deliverables und LCA durchkämpfen durfte. Nicht zu vergessen sind auch der IT-Supportdienst „Mörch“ und die guten Seelen des Labors, insbesondere Patricia, Sabrina, Konny, Maria und Sibylle.

Zu guter Letzt danke ich auch meiner Familie, meiner Freundin Sabrina und auch ihrer Familie für ihre Unterstützung während meiner Promotion. Es war eine schöne Zeit, auf die ich gerne zurückblicke und für welche ich allen Beteiligten danken möchte.

Inhaltsverzeichnis

I.	Abbildungsverzeichnis	XV
II.	Tabellenverzeichnis	XVII
III.	Abkürzungsverzeichnis	XIX
1	Einführung	1
1.1	Struktureller Aufbau pflanzlicher Biomasse.....	2
1.1.1	Komponenten der pflanzlichen Biomasse.....	2
1.1.2	Strukturelle Vielfalt der Hemicellulose.....	5
1.2	Mikrobieller Abbau pflanzlicher Biomasse.....	9
1.2.1	Übersicht über saccharolytische Bakterien.....	10
1.2.2	Enzymsysteme zum Abbau pflanzlicher Biomasse.....	11
1.3	Industrielle Nutzung pflanzlicher Biomasse.....	13
1.3.1	Totalhydrolyse von Hemicellulose zu Monosacchariden zur Herstellung von Biotreibstoff.....	13
1.3.2	Partielle Hydrolyse von Hemicellulose zu Oligosacchariden als Präbiotika für die menschliche und tierische Ernährung.....	14
1.4	Übersicht über die Zuckanalytik.....	15
1.4.1	Herausforderung der Zuckanalytik.....	15
1.4.2	Übersicht über Chromatographiemethoden der Zuckanalytik.....	16
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Material, Geräte und Verbrauchsmittel.....	21
2.1.1	Geräte und Software.....	21
2.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmittel.....	24
2.1.3	Medien und Puffer.....	26
2.1.4	Mono-, Oligo- und Polysaccharide sowie pNP-Substrate.....	29
2.1.5	Bakterienstämme und Plasmide.....	30
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	31
2.2.1	Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	31
2.2.2	Transformation.....	31

2.2.3	Produktion von rekombinanten Proteinen.....	31
2.2.4	Zellaufschluss	32
2.2.5	Aufreinigung von rekombinantem Protein mittels IMAC.....	32
2.2.6	Hitzedenaturierung von Wirtszellproteinen	33
2.2.7	SDS-PAGE zur Expressionskontrolle	34
2.2.8	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	35
2.3	Reaktionsansätze für den enzymatischen Verdau von Polysacchariden, pNP-Substraten und Oligosacchariden	36
2.3.1	Enzymatischer Verdau von Polysacchariden.....	36
2.3.2	Qualitative Aktivitätsbestimmung von Enzymen auf Polysaccharide.....	37
2.3.3	Aktivitätsbestimmung von Enzymen auf pNP-Substrate	38
2.3.4	Bestimmung eines Temperatur-vs-pH-Aktivitätsprofils	39
2.3.5	Enzymatischer Abbau von Oligosacchariden	40
2.4	Zuckeranalytik.....	41
2.4.1	DNSA-Assay	41
2.4.2	Dünnschichtchromatographie.....	42
2.4.3	HPLC und SEC	44
2.4.4	HPAEC-PAD	45
2.4.5	MALDI-TOF.....	48
2.5	Semipräparative Herstellung und Aufreinigung von Oligosacchariden	49
2.5.1	Proteinherstellung im 10 L-Fermenter	49
2.5.2	Semipräparative Oligosaccharidherstellung	50
2.5.3	Querstromfiltration.....	51
2.5.4	Einkonzentrierung mit Rotationsverdampfer und Exsikkator.....	53
2.5.5	Semipräparative HPLC und SEC	53
2.5.6	Sukzessive Präzipitation und Solubilisierung mit Ethanol	54
3	Ergebnisse	57
3.1	Auswahl von Polysacchariden und Enzymen für die Herstellung von Oligosacchariden	57
3.1.1	Auswahl der Polysaccharide für die Herstellung von Oligosacchariden.....	57
3.1.2	Auswahl der Enzyme für die Herstellung von Oligosacchariden aus Arabinoxylan und Glucomannan.....	58

3.2	Methodenetablierung für die Analyse von Oligosacchariden	60
3.2.1	Vergleich verschiedener Methoden für die Oligosaccharidanalytik: DC, HPLC und HPAEC-PAD	60
3.2.2	Trennleistung der HPAEC-PAD für die Oligosaccharidanalytik.....	64
3.2.3	Abfall der PAD-Sensitivität über die Zeit.....	66
3.3	Herstellung von XOS und AXOS aus Arabinoxylan.....	74
3.3.1	Charakterisierung von Xylanasen.....	74
3.3.2	Charakterisierung von α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen	80
3.3.3	Herstellung von XOS und AXOS aus Arabinoxylan mittels Xylanasen und Charakterisierung der Produktspektren	85
3.3.4	Herstellung von XOS mittels Xylanasen und α -Arabinofuranosidasen.....	92
3.3.5	Präparative Aufreinigung von XOS und AXOS	97
3.4	Herstellung von GMOS aus Glucomannan.....	101
3.4.1	Übersicht über untersuchte β -Glucanasen und β -Mannanasen	101
3.4.2	Charakterisierung des Produktspektrums von β -Glucanasen und Mannanasen	104
3.4.3	Detaillierte Produktanalyse des Produktspektrums von ct-Cel5E und ct-Cel9/44J bei der Hydrolyse von Glucomannan.....	106
3.4.4	Präparative Aufreinigung von GMOS	111
4	Diskussion.....	115
4.1	Charakterisierung der Enzymsammlung (Enzym- <i>Toolbox</i>) für die Herstellung von Oligosacchariden	115
4.2	Oligosaccharidanalytik	119
4.3	Herstellung von Oligosacchariden aus Hemicellulose	123
4.4	Eignung von XOS, AXOS und GMOS als Präbiotika.....	130
4.5	Ausblick	141
5	Literaturverzeichnis.....	143
	Anhang.....	155
i.1	Weitere Informationen zur Konzentration, Reinheit und Retentionszeit für die HPAEC-PAD verwendeter Oligosaccharide	155
i.2	Experimenteller Aufbau für die Bestimmung des Detektorsignalabfalls bei Messungen mit HPAEC-PAD	158

i.3	Daten für die Bestimmung des Detektorsignalabfalls bei Messungen mit HPAEC-PAD.....	160
i.4	Bestimmung des pH- und T-Optimums der Xylanasen, α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen aus <i>Hb. hemicellulosilytica</i>	173
i.5	Enzymkinetiken von Xylanasen.....	176
i.6	Präparative Aufreinigung von XOS und AXOS mittels HPLC und SEC.....	177
i.7	Endpunktbestimmung der Produktspektren von β -Glucanasen und β -Mannanasen auf Glucomannan.....	178
i.8	Kombinatorik von β -Glucanasen und β -Mannanasen bei der Hydrolyse von Glucomannan.....	180
ii	Eidesstattliche Erklärung.....	182
iii	Lebenslauf.....	183

I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Struktur der Lignocellulose	3
Abb. 2	Schematische Strukturen der verschiedenen Xylan-Subtypen.....	7
Abb. 3	Schematische Strukturen der verschiedenen Mannan-Subtypen.....	8
Abb. 4	Enzymaktivitäten für den Abbau von Xylan- und Mannan-basierten Polysacchariden	12
Abb. 5	Aufbau einer HPAEC-PAD-Anlage und die Funktionsweise des amperometrischen Detektors.....	18
Abb. 6	Aufbau einer präparativen Dünnschichtchromatographie.....	43
Abb. 7	Profil für Glycerin- und Lactose-Zulauf für die Proteinherstellung im 10 L-Fermenter.....	50
Abb. 8	Querstromfiltration für die Oligosaccharidaufreinigung.....	52
Abb. 9	Übersicht über die Prozessschritte für die sukzessive Präzipitation und sukzessive Solubilisierung	55
Abb. 10	Vergleich von Chromatographiemethoden zur Analyse von Arabinoxylanhydrolysaten.....	62
Abb. 11	Vergleich von Chromatographiemethoden zur Analyse von Gucomannanhydrolysaten	63
Abb. 12	Analyse verschiedener Oligosaccharide sowie enzymatischer Hydrolysate verschiedener Polysaccharide mittels HPAEC-PAD	64
Abb. 13	Zusammenhang des Retentionsfaktors k verschiedener Oligosaccharide mit der Polymerisationslänge.....	66
Abb. 14	Experimenteller Aufbau zur Bestimmung des PAD-Signalabfalls für 35 Analyten	68
Abb. 15	Vergleich der Datennormalisierung über eine Zerfallskinetik erster Ordnung (OPD) und über ISTD für C_2 , L_2 , M_2 und X_2	71
Abb. 16	PAD-Sensitivität verschiedener Analyten über die Zeit verglichen mit Glucose.....	73
Abb. 17	HPAEC-PAD-Chromatogramme der charakteristischen Abbauspektren von Arabinoxylan aus Weizen nach einer Hydrolyse mit unterschiedlichen Enzymen mit Xylanase-Aktivität	86
Abb. 18	DC charakteristischer Abbauspektren von Arabinoxylan aus Weizen nach einer Hydrolyse mit unterschiedlichen Enzymen mit Xylanase-Aktivität.....	88
Abb. 19	Präparative DC und anschließende Analyse der extrahierten Fraktionen eines mittels hh-Xyn10A erzeugten Arabinoxylanhydrolysats.....	89
Abb. 20	Vergleich des Produktspektrums verschiedener Xylanase-Typen auf Arabinoxylan vor und nach einer α -Arabinofuranosidase-Behandlung	93

Abb. 21 Quantifizierung der freigesetzten Menge an Monosacchariden und XOS beim Abbau von Arabinoxylan mittels cs-Xyn11A und hh-Xyn10A vor und nach einer Behandlung mit hh-Arf43C.....	95
Abb. 22 Prozessschema zur Oligosaccharidherstellung sowie DC nach Querstromfiltration und Aufkonzentrierung eines Arabinoxylanhydrolysats	98
Abb. 23 Präparative Aufreinigung von Arabinoxylanhydrolysaten mittels HPLC und SEC...	100
Abb. 24 Produktspektrum von β -Glucanasen und β -Mannanasen auf Glucomannan mittels DC und HPAEC-PAD.....	105
Abb. 25 Vergleich der Produktspektren von ct-Cel5E und ct-Cel9/44J via HPAEC-PAD.....	106
Abb. 26 Einzelne Analyseschritte zur Untersuchung des Produktspektrums von ct-Cel9/44J	107
Abb. 27 Über präparative DC, MALDI-TOF und HPAEC-PAD genauer bestimmtes Produktspektrum der Enzyme ct-Cel5E und ct-Cel9/44J.	109
Abb. 28 Aufreinigung von GMOS mittels HPLC und SEC	112
Abb. 29 Aufreinigung eines über ct-Cel9/44J hergestellten Glucomannanhydrolysats mittels sukzessiver Solubilisierung mit Ethanol-Wasser-Gemischen.....	113
Abb. 30 Potentielle Wirkungen von Präbiotika auf die Darmflora und auf die Gesundheit des Wirts	134

II. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht über den Anteil an Cellulose, Hemicellulose und Lignin in Bioraffinerie-relevanter Biomasse bezogen auf die Gesamttrockenmasse.....	2
Tab. 2	Geräte	21
Tab. 3	Chromatographiesäulen	23
Tab. 4	Software und Webtools.....	23
Tab. 5	Chemikalien.....	24
Tab. 6	Verbrauchsmaterialien.....	25
Tab. 7	Medien und Puffer	26
Tab. 8	Monosaccharide	29
Tab. 9	Oligosaccharide.....	29
Tab. 10	Polysaccharide	30
Tab. 11	pNP-Substrate.....	30
Tab. 12	Bakterienstämme und Plasmide	30
Tab. 13	Pipettierschema für die Erstellung von SDS Gelen	34
Tab. 14	Reaktionsbedingung für die qualitative Aktivitätsbestimmung von Enzymen verschiedener Organismen auf Polysaccharide	38
Tab. 15	Puffer für die Ermittlung der pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität	40
Tab. 16	Betriebsbedingungen für HPLC-Analyse.....	45
Tab. 17	Eluenten für HPAEC-PAD-Analyse.....	46
Tab. 18	Eluentengradienten-Profile für HPAEC-PAD-Analyse	46
Tab. 19	Probenvorbereitung für Analyse mittels HPAEC-PAD.....	47
Tab. 20	Stammlösungen für Standardmischungen für qualitative und quantitative Mono- und Oligosaccharidbestimmungen via HPAEC-PAD.....	48
Tab. 21	Reinigungsprotokoll für Querstromfiltration	53
Tab. 22	Übersicht über die untersuchten Enzyme für den Abbau von Arabinoxylan und Glucomannan	59
Tab. 23	Übersicht über die untersuchten Xylanasen.....	75
Tab. 24	Optimale Reaktionsbedingungen und Aktivitäten der Xylanasen aus <i>Hb. hemicellulosilytica</i>	77
Tab. 25	Substrat- und Produktspektren von Xylanasen auf XOS und AXOS	78
Tab. 26	Übersicht über die untersuchten α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen	81
Tab. 27	Optimale Reaktionsbedingungen und Aktivitäten der α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen aus <i>Hb. hemicellulosilytica</i>	82

Tab. 28 Substrat- und Produktspektren von α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen auf XOS und AXOS	83
Tab. 29 Produkte nach hh-Arf43C-Behandlung der extrahierten DC-Fractionen.....	90
Tab. 30 Übersicht über die untersuchten β -Glucanasen und β -Mannanasen.....	102
Tab. 31 Übersicht über industriell relevante Präbiotika und Präbiotikakandidaten	135

III. Abkürzungsverzeichnis

AA	Enzyme mit zusätzlichen Hilfsaktivitäten (engl.: <i>auxiliary activities</i>)
ACS	American Chemical Society
AOS	Arabinooligosaccharid/e
APS	Ammoniumpersulfat
Ara	L-Arabinose
Araf	L-Arabinofuranose
AXOS	Arabinoxyloligosaccharid/e
CAZymes	Kohlenhydrataktive Enzyme (engl.: <i>Carbohydrate-Active enzymes</i>)
CBM	Kohlenhydratbindemodul (engl.: <i>carbohydrate binding module</i>)
CDs	Cyclodextrinoligosaccharid/e
CE	Carbohydratesterase
COS	Chitinoligosaccharid/e
COS	Cellooligosaccharid/e
CZE	Kapillarelektrophorese (engl.: <i>capillary zone electrophoresis</i>)
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
Df	Freiheitsgrad/e (engl.: <i>degree of freedom</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNSA	3,5-Dinitrosalicylsäure
DP	Polymerisierungsgrad bei Oligosacchariden (engl.: <i>degree of polymerization</i>)
DS	Verzweigungsgrad bei Oligosacchariden (engl.: <i>degree of substitution</i>)
EC	EC-Nummer (engl.: <i>Enzyme Commission number</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELSD	Lichtstreuendetektor (engl.: <i>evaporative light scattering detector</i>)
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
FPLC	Schnelle Proteinflüssigchromatographie (engl.: <i>fast protein liquid chromatography</i>)
Gal	L-Galactose
GH	Glycosidhydrolase
GlcA	Glucuronsäure
Glu	D-Glucose
Glup	D-Glucopyranose
GMOS	Glucomannooligosaccharid/e; Im erweiterten Sinne werden ebenso alle aus Glucomannan enzymatisch hergestellten Oligosaccharide als GMOS bezeichnet. Bei dieser Verwendung kann der Begriff demnach auch Manno- und Cellooligosaccharide umfassen.
GOS	Galactooligosaccharid/e
GT	Glycosyltransferase
h	Stunde
HDAC-Inhibitor	Histondeacetylase-Inhibitor
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie (engl.: <i>hydrophilic interaction chromatography</i>)
HMO	Muttermilcholigosaccharid/e (engl.: <i>human milk oligosaccharides</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>)
HPLC-RI	HPLC dessen Detektion auf einen Brechungsindex-Detektor basiert
HPAEC-PAD	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (engl. <i>high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection</i>)
HPSEC	Hochleistungsgrößenausschlusschromatographie (engl.: <i>high performance size exclusion chromatography</i>)
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IMOS	Maltooligosaccharid/e bzw. Isomaltooligosaccharid/e
kDa	kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharide
LPMO	Lytische Polysaccharidmonoxygenase
MALDI-TOF	Matrix-assistierte Laser-Desorption/ionisierung mit Flugzeitanalyse zur Ionentrennung (engl.: <i>matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight</i>)
Man	D-Mannose
MeGlcA	4-O-Methyl-D-Glucuronsäure

Abkürzungsverzeichnis

MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MOS	Mannooligosaccharid/e
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (engl.: <i>molecular weight</i>)
MWCO	Ausschlussgrenze der Molekülgröße bei Filtrationen (engl.: <i>molecular weight cut-off</i>)
MTP	Mikrotiterplatte
NaCl	Natriumchlorid
NF	Amerikanisches amtliches Kompendium der Anforderungen an Hilfsstoffe und pflanzlichen Drogen (engl.: <i>national formulary</i>)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OPD	Zerfallskinetik erster Ordnung (engl.: <i>one phase decay</i>)
PL	Polysaccharidlyase
pNP	<i>para</i> -Nitrophenol
POS	Pektinoligosaccharid/e
PTFE	Polytetrafluorethylen
rpm	Runden pro Minute
Rf	Retentionsfaktor
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren (engl.: <i>small chain fatty acids</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl.: <i>size exclusion chromatography</i>)
s	Sekunde
SV	Säulenvolumen
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TMP	Transmembrandruck (engl.: <i>transmembrane pressure</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USP	Amerikanisches Arzneibuch (engl.: <i>United States Pharmacopeia</i>)
VE Wasser	Vollentsalztes Wasser
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
× g	Beschleunigung in Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
XGOS	Xyloglucanoligosaccharid/e
XOS	Xylooligosaccharid/e
Xyl	D-Xylose
Xylp	D-Xylopyranose

1 Einführung

Reststoffströme pflanzlicher Biomasse in Form von Erntegut- und Forstwirtschaftsrückständen stellen eine zu großen Teilen brachliegende und unterschätzte, aber nachhaltige Ressource dar. Trotz des steigenden politischen und gesellschaftlichen Interesses an nachwachsenden Rohstoffen ist die Verwertung dieser Ressource immer noch unzureichend und viele Potentiale sind noch nicht ausreichend ausgeschöpft.

Jährlich entstehen allein in Europa 94 Mio. t pflanzliche Biomasse, davon 84,6 Mio. t Erntegutrückstände und 9,2 Mio. t Forstwirtschaftsrückstände, welche hauptsächlich für eine Valorisierung zu Biokraftstoffen und Biopolymeren zur Verfügung stehen (Harrison et al., 2014; Searle und Malins, 2016). Eine weitere, bisher aber kaum genutzte Möglichkeit der Wertschöpfung, stellt die Überführung von Teilen dieser Rohstoffströme zu Präbiotika als Nahrungsbestandteile für Lebens- und Futtermittel dar. Auch dieser Ansatz birgt das Potential einer hohen Wertschöpfung und ist eine Alternative zur Umwandlung der Biomasse zu Biokraftstoffen und Biopolymeren. Ein Vorteil hierbei ist es, dass die Flächenkonkurrenz zwischen Energie- und Nutzpflanzen gegenüber Nahrungs- und Futtermittelpflanzen reduziert werden kann.

Beim klassischen Ansatz der Umwandlung von Reststoffströmen zu Biokraftstoffen werden die Polysaccharide der pflanzlichen Biomasse vollständig zu Monosacchariden abgebaut, welche anschließend fermentativ zu Biokraftstoffen und Grundchemikalien umgesetzt werden. Die Herstellung von Präbiotika unterscheidet sich hierzu dadurch, dass sie sich auf den Abbau des Hemicelluloseanteils der pflanzlichen Biomasse, also nur einem Teil der Polysaccharide, beschränkt. Weiterhin findet der Abbau nicht vollständig zu Monosacchariden, sondern partiell zu Mehrfachzuckern, sog. Oligosacchariden, statt. Basierend auf der chemischen Struktur der hergestellten Oligosaccharide können diese im Magen und Dünndarm nicht verdaut, sondern ausschließlich von Bakterien im Dickdarm abgebaut und verstoffwechselt werden. Solche unverdaulichen Oligosaccharide, die auf Basis ihrer mikrobiellen Verstoffwechslung gezielt zur Verbesserung der Darmflora eingesetzt werden können, werden als Präbiotika bezeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Herstellung von potentiell präbiotischen Oligosacchariden aus Reststoffströmen pflanzlicher Biomasse mithilfe von Enzymen untersucht werden. Dieses Bestreben umfasst die Auswahl geeigneter pflanzlicher Polysaccharide, die Selektion und Charakterisierung für die Herstellung benötigter Enzyme, eine gezielte Herstellung von Oligosacchariden als auch eine Hochskalierung des Herstellungsprozesses. Die hierbei gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu beitragen, eine Grundlage für eine effizientere industrielle Verwertung und bessere Wertschöpfung von Reststoffströmen pflanzlicher Biomasse zu schaffen.

1.1 Struktureller Aufbau pflanzlicher Biomasse

1.1.1 Komponenten der pflanzlichen Biomasse

Die mengenmäßig wichtigsten Polysaccharide in pflanzlicher Biomasse sind Cellulose, Hemicellulose, Pektin und in manchen Pflanzenteilen Stärke. Die pflanzliche Biomasse, die bei Erntegut- und Forstwirtschaftsrückständen anfällt, weist eine verhältnismäßig hohe Verholzung auf und wird oft als Lignocellulose bezeichnet. In ihrer Struktur wird Lignocellulose von Cellulose (~40% w/v) dominiert, gefolgt von Hemicellulose (~20-30% w/v) und dem phenolischen Makromolekül Lignin (~20-30% w/v) (Tuomela, 2000). Die genaue Aufteilung in Cellulose, Hemicellulose und Lignin hängt dabei vom Pflanzenteil, der Pflanzengattung, der Art und der Erntezeit ab und kann stark variieren (Tab. 1; Ebringerová et al. 2005; Busse-Wicher et al. 2014; Biely et al. 2016).

Tab. 1 Übersicht über den Anteil an Cellulose, Hemicellulose und Lignin in Bioraffinerie-relevanter Biomasse bezogen auf die Gesamttrockenmasse

Name	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	Referenzen
Nadelholz				
Fichte	43,2%	21,3%	28,3%	Alvarez et al. (2016)
Douglas-Fichte	44,0%	21,2%	32,0%	Alvarez et al. (2016)
Küsten-Kiefer	42,5%	20,8%	27,9%	Alvarez et al. (2016)
Gelb-Kiefer	41,7%	22,8%	26,9%	Alvarez et al. (2016)
Laubholz				
Espe	45,9%	17,9%	23,0%	Alvarez et al. (2016)
Weide	41,4%	21,7%	26,4%	Alvarez et al. (2016)
Gelbe Pappel	42,1%	19,0%	23,3%	Alvarez et al. (2016)
Hybridpappel	43,7%	21,5%	23,9%	Alvarez et al. (2016)
<i>Eucalyptus saligna</i>	48,1%	12,7%	26,9%	Alvarez et al. (2016)
Gräser und Getreide				
Weizenstroh	32,6%	22,7%	16,9%	Alvarez et al. (2016)
Roggenstroh	31,0%	25,0%	-	Otieno und Ahring (2012)
Gerstenstroh	42,0%	28,0%	-	Otieno und Ahring (2012)
Reisstroh	41,0%	21,5%	9,9%	van Dyk und Pletschke (2012)
Gräser (gemittelt)	25-40%	25-50%	10-30%	van Dyk und Pletschke (2012)
Heu	26,0%	26,8%	4,7%	van Dyk und Pletschke (2012)
Maisständer	38,1%	23,4%	20,2%	Alvarez et al. (2016)
Maiskolben	35-39%	38-42%	4,5-6,6%	van Dyk und Pletschke (2012)
Rutenhirse	35,9%	22,0%	23,1%	Alvarez et al. (2016)
Restpflanze nach Rapssaat	27,6%	20,2%	18,3%	van Dyk und Pletschke (2012)
Zuckerrohrbagasse	38,1%	26,9%	18,4%	van Dyk und Pletschke (2012)
Weitere Bioraffinerie-Nebenprodukte				
Schilf	39,5%	29,8%	24,0%	van Dyk und Pletschke (2012)
Melonenschalen	35,0%	19,0%	30,0%	van Dyk und Pletschke (2012)
Sägespäne	45,0%	15,1%	25,3%	van Dyk und Pletschke (2012)
Kokosfasern	17,7%	2,2%	34,0%	van Dyk und Pletschke (2012)
Nussschalen	25-30%	25-30%	30,4%	van Dyk und Pletschke (2012)
Blätter	15-20%	80-85%	-	van Dyk und Pletschke (2012)
Bambus	41-47%	16-27%	18-28%	He et al. (2014)

Je nach Studie können die Werte für Cellulose, Hemicellulose und Lignin um mehrere Prozentpunkte schwanken. Dies ist sowohl auf die natürliche Schwankung der Biomasse (z. B. verschiedene Erntebedingungen) als auch auf Unterschiede in der Analysemethode zurückzuführen. So basiert die Ermittlung des Celluloseanteils üblicherweise auf durch chemische Hydrolyse freigesetzter Glucose. Bei dieser Methode wird nicht berücksichtigt, dass Glucose auch als Teil der Hemicellulose vorkommen kann.

Cellulose

Die Grundelemente für die Struktur pflanzlicher Zellwände sind Cellulosemoleküle, welche durchschnittlich aus 8000 (primäre Zellwand) oder 15000 (sekundäre Zellwand) Einheiten β -1,4-glycosidisch-verknüpfter β -D-Glucose bestehen (Brown, 2004). Diese Moleküle können basierend auf unterschiedlicher Anordnung des linearen Cellulosemoleküls und unterschiedlicher sich ausbildender Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb eines Moleküls amorphe und kristalline Strukturen bilden. Während die amorphen Regionen der Cellulose für Enzyme leicht zugänglich sind und eine gute enzymatische Abbaubarkeit aufweisen, stellt der effiziente Abbau der kristallinen Anteile aufgrund der hohen strukturellen Stabilität, der Kompaktheit und der niedrigen Wasserlöslichkeit eine große Herausforderung für die moderne Biotechnologie dar (Zverlov und Schwarz, 2008). Einzelne Cellulosestränge bündeln sich weiterhin mit Hilfe von Wasserstoffbrückenbindungen zu Mikrofibrillen, welche sich nach Anlagerung von Hemicellulose und Lignin wiederum zu Makrofibrillen und schließlich zu Cellulosefasern bündeln (Abb. 1; Chinga-Carrasco 2011).

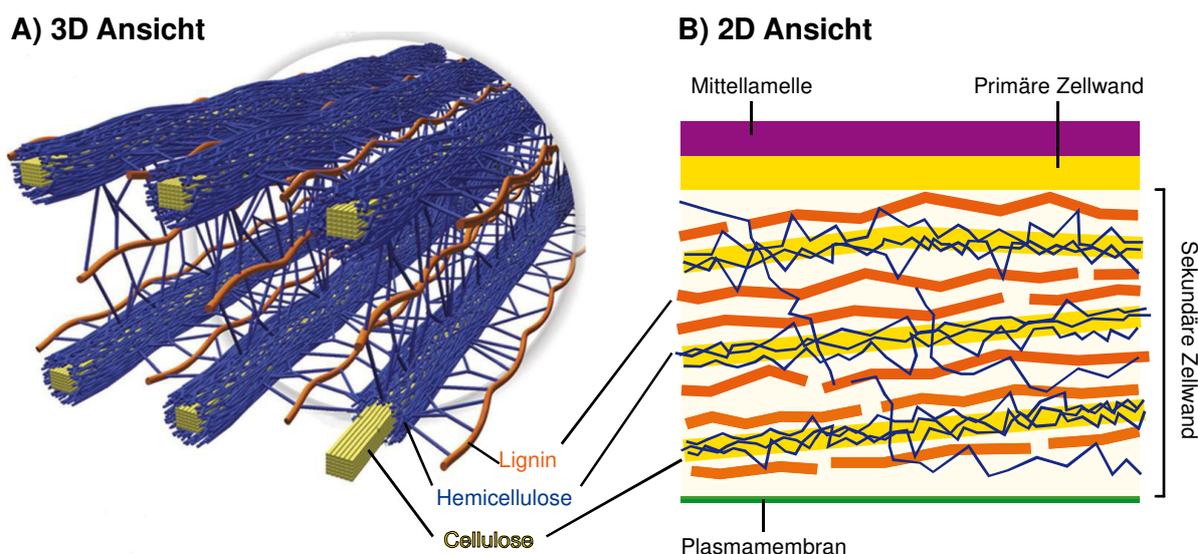


Abb. 1 Schematische Struktur der Lignocellulose

(A) 3D-Ansicht nach Brandt et al. (2013). (B) 2D-Ansicht adaptiert von Li et al. (2016).

Hemicellulose

Hemicellulose ist nicht so genau definiert wie Cellulose. Historisch bezeichnet Hemicellulose alle Polysaccharide, die durch eine basische Extraktion aus höheren Pflanzen extrahiert werden können. Dies unterscheidet sie von den Pektinen, welche mit heißem Wasser, schwachen Säuren oder Chelatbildnern extrahiert werden konnten (Ebringerová et al., 2005). Inzwischen bezeichnet Hemicellulose als Sammelbegriff eine breite Gruppe an unterschiedlichen Polysacchariden, welche üblicherweise basierend auf den Monosacchariden, aus denen sie bestehen, in die

Typen Xylan, Mannan, β -Glucan und Xyloglucan eingeteilt werden. Die Polysaccharide Galactan und Arabinan werden je nach Quelle sowohl den Hemicellulosen als auch Pektinen zugeordnet (van Dyk und Pletschke, 2012; Vries und Visser, 2001). Alle Grundtypen unterscheiden sich neben ihrer Monomerzusammensetzung auch in der Verknüpfung der Monomere und zusätzlichen Modifikationen am Polysaccharidrückgrat, wie z. B. Substitutionen mit Acyl- oder Zuckerresten. Eine detaillierte Beschreibung der strukturellen Merkmale der verschiedenen Hemicellulose Typen erfolgt in Kapitel 1.1.2 (Ebringerová et al., 2005).

Die Strukturen der verschiedenen Hemicellulosen haben gemein, dass sie im Unterschied zur Cellulose vergleichsweise amorphe Strukturen bilden. Sie weisen eine erheblich bessere Wasserlöslichkeit auf als Cellulose und sind enzymatisch leichter für einen Abbau zugänglich. Strukturell haben die meisten Hemicellulosen die Funktion, sich als Fäden um und zwischen die Cellulose-Mikrofibrillen zu legen und diese hierdurch quervernetzen (vgl. Abb. 1). Zusätzlich können kovalente Bindungen zwischen der Hemicellulose und Lignin gebildet werden, welche die Stabilität der pflanzlichen Zellwandstruktur zusätzlich verstärken (Biely et al., 2016; Ebringerová et al., 2005). Neben dieser strukturbildenden Funktion erfüllen einige Polysaccharide in bestimmten Pflanzen zusätzlich eine Speicherfunktion, wie z. B. Glucomanan in der Teufelszunge (*Amorphophallus konjac*) und Xyloglucan in Samenkernen von Tamarind (*Tamarindus indica*) (Chua et al., 2010; Mishra und Malhotra, 2009).

Lignin

Lignin ist ein phenolisches Makromolekül, welches sich in seiner Struktur erheblich von den Polysacchariden Cellulose und Hemicellulose unterscheidet. Durch Quervernetzung der drei aromatischen Monomere, *p*-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol, bildet Lignin eine komplexe amorphe dreidimensionale Struktur mit sehr hoher Hydrophobizität und mechanischer Stabilität (Pandey und Kim, 2011).

Eingelagert in die Zellwand trägt Lignin als Schutzschicht um Cellulose-Mikrofibrillen erheblich zur mechanischen Stabilität von pflanzlichen Zellwänden bei. Lignin erfüllt aber auch Aufgaben wie Pathogenresistenz und ist essentiell für den Wassertransport. Die hohe Resilienz des Abbaus pflanzlicher Biomasse ist zu einem großen Ausmaß der schützenden Wirkung des Lignins geschuldet, welches sowohl die enzymatische Zugänglichkeit der Polysaccharide mindert als auch hydrolytische Enzyme durch unspezifische Bindung inaktiviert (Li et al., 2016).

1.1.2 Strukturelle Vielfalt der Hemicellulose

Für einen gezielten Abbau und eine industrielle Nutzung der Hemicellulose ist es wichtig, ihre strukturelle Vielfalt als auch ihre Verbreitung in unterschiedlichen Pflanzenarten genau aufzuklären. Die erste grundlegende Einteilung der Hemicellulosen in unterschiedliche Typen erfolgt über die Monosaccharidzusammensetzung des Polysaccharidrückgrats: **Xylan**-basierte Polysaccharide (kurz: Xylan) mit einem Rückgrat aus β -D-1,4-verknüpfter Xylose in Pyranoseform (Xylp), **Mannan**-basierte Polysaccharide (kurz: Mannan) mit einem Rückgrat primär aus β -D-1,4-verknüpfter Mannose in Pyranoseform (Manp), **β -Glucan**-basierte Polysaccharide mit β -D-1,3-, β -D-1,4- oder β -D-1,6-verknüpfter Glucose in Pyranoseform (Glu_p) und **Xyloglucan** mit einem Rückgrat aus β -D-1,4-verknüpfter Glucose in Pyranoseform mit ausgeprägter Seitenkettenstruktur bestehend aus L-Xylose- und D-Galactoseeinheiten. Teilweise werden noch **Galactan** mit einem Rückgrat aus α -D-1,3- oder α -D-1,4-verknüpfter Galactose in Pyranoseform (Galp) und **Arabinan** mit einem Rückgrat aus α -1,5-verknüpfter L-Arabinose in Furanoseform (Araf) zu den Hemicellulosen gezählt (Ebringerová et al., 2005; van Dyk und Pletschke, 2012).

Eine feinere Unterteilung des Xylans findet auf Basis von Seitenketten und weiteren Modifikationen, wie z. B. L-Arabinose- und 4-O-Methyl-D-Glucuronsäure-Seitengruppen oder Estern statt. Bei Mannan-basierten Polysacchariden wird weiterhin unterschieden zwischen reinem Mannan, Galactomannan, welches reich an Galactose-Seitengruppen ist, Glucomannan, welches im Rückgrat zusätzlich Glucose enthält und Galactoglucomannan mit beiden Modifikationen. Auch bei β -Glucanen ist eine feinere Unterteilung möglich, je nachdem, welche Verteilung der β -1,3- und β -1,4-Bindungen im Polysaccharid vorliegt. Galactan kann zusätzlich längere Arabinose-Seitenketten aufweisen und wird dann als Arabinogalactan bezeichnet. Andersherum weist Arabinan ebenfalls häufig längere Galactose-Seitenketten auf, wird dann aber üblicherweise verzweigtes Arabinan genannt. Generell kommen Galactan und Arabinan hauptsächlich als komplexe Seitenketten in Pektinen vor. Sie zählen daher eher zu den Pektinen als Hemicellulosen, da letztere im Vergleich zu Pektinen eher kurze Seitenketten aufweisen (Ebringerová et al., 2005; van Dyk und Pletschke, 2012). Nachfolgend sollen die in pflanzlicher Biomasse mengenmäßig relevantesten Hemicellulose-Klassen – Xylan und Mannan, auf welche im Rahmen dieser Arbeit ein besonderer Fokus gesetzt wird – in ihrer Struktur und ihrem Vorkommen in der Natur genauer beschrieben werden.

Xylan

Xylan-basierte Polysaccharide stellen nach Cellulose das zweithäufigste Polysaccharid von Landpflanzen dar (Chakdar et al., 2016). Sie machen 15-30% w/v der Biomasse von zweikeimblättrigen Pflanzen, wie z. B. 15-18% w/v bei Laubhölzern, und bis zu 50% w/v bei einigen Gräsern und Getreiden aus (Ebringerová et al., 2005). Sie stellen die mengenmäßig wichtigste Hemicellulose dar, welche aus Erntegut- und Fortwirtschaftsrückständen gewonnen werden kann. Die wichtigsten Xylantypen umfassen: Arabinoxylan, Glucuronoxylan, Arabinoglucuronoxylan und komplexe Heteroxylane (Chakdar et al., 2016; Ebringerová et al., 2005).

Arabinoxylan (vgl. Abb. 2 A) ist das vorherrschende Xylan-basierte Polysaccharid in Gräsern und Getreiden, wie Weizen, Reis, Roggen und Mais, und findet sich dort primär in den Zellwänden des Endosperms und der Kleie von Getreide. Bei Arabinoxylan ist das lineare Xylanrückgrat zusätzlich mit α -L-Arabinose in der Furanoseform (Ara β) am O-2 (Monosubstitution) oder am O-2 und O-3 der Xylose (Disubstitution) substituiert (Biely et al., 2016; Ebringerová et al., 2005). Zusätzlich kann das Rückgrat am O-2 und O-3 der Xylose mit Acetat und am O-5 der Arabinosesubstitutionen mit phenolischen Säuren wie Ferula- und Cumarsäure verestert sein. Durch eine Ester- und Etherbindung zum Lignin tragen die phenolischen Säuren zur kovalenten Quervernetzung der Hemicellulose mit Lignin bei. Weiterhin ist das Xylanrückgrat oft am O-2 der Xylosen über α -1,4-Bindungen mit D-Glucuronsäure (GlcA) oder 4-O-Methyl-D-Glucuronsäure (MeGlcA) substituiert. Diese können ebenfalls über Esterbindungen mit Lignin kovalent verbunden sein (Biely et al., 2016; Vries und Visser, 2001). Die nun als **Glucuronoarabinoxylan** (vgl. Abb. 2 B) bezeichnete Hemicellulose ist nicht mehr neutral, sondern leicht sauer (Ebringerová et al., 2005; Vries und Visser, 2001).

Bei der Extraktion von Xylan-basierten Polysacchariden aus Gräsern und Getreiden werden Fraktionen mit unterschiedlichen Eigenschaften, wie z. B. Löslichkeit und Viskosität, unterschieden. Diese Fraktionen unterscheiden sich hauptsächlich in der Substituierungsstruktur des Xylans. So zeigen unlösliche Xylanfraktionen in der Regel eine erheblich höhere Konzentration an doppelten Arabinosesubstitutionen als lösliche Fraktionen und sind enzymatisch schwieriger abzubauen. Die aus Gräsern und Getreiden gewonnenen Fraktionen mit der höchsten Resilienz gegen enzymatischen Abbau stellen die sog. **komplexen Heteroxylane** (vgl. Abb. 2 G) dar. Diese zeichnen sich nicht nur durch einen besonders hohen Anteil an Substitutionen am Rückgrat aus, sondern vor allem auch durch eine weitere Modifizierung und Verlängerung der Seitengruppen. Diese umfassen zusätzlich zu den bisher genannten Modifikationen noch 2-O- α -verknüpfte D-Xylose-, L-Galactose- und weitere L-Arabinoseeinheiten (Biely et al., 2016; Ebringerová et al., 2005).

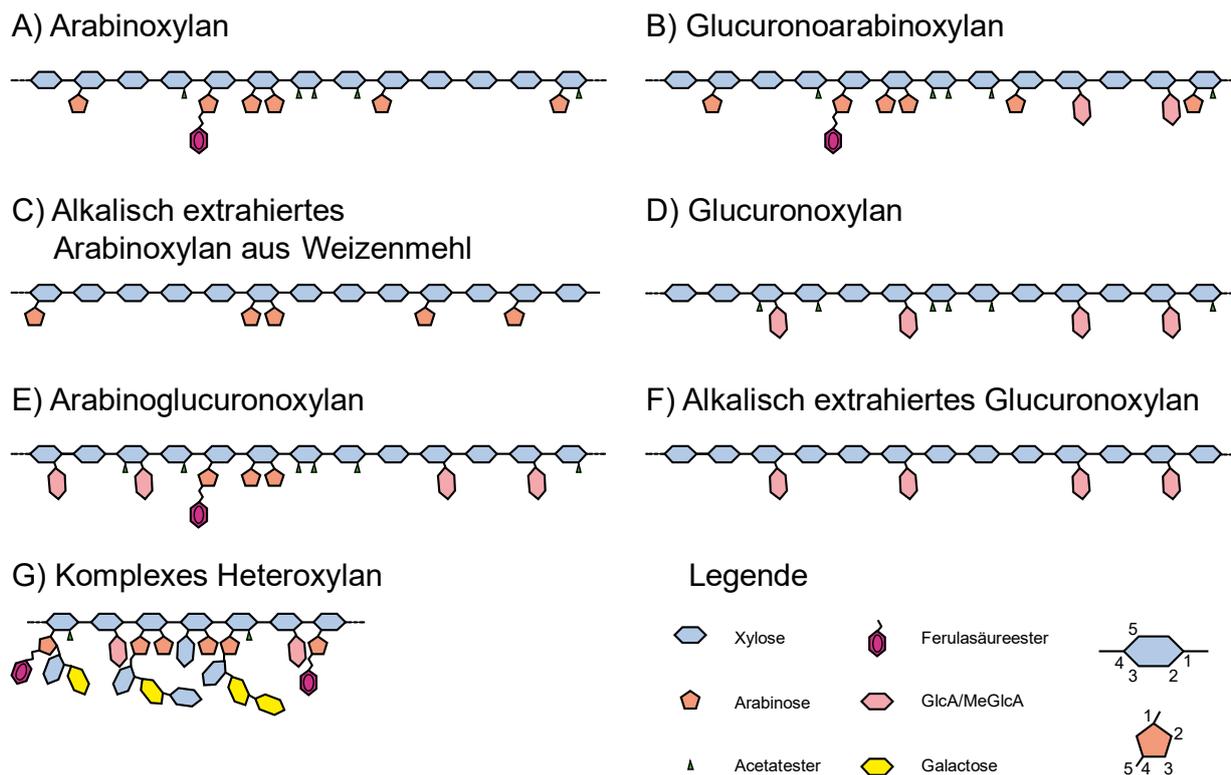


Abb. 2 Schematische Strukturen der verschiedenen Xylan-Subtypen

Strukturinformationen für die Erstellung der Graphiken wurden abgeleitet aus Biely et al. (2016), Ebringerová et al. (2005) und McCleary et al. (2015).

Das in Laub- und Nadelhölzern gefundene Xylan weist generell dieselben Modifikationen des Xylanrückgrats auf, wie aus Gräsern und Getreiden isoliertes Polysaccharid. Ein größerer Unterschied besteht allerdings in den Mengenverhältnissen der verschiedenen Modifikationen, welche zu unterschiedlichen Namen für die Polysaccharide führen. Xylan aus Nadelhölzern weist z.B. einen erheblich höheren Anteil an GlcA bzw. MeGlcA auf und wird daher als **Arabinoglucuronoxylan** (vgl. Abb. 2 E) bezeichnet. Xylan aus Laubholz fehlen die Arabinose-substitutionen teilweise sogar völlig und werden dann als **Glucuronoxylan** (vgl. Abb. 2 D) bezeichnet. Für Polysaccharide mit besonders ausgeprägter Acetylierung wird teilweise noch der Begriff Acetylglucuronoxylan verwendet (Biely et al., 2016; Ebringerová et al., 2005).

Bei Xylan handelt es sich um ein sehr heterogenes Polysaccharid und die hier beschriebenen Subtypen unterscheiden sich erheblich in ihrer Feinstruktur sowohl zwischen unterschiedlichen Pflanzen als auch innerhalb eines Xylanmoleküls (Biely et al., 2016; Busse-Wicher et al., 2014; Ebringerová et al., 2005). Weiterhin muss beachtet werden, dass technisch präparierte Xylane üblicherweise nicht zwingend die hier beschriebene native Xylanstruktur aufweisen. Je nach verwendeter Extraktionsmethode kann sich die Struktur des extrahierten Polysaccharids erheblich vom natürlichen Zustand unterscheiden. So werden bei einer alkalischen oder sauren Extraktion nahezu alle Estergruppen vom Polysaccharid abgespalten (vgl. Abb. 2 C und F).

Weiterhin fallen bei der Extraktion von Xylan teilweise verschiedene Fraktionen mit unterschiedlicher Löslichkeit und Viskosität an, welche sich signifikant im Grad der Dekorierung des Xylanrückgrats unterscheiden (Ebringerová et al., 2005).

Mannan

Lineares **Mannan** (Abb. 3 A), das ausschließlich aus β -1,4-verknüpfter D-Mannose besteht, kommt in pflanzlicher Biomasse vergleichsweise selten vor. Viel weiter verbreitet sind in der Natur die Polysaccharide **Galactomannan** (Abb. 3 B), bei dem das Mannanrückgrat mit α -1,6-verknüpfter D-Galactose substituiert ist, **Glucomannan** (vgl. Abb. 3 C), bei dem im Mannanrückgrat zusätzlich β -D-1,4-verknüpfte Glucose vorhanden ist und **Galactoglucomannan** (vgl. Abb. 3 D), welches beide Modifikationen aufweist (Ebringerová et al., 2005; Moreira und Filho, 2008; Vries und Visser, 2001). Je nach Funktion des Polysaccharids in der Pflanze weisen Mannane entweder eine vergleichsweise niedrige molekulare Kettenlänge (engl.: *degree of polymerisation*, DP) als Strukturelement in der Zellwand (etwa DP 800) oder eine hohe molekulare Masse (etwa DP 6 000) als Speicherpolysaccharid auf (Chauhan et al., 2012; Tester und Al-Ghazzewi, 2016).

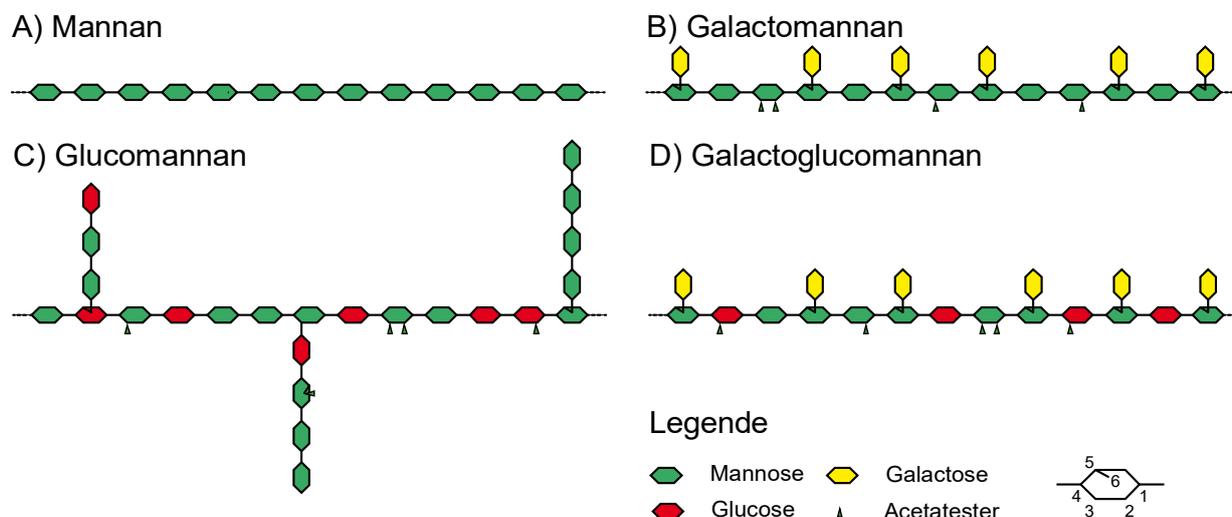


Abb. 3 Schematische Strukturen der verschiedenen Mannan-Subtypen

Strukturinformationen abgeleitet aus Vries und Visser (2001), Moreira und Filho (2008), Wang et al. (2014) und Zhang et al. (2014).

Aus dem Endosperm von Früchten der Steinnusspalme (*Phytelephas macrocarpa*) und aus Datteln (*Phoenix dactylifera*) kann ein Mannan-basiertes Speicherpolysaccharid extrahiert werden, welches aufgrund seines niedrigen Galactosegehalts von 4 % als Mannan bezeichnet wird. Im Unterschied hierzu wird das aus grünen Arabica-Kaffeebohnen (*Coffea arabica*) gewonnene Mannan-basierte Polysaccharid, welches einen vergleichbaren Galactosegehalt aufweist, bereits als schwach verzweigtes Galactomannan bezeichnet (Ebringerová et al.,

2005). Galactomannane mit unterschiedlichem Galactoseverzweigungsgrad findet man primär in den Samen von Leguminosen und machen dort einen Trockengewichtanteil von 1-38 % w/v aus (Ebringerová et al., 2005). Die industriell wichtigsten Quellen für Galactomannan, welche in der Lebensmittelindustrie als Verdickungsmittel eingesetzt werden, sind die Kerne des Johannisbrotbaums (*Ceratonia siliqua*; Johannisbrotkernmehl, E410), und die Samen der Guarbohne (*Cyamopsis tetragonolobus*; Lebensmittelzutat: Guarkernmehl, E412) (Barak und Mudgil, 2014; Mudgil et al., 2014).

Glucomannan und Galactoglucomannan sind nach Cellulose die dominierenden Polysaccharide in Nadelhölzern und machen einen Anteil von bis zu 25 % des Gesamtrockengewichts aus (Alvarez et al., 2016; Chauhan et al., 2012; Moreira und Filho, 2008). Wie viele andere Polysaccharide weisen auch diese Acetatester an Position O-2 und O-3 der Glucose bzw. Mannose im Polysaccharidrückgrat auf. In Glucomannan ist etwa jede zehnte bis elfte Hexose acetyliert. Als weiteres strukturelles Element weist Glucomannan vereinzelt Glucomannan-seitenketten am O-3 oder O-6 der Mannose, teilweise auch am O-6 der Glucose verknüpft auf. Generell ist über die Seitenkettenstruktur von Glucomannan in Bezug auf Häufigkeit und Länge der Seitenketten bisher nur wenig bekannt (Albrecht et al., 2011; Li et al., 2009; Moreira und Filho, 2008).

Im Rahmen der industriellen Verwendung von Mannanen kommt Glucomannan eine besondere wirtschaftliche Bedeutung zu. So wird das Mehl der Wurzel der Teufelszunge (*Amorphophallus konjac*), welches zu 40 % w/v aus Glucomannan als Speicherpolysaccharid besteht, seit ca. 2000 Jahren in der japanischen, chinesischen und südostasiatischen Küche für die Herstellung von Shirataki-Nudeln (Glasnudeln) verwendet. Aufgrund seiner stark hygroskopischen Eigenschaften wird es außer in Asien auch zunehmend in Europa als Füllstoff für kalorienneutrale Teigwaren und als Verdickungsmittel (E425) eingesetzt (Chua et al., 2010).

1.2 Mikrobieller Abbau pflanzlicher Biomasse

Der mikrobielle Abbau pflanzlicher Biomasse erfolgt in der Natur hauptsächlich über filamentöse Pilze und anaerobe Bakterien, sog. saccharolytischer Mikroorganismen. Filamentöse Pilze bilden Hyphen, mit denen sie die Biomasse penetrieren und sekretieren die hydrolytischen Enzyme direkt in die abzubauenende Biomasse (van den Brink und Vries, 2011). Beim bakteriellen Biomasseabbau wird oft zwischen cellulosomal und nicht-cellulosomal Systemen unterschieden. Während nicht-cellulosomale Systeme ähnlich wie Pilze freie Einzelenzyme nutzen, basieren cellulosomale Systeme auf der synergistischen Wirkung innerhalb eines Multienzymkomplexes, dem sogenannten Cellulosom (Zverlov und Schwarz, 2008).

Enzyme saccharolytischer Mikroorganismen stellen wertvolle Werkzeuge für den effizienten industriellen Abbau pflanzlicher Biomasse dar. Hierbei ist oft eine hohe Thermostabilität der Enzyme von Vorteil, da dies eine effizientere Verwendung der Enzyme in technischen Prozessen ermöglicht. Als Quelle für solche Enzyme werden insbesondere thermophile Organismen verwendet, da aus diesen abgeleitete Enzyme von Grund auf eine hohe Thermostabilität aufweisen (Blumer-Schuetz et al., 2014). Nachfolgend werden *Clostridium thermocellum*, *Herbivorax saccincola*, *Clostridium stercorarium*, *Clostridium cellulosi* und *Herbinix hemicellulosilytica* als thermophile Bakterien (optimale Wachstumstemperatur etwa um 50-60 °C) mit hoher Biomasseabbau-Kapazität vorgestellt, da ihnen im Rahmen dieser Arbeit eine besondere Bedeutung zukommt.

1.2.1 Übersicht über saccharolytische Bakterien

Saccharolytische Bakterien mit Cellulosom

Das erste Bakterium, bei dem ein Cellulosom entdeckt wurde, ist ***C. thermocellum*** (Lamed et al., 1983). Es ist ubiquitär verbreitet, wurde sowohl aus Kompost als auch aus Biogasanlagen isoliert und wird als eines der Bakterien mit der höchsten Cellulose- und Hemicelluloseabbaueffizienz bezeichnet (Koeck et al., 2014b; Zverlov und Schwarz, 2008). Obwohl *C. thermocellum* zahlreiche verschiedene Mono- und Oligosaccharidprodukte aus pflanzlicher Biomasse hydrolytisch herauslösen kann, beruht der Energiestoffwechsel des Bakteriums primär auf der Aufnahme von Cellobiose (Blumer-Schuetz et al., 2014). Andere Cellulosombildende Bakterien sind z.B. *Clostridium clariflavum*, *Ruminococcus flavefaciens* und *Bacteroides cellulosolvens* (Artzi et al., 2014; Rincon et al., 2005; Zhivin et al., 2017).

Die Anzahl an entdeckten und charakterisierten Organismen mit Cellulosom ist derzeit noch niedrig, nimmt jedoch auf Basis des zunehmenden Interesses an cellulolytischen Organismen stetig zu. So wurde erst kürzlich ein neues Bakterium, ***Hv. saccincola***, mit sehr hoher Cellulose- und Hemicelluloseabbaueffizienz aus einer Biogasanlage isoliert und charakterisiert (Koeck et al., 2016).

Saccharolytische Bakterien ohne Cellulosom

C. stercorarium ist ein thermophiles Bakterium, welches eine sehr hohe Hemicelluloseabbaueffizienz aufweist. Ähnlich wie *C. thermocellum* kann *C. stercorarium* Cellulose abbauen und auf Cellobiose wachsen. Im Unterschied zu *C. thermocellum* weist *C. stercorarium* jedoch eine erheblich höhere Aktivität auf Hemicellulosen wie z.B. β -Glucan und Xylan auf (Adelsberger et al., 2004; Zverlov und Schwarz, 2008).

Ein weiteres Bakterium mit hoher Cellulose- und Hemicelluloseabbaueffizienz ist ***C. cellulosi***. Das Bakterium wurde aus Kuhdung isoliert und weist eine nahe Verwandtschaft zu *C. thermocellum* auf. Ähnlich wie *C. stercorarium* zeigt auch *C. cellulosi* eine ähnlich große Akzeptanz verschiedener Zucker als C-Quelle (Koeck et al., 2014a). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass der Kulturüberstand von *C. cellulosi* eine höhere Abbaueffizienz aufweist als der Kulturüberstand von *C. stercorarium*, was somit auf ein hohes Potential seiner hydrolytischen Enzyme hindeutet (He et al., 1991; Koeck et al., 2014a). Ein weiteres neues, erst kürzlich aus einer Biogasanlage isoliertes, saccharolytisches Bakterium stellt ***Hb. hemicellulosilytica*** dar. Ähnlich wie *C. stercorarium* zeichnet sich *Hb. hemicellulosilytica* durch eine hohe Abbaueffizienz verschiedener Hemicellulosen, primär Xylan, aus (Koeck et al., 2015).

1.2.2 Enzymsysteme zum Abbau pflanzlicher Biomasse

Es ist ein breites Arsenal an Enzymen mit vielfältigen Aktivitäten notwendig, um das komplexe Netzwerk verschiedenster Polymere, die die pflanzliche Biomasse ausmachen, abzubauen. Enzyme, deren Aktivität etwas mit Kohlenhydraten zu tun hat, werden unter dem Begriff CAZymes (engl.: *Carbohydrate-Active Enzymes*) in der CAZy-Datenbank gelistet. Die einzelnen Module dieser Proteine werden basierend auf ihrer Wechselwirkung mit Kohlenhydraten in sechs Gruppen eingeteilt: Glycosidhydrolasen, Glycosyltransferasen, Polysaccharidlyasen, Carbohydresterasen, Kohlenhydratbindemodule und zusätzliche Hilfsaktivitäten (Lombard et al., 2014).

Die größte Gruppe der CAZy-Module stellen die **Glycosidhydrolasen (GH)** dar. Enzyme, die zu den Glycosidhydrolasen gehören, hydrolysieren und rearrangieren glycosidische Bindungen. Sie sind die Triebkraft der Hydrolyse pflanzlicher Polysaccharide. **Polysaccharidlyasen (PL)** spalten ebenfalls Glycosidbindungen, verwenden dafür allerdings den Mechanismus der sogenannten β -Eliminierung. **Glycosyltransferasen (GT)** erzeugen neue Glycosidbindungen durch Transfer von Zuckerresten eines aktivierten Donors auf einen spezifischen Akzeptor und spielen damit eine wichtige Rolle für die Synthese von Oligo- und Polysacchariden. Sowohl Polysaccharidlyasen als auch Glycosyltransferasen spielen für den Abbau pflanzlicher Biomasse eine untergeordnete Rolle. **Carbohydresterasen (CE)** katalysieren die Hydrolyse von Kohlenhydratestern und haben demnach eine große Bedeutung für den Abbau von veresterten Substraten, wie z.B. Acetylglucuronoxylan. **Kohlenhydratbindemodule (CBM, engl.: *carbohydrate binding module*)** binden selektiv an bestimmte Oligo- und Polysaccharide und ermöglichen hierdurch eine gezielte räumliche Annäherung eines Enzyms an das abzubauen Polysaccharid. Unter **zusätzlichen Hilfsaktivitäten (AA, engl.: *auxiliary activities*)** werden Enzymaktivitäten gefasst, die nicht zwingend direkt etwas mit dem Abbau von

Polysacchariden zu tun haben, deren Aktivität aber unerlässlich für den Abbau pflanzlicher Biomasse ist. Hierzu zählen insbesondere Enzyme, welche am Abbau von Lignin beteiligt sind (Lombard et al., 2014).

Enzyme können einzelne, aber auch Kombinationen von CAZy-Modulen aufweisen. So kommen in Enzymen GH-Module oft mit CBM-Modulen oder CE-Modulen assoziiert vor. Ein weiteres Modul, welches oft in Verbindung mit CAZymes assoziiert vorliegt, ist das Dockerin-Modul, welches die Anbindung eines Enzyms an ein Cohesinmodul eines „scaffoldin“-Proteins zur Bildung eines cellulosomalen Komplexes ermöglicht (Bayer et al., 2004).

Nachfolgend sollen die Enzymsysteme, die zur Hydrolyse von Hemicellulose eingesetzt werden, genauer beschrieben werden. Die Palette der hierfür geforderten enzymatischen Aktivitäten wird durch die Komplexität des jeweiligen Polysaccharids diktiert. Diese Komplexität wiederum hängt, wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, stark von der jeweiligen Pflanze und den gewählten Extraktionsmethoden ab. Eine Übersicht über die notwendigen Enzymsysteme zum Abbau von verschiedenen Xylan- und Mannan-basierten Substraten ist in Abbildung 4 gegeben.

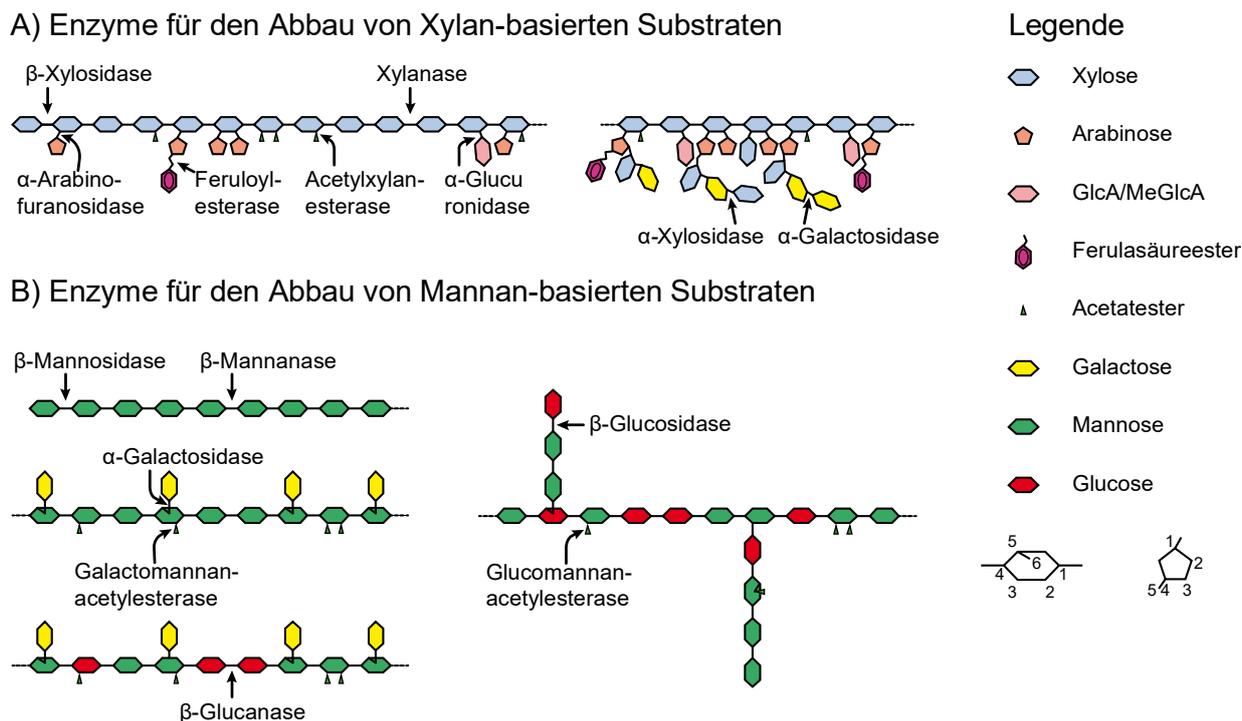


Abb. 4 Enzymaktivitäten für den Abbau von Xylan- und Mannan-basierten Polysacchariden
 Referenzen: Moreira und Filho (2008), Wang et al. (2014), Zhang et al. (2014), Ebringerová et al. (2005), Biely et al. (2016), McCleary et al. (2015) und Vries und Visser (2001).

Für den enzymatischen Abbau des Xylanrückgrats (vgl. Abb. 4 A) werden Enzyme mit β -1,4-Endoxylanase- und β -1,4-Xylosidase-Aktivität (sog. Xylanasen und β -Xylosidasen) benötigt. Je nach Art und Verteilung der weiteren Funktionalisierung können zusätzlich α -L-Arabinofuranosidasen, β -Glucuronidasen, Acetylxylanesterasen und Feruloylesterasen notwendig sein. Beim Abbau von komplexem Heteroxyylan sind weiterhin noch α -Xylosidasen und α -Galactosidasen involviert (Biely et al., 2016).

Der Abbau des Mannanrückgrats (vgl. Abb. 4 B) basiert auf einer β -1,4-Endomannanase (β -Mannanase) und β -1,4-Mannosidase-Aktivität (β -Mannosidase). Der Abbau eines Glucomannanrückgrats erfordert zusätzlich eine β -1,4-Endoglucanase (β -Glucanase) und β -1,4-Glucosidase-Aktivität (β -Glucosidase), welche üblicherweise vom Enzymsystem für den Celluloseabbau gestellt werden kann (Al-Ghazzewi et al., 2007). Ähnlich wie beim Abbau von Xylan-basierten Polysacchariden müssen auch bei Mannan-basierten Polysacchariden einzelne Seitengruppen und Ester durch α -L-Galactosidasen, Glucomannanacetylsterasen und Galactomannanacetylsterasen abgespalten werden (Chauhan et al., 2012; Ebringerová et al., 2005).

1.3 Industrielle Nutzung pflanzlicher Biomasse

1.3.1 Totalhydrolyse von Hemicellulose zu Monosacchariden zur Herstellung von Biotreibstoff

Die Herstellung von Biotreibstoffen, wie z. B. Bioethanol, und weiteren Grundchemikalien, wie z. B. Ethen und Hydroxymethylfurfural, stellt einen der zentralen Wertschöpfungswege pflanzlicher Biomasse dar. Grundsätzlich werden hierbei zwei Ansätze unterschieden: Zum einen gibt es die chemische Totalhydrolyse der Biomasse zu Monomeren, welche anschließend chemisch weiter zu Grundchemikalien umgesetzt werden. So wird mit diesem Ansatz z. B. aus pflanzlicher Biomasse Hydroxymethylfurfural gewonnen, welches als Grundbaustein für Nylon dient. Zum anderen gibt es die häufig enzymatisch gestützte Totalhydrolyse von Biomasse zu Monosacchariden, welche anschließend als Fermentationssubstrat, z. B. zur Herstellung von Bioethanol, dient (Alonso et al., 2010; Tuck et al., 2012).

Bei der Bioethanol-Herstellung wird bisher primär der Cellulose-Anteil pflanzlicher Biomasse zu Glucose abgebaut und nur dieser Zucker fermentativ zu Ethanol umgesetzt. Hemicellulosen, welche etwa 20-30% der Biomasse ausmachen (siehe Kapitel 1.1.1), werden bisher aufgrund der benötigten großen Anzahl verschiedener Enzymaktivitäten und der erhöhten Anforderungen

an die verwendeten Fermentationssysteme nur in geringem Umfang verwendet. Hierdurch ist auch die Auswahl der einsetzbaren pflanzlichen Biomasse eingeschränkt und konzentriert sich jeweils meist auf Saccharose aus Zuckerrohr (z. B. Brasilien) und Zuckerrüben (z. B. Deutschland), sowie auf Glucosesirup aus Mais (z. B. USA), Weizen und Gerste (z. B. Deutschland). Die Kulturen werden speziell für diesen Zweck angebaut, was wiederum zu einer Flächenkonkurrenz zwischen Energiepflanzen mit Nahrungs- und Futtermittelpflanzen führt (Chakravorty et al., 2009; Girio et al., 2010; Goldemberg, 2008).

Durch eine Verbesserung des industriellen Hemicelluloseabbaus kann sowohl die Flächeneffizienz bestehender Bioethanol-Herstellprozesse gesteigert, als auch die Verwendung bisher wenig genutzter Bioraffinerie-Nebenproduktströme, wie Erntegut- und Forstrückstände, ermöglicht werden.

1.3.2 Partielle Hydrolyse von Hemicellulose zu Oligosacchariden als Präbiotika für die menschliche und tierische Ernährung

Ein alternatives Anwendungsfeld von Hemicellulosen bietet ihr gezielter partieller Abbau zu speziellen Oligosacchariden. Solche sog. Präbiotika finden wegen ihrer positiven Gesundheitseffekte sowohl im Lebens- oder Futtermittel-, aber auch im pharmazeutischen Bereich Anwendung (Otieno und Ahring, 2012). Die Grundvoraussetzung für die vielen postulierten positiven Gesundheitseffekte von Präbiotika ist die Annahme, dass bestimmte Oligosaccharide im Magen und Dünndarm unverdaulich sind, im Dickdarm jedoch selektiv von bestimmten Bakterien verstoffwechselt werden können und anschließend positive Effekte auf den Körper haben (Gibson und Roberfroid, 1995; Moreno et al., 2017; Roberfroid et al., 2010). Hierdurch kann die Darmflora selektiv beeinflusst und z. B. das Wachstum und der Stoffwechsel gesundheitsförderlicher Bakterien, sog. Probiotika, gefördert werden.

Der Einsatz von Präbiotika als Nahrungsergänzungsmittel, Lebensmittelzutat, als auch als essentieller Bestandteil von funktionellen Lebensmitteln, sog. Nutraceuticals, ist in den letzten 20 Jahren stark gewachsen. Präbiotika werden üblicherweise in Getränken, Joghurts und weiteren fermentierten Milchprodukten eingesetzt (Belorkar und Gupta, 2016; Otieno und Ahring, 2012). Ein weiteres besonderes Anwendungsfeld der Präbiotika ist ihr Einsatz in Babynahrung, da gerade bei Kleinkindern eine gezielte Verbesserung der Darmflora wichtig erscheint (Bali et al., 2013). Es wird geschätzt, dass der weltweite Markt an Oligosacchariden im Lebensmittelbereich bis 2018 auf 4,8 Milliarden Euro ansteigen wird (Belorkar und Gupta, 2016; Spinner, 2013).

Mit wachsendem Verständnis über den Stellenwert des menschlichen Mikrobioms für die Gesundheit des Menschen werden zunehmend neue Anwendungsmöglichkeiten für Präbiotika entdeckt. So wurde gezeigt, dass durch eine auf Präbiotika-basierende Therapie bakteriell ausgelöste Akne vorgebeugt bzw. zurückgebildet werden kann (Al-Ghazzewi und Tester, 2010). Eine weitere Anwendung umfasst den Einsatz von Präbiotika für die Regeneration des Mikrobioms der Vagina nach einer Behandlung mit Antipilzmitteln (Tester et al., 2012).

Neben der Anwendung im Lebensmittelbereich stellt der Zusatz zu Futtermitteln für Tiere eine der wichtigsten Anwendungsbereiche von Präbiotika dar. Nachdem die europäische Union den Einsatz von Antibiotika als Wachstumsfaktoren 2006 verboten hat, ist die Nachfrage nach einer Alternative groß, die, Futtermitteln zugesetzt, mit vergleichbarer Effizienz das Wachstum und die Gesundheit fördern kann. Hier stellt die Verwendung von Präbiotika, die nachhaltig aus pflanzlichen Restströmen gewonnen werden können, eine aussichtsreiche Lösung dar und findet zunehmend Anwendung im Tiermastbetrieb (Carvalho et al., 2013; Kogut und Arsenault, 2016). Die Wirkung der Präbiotika im Tiermastbetrieb basiert auf der Verbesserung der meist gestörten Darmflora, welche mit einer verbesserten Nährstoffaufnahme einhergeht. Weiterhin kann eine Behandlung mit Präbiotika die Regeneration der Darmflora nach einer Antibiotikabehandlung erheblich verbessern (Abdelmalek et al., 2015; Carvalho et al., 2013; Sethiya, 2016).

1.4 Übersicht über die Zuckeranalytik

1.4.1 Herausforderung der Zuckeranalytik

Die hohe Vielfalt und Komplexität von Oligosacchariden und ihre potentielle Anwendung in verschiedenen Lebensbereichen verlangt nach einem flexiblen, robusten, schnellen, aber auch kosteneffizienten Analysesystem für die Charakterisierung von Oligosacchariden. Dies ist sowohl für die Entwicklung, Produktion und Charakterisierung von Oligosacchariden und Oligosaccharidgemischen, als auch für Qualitätskontrollen im Lebensmittel- und Futtermittelbereich von essentieller Bedeutung (Cataldi et al., 2000; Corradini et al., 2013; Otieno und Ahring, 2012).

Eine der Hauptherausforderungen in der Oligosaccharidanalytik liegt in der hohen potentiellen strukturellen Diversität. Diese umfasst unter anderem die Monosaccharidzusammensetzung, die anomere Konfiguration der Zucker, den Bindungstyp zwischen den Zuckern, die Position und den Bindungstyp von Seitengruppen und Seitenketten. Die hieraus resultierende Komplexität steigt mit wachsender Kettenlänge von Oligosacchariden zusätzlich exponentiell

an. Je nach Ausgangssubstrat können abgeleitete Produktgemische eine Vielzahl von unterschiedlichen und teilweise nur minimal strukturell unterschiedlichen Oligosacchariden enthalten, wie z. B. bei Arabinoxylan, Glucuronoarabinoxylan, Glucomannan, Galactoglucomannan- und Pectin-basierten Oligosacchariden (vgl. Kapitel 1.1.2) (Corradini et al., 2013; Zhang et al., 2012).

Eine weitere große Herausforderung bei der Oligosaccharidanalytik bzw. Zuckeranalytik ist das Fehlen von chromophoren Gruppen, welche eine chromatographische Detektion der Oligosaccharide generell erschwert. So können Oligosaccharide üblicherweise nicht direkt über UV/VIS-Detektoren gemessen werden, sondern verlangen eine Derivatisierung mit UV-absorbierenden oder fluoreszierenden Chromophoren. Eine Alternative stellt die Verwendung von Chromophor-unabhängigen, aber häufig vergleichsweise insensitiven Messmethoden dar, wie z. B. ein Brechungsindex- (Refraktionsindex, RI) oder ein ELSD-Detektor (engl.: *evaporative light scattering detector*, ELSD). Eine massenspektrometrische Bestimmung von Oligosacchariden ohne zusätzliche Fragmentierung des jeweiligen Moleküls kann Substanzen mit selber molekularen Masse nicht unterscheiden und gibt oft keine Informationen über Bindungstypen (Bhattacharyya und Rohrer, 2012).

1.4.2 Übersicht über Chromatographiemethoden der Zuckeranalytik

Die Zuckeranalytik hat eine lange Historie und begann in den 1940ern mit der Papierchromatographie, aus der anschließend die auf Silicagel basierende Dünnschichtchromatographie (**DC**) hervorging. Durch Vergleich der relativen Migrationsdistanz der zu untersuchenden Substanzen mit denen von gereinigten Zuckerstandards (Vergleich der Retentionsfaktoren) ist eine Identifizierung der untersuchten Substanzen möglich (Gasparič und Churáček, 1978; Zhang et al., 2012). Der Nachweis der Zucker nach der chromatographischen Trennung erfolgt über Besprühen mit einer Färbelösung und einer anschließenden Farbreaktion durch Inkubation bei erhöhter Temperatur. Ein Nachteil der DC war es, dass meist nur eine relative, aber keine absolute Quantifizierung der Analyte möglich war. Aus diesem Grunde sank das Interesse an der DC-basierten Zuckeranalytik nach der Entwicklung der **HPLC** (engl.: *High performance liquid chromatography*), welche einen höheren Automatisierungsgrad, eine bessere Reproduzierbarkeit und eine bessere Quantifizierung bei der Zuckeranalytik ermöglichte (Zhang et al., 2012).

Bei der klassischen HPLC wird für die Zuckeranalytik üblicherweise ein universell detektierender RI-Detektor (Refraktometer) eingesetzt. Der RI-Detektor misst die Veränderung des Brechungsindex des Laufmittels mit gelöstem Analyten, verglichen mit reinem Laufmittel,

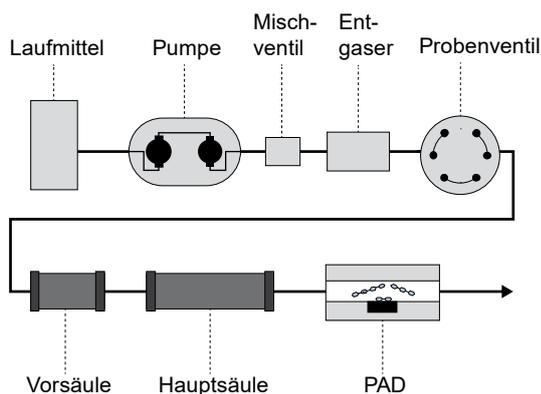
und kann daher auf alle im Laufmittel löslichen Analyten angewendet werden. Ein Problem der RI-basierten HPLC, sog. HPLC-RI, besteht neben der niedrigen Sensitivität des Detektors auch in der Abhängigkeit von einer konstanten Zusammensetzung des Laufmittels. So kann der RI-Detektor nur für isokratische Trennungen, nicht aber für die häufig höher auflösenden Gradienten-basierten Trennungen eingesetzt werden (Bhattacharyya und Rohrer, 2012).

Die hochauflösende Anionenaustauschchromatographie mit gepulstem amperometrischen Detektor (engl.: *high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection*, **HPAEC-PAD**) weist unter den hier vorgestellten Chromatographiemethoden die höchste Trennungsauflösung und gleichzeitig die sensitivste Detektion von Oligosacchariden auf. Diese Technologie unterscheidet sich sowohl in der Trennung als auch in der Detektion von Oligosacchariden grundlegend von den anderen Methoden. So wird bei der HPAEC-PAD ein stark alkalisches Laufmittel verwendet, in dessen Milieu azide Hydroxylgruppen von Oligosacchariden (schwache Säuren mit pK_S -Werten zwischen 12-14) in Oxyanionen überführt werden. Diese Oxyanionen binden an die mit quartären Ammonium-funktionalisierte Chromatographiesäule und können durch einen steigenden Gradienten eines Verdrängungsions (üblicherweise Acetat oder Nitrat) sukzessiv von der Chromatographiesäule eluiert werden. Der Aufbau einer HPAEC-PAD-Anlage, wie sie üblicherweise für Kohlenhydratanalytik angewendet wird, ist schematisch in Abb. 5 A dargestellt (Bhattacharyya und Rohrer, 2012; Corradini et al., 2013).

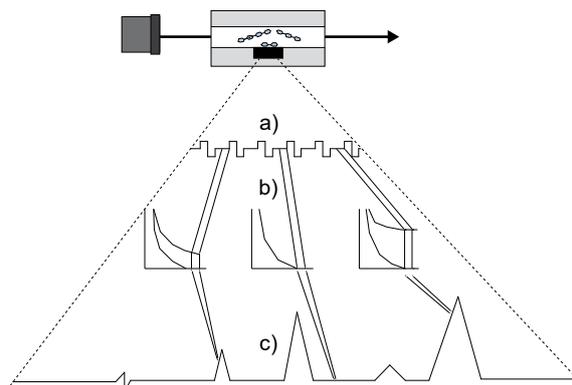
Die Detektion der HPAEC-PAD basiert auf der selektiven Oxidation von Hydroxylgruppen des Analyten über ein sich zyklisch wiederholendes Spannungspotentialprofil (vgl. Abb. 5B) am Detektor, üblicherweise eine Goldelektrode. Die hierbei freiwerdenden Elektronen (vgl. Abb. 5D) werden amperometrisch als Signal in nano-Coulomb (nC) gemessen (Johnson und Lacourse, 1990). Das angewendete Spannungspotentialprofil unterscheidet sich je nach untersuchtem Analyt, wobei für die Zuckeranalytik üblicherweise der „Standard Quad Waveform A“ (Quadruple Potential Waveform) verwendet wird. Dieser gliedert sich in vier Phasen (vgl. Abb. 5 C), wobei die erste Phase die für die Detektion notwendige Oxidation des Analyten und die drei darauffolgenden Phasen die Regeneration der Goldelektrode ermöglichen (für Details, siehe Technische Note TN21 von Thermo Fisher Scientific).

Verglichen mit anderen beschriebenen Detektoren ist der PAD und somit die HPAEC-PAD hoch selektiv, da die Spannung am Detektor so eingestellt werden kann, dass neben Zuckern keine anderen Stoffgruppen wie z. B. Peptide, oxidiert werden. Die Detektion selbst ist um Faktor 10 bis 100 sensitiver als z. B. der RI-Detektor.

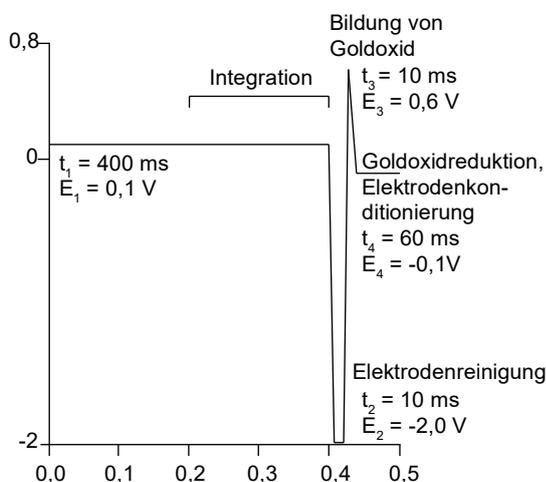
A) HPAEC-PAD-Aufbau



B) Aufnahme eines Chromatogramms



C) Spannungspotentialprofil



D) Oxidation von Glucose am PAD

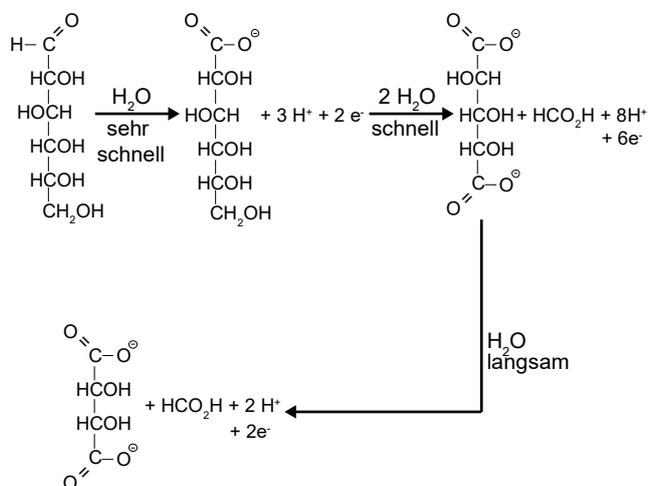


Abb. 5 Aufbau einer HPAEC-PAD-Anlage und die Funktionsweise des amperometrischen Detektors

(A) zeigt den instrumentellen Aufbau einer HPAEC-PAD Anlage. (B) zeigt schematisch, wie das Spannungspotentialprofil zyklisch wiederholt wird (a) und aus den Messungen ein Chromatogramm entsteht (b und c). (C) zeigt den detaillierten Aufbau des Spannungspotentialprofils. (D) zeigt am Beispiel der Glucose die Oxidation eines Analyten und die Freisetzung der Elektronen. Grundschemata der Graphiken (A), (B) und (C) wurden adaptiert von Bhattacharyya und Rohrer (2012). (D) wurde adaptiert aus Johnson und Lacourse (1990).

Chromatographische Methoden sind dafür geeignet, Oligosaccharide zu trennen und durch Vergleich der Retentionszeiten mit Reinsubstanzen diese auch zu identifizieren. Abgesehen hiervon wird allerdings keine direkte Information über den Analyten geliefert, wie z. B. seine molekulare Masse, Monomerzusammensetzung und den Bindungstyp zwischen den Monomeren.

Als Ergänzung zu chromatographischen Methoden werden oft massenspektrometrische Methoden eingesetzt, mit denen die Molekülmassen von Oligosacchariden genau bestimmt werden können. Hiermit können Oligosaccharide, die nur aus Monomeren mit unterschiedlichen Massen bestehen und nur einen Bindungstyp zwischen den Monomeren aufweisen, eindeutig identifiziert werden. Komplexere Oligosaccharide, die aus verschiedenen Monomeren mit gleicher

molekularer Masse bestehen und verschiedene Bindungstypen aufweisen, wie z.B. Arabinoxyloligosaccharide (AXOS) oder Glucomannooligosaccharide (GMOS), können hierdurch allerdings nicht direkt identifiziert werden. Für diese Oligosaccharide wird in der Regel eine enzymatische oder chemische Hydrolyse mit anschließender chromatographischer Analyse eingesetzt, um die Monomierzusammensetzung zu bestimmen und erste Rückschlüsse auf die Positionierung von Substitutionen zu bekommen. Eine genaue Information über die Bindungstypen zwischen den Zuckern und den genauen Positionen von Substitutionen wird dagegen normalerweise mit NMR ermittelt (McCleary et al., 2015).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, wie mit Hilfe von Enzymen aus Hemicellulose Oligosaccharide für eine Anwendung als Präbiotika hergestellt werden können. Als höheres Ziel sollte hierbei eine verbesserte Verwertung von Bioraffinerienebenprodukten für die Futtermittel-, Lebensmittel- und Healthcare-Branche angestrebt werden. Der Fokus der Arbeit lag dabei auf der Hydrolyse von Arabinoxylan und Glucomannan, da diese einen Großteil der Hemicellulose von Bioraffinerienebenprodukten ausmachen. Für alle aus diesen Polysacchariden abgeleiteten Oligosaccharidtypen, Xylooligo- (XOS) und Arabinoxyloligosaccharide (AXOS) aus Arabinoxylan sowie Glucomannooligosaccharide (GMOS) aus Glucomannan, konnte bereits ein präbiotisches Potential ermittelt werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde das Ziel verfolgt, eine *Toolbox* an Enzymen zu erarbeiten, mit welcher eine gezielte Hydrolyse der Hemicellulosen Arabinoxylan und Glucomannan zu Oligosacchariden ermöglicht wird. Hierzu wurden Enzyme der Organismen *C. thermocellum*, *C. stercorarium*, *Hb. hemicellulosilytica*, *Hv. saccincola* und *C. cellulosi* bezüglich einer Aktivität auf diese zwei Polysaccharide getestet. Weiterhin sollten in dem Zusammenhang für eine industrielle Anwendung wichtige Parameter der Enzyme der Enzym-*Toolbox*, wie z. B. pH- und Temperaturoptimum, bestimmt und berücksichtigt werden.

Als Grundlage für die Untersuchung von Oligosacchariden musste zunächst eine leistungsfähige Oligosaccharidanalytik etabliert werden. Hierzu sollten insbesondere HPLC-RI, HPAEC-PAD und DC in ihrer Eignung zur Charakterisierung verschiedener Oligosaccharidtypen getestet werden. Auf Basis dieser Methoden sollten anschließend eine genaue Analyse hergestellter Oligosaccharidprodukte und eine detaillierte Analyse der Enzymaktivitäten der *Toolbox* erfolgen.

Zusätzlich zur Auswahl und Beschreibung von Enzymen, welche für die Oligosaccharidherstellung genutzt werden können, sollte auch eine Hochskalierung der Herstellung und ein Erproben

verschiedener präparativer Aufreinigungsmethoden, wie z. B. Größenausschlusschromatographie, erfolgen. Auf diese Weise sollte eine Enzymsammlung als Plattform geschaffen werden, über die die Herstellung von Oligosaccharidpräparationen erfolgen kann, die für präbiotische Studien geeignet sind.

Zusammengefasst sollten durch diese Arbeit alle notwendigen Schritte vom Screening geeigneter Enzyme, über die Herstellung bis zur Aufreinigung von XOS und AXOS aus Arabinoxylan sowie GMOS aus Glucomannan untersucht werden. Hierdurch sollte sowohl eine verbesserte Wertschöpfung von Bioraffinerienebenprodukten als auch die Herstellung neuer interessanter Produkte für Futtermittel-, Lebensmittel- und Healthcare-Branche ermöglicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material, Geräte und Verbrauchsmittel

2.1.1 Geräte und Software

Tab. 2 Geräte

Bezeichnung/Anwendung	Modell/Beschreibung	Hersteller
Autoklav	VX-150 Varioklav Dampfsterilisator	Systemec GmbH (Linden, Deutschland) H+P Labortechnik Klaus Huber (Oberschleißheim, Deutschland)
Querstromfiltration		
- Anlage	Masterflex® L/S®	ZIND VT (Mainz, Deutschland)
- Magnetrührer	uniSTIRRER 1	LLG Labware (Meckenheim, Deutschland)
- 10 kD-MWCO-Membran	NovaSet-LS TFF Cassette ProStream (low binding mPES) MWCO: 10 kD; Channel: LP Screen Channel; Area: 0,02 m ²	ZIND VT
- 1 kD-MWCO-Membran	NovaSet-LS TFF Cassette ProStream (low Binding mPES) MWCO: 1 kD; Channel: LP Screen Channel; Area: 0,02 m ²	ZIND VT
- 0,2 µm-MWCO-Membran	NovaSet-LS TFF Cassette HyStream (Low Fouling mPES) 0,2 µm; Channel: LP Screen Channel; Area: 0,02 m ²	ZIND VT
Dünnschichtchromatographie		
- Laufkammer	Simultan separating chamber with knob lid	biostep GmbH (Jahnsdorf, Deutschland)
- Färbesystem	Desaga ChromaJet DS20	Sarstedt (Nürmbrecht, Deutschland)
- Scanner	TMA 1000 XL Scan Maker	Microtek, Inc. (Singapur)
Elektronische Multipipette	Eppendorf Xplorer®	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Elektronische Multipipette mit einstellbarem Spitzenabstand	Voyager II, 8-Kanal, 10-300 µL Voyager II, 8-Kanal, 50-1250 µL	INTEGRA Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
FPLC-Systeme		
- Äkta FPLC-Systeme	Äkta Purifier Äkta Pure	GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, England)
- Pharmacia FPLC System	Rec 102 (Rekorder) Unico (UV-Spektrometer, 210 nm) GP-250 (Gradientenmischer) P-500 (Pumpe)	Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden)
-80 °C Gefrierschrank	Ultra Low Temperature Freezer VIP™ Series	Haier Bio-Medical (Qingdao, China) Sanyo Electric Co., Ltd (Moriguchi, Japan)
Heizschrank	Function Line	Heraeus (Hanau, Deutschland)
HPAEC-PAD	Dionex ICS 3000 AS 40 (Autosampler) EO Gas Regulator	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
HPLC	HPLC System Azura Optimas (Autosampler) Azura CT 2.1 (Säulenofen) Foxy R1 (Fraktionssammler) RefractoMax520 (RI-Detektor)	Knauer (Berlin, Deutschland) ERC GmbH (Riemerling, Deutschland)

Tab. 2 Geräte (Fortsetzung)

Bezeichnung/Anwendung	Modell/Beschreibung	Hersteller
Inkubator	innova 42 Incubator Shaker series	New Brunswick Scientific (New Jersey, USA)
MALDI-TOF	MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme MTP 384 Target plate ground steal BC	Bruker Corporation (Billerica, USA)
pH-Meter	Labor-pH Meter inoLab® pH 7110	WTW - a xylam brand (Weilheim, Deutschland)
Reinstwasseranlage	MicroPure	TKA Wasseraufbereitungs-system (Niederelbert, Deutschland)
Rotationsverdampfer	HEI-VAP Value Membranvakuumpumpe 2219 Multitemp II Thermostatic Circulator	Heidolph Instruments Labortechnik (Schwabach, Deutschland) vaccubrand (Wertheim, Deutschland) Pharmacia LKB (Bromma, Schweden)
SDS-PAGE – Elektrophoresekammer	Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad (Hercules, USA)
- Netzteil	2297 Macrodrive 5 Constant Power Supply	Pharmactia LKB
Thermocycler für Enzymassays	TAdvanced Thermal Cycler Primus 96 advanced	Analytik Jena (Jena, Deutschland) VWR (Radnor, USA)
Thermomixer	Thermomixer MHR23	Digital Biomedical Imaging Systems AG (Pforzheim, Deutschland)
UV/VIS-Spektrometer		
- für Quarzküvetten	Ultrospec PLUS	Pharmacia LKB
- für Kunststoffküvetten	BioSpectrometer	Eppendorf AG
- für Mikrotiterplatten	Sunrise™	Tecan Group (Männedorf, Schweiz)
Ultraschallgerät	UP200S Ultraschallprozessor Sonotrode Tip S14	Hielscher Ultrasonic GmbH (Teltow, Berlin)
Waagen		
- Digitalwaagen	1204 MP Navigator™	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland) Ohaus Europe GmbH (Greifensee, Schweiz)
- Feinwaage	Entris 2201-1S 125 A SCS	Sartorius AG Precisa Gravimetrics AG (Dietikon, Schweiz)
Wasserbäder	Haake DC 10	Thermo Fisher Scientific
Wippschüttler	Polymax 2040	Heidolph Instruments Labortechnik
Zentrifugen		
- für 1,5 mL Reaktionsgefäße	Rotina 35 R Biofuge pico Fresco21 Centrifuge	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland) Heraeus Heraeus
- für 50 mL Reaktionsgefäße und 96er PCR-Platten	Rotina 420R	Hettich Zentrifugen
- für Volumina zu 1000 mL	Sorvall RC 6+	Thermo Fisher Scientific
- Ultrazentrifuge	Sorvall Lynx 6000 Centrifuge Rotoren: F12S-6x500Lex, F9-6x100Lex, A27-8x50, F14-6x250y	Thermo Fisher Scientific

Tab. 3 Chromatographiesäulen

Modell/Beschreibung	Bezeichnung/Verwendung	Hersteller
CarboPac® PA1, 10 µm, 4 x 50 mm (Vorsäule) CarboPac® PA1, 10 µm, 4 x 250 mm (Trennsäule)	Vor- und Trennsäule für Mono- und Oligosaccharidanalyse mittels HPAEC-PAD	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Eurokat® Na ⁺ , 10 µm, 8 x 30 mm Eurokat® Na ⁺ , 10 µm, 8 x 300 mm	Vor- und Trennsäule für Oligosaccharidanalyse mittels HPLC	Thermo Fisher Scientific
Eurokat® H ⁺ , 10 µm, 8 x 30 mm Eurokat® H ⁺ , 10 µm, 8 x 300 mm	Vor- und Trennsäule für Analyse von Monosacchariden, kurzen Säuren und Alkoholen mittels HPLC	Knauer (Berlin, Deutschland)
Eurokat® Pb ⁺ , 10 µm, 8 x 30 mm Eurokat® Pb ⁺ 10 µm, 8 x 300 mm	Vor- und Trennsäule für Analyse von Monosacchariden mittels HPLC	Knauer
Superdex™ Peptide 10/300 GL Superdex™ 75 10/300 GL	Trennsäulen für die präparative Trennung von Oligosacchariden mittels SEC	GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, England)

Tab. 4 Software und Webtools

Software/Webtool	Verwendung	Hersteller / Anbieter
Adobe Photoshop CS 2; Version 9.0	Helligkeits- und Kontrastkorrektur bei Dünnschichtchromatographie	Adobe Systems (Mountain View, USA)
Adobe Illustrator; Version CC 2014	Erstellung von Graphiken, Prozessflussgraphiken und Schemata	Adobe Systems
Blast+; Version 2.6.0	Vergleich und Zuordnung von Nukleotidsequenzen mit Datenbanken	National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Bethesda MD, USA)
Chromeleon 7.2 Chromatography Data System; Version 7.2 SR3	Aufnahme und Auswertung von HPAEC-PAD-Chromatogrammen	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Clarity Chrom; präparative Version 5.0.3.192	Aufnahme und Auswertung von HPLC und SEC -Chromatogrammen	Data Apex (Prag, Tschechien)
Clone Manager 9 Professional Edition	Software für <i>in situ</i> Klonierung und DNA-Modifizierungen	Scientific & Educational Software (Denver, USA)
CP Atlas; Version 2.0	Ermittlung von Retentionsfaktoren (R _f) bei Dünnschichtchromatographie	Dr. Istvan Lazar
ExPASy	Ermittlung von molaren Extinktionsfaktoren von Proteinen (Sigrist et al., 2013)	Swiss Institute of Bioinformatics (Lausanne, Schweiz)
flexAnalysis; Version 3.3	Analyse von MALDI-TOF-Massenspektren	Bruker Daltonics (Billerica, USA)
flexControl; Version 3.3	Aufnahme von MALDI-TOF-Massenspektren	Bruker Daltonics
GraphPad-Prism 7; Version 7.00	Graphische Darstellung von Chromatogrammen; Statistische Auswertung und Regressionen	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)
ImageJ; Version 1.47	Umwandlung von Dünnschichtchromatogrammen in Densitogramme	Wayne Rasband, National Institutes of Health 7 (Maryland, USA)
Perkin Elmer UV WinLab; Version 6.04.0738	Messung und Auswertung von UV - Messungen für Protein-konzentrationsbestimmung	Perkin Elmer (Waltham, USA)
SignalP, Version 4.0	Bestimmung von Signalpeptiden	Nielsen (2017)
UNICORN; Version 5.31	IMAC-basierte Proteinaufreinigung mittels FPLC-Anlagen (Äkta)	GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, England)

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von AppliChem GmbH (Gatersleben, Deutschland) oder Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland), GE Healthcare Life Science (Little Chalfont, England), Sigma Aldrich (Waltham, USA), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) oder VWR International (Radnor, USA) verwendet.

Tab. 5 Chemikalien

Substanz	Reinheit und weitere Informationen	Hersteller
Aceton	99,9% für HPLC,UV, IR,SEC, ACS	AppliChem GmbH (Gatersleben, Deutschland)
Acetonitril	> 99%, HPLC-Ultra gradient grade	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Agar-Agar	-	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ameisensäure	97%	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Ammoniumpersulfat	98%	Sigma Aldrich
Ammoniumsulfat	> 99%	AppliChem GmbH
Anilin	> 99%	Sigma Aldrich
Borsäure	> 99,8%	AppliChem GmbH
n-Butanol	UV/IR-Grade > 99,8%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Bromphenolblau-Natriumsalz	90%	GERBU Biotechnologie GmbH (Geiberg, Deutschland)
Calciumchlorid	101,5%	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Citronensäure	99,5-100,5%	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Cobalt(II)-chlorid Hexahydrat	98,0-102,0%	Sigma Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G250	-	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
2,5-Dihydroxybenzoesäure	> 99,0%	Sigma Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat	> 99,9%	AppliChem GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	-	Sigma Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	≥ 99,5%	Merck Millipore
3,5-Dinitrosalicylsäure	≥ 98%	Sigma Aldrich
Diphenylamin	-	Sigma Aldrich
Eisen(III)citrat	16,5-20% Fe(III) Max 5% Fe(II)	Alfa Aesar (Haverhill, USA)
Essigsäure	> 99,7%, für Analyse	AppliChem GmbH
Ethanol (absolut)	99,8%	AppliChem GmbH
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	-	BioFroxx GmbH (Einhausen, Deutschland)
Glucose		AppliChem GmbH
Glycerin	> 99%	Alfa Aesar
Glycin	≥ 99%, zur Synthese	Carl Roth GmbH & Co. KG
Harnstoff	Zur Analyse	AppliChem GmbH
Hefeextrakt	-	Carl Roth GmbH & Co. KG
Imidazol	-	BioFroxx GmbH
Isopropanol	> 99,8%	AppliChem GmbH
Kaliumacetat	> 99,0%	Sigma Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	> 99,5%	Merck Millipore
Kalium-Natrium-Tartrat	USP, Pharma grade	AppliChem GmbH
Kanamycinsulfat	mind. 750 I.E./mg	AppliChem GmbH
Kupfer(II)chlorid-Dihydrat	>99%	Alfa Aesar
α-Lactose	> 99%	Sigma Aldrich
Magnesiumchlorid Hexahydrat	99-102%	Merck Millipore

Tab. 5 Chemikalien (Fortsetzung)

Substanz	Reinheit und weitere Informationen	Hersteller
Magnesiumsulfat- Heptahydrat	> 99,5 %	Merck Millipore
Manganchlorid-Dihydrat	-	Merck Millipore
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	> 99,5 %; Pufferqualität	AppliChem GmbH
Natriumacetat	≥ 99 %	Sigma Aldrich
Natriumazid	-	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriummolybdat-Dihydrat	-	AppliChem GmbH
Natriumsulfat	> 99,4 %	Thermo Fisher Scientific
Natronhydroxid – 50 % Lösung	-	VWR International (Radnor, USA)
Natronhydroxid – Pellets	97-105 %	AppliChem GmbH
Nickelsulfat	98-102 %	Sigma Aldrich
O-Phosphorsäure	85 %; Ph. Eur.; NF	AppliChem GmbH
Salzsäure, 37 % w/v	p. A.	AppliChem GmbH
Schwefelsäure, 1 M	-	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	> 99 %	AppliChem GmbH
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	> 99 %	AppliChem GmbH
Trypton	-	Carl Roth GmbH & Co. KG
Zinkacetat	-	Sigma Aldrich

IR = Infrarot; p. A. = analysenrein (*pro analysi*); Ph. Eur. = Europäisches Arzneibuch; NF = Amerikanisches amtliches Kompendium der Anforderungen an Hilfsstoffen und pflanzlichen Drogen (engl.: *national formulary*); USP = amerikanisches Arzneibuch (engl.: *United States Pharmacopeia*); ACS = American Chemical Society.

Tab. 6 Verbrauchsmaterialien

Material	Beschreibung/Verwendung	Hersteller
Antifoam 204	Antischaum	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kD	Proteingrößenstandard für SDS-PAGE	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free easypack	Protease-Inhibitortabletten	Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz)
Lysozym	22500 U/mg; Eingesetzt für Zellaufschluss bei Proteinaufreinigung	AppliChem GmbH (Gatersleben, Deutschland)
ACCELLERASE® BG	Abbau von Oligosacchariden für deren Konzentrationsbestimmung	DuPont (Wilmington, USA)
Quarzküvetten, High Precision Cell, Light Path 10 mm µCuvette G1.0	Bestimmung der Proteinkonzentration aufgereinigter Proteine Küvette für Photometer	Hellma GmbH (Müllheim, Deutschland) Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
TLC Silica Gel 60	Platten für Dünnschichtchromatographie	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Cellulose-Acetat-Filter, Porengröße: 0,2 µm	Filter für Sterilfiltration von Lösungen, Laufmitteln und Puffern	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
ACRODISC GHP 0,45 µm 13 mm + Minispikes	0,2 µm Filter für Probenvorbereitung für HPLC-Analyse	VWR International (Radnor, USA)
VIVASPIN 15, 10 kDa MWCO PES	Filtrationseinheit	Sartorius AG
Silica Gel Orange, 2-5 mm mit Indikatoren, Perform	Trockenmittel für Exsikator	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
primaPLATE, 96well PCR-Platte, PP; vollrand, klar, cut corner H1	96 well-Mikrotiterplatte für Enzymassays	Steinbrenner Laborgeräte GmbH (Wiesbaden, Deutschland)
Rotilabo®-Mikrometer-Platte; F-Profi	96 well-Mikrotiterplatte für photometrische Messungen	Carl Roth GmbH & Co. KG

Tab. 6 Verbrauchsmaterialien (Fortsetzung)

Material	Beschreibung/Verwendung	Hersteller
ALPHAGAZ™ 2 - Helium	Gas für Headspace-Begasung von Laufmittelflaschen bei HPAEC-PAD	Air Liquide S.A. (Paris, Frankreich)
Rotilabo Gewindefläschchen ND10 1,5 mL Klarglas Roth LC16.1	HPLC Probenfläschchen	Carl Roth GmbH & Co. KG
Schraubkappe mit Bohrung, PP, ND10, Septum Silikon/PTFE UltraCL, 1,3mm 45 °C	Schraubkappe für HPLC Probenfläschchen	Carl Roth GmbH & Co. KG
PolyVials + Plain Caps, 0,5 mL, Art. Nr. 042014	HPAEC-PAD-Probenfläschchen und Deckel	Thermo Fisher Scientific
Cap Removal Tool, Art. Nr.: 068925	Deckel-Entferner für HPAEC-PAD Probenfläschchen	Thermo Fisher Scientific
Folienelektrode, Au an PTFE, Art. Nr.: 060139 bzw. 060216	Folienelektroden für HPAEC-PAD	Thermo Fisher Scientific
Gaskets 50,8 mm; PTFE	Dichtring für Folienelektroden für HPAEC-PAD	Thermo Fisher Scientific
pH-Referenzelektrode für HPAEC- PAD	AgCl, ED ICS3/ICS5 Art. Nr.: 061879	Thermo Fisher Scientific

2.1.3 Medien und Puffer

Tab. 7 Medien und Puffer

Medium/Puffer	Substanz	Konzentration/Anteil
LB-Medium	Trypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	10 g/L
	Optional: Agar in ddH ₂ O gelöst	15 g/L
CCMB80 Puffer	Kaliumacetat	10 mM
	Calciumchlorid	80 mM
	Magnesiumchlorid	10 mM
	Manganchlorid	20 mM
	Glycerin	10% v/v
	in ddH ₂ O gelöst	
ZYP-5052	ZY	928 mL
	Trypton	5 g
	1 M Magnesiumsulfat	1 mL
	50x 5052	20 mL
	20x NPS	50 mL
	Optional: Kanamycin	50 mg/L
ZY	Trypton	5 g
	Hefeextrakt	10 g
	ddH ₂ O	ad 925 mL
20x NPS	Ammoniumsulfat	10 g
	Kaliumdihydrogenphosphat	136 g
	Dinatriumhydrogenphosphat	142 g
	ddH ₂ O	900 mL
50x 5052	Glycerin	250 g
	Glucose	25 g
	α-Lactose	100 g
	ddH ₂ O	730 mL
	zum Lösen der Lactose auf 60 °C erhitzt	
Lysepuffer (pH 7,3) für Proteinaufreinigung	MOPS	50 mM
	NaCl	0,5 mM
	CaCl ₂	20 mM
	Imidazol	20 mM
	mit ddH ₂ O aufgefüllt, pH-Wert mit HCl und NaOH eingestellt, sterilfiltriert	

Tab. 7 Medien und Puffer (Fortsetzung)

Medium/Puffer	Substanz	Konzentration/Anteil
Elutionspuffer (pH 7,3) für Proteinaufreinigung	MOPS	50 mM
	NaCl	0,1 mM
	Imidazol	0,5 M
	CaCl ₂	5 mM
	mit ddH ₂ O aufgefüllt, pH-Wert mit HCl und NaOH eingestellt	
Stripping-Puffer (pH 7,3) zur Reinigung von HisTrap – Chromatographiesäulen	MOPS	50 mM
	NaCl	0,1 M
	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	50 mM
	in ddH ₂ O gelöst	
Recharging-Puffer zur Regeneration von HisTrap-Chromatographiesäulen	Nickelsulfat in ddH ₂ O gelöst	100 mM
4x Auftragspuffer für SDS-PAGE	Tris pH 6,8	250 mM
	Glycerin	40% v/v%
	SDS	8,6% w/v%
	β-Mercaptoethanol	0,57 M
	Bromphenolblau in ddH ₂ O gelöst	Spatelspitze
Trenngelpuffer (pH 8,8) für SDS-PAGE	Tris	36,4 g
	SDS 10% w/v in ddH ₂ O	8 mL
	ddH ₂ O	ad 200 mL
Sammelgelpuffer (pH 6,8) für SDS-PAGE	Tris	12,2 g
	SDS 10% w/v in ddH ₂ O	8 mL
Laufpuffer für SDS-PAGE	Tris	3 g/L
	Glycin	14,4 g/L
	SDS	1 g/L
	in ddH ₂ O gelöst	
Färbelösung für SDS-PAGE	Coomassie Brilliant Blue G	1 g/L
	Methanol	45% v/v
	Essigsäure	10% v/v
	ddH ₂ O	45% v/v
Entfärbelösung für SDS-PAGE	Essigsäure	10% v/v
	Methanol	33% v/v
	ddH ₂ O	57% v/v
10x MOPS Reaktionspuffer	MOPS	1 M
	CaCl ₂ * H ₂ O	0,1 M
	NaCl	0,5 M
	in ddH ₂ O gelöst, Puffer individuell auf jeweils pH 4,0/4,5/5,0/5,5/6,0/6,5 mit HCl und NaOH eingestellt; sterilfiltriert	
10x Acetat Reaktionspuffer	Essigsäure	0-0,5 M
	Natriumacetat	0-0,5 M
	CaCl ₂ *H ₂ O	0,1 M
	NaCl	0,5 M
	in ddH ₂ O gelöst	
5x Phosphat-Citratpuffer	Zitronensäure-Monohydrat	~250 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat	~250 mM
	NaCl	250 mM
	Herstellung durch Mischung verschiedener Anteile von 250 mM Citronensäure und 500 mM Dinatriumhydrogenphosphat wie in Tabelle 15 angegeben; sterilfiltriert	
DNSA-Lösung	3,5-Dinitrosalicylsäure (DNSA)	10 g/L
	NaOH	10 g/L
	Kalium-Natrium-Tartrat	200 g/L
	Natriumsulfat	0,5 g/L
	Phenol	2,0 g/L
	in ddH ₂ O gelöst; sterilfiltriert; dunkel gelagert	

Tab. 7 Medien und Puffer (Fortsetzung)

Medium/Puffer	Substanz	Konzentration/Anteil
DC-Färbelösung	Anilin	1 mL
	Diphenylamin	1,0 g
	Aceton	ad 100 mL
Probenmatrix für MALDI-TOF Messungen	2,5-Dihydroxybenzoesäure	20 mg/mL
	Acetonitril	78 % v/v
	ddH ₂ O	22 % v/v
	Ameisensäure	0,1 % v/v
Riesenberg-Medium für Proteinherstellung im Zulaufverfahren	Herstellung für 6 L / 0,5 L:	
	Glycerol	180 g / 15,0 g
	Kaliumdihydrogenphosphat	89,8 g / 7,483 g
	Diammoniumhydrogenphosphat	48,0 g / 4 g
	Citronensäure	11,16 g / 1,07 g
	Eisen(III)citrat-Stammlösung	60 mL / 5 mL
	Chlorid-Stammlösung	1,25 mL / 0,104 mL
	Säure-Stammlösung	1,25 mL / 0,104 mL
	Zink-Stammlösung	1,25 mL / 0,104 mL
	Antischaum	600 mL / 50 mL
	EDTA-Stammlösung	1,25 mL / 0,104 mL
	Für 6 L (Fermenter): Mit ddH ₂ O auf 5,94 L auffüllen. Dabei den pH-Wert mit NaOH auf pH 6,3 einstellen. Nach dem Autoklavieren Zugabe von 60 mL Magnesiumsulfat-Stammlösung	Für 0,5 L (Erlenmeyerkolben): Mit ddH ₂ O auf 0,495 L auffüllen. Dabei den pH-Wert mit NaOH auf pH 6,9 einstellen. Nach dem Autoklavieren Zugabe von 5 mL Magnesiumsulfat-Stammlösung
	Glycerin-Fütterlösung für Proteinherstellung im Zulaufverfahren	Glycerin
Eisen(III)citrat-Stammlösung		2,0 mL
Chlorid-Stammlösung		1,0 mL
Säure-Stammlösung		1,0 mL
Zink-Stammlösung		1,0 mL
EDTA-Stammlösung		1,0 mL
ddH ₂ O		ad 450 mL
Nach dem Autoklavieren Zugabe von 50 mL Magnesiumsulfat-Stammlösung		
Lactose-Fütterlösung für Proteinherstellung im Zulaufverfahren	Lactose	300 g
	Fe(III)citrat-Stammlösung	4,0 mL
	Chlorid-Stammlösung	2,0 mL
	Säure-Stammlösung	2,0 mL
	Zink-Stammlösung	2,0 mL
	EDTA-Stammlösung	2,0 mL
	ddH ₂ O	ad 900 mL
	Nach dem Autoklavieren Zugabe von 100 mL Magnesiumsulfat-Stammlösung	
100 x Eisen(III)citrat-Stammlösung	Eisen(III)citrat ddH ₂ O	2,5 g ad 250 mL
4 000 x Chlorid-Stammlösung	CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,5 g
	MnCl ₂ * 4 H ₂ O	3,0 g
	CuCl ₂ * 2 H ₂ O	0,3 g
	ddH ₂ O	ad 50 mL
4 000 x Säure-Stammlösung	H ₃ BO ₃	0,6 g
	Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,5 g
	ddH ₂ O	ad 50 mL
4 000 x Zink-Stammlösung	Zn(CH ₃ COO) ₂ * 2 H ₂ O	2,6 g
	ddH ₂ O	ad 50 mL
4 000 x EDTA-Stammlösung	EDTA	1,68 g
	ddH ₂ O	ad 50 mL
100 x Magnesiumsulfat-Stammlösung	MgSO ₄ * 7 H ₂ O	100 g
	ddH ₂ O	ad 250 mL

2.1.4 Mono-, Oligo- und Polysaccharide sowie pNP-Substrate

Tab. 8 Monosaccharide

Name	Reinheit	Hersteller/Anbieter
D-Mannitol	99% (USP-NF, Pharma grade)	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
L-(+)-Arabinose	>99%	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany)
β -D-(-)-Fructose	>99%	Sigma Aldrich
L-(-)-Fucose	>99%	Sigma Aldrich
D-(+)-Galactose	>98%	AppliChem GmbH (Gatersleben, Deutschland)
D-(+)-Glucose-Monohydrat	-	AppliChem GmbH
D-(+)-Glucose	>99%	AppliChem GmbH
D-(+)-Mannose	Research grade	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany)
α -L-Rhamnose-Monohydrate	>99%	Sigma Aldrich
D-(+)-Xylose	>99%	Sigma Aldrich

NF = Amerikanisches amtliches Kompendium der Anforderungen an Hilfsstoffen und pflanzlichen Drogen (engl.: *national formulary*); USP = amerikanisches Arzneibuch (engl.: *United States Pharmacopeia*).

Tab. 9 Oligosaccharide

Gruppierung	Name	Reinheit*	Hersteller/Anbieter
Xylooligo-saccharide (XOS)	Xylobiose (X ₂)	>90%	Megazyme (Bray, Irland)
	Xylotriose (X ₃)	>95%	Megazyme
	Xylotetraose (X ₄)	>95%	Megazyme
	Xylopentaose (X ₅)	>95%	Megazyme
	3 ² - α -L-Arabinofuranosyl-xylobiose (A ³ X)	>95%	Megazyme
Arabinoxyloligo-saccharide (AXOS)	2 ³ - α -L-Arabinofuranosyl-xylotriose (A ² XX)	>95%	Megazyme
	Mix aus 3 ³ - α -L-Arabinofuranosyl-xylotriose (XA ³ XX) und 2 ³ - α -L-Arabinofuranosyl-xylotriose (XA ² XX)	>95%	Megazyme
	2 ³ ,3 ³ -di- α -L-Arabinofuranosyl-xylotriose (XA ²⁺³ XX)	>95%	Megazyme
	2 ³ ,3 ³ -di- α -L-Arabinofuranosyl-xylotriose (A ²⁺³ XX)	>95%	Megazyme
Mannooligo-saccharide (MOS)	Mannobiose (M ₂)	~95%	Megazyme
	Mannotriose (M ₃)	~95%	Megazyme
	Mannotetraose (M ₄)	~95%	Megazyme
	Mannopentaose (M ₅)	>95%	Megazyme
	Mannohexaose (M ₆)	~90%	Megazyme
Glucomannooligo-saccharide (GMOS)	Mix aus 1,4- β -D-Glucosyl-D-Mannose (GM) und Mannobiose (M ₂)	~92%	Megazyme
	Mix aus 1,4- β -D-Glucosyl-D-Mannobiose (GMM) und 1,4- β -D-Di-glucosyl-D-Mannose (GGM)	~96%	Megazyme
Cellooligo-saccharide	Cellobiose (C ₂)	~99%	AppliChem GmbH (Gatersleben, Deutschland)
	Cellotriose (C ₃)	~95%	Megazyme
	Cellotetraose (C ₄)	~95%	Megazyme
	Cellopentaose (C ₅)	~95%	Megazyme
	Cellohexaose (C ₆)	~90%	Megazyme
Laminarinoligo-saccharide	Laminaribiose (L ₂)	>95%	Megazyme
	Laminaritriose (L ₃)	>95%	Megazyme
	Laminaritetraose (L ₄)	~95%	Megazyme
	Laminaripentaose (L ₅)	~95%	Megazyme
Glucooligo-saccharide (gemischte Bindungen)	Cellotriosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucose (Glucotetraose B)	~95%	Megazyme
	Cellobiosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-cellobiose (Glucotetraose C)	~90%	Megazyme

* laut Herstellerangaben.

Tab. 10 Polysaccharide

Gruppierung	Name (Quelle)	Arbeitskonzentration	Hersteller/Anbieter
Arabinan	Arabinan (Zuckerrübe)	0,5 % w/v	Megazyme (Bray, Irland)
	Arabinogalactan (Lärche)	0,5 % w/v	Megazyme
Galactane	Galactan (Kartoffel)	0,5 % w/v	Megazyme
	Galactan (Lupine)	0,5 % w/v	Megazyme
	Pectisches Galactan (Lupine)	0,5 % w/v	Megazyme
	Pectisches Galactan (Kartoffel)	0,5 % w/v	Megazyme
	Amylose	0,5 % w/v	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Glucane	Gersten-β-Glucan (mittlere Viskosität)	0,5 % w/v	Megazyme
	Curdlan	0,5 % w/v	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
	Lichenan (Lichenin)	0,5 % w/v	Sigma Aldrich
	Pullulan	0,5 % w/v	Sigma-Aldrich
	Xyloglucan	0,5 % w/v	Megazyme
Mannane	Galactomannan (Guarbohnen, mittlere Viskosität)	0,5 % w/v	Megazyme
	Glucomannan (<i>Amorphophallus konjac</i>)	0,125 % w/v	Megazyme
	Mannan	1,00 %	Megazyme
	Mannan (Steinnuss)	0,75 %	Megazyme
Xylane	Arabinoxylan (Weizen, mittlere Viskosität)	0,5 % w/v	Megazyme
	Arabinoxylan (Weizen, unlöslich)	0,5 % w/v	Megazyme
	Xylan (Birke)	1,0 % w/v	Sigma-Aldrich
	Xylan (Haferspelzen)	0,5 % w/v	Megazyme
	Xylan (Lärche, Nadelholz)	0,5 % w/v	ICN Bio-Chemicals (Santa Ana, USA)
	Xylan (Gräser)	0,5 % w/v	ASA Spezialenzyme GmbH (Wolfenbüttel, Deutschland)

Tab. 11 pNP-Substrate

Name	Reinheit	Hersteller
pNP-α-L-Arabinofuranosid	>98 %	Carbosynth LLC (San Diego, USA)
pNP-β-D-Xylopyranosid	Forschungsqualität	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)

2.1.5 Bakterienstämme und Plasmide

Tab. 12 Bakterienstämme und Plasmide

Stamm/Plasmid	Genotyp bzw. weitere Beschreibung	Hersteller
<i>E. coli</i> BL21 Star™ (DE3)	F-ompT hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻) galdcmrne131 (DE3)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<i>E. coli</i> DH10B	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80d/lacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu)7697 araD139 gal/U galK nupG rpsL λ-	Thermo Fisher Scientific (Durfee et al., 2008)
pET24c Vektor	T7-Promotor und Terminator, His-Tag kodierende Sequenz, f1 origin, pBR322 origin, Kanamycin-Resistenz	Thermo Fisher Scientific

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde 250 mL SOB Medium mit 3 mL einer frischen Übernachtskultur des gewünschten *E. coli* Stammes (LB-Medium) inokuliert und bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,3 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nach einer Zellernte durch Zentrifugation ($4950 \times g$, 4 °C, 10 min) wurden die Zellen in 80 mL gekühlten CCMB80 Puffer aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und Aufnahme in 10 mL eisgekühlten CCMB80 Puffer wurden die Zellen anschließend in 50 μ L Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff gefroren, und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Transformation

Für die Transformation des Expressionsstamms *E. coli* BL21 Star™ (DE3) wurden ca. 1-5 μ L eines Plasmids zu ca. 50 μ L des aufgetauten kompetenten *E. coli* Stammes gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45 s bei 42 °C wurden die Zellen anschließend in 250 μ L LB Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt (500-700 rpm). Nach dieser Regenerationsphase wurden 75 μ L der transformierten Zellen auf LB-Agarplatten mit 50 mg/L Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Von einer flüssigen Übernachtskultur eines Transformationsklons in LB Medium wurden 600 μ L entnommen, mit 200 μ L Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Produktion von rekombinanten Proteinen

Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte im *E. coli* Stamm BL21DE3 Star™ mithilfe des Autoinduktionsprotokolls nach Studier (2005). Für die Vorkultur wurden 5 mL LB Medium mit Kanamycin mit einer Kolonie einer LB Platte angeimpft und für 7-8 h bei 37 °C geschüttelt (120 rpm). Die Hauptkultur, bestehend aus 250 mL ZYP-5052 Medium und 50 μ g/mL Kanamycin, wurde mit 1 % v/v der Vorkultur inokuliert und für 18 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

Die Ernte der Hauptkultur erfolgte über Zentrifugation (20 min, $5000 \times g$, 4 °C), wobei der Überstand verworfen und das Zellpellet für die weitere Proteinherstellung verwendet wurde. Wenn auf die Zellernte nicht direkt ein Zellaufschluss mit anschließender Proteinaufreinigung folgte, wurde das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.4 Zellaufschluss

Das Zellpellet einer Hauptkultur wurde nach dem Auftauen in 20 mL Lysepuffer suspendiert, mit einer halben Tablette Proteaseinhibitor sowie 200 μ L 100 mg/mL Lysozym versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert.

Dieser Ansatz wurde anschließend zwei Mal für 4 min mit einer 4 min Pause dazwischen auf Eis sonifiziert (Einstellungen: 60 % Amp, 0,25 Cycle). In einer anschließenden Zentrifugation (38500 \times g 4 °C, 20 min) wurden die Zelltrümmer als Pellet abgetrennt und für eine spätere Analyse mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.2.7) in 20 mL Lysepuffer resuspendiert.

Der Überstand nach der Zentrifugation, welcher den Zellextrakt und somit auch das rekombinante hergestellte Protein enthält, wurde anschließend direkt der Proteinaufreinigung mittels IMAC zugeführt.

2.2.5 Aufreinigung von rekombinantem Protein mittels IMAC

Die Aufreinigung rekombinanter Proteine erfolgte mittels IMAC, bei der sich die selektive Affinitätsbindung des C-terminalen His₆-Tags der rekombinanten Proteine an Nickelionen bzw. an eine mit Nickelionen besetzte Chromatographiesäule (HisTrap FF, GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, England) zu Nutze gemacht wird. Die Detektion der Proteinfractionen erfolgt bei dieser Methode photometrisch bei 210 nm.

Die chromatographische Aufreinigung wurde mittels drei unterschiedlicher Systeme, Äkta Pure, Äkta Purifier sowie einem Pharmacia FPLC-System, durchgeführt, wobei stets dieselben Prozessschritte aufeinander folgten: Equilibrierung der Chromatographiesäulen, Auftragen des Zellextrakts auf die Säule, Waschen der gebundenen Proteine mit Lysepuffer sowie selektives Eluieren des Zielproteins mit Elutionspuffer. Anschließend wurden die Chromatographiesäulen gewaschen, regeneriert und nach Versetzen mit 20 % v/v Ethanol eingelagert. Je nach Volumen der verwendeten Chromatographiesäule betrug die Flussgeschwindigkeit 1 ml/min (Säulenvolumen von 1 mL) oder 5 ml/min (Säulenvolumen von 5 mL).

Der Einbau der Chromatographie-Säulen erfolgte unter Fluss mit 20 % v/v Ethanol. Anschließend wurden die Säulen mit 5 Säulenvolumina (SV) ddH₂O gespült und mit etwa 10 SV Lysepuffer equilibriert, bis sich das UV-Signal, gemessen bei 210 nm, stabilisiert hatte. Je nach ausgewähltem System und Chromatographiesäule wurde anschließend das Zellextrakt per Superloop (Pharmacia FPLC-System) oder Probenpumpe (Äkta Purifier, Äkta Pure) auf die Säule aufgetragen. Nachfolgend wurde die Säule solange mit Lysepuffer gespült, bis das UV-Signal wieder das Basisniveau erreicht hatte. Durch Spülen der Säule mit Elutionspuffer wurde das

Zielprotein selektiv eluiert und separat aufgefangen. Nach abschließendem Spülen mit 5 SV Lysepuffer, 5 SV ddH₂O und 10 SV 20% v/v Ethanol, wurde die Säule bis zur Regeneration bei 4 °C gelagert.

Für die Regeneration einer Chromatographiesäule wurde diese zunächst unter Fluss mit 20% v/v Ethanol eingebaut, mit 10 SV Wasser gespült und die komplexierten Ni²⁺-Ionen mit einem EDTA-basierten Stripping Puffer von der Säule gelöst. Nach einem Zwischenspülschritt mit 10 SV ddH₂O wurde die Säule durch Spülen mit 5 SV einer „Recharging“-Lösung neu mit Nickelionen beladen, erneut mit 5 SV ddH₂O und 10 SV 20% v/v Ethanol gespült und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.6 Hitzedenaturierung von Wirtszellproteinen

Auch nach einer chromatographischen Aufreinigung über IMAC kann aufgrund von unspezifischer Bindung noch ein hoher Anteil an Wirtszellprotein in den aufgereinigten Proteinfractionen vorhanden sein. Zur Erhöhung der Reinheit des Zielproteins nach der Chromatographie wurden die Elutionsfraktionen daher einem Hitzedenaturierungsschritt unterzogen. Hierbei wird sich zu Nutze gemacht, dass Wirtszellproteine von *E. coli* bei höheren Temperaturen nicht stabil sind, sondern denaturieren und als Präzipitat ausfallen (Burgess, 2009). Im Gegensatz hierzu weisen die in dieser Arbeit exprimierten Gylcosidhydrolasen, welche ausschließlich aus thermophilen Organismen stammen (*C. thermocellum*, *C. stercorarium*, *C. cellulosisii*, *Hb. hemicellulosilytica*, *Hv. saccincola*), eine erheblich höhere Thermostabilität auf und bleiben bei der durchgeführten Hitzedenaturierung in Lösung.

Für die Hitzedenaturierung wurden die gesammelten Elutionsfraktionen 10 min auf 50 °C erhitzt, 10 min bei 16 200 × g zentrifugiert und die Überstände vereinigt. Zu dieser gereinigten Proteinlösung wurde anschließend Natriumazid (Endkonzentration 0,02% w/v) gegeben und, sollte die Proteinlösung bei -20 °C gelagert werden, vorher noch mit 20% v/v Glycerin versetzt. Das ausgefällte Proteinpellet wurde für eine Analyse mittels SDS-PAGE in demselben Volumen an Elutionspuffer resuspendiert.

Bei einer sehr hohen Ausbeute an Zielprotein nach der chromatographischen Aufreinigung – ersichtlich am Integral des Elutionspeak im IMAC-Chromatogramm – war es notwendig, die eluierte Proteinlösung vor der Hitzedenaturierung 1:2 bis 1:5 mit Lysepuffer zu verdünnen.

2.2.7 SDS-PAGE zur Expressionskontrolle

Mithilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. *Sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) wurde die Expression des jeweiligen Zielproteins als auch dessen relative Konzentration und Reinheit im Verlauf der Aufreinigung nachverfolgt. Die SDS-PAGE wurde auf Basis der Mini-PROTEAN® Tetra Cell Apparatur von Biorad (Hercules, USA) und den zugehörigen Glasplatten, Kämmen und Gelelektrophoresekammern durchgeführt. Als Spannungsquelle wurde ein 2297 Macrodrive 5 Constant Power Supply von LKB Bromma (Bromma, Schweden) verwendet.

Die Erstellung der Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE erfolgte nach dem in Tabelle 13 angegebenen Pipettierschema. Zunächst wurde das Sammelgel hergestellt, wobei die Polymerisation durch die Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethylen-diamin (TEMED) initiiert wurde. Der Reaktionsansatz wurde anschließend zwischen die vorbereiteten Glasplatten bis 2,5 cm unter dem oberen Rand pipettiert und mit ddH₂O überschichtet. Nach Aushärtung des Sammelgels wurde die Flüssigkeit abgegossen, das Sammelgel mit einem Reaktionsansatz des Trenngels überschichtet und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Bei nicht sofortiger Weiterverwendung des Gels wurde es, mit feuchten Papiertüchern umwickelt, bis zu einer Woche im Kühlschrank gelagert.

Tab. 13 Pipettierschema für die Erstellung von SDS Gelen

Bestandteil	Sammelgel	Trenngel
Anteil an Acrylamid im Gel	4 % w/v	10 % w/v
Gesamtvolumen	5,045 mL	20,115 mL
Sammel-/Trenngel-Puffer	1,25 mL	5 mL
Acrylamid (30 % w/v)	0,5 mL	6,7 mL
ddH ₂ O	3,25 mL	8,3 mL
10 % APS in ddH ₂ O	30 µL	100 µL
TEMED	15 µL	15 µL

20 µL einer Probe wurde für die SDS-PAGE mit 80 µL 4x Auftragspuffer gemischt, für 5 min bei 95 °C erhitzt und zentrifugiert. 10 µL einer so behandelten Probenlösung wurde anschließend in jeweils eine Probenaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel durchgeführt und beendet, sobald die Bromphenol-Front das Ende des Gels erreicht hatte. Bei jeder durchgeführten SDS-PAGE wurde 5 µL des „Page Ruler Plus Prestained“ von Life Technologies (Carlsbad, USA) als Standard zur Abschätzung der Proteingrößen verwendet.

Für die Färbung der Proteine in den SDS-Gelen wurden diese für 30 min in einer Färbelösung und anschließend für 30 min in einer Entfärbelösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die SDS-Gele mehrfach in ddH₂O gewaschen, bis die blaue Grundfärbung des Gels verschwand und deutliche Proteinbanden erkennbar waren.

2.2.8 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der rekombinant hergestellten Proteine erfolgte photometrisch auf Basis der UV-Absorptionseigenschaften der Aminosäuren des Zielproteins unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen. Der hierfür notwendige molare Extinktionskoeffizient, welcher sich durch die Primärstruktur des Proteins berechnen lässt, wurde über das Tool „Prot Param“ von ExpASy (Sigrist et al., 2013) ermittelt.

Für die Messungen wurden jeweils 10, 20 und 30 µL der Proteinlösung zu 600 µL 8 M Harnstoff gegeben und die Extinktion bei 280 nm gegen eine Negativkontrolle von 8 M Harnstoff ohne Proteinlösung verglichen. Die Messungen wurden in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm im Photometer Ultrospec PLUS von Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden) oder in Kunststoffküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm im Photometer BioSpectrometer der Firma Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Für die Berechnung der Proteinkonzentration wurde das arithmetische Mittel aus drei Messungen herangezogen. Die Formel für die Berechnung der Proteinkonzentration wurde aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Beer, 1852; Bouguer, 1729; Lambert, 1760) abgeleitet:

$$c_{Protein} \left[\frac{g}{L} \right] = \left(\frac{E_{280nm,Protein} - E_{280nm,NK}}{\epsilon_{red} \left[\frac{L}{mol * cm} \right] * d [cm]} \right) * MW_{Protein} \left[\frac{g}{mol} \right] \quad (\text{Gleichung 1})$$

$c_{Protein}$ = Konzentration des Proteins [g/L]

$E_{280nm,Protein}$ = Extinktion der Proteinlösung bei 280 nm [-]

$E_{280nm,NK}$ = Extinktion von 8 M Harnstoff bei 280 nm [-]

ϵ_{red} = molarer Extinktionskoeffizient unter reduzierten Bedingungen [L/mol/cm]

d = Schichtdicke der Küvette, 1 cm

$MW_{Protein}$ = Molekulargewicht des Proteins [g/mol]

2.3 Reaktionsansätze für den enzymatischen Verdau von Polysacchariden, pNP-Substraten und Oligosacchariden

2.3.1 Enzymatischer Verdau von Polysacchariden

Jeder Reaktionsansatz für den Verdau eines Polysaccharids beinhaltete ein Polysaccharid (0,125-1% w/v), ein Enzym oder Enzymgemisch (0,1-50 mg/L) und optional eine Pufferkomponente (10-100 mM) zum Einstellen des pH-Wertes. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Reaktionsansätze für alle enzymatischen Hydrolysen mit einem MOPS-Puffer bei pH 6,5 (10 mM MOPS, 1 mM CaCl₂ und 5 mM NaCl) angesetzt, bei einer Temperatur von 60 °C inkubiert und nach Abschluss der Reaktion durch eine Inkubation von 10 min bei 95 °C gestoppt.

Reaktionsvolumen

Der enzymatische Verdau von Polysacchariden wurde, je nach Reaktionsvolumen, in Mikrotiterplatten (bis zu 200 µL), Mikroreaktionsgefäßen (bis zu 1,5 mL), Falcons (bis zu 40 mL), 500 mL Erlenmeyerkolben (bis zu 100 mL) oder 5 L Erlenmeyerkolben (bis zu 1000 mL) durchgeführt. Je nach Reaktionssystem erfolgte die Temperierung der Ansätze im Thermocycler (Mikrotiterplatten), Wasserbad (Mikroreaktionsgefäße) oder in Inkubatoren (Falcons und Erlenmeyerkolben) bei 120 rpm.

Polysaccharidauswahl und -konzentration

Der Großteil der Experimente bezüglich des Abbaus von Arabinoxylan wurde mit Arabinoxylan mittlerer Löslichkeit aus Weizenstroh von Megazyme (Bray, Irland) in einer Konzentration von 0,5% w/v als Modellsubstrat durchgeführt. Da dieses Substrat nur in geringen Mengen verfügbar war, wurde für Experimente im Maßstab über 5 mL eine von der Firma ASA Spezialenzyme (Wolfenbüttel, Deutschland) zur Verfügung gestellte Präparation von Arabinoxylan aus Gräsern ebenfalls in einer Konzentration von 0,5% w/v eingesetzt. Weitere getestete Xylanbasierte Substrate waren eine unlösliche Arabinoxylanpräparation aus Weizen (0,5% w/v), Xylan aus Birke (1% w/v), Haferspelzen (0,5% w/v) und Lärche (0,5% w/v) jeweils von Megazyme (Bray, Irland) oder Sigma Aldrich (St. Louis, USA) (vgl. Tab. 10).

Das Modellsubstrat zur Untersuchung des enzymatischen Abbaus von Glucomannan wurde von Megazyme (Bray, Irland) bezogen und in einer Konzentration von 0,125% w/v eingesetzt. Hierbei handelte es sich um eine Hemicellulosepräparation, welche aus der Teufelszunge, *Amorphophallus Konjac*, extrahiert wurde. Für Experimente mit einem Volumen von mehr als 5 mL wurde eine alternative Glucomannan-Präparation von *Amorphophallus Konjac* gewählt,

welche als Lebensmittelzusatzstoff E425 von Golden Peanut (Garstedt, Deutschland) bezogen wurde.

Weitere untersuchte Substrate umfassten verschiedene Mannane, wie z. B. Galactomannan und Mannan aus der Steinruss, Glucane, wie z. B. Gersten- β -Glucan und Lichenan, sowie Pektin-assoziierte Substrate. Bei der Verwendung von Substraten mit unlöslichen Bestandteilen wurden diese per Zentrifugation (5 min, $4890 \times g$) vor einer weiterführenden Analyse der Reaktionsansätze abgetrennt.

Enzymkonzentration

Je nach Zielsetzung des Experiments und Aktivität der eingesetzten Enzyme wurde eine unterschiedlich hohe Enzymkonzentration für einen Reaktionsansatz eingesetzt. Zur qualitativen Aktivitätsbestimmung von Enzymen auf Polysaccharide in einem Reaktionsansatz über Nacht wurde eine Enzymkonzentration zwischen 2 und 4 $\mu\text{g/mL}$ eingesetzt (vgl. Tab. 14).

Für die Durchführung von Reaktionskinetiken wurde keine konstante Enzymkonzentration eingesetzt. Stattdessen wurde die Enzymkonzentration in Abhängigkeit der jeweiligen Enzymaktivität so variiert, dass über den gesamten Verlauf der Reaktion von bis zu 24 h ein gleichmäßiger und letztendlich vollständiger Reaktionsumsatz stattfand. Für die Bestimmung von Temperatur-vs-pH-Aktivitätsprofilen in Mikrotiterplatten (siehe Kapitel 2.3.4) wurde ebenfalls eine für jedes Enzym individuell gewählte und getestete Enzymkonzentration eingesetzt.

2.3.2 Qualitative Aktivitätsbestimmung von Enzymen auf Polysaccharide

Die Bestimmung einer generellen Aktivität von Enzymen auf Polysaccharide wurde in einem Übernacht-Reaktionsansatz bei 60°C und einem MOPS-Puffer bei pH 6,5 des jeweiligen Enzyms mit einer Reihe an unterschiedlichen Hemicellulose-assoziierten Polysacchariden bestimmt (vgl. Tab. 10). Im Anschluss an die Reaktion wurden die Reaktionsansätze zentrifugiert (4500 rpm, 5 min) und im Überstand die freigesetzte Menge an reduzierenden Enden, welche mit der Anzahl hydrolysiertes Glycosidbindungen korreliert, über einen DNSA-Assay ermittelt (siehe Kapitel 2.4.1).

Die Methodik für die qualitative Aktivitätsbestimmung der Enzyme wurde im Laufe der Arbeit sukzessive verbessert. Die hieraus resultierende Variation in den Reaktionsbedingungen bei den unterschiedlichen getesteten Enzymen sind in Tabelle 14 angegeben.

Tab. 14 Reaktionsbedingung für die qualitative Aktivitätsbestimmung von Enzymen verschiedener Organismen auf Polysaccharide

Bedingung	<i>C. thermo-cellum</i>	<i>Hb. hemicellulosilytica</i>	<i>C. stercorarium</i>	<i>C. cellulosisii</i>	<i>Hv. saccincola</i>
Gefäß	1,5 mL Mikroreaktionsgefäß	MTP	MTP	MTP	MTP
Volumen	600 µL	125 µL	150 µL	150 µL	150 µL
Enzymkonzentration	3,33 ng/µL	2 ng/µL	4 ng/µL	4 ng/µL	4 ng/µL
Puffersystem	1x MOPS-Puffer, pH 6,5	1x MOPS-Puffer, pH 6,5	1x MOPS-Puffer, pH 6,5	1x MOPS-Puffer, pH 6,5	0,1x MOPS-Puffer, pH 6,5
Wiederholungen	3x	2x	3x	3x	3x
Durchgeführt durch	Simon Heinze	Florian Krabichler	Jannis Bröker	Jurik Mutter	Julius Glanz

1x MOPS-Puffer: 100 mM MOPS, 10 mM CaCl₂, 50 mM NaCl; 0,1x MOPS-Puffer: 10 mM MOPS, 1 mM CaCl₂, 5 mM NaCl; MTP = Mikrotiterplatte (96 well-PCR-Platte).

Die eingesetzte Konzentration an Polysaccharid blieb für das jeweilige Polysaccharid bei allen Enzymen gleich und ist Tabelle 10 zu entnehmen. In der Regel wurde für das Ansetzen der Reaktionsansätze eine doppelt konzentrierte Polysaccharid-Stammlösung verwendet, welche unter Zugabe von 0,02 % w/v NaN₃ bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert wurde.

2.3.3 Aktivitätsbestimmung von Enzymen auf *p*NP-Substrate

Die Bestimmung der β -Xylosidase- und α -Arabinofuranosidaseaktivität erfolgte durch eine Aktivitätsbestimmung der Enzyme auf den entsprechenden *para*-Nitrophenol-Substraten (*p*NP-Substrate), *p*NP- β -L-Xylopyranosid und *p*NP- α -L-Arabinofuranosid. Bei dieser Methode wird sich zu Nutze gemacht, dass bei der Hydrolyse dieser Substrate freigesetztes *p*NP im Gegensatz zum eingesetzten Konjugat eine gelbe Farbe aufweist, welche bei 405 nm photometrisch nachgewiesen werden kann.

Das Volumen der Reaktionsansätze betrug 100 µL und wurde in Mikrotiterplatten angesetzt. Für jeden Reaktionsansatz wurden 4 mM des jeweiligen Substrats sowie eine Enzymkonzentration zwischen 0,1 und 1 mg/L eingesetzt. Als Puffersystem wurde, wenn nicht anders angegeben, ein MOPS-Puffer (100 mM MOPS, 10 mM CaCl₂, 50 mM NaCl, eingestellt auf pH 6,5 bei 60 °C) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 60 °C im Thermocycler. Anschließend wurde durch Zugabe von 100 µL 1 M Natriumcarbonat die Reaktion abgestoppt und nach Übertragung eines Aliquots von 100 µL auf eine „Flat bottom“-Mikrotiterplatte im Photometer Sunrise™ von Tecan (Männedorf, Schweiz) bei 405 nm photometrisch gemessen. Die Quantifizierung der freigesetzten Menge an *p*NP erfolgte durch Vergleich mit einer Kalibriergeraden von 0,05-0,60 mM *p*NP. Alle Reaktionsansätze wurden im Dreifachansatz durchgeführt. Die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität auf Basis der freigesetzten *p*NP-Menge lautet wie folgt:

$$\text{Aktivität [U]} = \frac{n_{pNP} [\mu\text{mol}]}{t [\text{min}]} \quad (\text{Gleichung 2})$$

$$\begin{aligned} \text{Spezifische Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right] &= \frac{n_{pNP} [\mu\text{mol}]}{t [\text{min}] * m_{\text{Protein}} [\text{mg}]} \\ &= \frac{n_{pNP} [\mu\text{mol}] * 1000}{t [\text{min}] * c_{\text{Protein}} \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right] * V_{\text{Reaktion}} [\mu\text{L}]} \end{aligned} \quad (\text{Gleichung 3})$$

$$\text{Spezifische Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\mu\text{mol}} \right] = \frac{n_{pNP} [\mu\text{mol}] * MW_{\text{Protein}} \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]}{t [\text{min}] * m_{\text{Protein}} [\text{mg}]} \quad (\text{Gleichung 4})$$

n_{pNP} = freigesetzte Menge an pNP [μmol]

t = Reaktionszeit, 60 min

$$\text{Aktivität [U]} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$$

$$\text{Spezifische Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{mg}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{mg}} \right]$$

$$\text{Spezifische Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\mu\text{mol}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \mu\text{mol}} \right]$$

m_{Protein} = Gesamtmenge des Proteins im Reaktionsansatz [μg]

V_{Reaktion} = Volumen des Reaktionsansatzes [μL]

c_{Protein} = Konzentration des Proteins im Reaktionsansatz [$\text{ng}/\mu\text{L}$]

MW_{Protein} = Molekulargewicht des Proteins [g/mol]

2.3.4 Bestimmung eines Temperatur-vs-pH-Aktivitätsprofils

Für die Xylanasen, α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidase von *Hb. hemicellulosilytica* wurde ein Temperatur-vs-pH-Aktivitätsprofil ermittelt. Für die Charakterisierung der Xylanasen wurde ein Mikrotiterplatten-Assay aufgesetzt, welcher 0,5% w/v lösliches Arabinoxylan als Substrat verwendete und dessen Aktivitätsbestimmung auf einem DNSA-Assay beruht (siehe Kapitel 2.3.2 und 2.4.1). Die Reaktionsdauer betrug hierbei 2 h. Für die Charakterisierung der α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidase wurde hingegen pNP- α -L-Arabinofuranosid und pNP- β -L-Xylopyranosid als Substrat sowie eine photometrische pNP-Quantifizierung zur Aktivitätsbestimmung verwendet (siehe Kapitel 2.3.3). Bei diesen Experimenten betrug die Reaktionszeit 1 h. Alle Experimente wurden als Triplikate angesetzt. Bei beiden Assay-Typen wurde erst das Temperaturoptimum und basierend auf dem ermittelten Optimum anschließend das pH-Optimum ermittelt.

Für die Ermittlung der Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Reaktionstemperatur wurde ein Acetat-Puffer mit pH 6,5 (100 mM Natriumacetat, 10 mM CaCl_2 , 50 mM NaCl_2) eingesetzt, da dieses Puffersystem eine sehr niedrige Temperaturabhängigkeit aufweist. Die Einstellung der

unterschiedlichen Temperaturen erfolgte über einen Thermocycler mit Temperaturgradient-Funktion: 25-55 °C für hh-Arf51A, 30-60 °C für hh-Xyn10B, hh-Xyn11F, hh-Arf43C und hh-Xyl43A, 45-75 °C für hh-Xyn10A, hh-Xyn10B, hh-Xyn10C, hh-Xyn10D, hh-Xyn11E, hh-Xyn11F und hh-Arf51B und 50-80 °C für hh-Xyl43A. Eine genauere Erklärung zur Nomenklatur der eingesetzten Enzyme ist in Kapitel 3.1.2 und in Tabelle 23 und 26 gegeben.

Die Bestimmung der Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert wurde mit unterschiedlichen Puffern durchgeführt, welche die pH-Werte von 4,0 bis 8,0 in 0,5er-Intervallen abdeckten (siehe Tab. 15). Als Reaktionstemperatur wurde das vorher ermittelte Temperaturoptimum gewählt.

Tab. 15 Puffer für die Ermittlung der pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität

Acetat-Puffer	MOPS-Puffer	pH-Wert	Phosphat-Puffer		
100 mM Acetat, 5 mM CaCl ₂ , 50 mM NaCl		4,0	51 mM Citronensäure	35 mM Na ₂ HPO ₄	50 mM NaCl
		4,5	51,5 mM Citronensäure	45 mM Na ₂ HPO ₄	50 mM NaCl
		5,0	50 mM Citronensäure	58 mM Na ₂ HPO ₄	50 mM NaCl
		5,5	33 mM Citronensäure	50 mM Na ₂ HPO ₄	50 mM NaCl
		6,0	25 mM Citronensäure	52 mM Na ₂ HPO ₄	50 mM NaCl
	100 mM MOPS, 5 mM CaCl ₂ , 50 mM NaCl	6,0	15 mM Citronensäure	50 mM Na ₂ HPO ₄	50 mM NaCl
		6,5	7 mM Citronensäure	50 mM Na ₂ HPO ₄	50 mM NaCl
		7,0	2,5 mM Citronensäure	50 mM Na ₂ HPO ₄	50 mM NaCl
		7,5	0,85 mM Citronensäure	65 mM Na ₂ HPO ₄	50 mM NaCl
		8,0	0,51 mM Citronensäure	35 mM Na ₂ HPO ₄	50 mM NaCl

Konzentrationsangaben sind als 1x-Konzentrationen nach der Verdünnung aus den jeweiligen Stammlösungen angegeben. Die Herstellung des Acetat- und MOPS-Puffers (10x Stammlösungen) erfolgte durch Erstellen einer 100 mM Acetat bzw. MOPS Lösung und Einstellung des pH-Werts über Zugabe von 37% HCl und 10 M NaOH. Die Herstellung des Phosphat-Puffers (5x Stammlösung) erfolgte durch die Mischung von 250 mM Citronensäure, 500 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) und ddH₂O.

2.3.5 Enzymatischer Abbau von Oligosacchariden

Durch selektiven Verdau kommerziell erhältlicher Oligosaccharide mit bekannter Struktur (siehe Tab. 9) wurde das hydrolytische Schnittmuster und die Substraterkennung von Enzymen ermittelt. Die hierbei entstehenden Produkte wurden anschließend über HPAEC-PAD analysiert und auf Basis der Hydrolyseprodukte wurden Rückschlüsse auf die enzymatische Aktivität geschlossen.

Bei allen Experimenten wurden, falls bekannt, die optimalen Reaktionsbedingungen bezüglich Puffer und Temperatur des jeweiligen Enzyms gewählt. Bei unbekannt optimalen Reaktionsbedingungen wurde ein MOPS-Puffer (10 mM MOPS, 1 mM CaCl₂ und 5 mM NaCl) eingesetzt und eine Reaktionstemperatur von 60 °C ausgewählt. Wenn nicht anders angegeben, wurde bei allen Hydrolyseansätzen bei einem Gesamtvolumen von 500 µL, 10 mg/L Oligosaccharid bzw. 20 mg/L eines Oligosaccharidgemischs sowie 2 mg/L Enzym eingesetzt. Alle Reaktionsansätze wurden über Nacht inkubiert.

Zur Produktanalyse wurden 450 μL des Reaktionsansatzes entnommen, mit 50 μL 20 mg/L D-Mannitol versetzt und über HPAEC-PAD analysiert (siehe Kapitel 2.4.4). Die Identifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten der Reaktionsprodukte mit kommerziell erhältlichen Reinsubstanzen als Standards.

2.4 Zuckeranalytik

2.4.1 DNSA-Assay

Zur Ermittlung der Aktivität von Enzymen auf Polysaccharide als Substrat wurde der DNSA-Assay verwendet (Miller, 1959; Wood und Bhat, 1988). Beim DNSA-Assay wird die namensgebende 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNSA) durch reduzierende Substanzen, wie z. B. Aldehydgruppen von reduzierenden Zuckern, zu 3-Amino-5-Nitrosalicylsäure reduziert. Diese Reaktion geht mit einem Wechsel im Absorptionsspektrum der Nitrosalicylsäure einher, welches sich durch einen Farbwechsel der Lösung von orangegelb zu rotbraun äußert. Dieser Farbwechsel wird photometrisch bei 540 nm gemessen und ist proportional zur freigesetzten Menge an reduzierenden Enden bei der Hydrolyse von Polysacchariden. Die Herstellung der DNSA-Lösung ist in Tabelle 7 beschrieben.

Für die Durchführung des DNSA-Assays in Mikrotiterplatten wurden 75 μL der DNSA-Lösung zu 50 μL des Reaktionsansatzes gegeben, der Ansatz für 5 min auf 95 °C im Thermocycler erhitzt und anschließend nach einer Überführung in eine „flat bottom“ Mikrotiterplatte im Photometer Sunrise™ von Tecan (Männedorf, Schweiz) bei 540 nm gemessen. Die Durchführung in 1,5 mL Mikroreaktionsgefäßen verlief analog: Hierfür wurden 500 μL Reaktionsansatz zu 750 μL DNSA-Lösung in ein Mikroreaktionsgefäß mit verschraubbarem Deckel gegeben, der Ansatz für 5 min im Wasserbad auf 95 °C erhitzt und anschließend im Photometer UltraSpec PLUS von Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden) bei 540 nm vermessen.

Die Quantifizierung der freigesetzten Menge an reduzierenden Zuckerenden erfolgte über einen Vergleich zu einer Kalibriergeraden basierend auf 50-1600 ng/ μL Glucose. Die Berechnung der enzymatischen Aktivität lautete wie folgt:

$$\text{Aktivität } [U] = \frac{n_{\text{Glucose}} [\mu\text{mol}]}{t [\text{min}]} \quad (\text{Gleichung 5})$$

$$\begin{aligned} \text{Spezifische Aktivität } \left[\frac{U}{\text{mg}} \right] &= \frac{n_{\text{Glucose}} [\mu\text{mol}]}{t [\text{min}] * m_{\text{Protein}} [\text{mg}]} && (\text{Gleichung 6}) \\ &= \frac{n_{\text{Glucose}} [\mu\text{mol}] * 1000}{t [\text{min}] * c_{\text{Protein}} \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right] * V_{\text{Reaktion}} [\mu\text{L}]} \end{aligned}$$

$$\text{Spezifische Aktivität} \left[\frac{U}{\mu\text{mol}} \right] = \frac{n_{\text{Glucose}} [\mu\text{mol}] * MW_{\text{Protein}} \left[\frac{g}{\text{mol}} \right]}{t [\text{min}] * m_{\text{Protein}} [\text{mg}]} \quad (\text{Gleichung 7})$$

n_{Glucose} = freigesetzte Menge an reduzierenden Zuckeren als Glucose-Äquivalente angegeben [μmol]

t = Reaktionszeit, 60 min

$$\text{Aktivität [U]} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$$

$$\text{Spezifische Aktivität} \left[\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{mg}} \right]$$

$$\text{Spezifische Aktivität} \left[\frac{U}{\mu\text{mol}} = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \mu\text{mol}} \right]$$

m_{Protein} = Gesamtmenge des Proteins im Reaktionsansatz [μg]

V_{Reaktion} = Volumen des Reaktionsansatzes [μL]

c_{Protein} = Konzentration des Proteins im Reaktionsansatz [$\text{ng}/\mu\text{L}$]

MW_{Protein} = Molekulargewicht des Proteins [g/mol]

2.4.2 Dünnschichtchromatographie

Zur qualitativen Analyse von enzymatischen Polysaccharidhydrolysaten wurde Dünnschichtchromatographie (DC) eingesetzt. Für die Dünnschichtchromatographie wurden die Kieselgelplatten „TLC Silica Gel 60“ von Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland) als stationäre Phase verwendet. Als mobile Phase diente, je nach Zielsetzung, entweder ein Gemisch von Acetonitril und ddH₂O im Verhältnis 8:2 v/v für die Untersuchung von Arabinoxylanhydrolysaten oder ein Gemisch von Butanol, Ethanol und ddH₂O im Verhältnis von 5:5:4 v/v/v für die Untersuchung von Glucomannanhydrolysaten.

Zum Nachweis der Hydrolyseprodukte wurde zu 10 mL einer Anilin-basierten Färbelösung (siehe Tab. 7) 1 mL 85% w/v *ortho*-Phosphorsäure gegeben und, entweder mit einem Reagenzglaszerstäuber mit Venturidüse oder mit dem automatischen Sprühgerät „Desaga ChromaJet DS 20“ von Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland), gleichmäßig auf die DC-Platten aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte durch Erhitzung der Platten auf 120 °C für 15-20 min im Trockenschrank. Anschließend wurden die Platten mittels des Scanners „TMA 1000 XL Scan Maker“ von Microtek (Singapur) eingescannt. Je nach Bedarf wurden die Helligkeit und der Kontrast der Bilder mit dem Programm Photoshop CS 2 angepasst und mit dem Programm CP Atlas 2.0 weiterführend analysiert.

Die qualitative Identifizierung der Hydrolyseprodukte erfolgte durch Vergleich der Migrationsdistanz bzw. der Retentionsfaktoren (R_f -Wert) der Analyten zu kommerziell erhältlichen

Substanzen, welche als Vergleichsstandards an den Rändern der DC-Platten mitgeführt wurden. Die übliche Auftragsmenge an Hydrolysat betrug 4,5 μL für alle Proben, welche in jeweils drei Intervallen mit jeweils 1,5 μL mit der Pipette auf eine DC-Platte aufgetragen wurden. Die Auftragsmenge der Standards für die Dünnschichtchromatographie betrug 1 μg , was in der Durchführung 1 μL einer 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Lösung entsprach.

Präparative Dünnschichtchromatographie

Neben der analytischen Dünnschichtchromatographie wurde in dieser Arbeit zusätzlich eine präparative Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Die Durchführung war analog zu der analytischen Dünnschichtchromatographie, mit dem Unterschied, dass nicht die gesamte DC-Platte, sondern nur bestimmte Bereiche nach der Chromatographie gefärbt wurden (vgl. Abb. 6) und insgesamt ein erheblich höheres Probenvolumen aufgetragen wurde. Wieviel Probe aufgetragen werden konnte, bevor es zu Schmiereffekten bei der chromatographischen Trennung käme, wurde durch eine vorherige analytische Dünnschichtchromatographie bestimmt. Üblicherweise betrug das Auftragsvolumen für die präparative Auftrennung eines Arabinoxylanhydrolyсата etwa 8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ und für die Auftrennung eines Glucomannanhydrolyсата etwa 10 $\mu\text{L}/\text{cm}$.

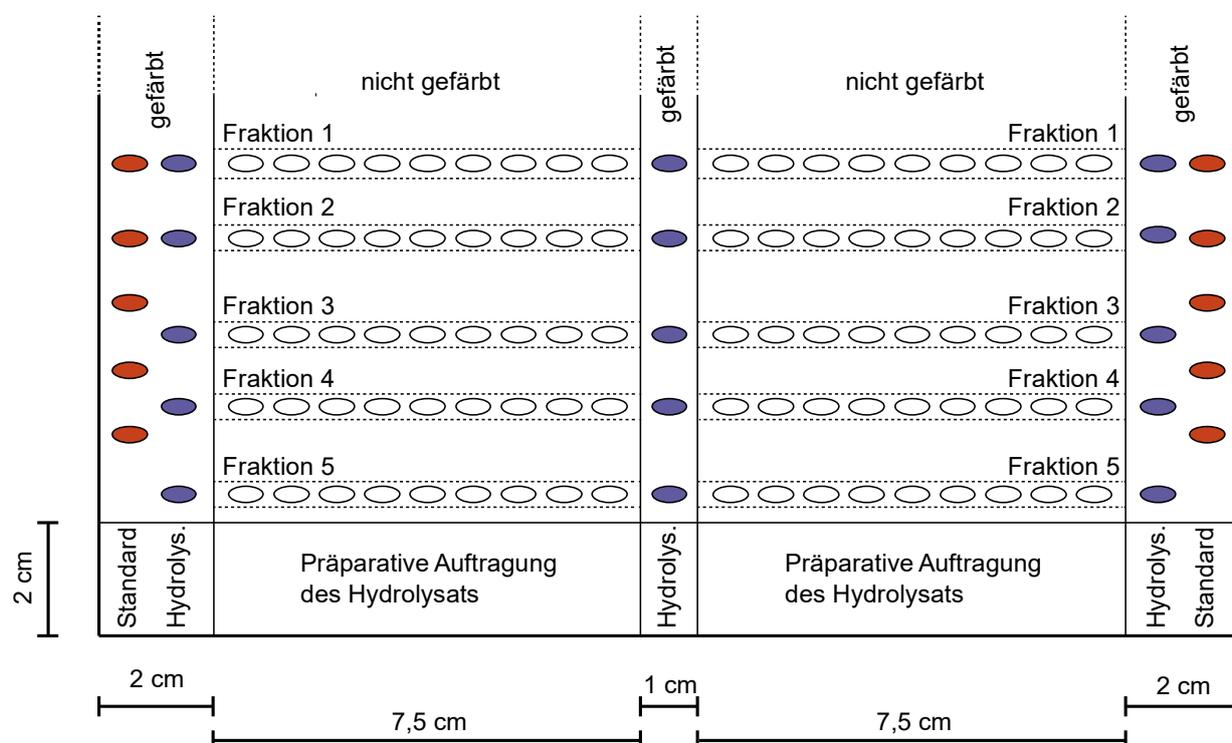


Abb. 6 Aufbau einer präparativen Dünnschichtchromatographie

Die zwei äußeren und der mittlere Streifen wurden von der DC-Platte getrennt und separat gefärbt. Anschließend wurde die DC-Platte wieder zusammengesetzt und die Bereiche der DC-Platte mit aufzureinigenden Substanzen, hier als Fraktionen angegeben, markiert. Hydrolys. = Hydrolysat.

Durch die gefärbten Bereiche konnte die Migrationsdistanz der noch ungefärbten, aber getrennten Analyte geschätzt werden. Die Analyten wurden anschließend je nach Trennung in Fraktionen aufgeteilt, das Silica-Gel mit einem Spatel abgekratzt und in 750 μL ddH₂O suspendiert. Nach einer Inkubation der Suspensionen für 3 h bei 40 °C, wurden die Ansätze zentrifugiert (16200 \times g, 5 min), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und im Exsikkator getrocknet. Nach der Trocknung wurde das jeweilige Pellet in ein definiertes Volumen ddH₂O aufgenommen und über analytische Dünnschichtchromatographie die Trennung überprüft. Mit dieser Methode gereinigte Substanzen konnten unverdünnt in mittels MALDI-TOF-Analyse oder nach einer 1:10 Verdünnung direkt mittels HPAEC-PAD analysiert werden.

2.4.3 HPLC und SEC

Generelle Informationen zum verwendeten Chromatographiesystem

Sowohl HPLC als auch SEC wurden mit der HPLC-Anlage AZURA von Knauer (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Das Chromatographiesystem enthielt ein Pumpen-, Misch- und Entgasungssystem, einen Autosampler Optimas von Spark Holland B.V. (Emmen, Niederlande), RI-Detektor RefractoMax520 von ERC GmbH (Riemerling, Deutschland), Säulenthermostat Azura CT 2.1 und einen Fraktionssammler Foxy R1 von Knauer. Durch die Wahl des RI-Detektors bestimmt sich auch der Messbereich für die Quantifizierung von Zuckern: Dieser betrug für die durchgeführte Analyse von Monosacchariden, Oligosacchariden, Alkoholen und kurzen Säuren mittels H-, Pb- und Na-Säule etwa 2-50 μg , was einer Injektion von 2-50 μL einer 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Standardlösung entspricht. Bei der Analyse von Oligosacchariden mittels Na- oder SEC-Säule wurde für die Standardlösungen üblicherweise eine Injektionsmenge von 10 μg (20 μL einer 0,5 g/L Lösung) eingesetzt. Bei dem hier beschriebenen analytischen Einsatz der HPLC wurde eine 100 μL Probenschleife eingesetzt.

Je nach analytischer Fragestellung wurden unterschiedliche chromatographische Säulen, Thermostatttemperaturen, Laufmittel und Flussgeschwindigkeiten verwendet. So wurden Monosaccharide, kurze Säuren und Alkohole vorwiegend mit einer H-Säule oder Pb-Säule analysiert. Zur Trennung von Oligosacchariden wurden hingegen eine Na-Säule oder ein System mit SEC-Säulen gewählt. Bei der Verwendung von SEC-Säulen wurde auf die Verwendung eines Säulenthermostats verzichtet und die Säulen bei Raumtemperatur eingesetzt. Details für die Betriebsbedingungen und Messmethoden sind in Tabelle 16 angegeben.

Tab. 16 Betriebsbedingungen für HPLC-Analyse

	H-Säule	Na-Säule	Pb-Säule	SEC
Verwendete Säulen	Eurokat® H ⁺ Partikel: 10 µm VS: 8 x 30 mm HS: 8 x 300 mm	Eurokat® Na ⁺ Partikel: 10 µm VS: 8 x 30 mm HS: 8 x 300 mm	Rezex™ RPM-Monosaccharide Pb+2 (8%), LC Column 100 x 7,8 mm	Superdex™ Peptide 10/300 GL Superdex™ 75 10/300 GL
Hersteller	Knauer (Berlin, Deutschland)		Phenomenex (Torrance, USA)	GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, UK)
Thermostat-Temperatur	60 °C	60 °C	80 °C	Raumtemperatur
Laufmittel	5 mM H ₂ SO ₄ *,**	ddH ₂ O*	ddH ₂ O*	ddH ₂ O
Flussgeschwindigkeit	0,8 mL/min	0,5 mL/min	0,6 mL/min	0,4 mL/min
Laufzeit	30 min	30 min	30 min	
Reinigung und Regeneration	Über Nacht 0,2 mL/min Umkehrfluss mit Laufmittel bei 60 °C, 1 h 0,2 mL/min Normalfluss mit Laufmittel bei 75 °C, 30 min 0,2 mL/min 10% Acetonitril-Laufmittel, 5 h Regenerationslösung		-	60 min 0,4 ml/min 1 M NaOH; 30 min 0,4 mL/min ddH ₂ O, 60 min 1 M HCl, 60 min mit 1 M ddH ₂ O
Regenerationslösung	25 mM H ₂ SO ₄ **	25 mM NaCl	-	-

VS: Vorsäule, HS: Hauptsäule. * Das Laufmittel musste vor der Benutzung entgast werden. ** Herstellung erfolgte durch Verdünnung aus 1 M H₂SO₄ Maßlösung.

Alle über Chromatographie zu analysierenden Proben haben gemein, dass diese partikelfrei sein müssen. Je nach verwendetem Substrat war es daher notwendig, die Probe vor der Messung zu zentrifugieren oder mit einem 0,4 µm Filter zu filtrieren. Zusätzlich musste bei der Verwendung der Pb- und Na-Säule darauf geachtet werden, dass die zu messenden Proben frei von Anionen waren, die die Blei- bzw. Natrium-Ionen komplexieren und von der Säule lösen oder diese gar, durch die irreversible Bildung eines wasserunlöslichen Salzes, verstopfen und somit langfristig zerstören. Mit steigender Anzahl gemessener Proben setzten sich verschiedene Substanzen auf der jeweiligen Chromatographiesäule ab, was durch ein Ansteigen des Betriebsdrucks verfolgt werden konnte. Zur Regeneration der Chromatographiesäulen mussten diese in regelmäßigen Abständen mit einem individuellen Reinigungsprotokoll gereinigt und regeneriert werden (für Details, siehe Tab. 16).

2.4.4 HPAEC-PAD

Technischer Aufbau und Gradientenprofil für die Analyse mittels HPAEC-PAD

Die detaillierte Produktanalyse von Poly- und Oligosaccharidhydrolysaten wurde mittels HPAEC-PAD mithilfe einer ICS3000 Chromatographieanlage von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) durchgeführt. Als Chromatographiesäulen wurde eine CarboPac™ PA1 Vorsäule (4 x 50 mm) und Hauptsäule (4 x 250 mm) eingesetzt, welche für die Trennung auf 30 °C temperiert wurde.

Die für die Chromatographie verwendeten Laufmittel wurden wie in Tabelle 17 beschrieben hergestellt. Die verschiedenen angewendeten Eluentengradienten-Profile für die Trennung der Zucker (0-67,5 min), der Regeneration (67,5 -73,5 min) und Reequilibrierung der Chromatographiesäule (73,5-87,5 min) sind Tabelle 18 zu entnehmen.

Tab. 17 Eluente für HPAEC-PAD-Analyse

	Eluent A	Eluent B	Eluent C	Eluent D
	Konzentrationen			
NaOH	100 mM	100 mM	100 mM	500 mM
NaAcetat	0 mM	150 mM	1000 mM	0 mM
	Herstellung			
50% NaOH	20,80 mL	8,84 mL	10,40 mL	52,00 mL
Natriumacetat-Wasserfrei	-		164,06 g	
Eluent C	-	150 mL	-	
ddH ₂ O	ad 4000 mL	ad 2000 mL	ad 2000 mL	ad 2000 mL

Tab. 18 Eluentengradienten-Profile für HPAEC-PAD-Analyse

Phase	Gradientprofil A	Gradientprofil B
Probeninjektion -2,3-0 min		100 mM NaOH 0-7,5 mM NaAcetat (100-95,0% Eluent A) (0-5,0% Eluent B)
Analyttrennung* 0-67,5 min		100 mM NaOH 7,5-100 mM NaAcetat (95-33,3% Eluent A) (5-66,7% Eluent B)
Waschen 67,500-67,501 min		100 mM NaOH 100-0 mM NaAcetat (33,3-100% Eluent A) (66,7-0% Eluent B)
67,501-69,0 min	100 mM NaOH 0-650 mM NaAcetat (100-35% Eluent A) (0-65% Eluent C)	100-210 mM NaOH 0-500 mM NaAcetat (100-10% Eluent A) (0-50% Eluent C) (0-40% Eluent D)
69,0-73,0 min	100 mM NaOH 650 mM NaAcetat (35% Eluent A) (65% Eluent C)	210 mM NaOH 500 mM NaAcetat (10% Eluent A) (50% Eluent C) (40% Eluent D)
73,0-73,5 min	100 mM NaOH 650-0 mM NaAcetat (65-0% Eluent C) (35-100% Eluent A)	210-100 mM NaOH 500-0 mM NaAcetat (10-100% Eluent A) (50-0% Eluent C) (40-0% Eluent D)
Regenerieren 73,5 min-87,5 min		100 mM NaOH (100% Eluent A)

In allen Phasen beträgt die Flussgeschwindigkeit 1,0 mL/min. Alle angegebenen Gradienten sind linear. Bei konstant gehaltener Steigung des Natriumacetat-Gradienten (1,3711 mM/min) kann die Analyttrennungsphase verkürzt werden, ohne dass die Retentionszeiten von Analyten sich verändern. Dies wurde bei der Analyse von Proben eingesetzt, welche nur Analyten mit entsprechend kurzer Retentionszeit enthalten, wie z. B. dem gezielten Verdau von Oligosacchariden.

Alle HPAEC-PAD-Chromatogramme dieser Arbeit wurden mit Eluentengradientprofil A oder B bei einem Fluss von 1 mL/min gemessen. Beide Gradientprofile verwenden denselben linearen Natriumacetat-Gradienten für die Analyttrennung und unterscheiden sich lediglich im Waschschrift. Hierdurch weisen sie eine identische Analyttrennung auf und werden im Rahmen dieser Arbeit nicht unterschieden. Das Injektionsvolumen aller gemessenen Proben und Standards betrug 25 µL. Teilweise war es notwendig, die Probenschleife zwischen einzelnen Messungen mit sog. Spülproben zu reinigen, um einen Übertrag von Proben zwischen einzelnen Messungen zu verhindern.

Probenvorbereitung

Wenn nicht anders angegeben, wurden für eine Messung mittels HPAEC-PAD alle Polysaccharid-Hydrolysate auf eine Konzentration von 500 µg/mL für Xylan-basierte Substrate und 125 µg/mL für Glucomannan verdünnt. Dies entsprach in den meisten Fällen einer 1:10-Verdünnung der Reaktionsansätze mit ddH₂O. Zusätzlich wurde der Mehrheit der Proben D-Mannitol als interner Standard zur Kontrolle des Detektorsignals hinzugefügt (finale Konzentration 2 mg/L). Hydrolysate gereinigter Oligosaccharide wurden vor der Analyse mittels HPAEC-PAD, abgesehen von der Zugabe des internen Standards, nicht weiter verdünnt. Als Kontrolle für die Stabilität des Detektorsignals als auch für eine Überprüfung der Konstanz der Retentionszeit wurden in regelmäßigen Abständen sog. Checkstandards gemessen (9 mg/mL Glucuronsäure, 2 mg/L D-Mannitol). Das Pipettierschema für die standardmäßige Probenvorbereitung von verdautem Poly- und Oligosaccharid als auch Checkstandards ist in Tabelle 19 angegeben.

Tab. 19 Probenvorbereitung für Analyse mittels HPAEC-PAD

	Verdautes Polysaccharid		Verdauter Oligosaccharid	Checkstandard
Probenvolumen	50 µL	50 µL	450 µL	450 µL 10 mg/L Glucuronsäure
D-Mannitol (20 mg/L)	50 µL	0 µL	50 µL	50 µL
ddH ₂ O	400 µL	450 µL	-	-
Gesamtvolumen	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

Qualitative und quantitative Mono- und Oligosaccharidbestimmung

Die qualitative und quantitative Bestimmung von Mono- und Oligosacchariden erfolgte über einen Vergleich mit käuflich erwerblichen Oligosacchariden. Je nach erwartetem Produktmuster wurden hierzu verschiedene Mischungen an Mono- und Oligosacchariden angesetzt. Wenn nicht anders angegeben wurden Stammlösungen (siehe Tab. 20) für eine qualitative Analyse 1:10 mit ddH₂O zu Standardmischungen verdünnt und gleichzeitig mit internem Standard (Stockkonzentration: 20 mg/L, finale Konzentration 2 mg/L) versetzt.

Tab. 20 Stammlösungen für Standardmischungen für qualitative und quantitative Mono- und Oligosaccharidbestimmungen via HPAEC-PAD

Arabinoxyloligosaccharid-Standards (AXOS)		Mannooligosaccharid-Standards (MOS)		Cellooligosaccharid-Standards (COS)	
Name	Konz.	Name	Konz.	Name	Konz.
Xylose	20 mg/L	Mannose	20 mg/L	Glucose	20 mg/L
Arabinose	20 mg/L	M ₂	100 mg/L	C ₂	100 mg/L
X ₂	100 mg/L	M ₃	100 mg/L	C ₃	100 mg/L
X ₃	100 mg/L	M ₄	100 mg/L	C ₄	100 mg/L
X ₄	100 mg/L	M ₅	100 mg/L	C ₅	100 mg/L
X ₅	100 mg/L	M ₆	100 mg/L	C ₆	100 mg/L
A ³ X	100 mg/L	Glucomannooligosaccharid-Standards (GMOS)		Laminarioligosaccharid-Standards (LOS)	
A ² XX	100 mg/L	Name	Konz.	Name	Konz.
A ²⁺³ XX	100 mg/L	Glucose	20 mg/L	Glucose	20 mg/L
XA ² XX/XA ³ XX	200 mg/L	Mannose	20 mg/L	L ₂	100 mg/L
XA ²⁺³ XX	100 mg/L	GMM/GGM	200 mg/L	L ₃	100 mg/L
		GM/M ₂	200 mg/L	L ₄	100 mg/L
				L ₅	100 mg/L

Die hier angegebenen Stammlösungen der verschiedenen Standardmischungen wurden aus Stammlösungen der einzelnen Analyte erstellt (Analytstammlösungen). Für die Konzentration der Analytstammlösungen wurde der Einwaage entsprechend für alle Monosaccharide 2 g/L und für alle Oligosaccharide 10 g/L angenommen. Für die Bestimmung der tatsächlichen Analytkonzentrationen in den Analytstammlösungen wurde zusätzlich ein enzymatischer Verdau der Analyte einschließlich einer Quantifizierung der gebildeten Monosaccharide durchgeführt. Die hieraus abgeleiteten tatsächlichen Analytkonzentrationen der Oligosaccharidmischungen sind im Anhang in Tabelle A1 angegeben und bilden die Grundlage aller quantitativen Bestimmungen.

Für eine quantitative Bestimmung wurde aus der jeweiligen Stammlösung eine Verdünnungsreihe erstellt. Zusätzlich wurde über den Verlauf der zu analysierenden Messsequenz in regelmäßigen Abständen eine Standardmischung gemessen, um den Abfall des Detektorsignals für einzelne Analyten nachzuverfolgen. Für die Quantifizierung wurde eine lineare Kalibrationsgerade herangezogen.

Wurde über den Verlauf der Messsequenz ein Abfall des Detektorsignals für einzelne Analyten festgestellt, wurde der Abfall durch Verwendung eines exponentiellen Zerfalls erster Ordnung beschrieben und für die Quantifizierung berücksichtigt. Eine genaue Erklärung der hierfür notwendigen Berechnungen findet sich in Kapitel 3.2.3.

2.4.5 MALDI-TOF

Eine massenspektrometrische Analyse von Oligosacchariden und Oligosaccharidgemischen erfolgte mithilfe einer MALDI-TOF/TOF UltrafleXtreme Anlage der Bruker Corporation (Billerica, USA) des Bayerischen Zentrums für Biomolekulare Massenspektrometrie des Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt.

Für eine Messung wurden 0,5 µL unverdünnte Probe zu 0,5 µL Matrixlösung (20 mg/L 2,5-Dihydroxy-benzoesäure, 78 % v/v Acetonitril, 22 % v/v ddH₂O, 0,1 % v/v Ameisensäure) auf einer 394er Target plate (Bruker, Billerica, USA) pipettiert, gemischt und luftgetrocknet.

Die für die massenspektrometrische Analyse notwendige Kalibrierung erfolgte über einen PAS R36mer Kalibrierstandard mit einem Massenbereich von 759 bis 3140 Da (Maier et al., 2014). Die Unterdrückungsgrenze für die Ionenerkennung wurde auf 260 Da eingestellt. Der Detektionsbereich betrug 260 Da bis 4500 Da. Die Laserenergie wurde zwischen 20 und 60% der maximalen Leistung variiert, mit dem Ziel, für jede Messung das beste Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Wenn nicht anders angegeben besteht eine Messung aus einer Aufsummierung von 100 Einzelmessungen im Teilabtastrmodus. Zur Erhöhung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses wurden für die Ermittlung eines Massenspektrums 5 bis 10 Messungen aufsummiert.

2.5 Semipräparative Herstellung und Aufreinigung von Oligosacchariden

2.5.1 Proteinherstellung im 10 L-Fermenter

Für die Herstellung von GMOS aus Glucomannan im Liter-Maßstab war eine Enzymherstellung im Schüttelkolbenmaßstab nicht ausreichend. Daher wurde für das Enzym ct-Cel9/44J eine Proteinproduktion im 8 L Maßstab per Zulaufverfahren mit *E. coli* als Expressionswirt und pET24c als Expressionsvektor durchgeführt.

Als erste Vorkultur wurden 15 mL LB-Medium mit 50 mg/L Kanamycin einer Einzelkolonie beimpft und für 8 h bei 37 °C und 138 rpm inkubiert. Die erste Vorkultur wurde anschließend in 500 mL Riesenbergmedium mit 50 mg/L Kanamycin überführt und für 18 h bei 30 °C und 138 rpm im 5 L Erlenmeyerkolben mit Schikanen geschüttelt. Durch Zugabe dieser zweiten Vorkultur zu 6 L Riesenbergmedium, ebenfalls mit 50 mg/L Kanamycin versetzt, in einem Biostat B-MO Single Rührkesselreaktor mit einem Maximalvolumen von 10 L von der Sartorius AG (Göttingen, Deutschland) wurde schließlich eine Satzfermentation gestartet. Nach Verbrauch der initialen Kohlenstoffquelle (6 h) wurde die Fermentation auf ein Zulaufverfahren mit Glycerin umgestellt. Die Expression wurde durch Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glycerin auf Lactose gestartet (siehe Abb. 7). Die Zellernte erfolgte nach weiteren 15,5 h Stunden, was einer Gesamtfermentationszeit von 48 h entspricht. Nach der Zellernte über Zentrifugation ($3450 \times g$, 4 °C) wurde das Zellpellet bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

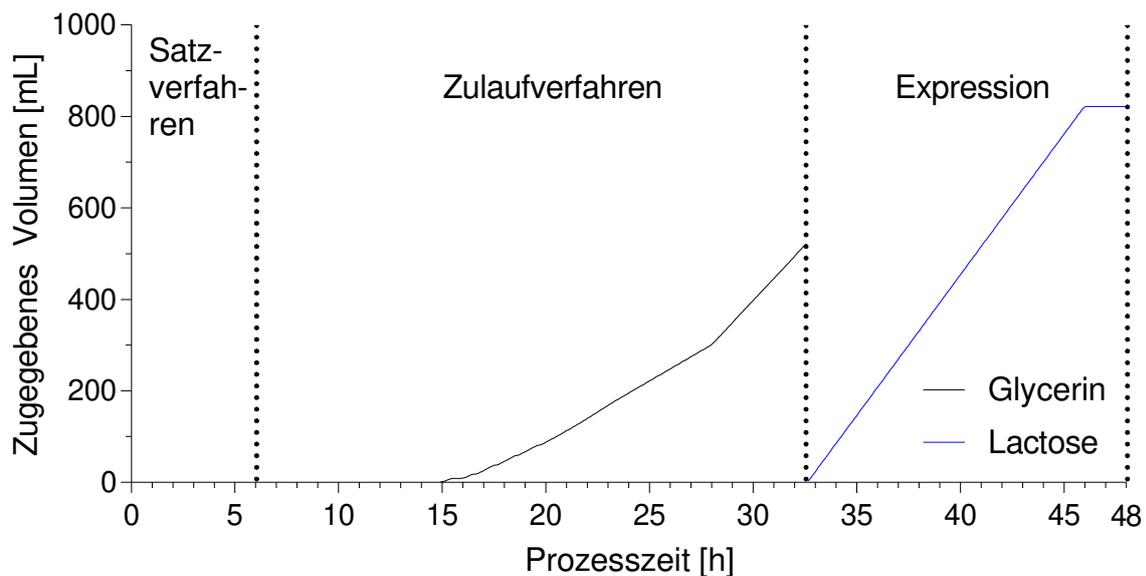


Abb. 7 Profil für Glycerin- und Lactose-Zulauf für die Proteinherstellung im 10 L-Fermenter.
Insgesamt eingesetztes Volumen an Glycerin- und Lactose-Stammlösung waren 522 und 821 mL.

Während der gesamten Fermentation wurde die Temperatur bei 30 °C und der pH-Wert des Mediums über die Zugabe von 25 % v/v Ammoniakwasser als Base bzw. 25 % v/v *ortho*-Phosphorsäure als Säure automatisch reguliert und bei pH 6,7 gehalten. Die Regulation des Energie- und Sauerstoffeintrags erfolgte ebenfalls automatisiert mit dem Ziel, ein optimales Wachstum der Bakterien zu gewährleisten, welches photometrisch bei 600 nm (OD_{600}) verfolgt wurde. Zu starke Schaumbildung wurde bei Bedarf durch die Zugabe von Antischaum reduziert.

Der Aufschluss des Zellpellets zur Freisetzung des Zielproteins erfolgte in Aliquots à 30 g. Hierfür wurde das Zellpellet in 300 mL Lysepuffer resuspendiert, mit 3 mL 100 mg/mL Lysozym und 3 Tabletten Proteaseinhibitor versetzt, im Ultraschallbad aufgeschlossen (4x 15 min mit 2 min Pause dazwischen), und das Zellextrakt mit dem Zielprotein über Zentrifugation (60 min, $38500 \times g$) von den Zelltrümmern getrennt. Je nach Reinheitsanspruch des Polysaccharidhydrolysats konnte das Zellextrakt direkt für die Polysaccharidhydrolyse eingesetzt werden oder wurde wie in Kapitel 2.2.4 und 2.2.5 beschrieben einer weiteren chromatographischen Aufreinigung unterzogen.

2.5.2 Semipräparative Oligosaccharidherstellung

Die semipräparative Oligosaccharidherstellung verlief prinzipiell analog zum in Kapitel 2.3.1 beschriebenen enzymatischen Verdau von Polysacchariden. So wurden auch bei der semipräparativen Herstellung neben dem Polysaccharid und Enzym Pufferkomponenten eingesetzt.

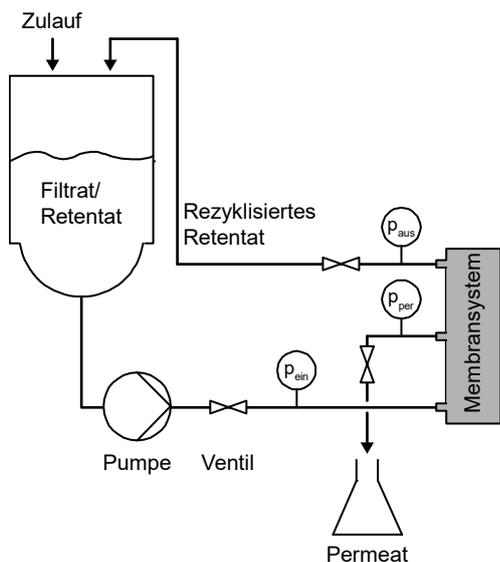
Für die semipräparative AXOS-Herstellung wurde eine Arabinoxylan-Präparation der Firma ASA Spezialenzyme (Wolfenbüttel, Deutschland) und für die GMOS-Herstellung eine Glucosamannan-Präparation von Golden Peanut (Garstedt, Deutschland) verwendet. Die eingesetzte Substratkonzentration betrug je nach Experiment bis zu 1% w/v für die XOS/AXOS- und GMOS-Herstellung. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen analytischen Hydrolysen wurden die Substratlösungen für die präparative Hydrolyse direkt vor der Hydrolyse hergestellt. Hierfür wurde das Polysaccharidpulver zunächst mit wenigen Millilitern absoluten Ethanol versetzt, unter starkem Rühren mit auf 60 °C temperiertem ddH₂O bzw. Reaktionspuffer bis zur gewünschten Konzentration aufgefüllt und zur Verbesserung der Lösung auf etwa 60 °C erhitzt. Da die hergestellten Oligosaccharide für präbiotische Tests eingesetzt werden sollten, wurde bei der Herstellung der Oligosaccharide auf eine Zugabe von Natriumazid als Stabilisator verzichtet. Stattdessen wurde das gelöste Substrat autoklaviert und für die Hydrolyse zugesetztes Enzym sterilfiltriert.

Der Verlauf der Hydrolyse, welche im Erlenmeyerkolben bei 60 °C und 100 rpm stattfand, wurde über Dünnschichtchromatographie qualitativ verfolgt. Nach Ende der Hydrolyse, je nach Experiment nach etwa 18-48 h, wurde der Ansatz für 10 min bei 95 °C Hitze-inaktiviert, nach Abkühlung auf Raumtemperatur für 20 min bei 4 890 × g zentrifugiert und das Pellet verworfen.

2.5.3 Querstromfiltration

Zur Abtrennung von nicht-verdautem Polysaccharid und weiteren makromolekularen Bestandteilen im Polysaccharidhydrolysat wurde Querstromfiltration mit einer Ausschlussgrenze der Molekülgröße (engl.: *molecular weight cut-off*, MWCO) über 10 kDa eingesetzt. Der genaue Aufbau der Querstromfiltrationsanlage als auch die Anwendung in der Oligosaccharidaufreinigung ist in Abbildung 8 dargestellt. Beim Betrieb der Querstromfiltrationsanlage wurde darauf geachtet, dass der Transmembrandruck (TMP), welcher sich als Durchschnitt des Drucks vor (p_{ein}) und nach der Membran (p_{aus}) berechnet, 1,8 bar nicht übersteigt. Dies konnte durch Einstellung unterschiedlicher Werte für p_{ein} und p_{aus} mit Hilfe einer Schlauchklemme an den in Abbildung 8 eingezeichneten Ventilpositionen als auch durch Variation der Pumpeinstellung erreicht werden.

A) Aufbau Querstromfiltration



B) Prozess für Oligoaufreinigung

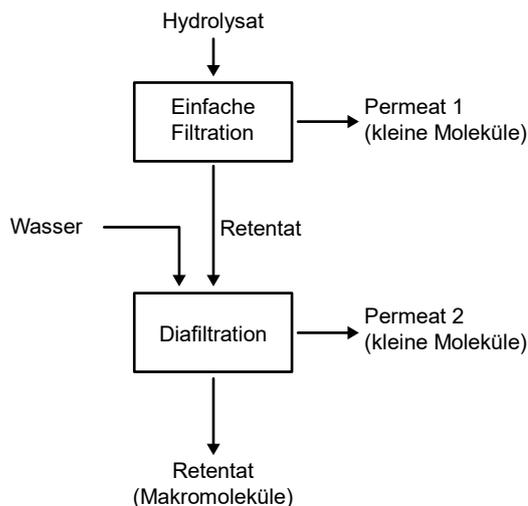


Abb. 8 Querstromfiltration für die Oligosaccharidaufreinigung

(A) zeigt den Aufbau der für die Oligosaccharidaufreinigung eingesetzten Querstromfiltrationsanlage. Von den drei angezeigten Positionen für Ventile konnte jeweils nur eine Position gleichzeitig über eine Schlauchklemme eingestellt werden. Je nach Filtrationsprozess, einfacher Filtration oder Diafiltration, konnte eine unterschiedliche Lösung, wie z. B. mehr zu filtrierende Lösung, einen auszutauschenden Puffer oder ddH₂O, als Zulauf eingesetzt werden (B) zeigt das zweistufige Vorgehen zur Trennung der Makromoleküle, wie z. B. Polysaccharide, von den Oligosacchariden. Eine genauere Erklärung des zweistufigen Verfahrens ist im Text gegeben.

Der erste Schritt der Aufreinigung (vgl. Abb. 8 B, einfache Filtration) bestand in der Filtration und Einkonzentrierung des Polysaccharidhydrolysats auf ein minimales Volumen. Abhängig von der ursprünglich eingesetzten Polysaccharidkonzentration und der Viskosität der Lösung entsprach dies üblicherweise etwa einem Drittel des Ursprungsvolumens. Bei dieser Filtration werden makromolekulare Hydrolysatbestandteile von der Membran zurückgehalten und sammeln sich im Retentat an, während niedermolekulare Hydrolysatbestandteile, wie Pufferkomponenten, Salze, Mono- und Oligosaccharide, die Membran passieren können und sich im Permeat wiederfinden.

Mit dem Ziel die verbleibenden niedermolekularen Hydrolysatbestandteile aus dem Retentat in das Permeat zu waschen, wurde als optionaler Prozessschritt eine sog. Diafiltration durchgeführt. Hierfür wird der Filtrationsprozess fortgesetzt, das Retentatvolumen jedoch durch Anlegen eines Wasserzulaufs konstant gehalten. Dieser Prozess wurde fortgeführt, bis das Retentat mit etwa drei Retentatvolumina ddH₂O gewaschen wurde.

Wies das eingesetzte Polysaccharidhydrolysat vor der Filtration mit der 10 kDa Membran zu viele Schwebstoffe auf, wurden diese zuvor über Querstromfiltration mit einer 0,2 µm Membran aus der Lösung entfernt. Der Verlauf der Polysaccharid- und Oligosaccharidkonzentration

wurde während aller Filtrationsprozesse durch Messungen mit Dünnschichtchromatographie und HPAEC-PAD verfolgt.

Auf die Verwendung einer Filtrationsmembran folgte stets eine Reinigung mittels Natronlauge, Phosphorsäure und Isopropanol (für Details, vgl. Tab. 21). Nicht verwendete Filtrationsmembranen wurden in 0,1 M NaOH gelagert und vor Gebrauch mit 2 L ddH₂O im Durchfluss gespült.

Tab. 21 Reinigungsprotokoll für Querstromfiltration

Lösung	Dauer/Volumen	Modus
ddH ₂ O	2 L	Durchfluss
0,5 M NaOH	30 min	Rezyklisierend
Leitungswasser	0,5 L	Durchfluss
VE Wasser	2 L	Durchfluss
8,5 % v/v <i>ortho</i> -Phosphorsäure	30 min	Rezyklisierend
Leitungswasser	0,5 L	Durchfluss
VE Wasser	2 L	Durchfluss
30 % Isopropanol	30 min	Rezyklisierend
VE Wasser	2 L	Durchfluss
0,1 M NaOH	20 min	Rezyklisierend

VE Wasser = Vollentsalztes Wasser. Beim rezyklisierenden Betrieb wird das Retentat zurück in das Filtrat geleitet. Beim Durchflussbetrieb wird das Retentat nicht zurück in das Filtrat geleitet, sondern verworfen.

2.5.4 Einkonzentrierung mit Rotationsverdampfer und Exsikkator

Bei verschiedenen Prozessen der Oligosaccharidaufreinigung, wie z. B. der Querstromfiltration, der semipräparativen HPLC und SEC, aber auch bei der sukzessiven Präzipitation und Solubilisierung, kommt es zu einer Verdünnung der ursprünglich eingesetzten Proben. Im Rahmen der Weiterarbeitung der Proben ist es deswegen häufig notwendig, die Oligosaccharidkonzentration der Proben im Anschluss wieder zu erhöhen. Dies wurde je nach Anzahl und Volumen der Proben über einen Rotationsverdampfer oder Exsikkator erreicht.

Die Einkonzentrierung im Rotationsverdampfer erfolgte bei einer konstanten Wasserbadtemperatur von 60 °C und einem manuell eingestellten Unterdruck, der gleichmäßige Verdampfung ohne Blasenbildung ermöglichte. Die Einkonzentrierung über Rotationsverdampfer wurde nur bis zu einem Volumen von 20-30 mL eingesetzt. Für die Einkonzentrierung mit Exsikkator wurde das Trockenmittel Silica Gel Orange von Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland) unter Anlegen eines permanenten Unterdrucks mit einer Membranvakuumpumpe von vaccu-brand (Wertheim, Deutschland) eingesetzt.

2.5.5 Semipräparative HPLC und SEC

Die semipräparative HPLC und SEC zur Oligosaccharidaufreinigung wurde analog zur analytischen Trennung durchgeführt mit der Erweiterung, dass eine größere Menge an Probe eingesetzt wurde und die bei der Trennung erhaltenen Fraktionen via Fraktionssammler

gesammelt wurden. Als Probenvorbereitung wurden zu untersuchende Proben falls nötig zentrifugiert und der Überstand filtriert. Je nach geplantem Auftragsvolumen und Oligosaccharidkonzentration der Probe wurde diese weiterhin noch über Rotationsverdampfer oder Exsikkator aufkonzentriert. Das Injektionsvolumen für die Trennung mittels HPLC mit Na-Säule und SEC betrug 500 μL , welche mit Hilfe einer 500 μL Probenschleife aufgetragen wurde.

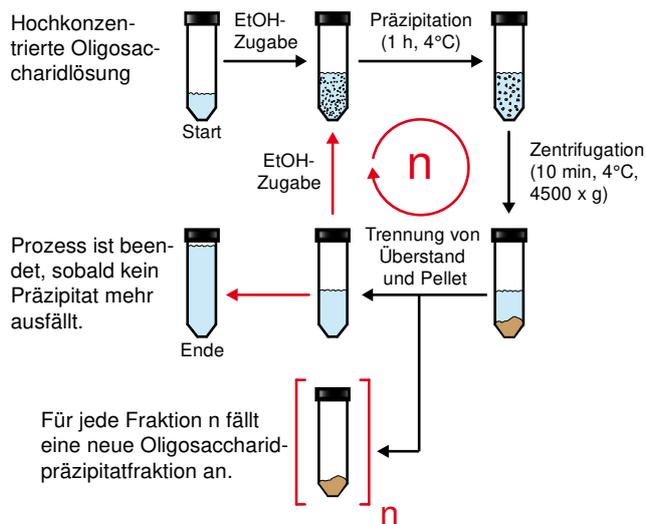
Das Sammeln der über HPLC und SEC getrennten Fraktionen wurde mit Hilfe des Fraktionsammlers Foxy R1 durchgeführt. Die für das Sammeln notwendigen Sammelgrenzen für einzelne Fraktionen wurden basierend auf einem vorher durchgeführten Testlauf manuell zeitlich festgelegt. Eine präparative Trennung wurde bis zu fünf Mal wiederholt und gleiche gesammelte Fraktionen zusammengeführt. Das insgesamt aufgetragene Volumen betrug demnach 2,5 mL. Die Reinheit der erhaltenen Fraktionen wurde mittels Dünnschichtchromatographie und HPAEC-PAD jeweils mit angemessener vorheriger Aufkonzentrierung untersucht.

2.5.6 Sukzessive Präzipitation und Solubilisierung mit Ethanol

Als alternative Aufreinigungsmethode zur chromatographischen Auftrennung und teilweise auch für die Querstromfiltration wurde eine sukzessive Präzipitation und eine sukzessive Solubilisierung mit Ethanol-Wasser-Gemischen durchgeführt.

Für die **sukzessive Präzipitation** wurde eine Oligosaccharidlösung bzw. ein Polysaccharidhydrolysat mit vergleichsweise hoher Oligosaccharidkonzentration (vgl. Kapitel 2.5.4) eingesetzt. Im ersten Schritt wurde absoluter Ethanol bis zu einer Ethanolkonzentration von 50 % der Lösung hinzugegeben. Diese Lösung wurde anschließend gemischt und bei 4 °C für 1 h inkubiert. Das hierbei entstandene Präzipitat wurde anschließend über Zentrifugation (10 min, 4 °C, 4890 \times g) abgetrennt und im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und konnte durch Zugabe von weiterem absoluten Ethanol (Erhöhung auf 55% Ethanol, usw.) einem erneuten Präzipitationszyklus zugeführt werden. Der Prozess der sich zyklisch wiederholenden Präzipitationen mit sukzessiv steigender Ethanolkonzentration wurde solange wiederholt, bis kein Präzipitat mehr ausfiel oder das hinzuzufügende Ethanolvolumen zu groß wurde, was üblicherweise bei etwa 97 % erreicht wurde. Eine Skizze über die verschiedenen Prozessschritte ist in Abbildung 9 A abgebildet. Der Prozess wurde sowohl im μL -Maßstab bei einem initialen Probenvolumen von 200 μL als auch im mL-Maßstab bei einem Probenvolumen von etwa 25 mL durchgeführt.

A) Sukzessive Präzipitation



B) Sukzessive Solubilisierung

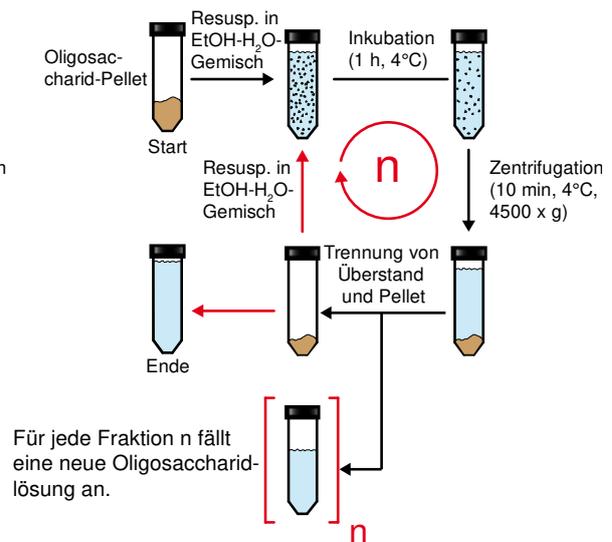


Abb. 9 Übersicht über die Prozessschritte für die sukzessive Präzipitation und sukzessive Solubilisierung
 EtOH = Ethanol, Zentrif. = Zentrifugation, Resusp. = Resuspendieren; schwarz = Prozessschritte des ersten Zyklus; rot = Prozessschritte, die einen neuen Zyklus einleiten oder die Produkte mehrerer Zyklen beschreiben. (A) zeigt die Prozessschritte für die sukzessive Präzipitation. Bei jedem neuen Zyklus wird durch die Ethanolzugabe die Ethanolkonzentration erhöht, sodass die Oligosaccharidlöslichkeit in der Lösung sinkt und sukzessive mit jedem Zyklus neue Oligosaccharidfraktionen präzipitieren. Der Prozess ist beendet, sobald eine Erhöhung der Ethanolkonzentration nicht mehr zum Ausfallen neuer Oligosaccharidfraktionen führt bzw. eine Erhöhung der Ethanolkonzentration aufgrund des hohen Ethanolbedarfs nicht mehr sinnvoll ist. (B) zeigt die Prozessschritte für die sukzessive Solubilisierung. Bei jedem neuen Zyklus wird das Oligosaccharidpellet in einer neuen Ethanol-Wasser-Mischung resuspendiert und solubilisiert. Durch die sukzessiv sinkende Ethanolkonzentration können bei jedem Zyklus neue Oligosaccharide in Lösung gebracht werden. Der Prozess ist beendet, sobald sich das Pellet vollständig aufgelöst hat.

Bei der Durchführung der **sukzessiven Solubilisierung** wurde eine sehr hoch konzentrierte, idealerweise fast trockene, Oligosaccharidlösung mit einem großen Überschuss absoluten Ethanols gefällt (4°C, 1 h), abzentrifugiert und der Überstand vollständig in ein neues Gefäß überführt. Das Pellet wird anschließend in einem definierten Volumen eines bestimmten Ethanol-Wasser-Gemischs (z. B. 95%iger Ethanol) resuspendiert und für 1 h bei 4°C gerührt. Anschließend wird die Suspension für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand abermals in ein neues Gefäß überführt. Mit dem verbleibenden Pellet konnte basierend auf eines etwas niedriger konzentrierten Ethanol-Wasser-Gemischs eine neue Solubilisierung begonnen werden. Dieser Zyklus wurde solange mit sukzessiv sinkender Ethanolkonzentration wiederholt, bis sich das gesamte Pellet aufgelöst hatte. Die hierbei anfallenden Ethanol-Wasser-Gemische mit gelöstem Pellet wurden anschließend über einen Rotationsverdampfer bzw. Exsikkator eingetrocknet und in ein definiertes Volumen Wasser gelöst. Der Ablauf der sukzessiven Solubilisierung ist schematisch in Abbildung 9 B dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl von Polysacchariden und Enzymen für die Herstellung von Oligosacchariden

3.1.1 Auswahl der Polysaccharide für die Herstellung von Oligosacchariden

Die Vielfalt der in der Literatur auf präbiotische Wirkung untersuchten Oligosaccharide ist sehr groß. Viele dieser Oligosaccharide werden hydrolytisch aus verschiedenen Reststoffströmen pflanzlicher Biomasse hergestellt. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf den Abbau der Polysaccharide Arabinoxylan und Glucomannan gesetzt, da diese einen Großteil der in der Natur auftretenden Hemicellulosen abdecken (vgl. Kapitel 1.1.2). Dementsprechend sind diese Polysaccharide auch in pflanzlichen Reststoffströmen in hohem Anteil vertreten. Eine Evaluierung der Eignung dieser Substrate für die Oligosaccharid-Herstellung kann demnach auch als Maß für das Potential der Oligosaccharid-Herstellung aus Bioraffinerienebenprodukten generell herangezogen werden. Die strukturelle Basis der Polysaccharide bestimmt auch die potentielle Vielfalt der herstellbaren Oligosaccharide. So können aus Arabinoxylan durch enzymatische Spaltung ausschließlich XOS und AXOS und aus Glucomannan ausschließlich GMOS hergestellt werden. Die präbiotische Wirkung wird hierbei vermutlich nicht durch einzelne spezifische Oligosaccharide, sondern durch die Grundgesamtheit ähnlicher Oligosaccharide hervorgerufen. Das Ziel dieser Arbeit war es demnach, durch Hydrolyse von Polysacchariden nicht einzelne Oligosaccharide, sondern verschiedene Oligosaccharidmischungen herzustellen.

In Kapitel 3.1.2 soll zunächst eine generelle Übersicht über die untersuchte Enzym-*Toolbox* für die Herstellung von Oligosacchariden und in Kapitel 3.2 die etablierte Oligosaccharidanalytik dargelegt werden. In Kapitel 3.3 werden anschließend im Detail die für die XOS/AXOS-Herstellung notwendigen Enzyme vorgestellt, ihre katalytische Substrat- und Produktspezifität charakterisiert, mit ihrer Hilfe Oligosaccharide hergestellt und abschließend verschiedene Methoden der XOS/AXOS-Aufreinigung evaluiert. Analog wird in Kapitel 3.4 zunächst die enzymatische Herstellung und anschließend die Aufreinigung von GMOS mit unterschiedlichen Methoden erarbeitet.

3.1.2 Auswahl der Enzyme für die Herstellung von Oligosacchariden aus Arabinoxylan und Glucomannan

Übersicht über relevante Enzymklassen für die Herstellung von Oligosacchariden aus Arabinoxylan und Glucomannan

Die strukturelle Vielfalt aus Hemicellulose hergestellter Oligosaccharide wird primär durch den zugrundeliegenden Aufbau des abzubauenen Polysaccharids bestimmt. Enzymatische Aktivitäten, welche für die hydrolysebasierte Oligosaccharidherstellung eingesetzt werden können, werden in dieser Arbeit in drei Gruppen eingeteilt:

- (A) Endo- und Exo-Glycanaseaktivitäten, welche durch Hydrolyse des Polysaccharidrückgrats direkt Oligosaccharide aus einem Polysaccharid freisetzen
- (B) Exo-Glycanaseaktivitäten, welche das Rückgrat von Oligosacchariden durch Abspaltung von Monosacchariden verkürzen und
- (C) Glycosidase- und Glycanaseaktivitäten, welche Seitengruppen und -ketten von Oligo- und Polysacchariden abspalten.

Eine auf Basis dieser Aktivitäten aufgebaute Enzym-*Toolbox* kann dazu genutzt werden, um sowohl verschiedene Oligosaccharidmischungen aus Polysacchariden zu lösen (Aktivität A), diese anschließend zu modifizieren (Aktivität B und C), oder ein Polysaccharid vor dem Herauslösen von Oligosacchariden zunächst so zu modifizieren (Aktivität B und C), dass anschließend andere Oligosaccharidmischungen freigesetzt werden können (Aktivität A).

Oligosaccharid-freisetzende Enzyme für den Abbau von Arabinoxylan sind ausschließlich Xylanasen. Mit diesen Enzymen gebildete Oligosaccharide (XOS und AXOS) können anschließend über β -Xylosidasen, welche endständige Xylose von XOS und AXOS abspalten (Aktivität B), und α -Arabinofuranosidasen, welche Arabinose von den AXOS abspalten (Aktivität C), weiter modifiziert werden. Direkt Oligosaccharid-freisetzende Enzyme für Glucomannan (Aktivität A) stellen Enzyme mit β -1,4-Endo- oder Exo-Glucanase-, als auch β -1,4-Endo- oder Exo-Mannanase-Aktivität dar. Da die Struktur der Seitenketten des Glucomannans sich nicht von der des Rückgrats unterscheidet, können β -Glucanasen und β -Mannanasen ebenfalls für den Abbau der Seitenketten eingesetzt werden (Aktivität B). Enzyme, die Glucose- und Mannose-Einheiten von GMOS lösen können, sind β -Glucosidasen und β -Mannosidasen (Aktivität C) und spielen für die Oligosaccharidherstellung eine vergleichsweise untergeordnete Rolle.

Übersicht über etablierte Enzym-Toolbox

Im Rahmen dieser und weiterer Doktorarbeiten sowie studentischer Arbeiten wurde eine *Toolbox* von Enzymen erstellt, welche für einen gezielten Abbau von Hemicellulose eingesetzt werden kann. Hierfür wurden gezielt Enzyme ausgewählter GH-Familien aus verschiedenen Organismen mit hohem hemicellulolytischen Potential, *C. thermocellum*, *C. stercorarium*, *C. cellulosi*, *Hb. hemicellulosilytica* und *Hv. saccincola*, selektiert, in *E. coli* kloniert und exprimiert. Bei der Klonierung der Enzyme wurden etwaige Signalpeptide (annotiert mittels SignalP 4.1, Nielsen (2017)) entfernt und ein jeweils C-terminaler His-Tag hinzugefügt.

Nach Aufreinigung der exprimierten Proteinprodukte über IMAC und Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die hergestellten Enzyme systematisch für die Hydrolyse verschiedener Hemicellulosen (vgl. Tab. 10) in Übernachtansätzen bei 60 °C und einem pH-Wert von 6,5 getestet. Diese Bedingungen entsprechen ungefähr den Wachstumsbedingungen der jeweiligen Organismen, aus denen die Enzyme stammen. Etwaige enzymatische Aktivitäten der Enzyme wurden zunächst über DNSA-Assay ermittelt. Anschließend wurde bei den Polysaccharidhydrolysaten aktiver Enzyme eine detaillierte Analyse der gebildeten Hydrolyseprodukte über DC und HPAEC-PAD durchgeführt. Eine Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Enzyme für den Abbau von Arabinoxylan und Glucomannan ist in Tabelle 22 angegeben.

Tab. 22 Übersicht über die untersuchten Enzyme für den Abbau von Arabinoxylan und Glucomannan

Enzym	ct	cs	hh	hs	cc	Insgesamt
Xylanasen	7	6	6	9*	2	30*
GH10	(4)	(4)	(4)	(5)	(2)	(19)
GH11	(1)	(1)	(2)	(5)	(-)	(9)
Weitere	(2)	(1)	(-)	(-)	(-)	(3)
α-Arabinofuranosidasen	1	2	3	3	3	12
GH43	(1)	(1)	(1)	(2)	(-)	(5)
GH51	(-)	(1)	(2)	(1)	(3)	(7)
β-Xylosidasen	-	2	1	2	-	5
GH43	(-)	(1)	(1)	(2)	(-)	(4)
Weitere	(-)	(1)	(-)	(0)	(-)	(1)
β-Glucanasen	22	1	2	15	3	43
GH5	(6)	(-)	(1)	(4)	(1)	(12)
GH9	(15)	(1)	(1)	(10)	(2)	(29)
Weitere	(1)	(-)	(-)	(1)	(-)	(2)
β-Glucosidasen	-	-	-	-	-	0
β-Mannanasen	3	1	-	2	-	6
GH5	(1)	(-)	(-)	(1)	(-)	(2)
GH26	(2)	(1)	(-)	(1)	(-)	(4)
β-Mannosidasen	-	-	-	-	-	0
Summe:	33	12	11	32	8	96

ct = *C. thermocellum*, cs = *C. stercorarium*, hh = *Hb. hemicellulosilytica*, hs = *Hv. saccincola*, cc = *C. cellulosi*.; * = Es gibt ein Enzym mit sowohl GH10 als auch GH11-Modul. Es wurden nur Enzyme in die Tabelle mit aufgenommen, deren Aktivität unter den gewählten Reaktionsbedingungen (60 °C, pH 6,5, über Nacht) eindeutig durch den Verdau von Poly- oder Oligosacchariden mit anschließender Analyse über HPAEC-PAD oder DC zugeordnet werden konnte. Bis auf wenige Ausnahmen wurden die Enzympräparationen von *C. thermocellum* von Dr. Benedikt Leis und Dr. Claudia Held, Enzympräparationen von *C. stercorarium* von Jannis Bröker, Enzympräparationen von *Hb. hemicellulosilytica* von Dr. Daniela Köck und Enzyme von *Hv. saccincola* und *C. cellulosi* von Jonathan Herlet und Dr. Petra Kornberger zur Verfügung gestellt.

Insgesamt umfasste die erarbeitete *Toolbox* 96 unterschiedliche Enzyme, für die eine hemicellulolytische Aktivität auf Arabinoxylan und Glucomannan nachgewiesen werden konnte. Hiervon waren 47 Enzyme (30 Xylanasen, 12 α -Arabinofuranosidasen, 5 β -Xylosidasen) mit dem Abbau von Arabinoxylan und 49 Enzyme (43 β -Glucanasen, 6 β -Mannanasen) mit dem Abbau von Glucomannan assoziiert. Unter den insgesamt 239 getesteten Enzymen konnten keine β -Mannosidasen und β -Glucosidasen bestimmt werden.

Nomenklatur für Enzymbezeichnung

Für die Bezeichnung von Glycosidhydrolasen gibt es in der Literatur keine einheitliche Regelung. Üblicherweise wird für die Bezeichnung eines Enzyms der jeweilige Aktivitätstyp als Präfix mit drei Buchstaben abgekürzt und anschließend mit einer Laufziffer weiter ergänzt (z. B. XynA, XynB und XynC für Xylanasen). In dieser Arbeit wurden wie oft üblich weiterhin die GH-Module des Enzyms als Interfix zwischen die Aktivitätsbezeichnung und die Laufziffer gesetzt (z. B. Xyn10A, Cel5/26H) und eine Zuordnung zum Herkunftsorganismus über einen weiteren Präfix ermöglicht (z. B. hh-Xyn10A und ct-Cel5/26H mit hh für *Hb. hemicellulosilytica* und ct für *C. thermocellum*). Sofern ein Enzym noch nicht in der Literatur erwähnt und noch kein Name festgelegt wurde, wurde in dieser Arbeit stattdessen der Lokus des jeweiligen Enzyms zusammen mit den charakteristischen GH-Modulen als eindeutige Zuordnung des Enzyms verwendet (z. B. SR1_339 (GH10)). Falls ein Enzym in der Literatur bereits beschrieben wurde, die Zuordnung der Aktivität jedoch nicht mit der hier bestimmten Aktivität übereinstimmte, wurde stattdessen ebenfalls der Lokus als eindeutige Zuordnung verwendet.

3.2 Methodenetablierung für die Analyse von Oligosacchariden

3.2.1 Vergleich verschiedener Methoden für die Oligosaccharidanalytik: DC, HPLC und HPAEC-PAD

Für die Analyse von Oligosacchariden stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, welche je nach Zielsetzung unterschiedlich eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einsatz von DC, HPLC und HPAEC-PAD für die Oligosaccharidanalytik der Oligosaccharidtypen XOS und AXOS (siehe Abb. 10) als auch MOS, COS und GMOS (siehe Abb. 11) evaluiert. Hierzu wurden neben unterschiedlichen kommerziell erhältlichen Oligosacchariden auch mit unterschiedlichen Enzymen erzeugte Polysaccharidhydrolysate analysiert.

Für die Benennung von AXOS (Abb. 10 A) wurde die von Fauré et al. (2009) entwickelte Nomenklatur verwendet, bei der alle Xylosen im Rückgrat des Oligosaccharids schrittweise vom nicht reduzierenden Ende zum reduzierenden Ende hin als Großbuchstaben dargestellt

werden. Je nach Art der Substitution an einer Xylose wird statt X (unsubstituierte Xylose) ein anderer Buchstabe gewählt, wie z. B. A für eine arabinosylierte Xylose. Die Positionen der jeweiligen Substitutionen bzw. Seitenketten an der jeweiligen Xylose werden zusätzlich über hochgestellte Zahlen kodiert. Für die Beschreibung von GMOS wurde eine vergleichbare Nomenklatur (Abb. 11 A) herangezogen. Hierbei wurden Glucose- und Mannose-Einheiten des Poly- bzw. Oligosaccharidrückgrats mit den Buchstaben G und M abgekürzt und ebenfalls vom nicht-reduzierenden Ende zum reduzierenden Ende hin aufgereiht.

Der Vergleich der Analysemethoden zeigt deutlich, dass unter den getesteten Methoden nur mittels HPAEC-PAD eine Basislinientrennung aller getesteten XOS- und AXOS und der meisten MOS, COS und GMOS erreicht werden konnte. Für DC und HPLC war eine Trennung von Oligosacchariden mit teilweise nur geringen strukturellen Unterschieden kaum möglich und von Überlagerungen der Retentionszeiten bzw. Migrationsdistanzen verschiedener Analyte begleitet.

Bei der Analyse mittels HPLC-RI kam erschwerend hinzu, dass der Detektor eine geringe Sensitivität aufweist. Unter den angewendeten Bedingungen konnten durch enzymatische Hydrolyse hergestellte Polysaccharidhydrolysate mittels HPLC-RI nicht eindeutig unterschieden werden. Im Vergleich dazu waren die deutlich sensitiveren Methoden DC und HPAEC-PAD deutlich besser geeignet, um unterschiedliche Produktmuster sowohl bei der Hydrolyse von Arabinoxylan als auch von Glucomannan zu untersuchen.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass aufgrund der hohen Anzahl unterschiedlicher Oligosaccharide in den Polysaccharidhydrolysaten eine Unterscheidung von Produktmustern oft nur auf Fingerprintebene möglich war (Abb. 11 B und D). Hierfür war eine Analyse mittels DC teilweise besser geeignet als eine Analyse mittels HPAEC-PAD, da bestimmte Unterschiede in den Produktspektren markanter und die Produktspektren somit oft besser zu unterscheiden waren.

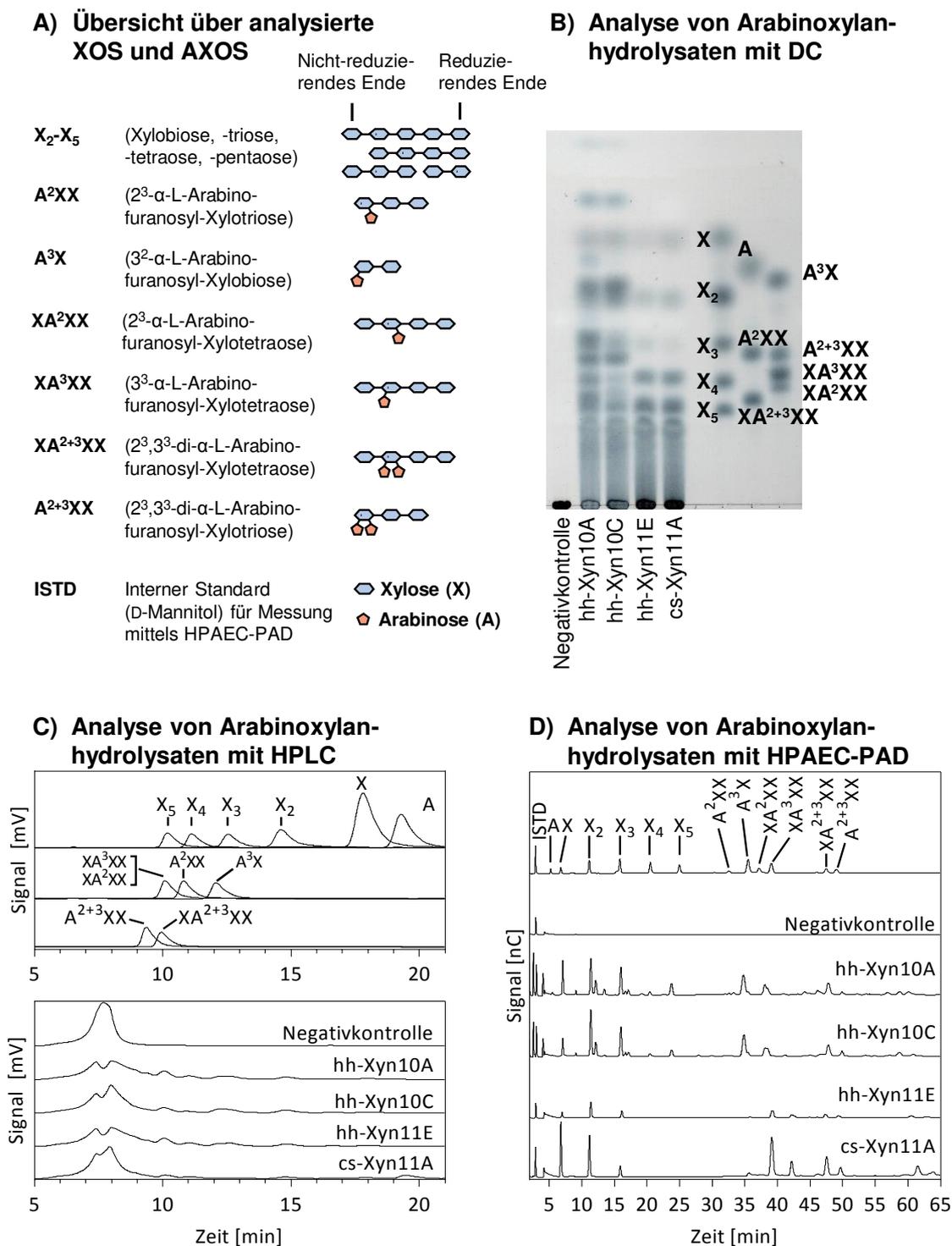


Abb. 10 Vergleich von Chromatographiemethoden zur Analyse von Arabinoxylanhydrolysaten
 Arabinoxylanhydrolysate wurden durch Inkubation von 0,5% w/v Arabinoxylan aus Weizen mit 5 mg/L hh-Xyn10A, hh-Xyn10C, hh-Xyn11E und cs-Xyn11A über Nacht bei 60 °C erzeugt. **(A)** zeigt eine Übersicht über die Strukturen der verwendeten Standards. **(B)**, **(C)** und **(D)** zeigen exemplarisch analytische Trennungen der Standards und Arabinoxylanhydrolysate mit den unterschiedlichen Methoden. Als Laufmittel für die Analyse mittels DC wurde ein Gemisch aus Acetonitril und ddH₂O im Verhältnis 8:2 v/v verwendet. Für die Analyse mittels HPLC wurde eine Na-Säule und für die Analyse mittels HPAEC-PAD eine CarboPac PA1-Säule verwendet.

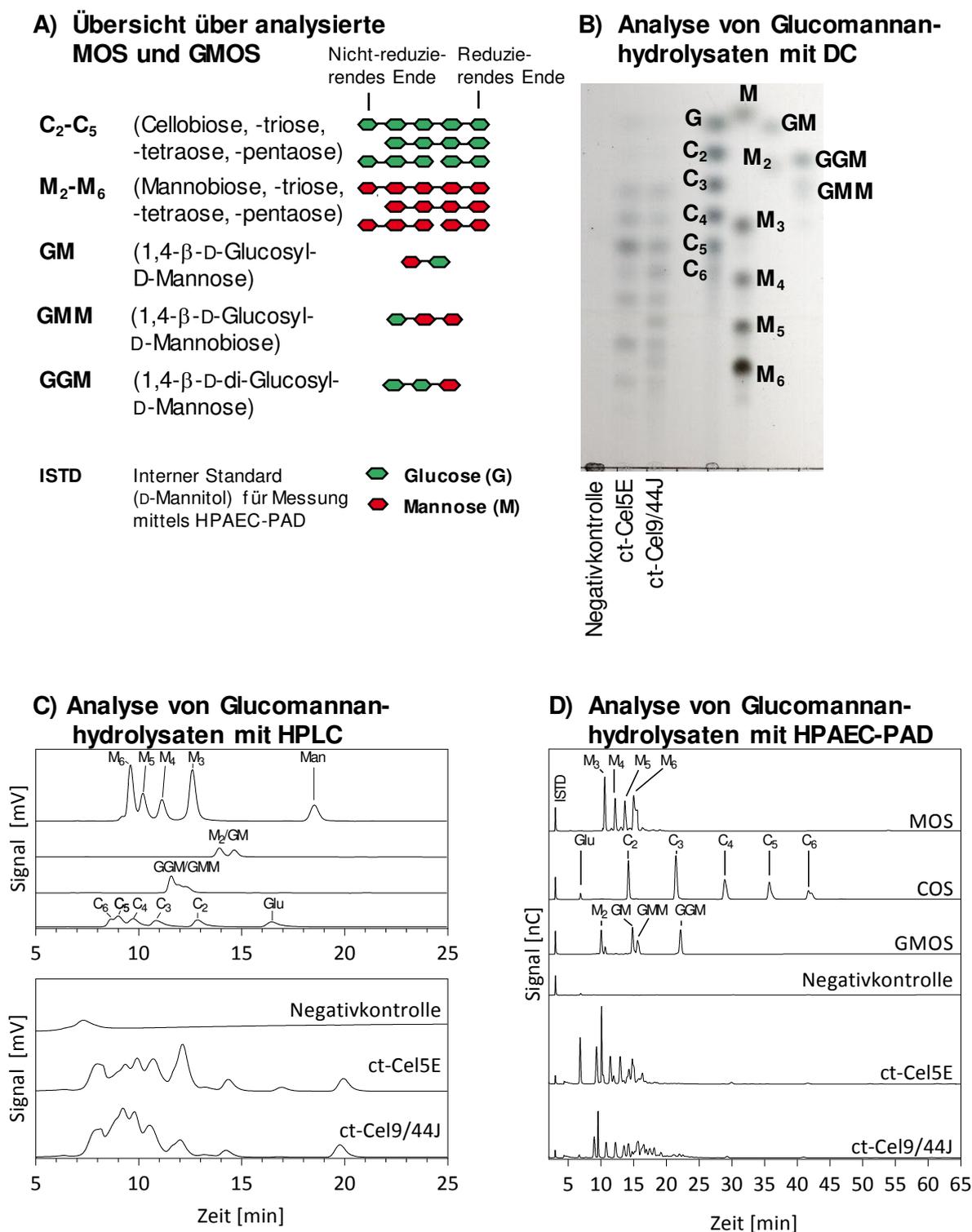


Abb. 11 Vergleich von Chromatographiemethoden zur Analyse von Glucomannanhydrolysaten

Glucomannanhydrolysate wurden durch Inkubation mit 0,125 % w/v Glucomannan aus *Amorphophallus Konjac* mit 5 mg/L ct-Cel5E und ct-Cel9/44J über Nacht bei 60 °C erzeugt. (A) zeigt eine Übersicht über die Strukturen der verwendeten Standards. (B), (C) und (D) zeigen exemplarisch analytische Trennungen der Standards und Glucomannanhydrolysate mit unterschiedlichen Methoden. Als Laufmittel für die Analyse mittels DC wurde ein Gemisch aus Butanol, Ethanol und ddH₂O im Verhältnis 5:5:4 v/v/v verwendet. Für die Analyse mittels HPLC wurde eine Na-Säule und für die Analyse mittels HPAEC-PAD eine CarboPac PA1-Säule verwendet.

3.2.2 Trennleistung der HPAEC-PAD für die Oligosaccharidanalytik

Aufgrund der hohen Trennleistung, der hohen Robustheit gegen verschiedene Probenmatrizes und der hohen Sensitivität stellte die HPAEC-PAD im Verlauf dieser Arbeit die Standardmethode für die Analyse der meisten Oligosaccharide dar. Beispiele für die Trennleistung der HPAEC-PAD für eine Analyse von verschiedenen Oligosacchariden und enzymatisch hergestellten Polysaccharidhydrolysaten sind in Abbildung 12 dargestellt.

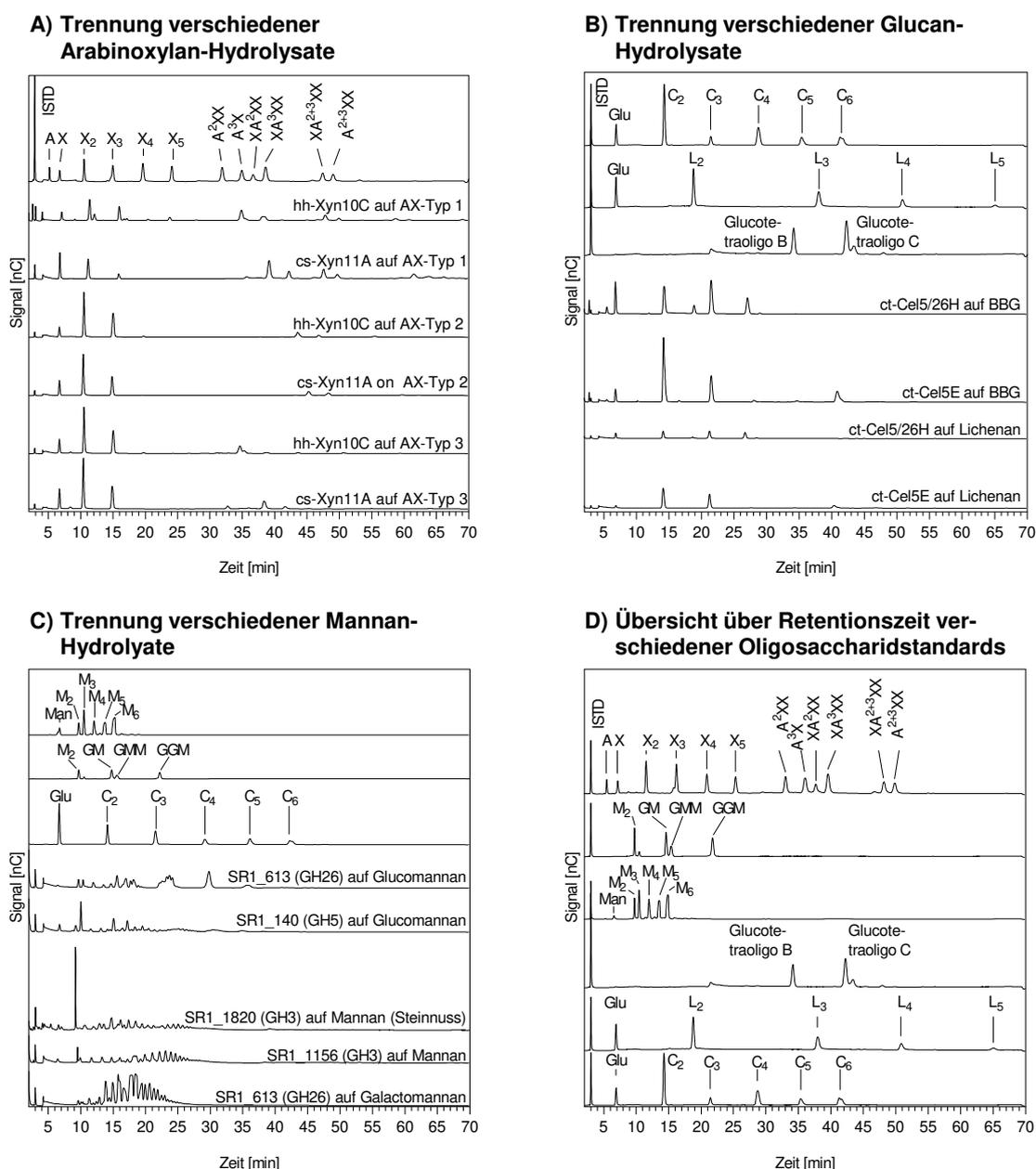


Abb. 12 Analyse verschiedener Oligosaccharide sowie enzymatischer Hydrolysate verschiedener Polysaccharide mittels HPAEC-PAD

AX-Typ 1 = Xylan aus Weizen; AX-Typ 2 = Xylan aus Birke; AX-Typ 3 = Xylan aus Haferspreu; BBG = Gersten- β -Glucan (engl.: *barley* β -glucan). Die Polysaccharidhydrolysate wurden mit 2-5 mg/L Enzym über Nacht bei 60 °C inkubiert. Eine Übersicht über alle in dieser Arbeit untersuchten Mono- und Oligosaccharidstandards findet sich in Tab. 9, Abb. 10 A und 11 A.

Abbildungen 12 A, B und C zeigen deutlich, dass die etablierte HPAEC-PAD-Methodik erfolgreich für die Analyse von Hydrolysaten verschiedener Xylan- (aus Weizen, Birke und Hafer-spreu), Glucan- (Gersten- β -Glucan, Lichenan) und verschiedener Mannantypen (Gluco-mannan, Mannan und Galactomannan) eingesetzt werden konnte. Durch Vergleiche der Re-tentionszeiten der Peaks aus Proben zu den Peaks der kommerziell erhältlichen Oligosaccharide konnten eindeutige Rückschlüsse auf die Oligosaccharidzusammensetzung der verschiedenen Polysaccharidhydrolysate getroffen werden.

Die genaue Zuordnung von Peaks zu bestimmten Oligosaccharidstrukturen war aber nicht für alle Oligosaccharidgemische im gleichen Maße möglich: So wiesen Mannan-basierte Oligosac-charide (Hydrolysate von Mannan, Gluco- und Galactomannan) oft nur geringe Unterschiede in den Retentionszeiten auf, sodass nicht immer eine Basislinientrennung der einzelnen Analyten möglich war. Die Trennung konnte allerdings durch die Verwendung eines flacheren Natrium-acetatgradienten in Einzelfällen verbessert werden.

Die Analyse von homogenen linear aufgebauten Oligosaccharidstandards mittels HPAEC-PAD zeigte eine hohe Korrelation zwischen der Zunahme der Retentionszeit der Analyten und stei-gendem Polymerisierungsgrad auf. Der Abstand zwischen den Retentionszeiten dieser Oligo-saccharide blieb bei steigendem Polymerisierungsgrad, wie in Abbildung 12 D dargestellt, nahezu konstant. Der hieraus abgeleitete lineare Zusammenhang zwischen Retentionsfaktor k_i der Oligosaccharide mit der Polymerisationslänge DP (siehe Abb. 13) kann dazu genutzt werden, auch ohne verfügbare Standards, Peaks bestimmten Strukturen zuzuordnen.

Im Vergleich hierzu ließen sich die Retentionszeiten von Heterooligosacchariden mit unter-schiedlichen Monosacchariden und unterschiedlichen Bindungstypen kaum abschätzen. Dies zeigte sich insbesondere bei der Analyse von AXOS, wie in Abbildung A1 im Anhang dargestellt: Die Retentionszeiten der Analyten A^2X , XA^2X , XA^3X und $XA^{2+3}X$ waren wie erwartet kürzer als die Retentionszeiten ihrer um eine Xylose am reduzierenden Ende verlängerten Pen-dants A^2XX , XA^2XX , XA^3XX und $XA^{2+3}XX$. Im Unterschied hierzu war die Retentionszeit des Analyten A^3X etwas länger als die von A^3XX . Eine Verlängerung von AXOS am nicht-reduzie-renden Ende mit einer Xylose konnte je nach Oligosaccharid zu einer Verlängerung (A^2XX und A^3XX verglichen mit XA^2XX und XA^3XX), aber auch zu einer Verkürzung (A^3X und $A^{2+3}XX$ verglichen mit XA^3X und $XA^{2+3}XX$) der Retentionszeiten führen.

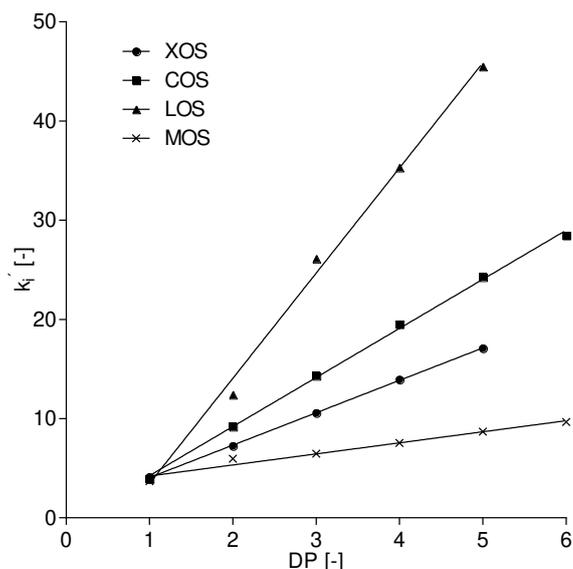


Abb. 13 Zusammenhang des Retentionsfaktors k_i verschiedener Oligosaccharide mit der Polymerisationslänge

DP = Polymerisationsgrad des jeweiligen Analyten. Die Berechnung des Retentionsfaktors k_i erfolgt durch Berechnung der Differenz zwischen der Totzeit des Systems und der Bruttoretentionszeit eines Analyten i geteilt durch die Totzeit des Systems. Die Bestimmtheitsmaße für die lineare Korrelation des Retentionsfaktors mit dem Polymerisationsgrad der Oligosaccharidtypen XOS, COS, LOS und MOS betragen 1,000, 0,999, 0,995 und 0,970.

3.2.3 Abfall der PAD-Sensitivität über die Zeit

Ein Nachteil bei der Analyse von Oligosacchariden mittels HPAEC-PAD ist die Instabilität der Sensitivität des PAD-Detektionssystems. So ist die Detektorsensitivität nach Einsetzen einer neuen Goldelektrode zunächst hoch, nimmt mit zunehmender Anzahl an gemessenen Proben jedoch stetig ab, bis das Signal vollständig abbricht und eine neue Goldelektrode eingebaut werden muss.

Der genaue Verlauf des Abfalls des Detektionssignals wurde in einem speziell dafür entwickelten Versuchsaufbau, dargestellt in Abbildung 14, für 35 verschiedene Analyte, darunter Monosaccharide, Oligosaccharide und Uronsäuren, untersucht. Die hieraus abgeleiteten Ergebnisse sollten dafür verwendet werden, den Abfall der Detektorsensitivität für die Quantifizierung von Analyten besser berücksichtigen zu können und somit um eine verbesserte HPAEC-PAD-Analytik von Oligosacchariden zu ermöglichen.

Versuchsaufbau

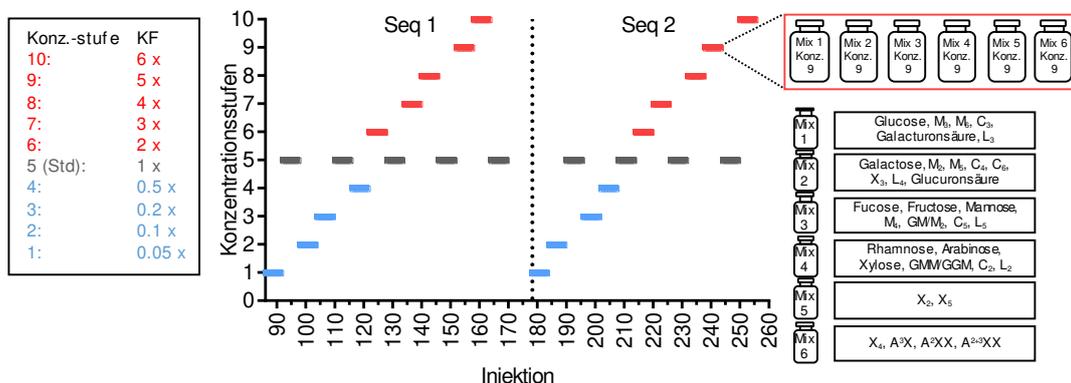
Die 35 untersuchten Analyte wurden wie in Abbildung 14 A2 dargestellt in sechs Mischungen (Mix 1-6) aufgeteilt. Die Mischungen waren so aufgebaut, dass keine Peaks der Analyte bzw. Verunreinigungen der Analyten Retentionszeitüberschneidungen untereinander aufwiesen, sodass eine simultane exakte Quantifizierung aller Analyten möglich war. Im Rahmen des Experimentes wurden diese sechs Mischungen bei zehn unterschiedlichen Konzentrationsstufen (Konz 1-10) gemessen (vgl. Abb. 14 A1), welche durch Konzentrationsfaktoren (KF) definiert sind. Der Konzentrationsfaktor beschreibt hierbei jeweils die Menge an Analyt im Verhältnis zu der Menge des Analyten bei der Konzentrationsstufe 5. Detaillierte Informationen über die genauen Reinheiten und Konzentration der Analyten sind in Tabelle A1 im Anhang angegeben. Zusätzlich wurde jeder Probe 2 mg/L D-Mannitol als interner Standard (ISTD) zugesetzt.

Um die Stabilität des PAD-Detektors für jeden einzelnen Analyten über den Verlauf einer Testsequenz zu evaluieren, wurden jeweils nacheinander Mix 1-6 mit der Konzentrationsstufe 5 repetitiv in regelmäßigen Abständen gemessen. Dazwischen wurden in aufsteigender Reihenfolge die verbleibenden Konzentrationsstufen 1-4 und 6-10 gemessen. Dieser experimentelle Ansatz (Messesequenz, Seq) wurde insgesamt zwei Mal wiederholt (Seq 1, Seq 2), wobei nach der Messung der ersten Sequenz die pH-Elektrode neu kalibriert sowie die Goldelektrode ausgetauscht wurde. Eine genaue Auflistung der gemessenen Proben der Messesequenzen ist in Tabelle A4 im Anhang gegeben.

A) Experimenteller Aufbau

A1) Messsequenz für die Analyse des PAD-Signalabfalls und der Kalibrierkurve der Probenmischungen

A2) Zusammensetzung der Probenmischungen

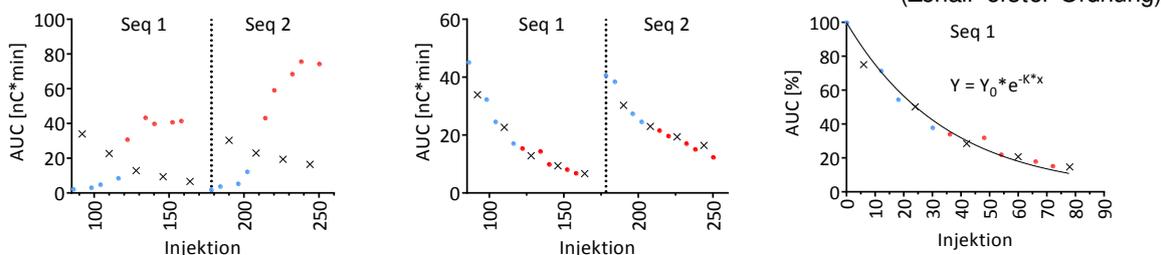


B) PAD-Signalabfall – Beispiel: Glucose

B1) Rohdaten

B2) Daten korrigiert mit KF

B3) Modell für Abfall des PAD-Detektorsignals (Zerfall erster Ordnung)



C) Vergleich des PAD-Signalabfalls für verschiedene Analyten

C1) PAD-Halbwertszeiten der Analyten aus Seq 1

C2) PAD-Signalabfall für Analyten aus Seq 1

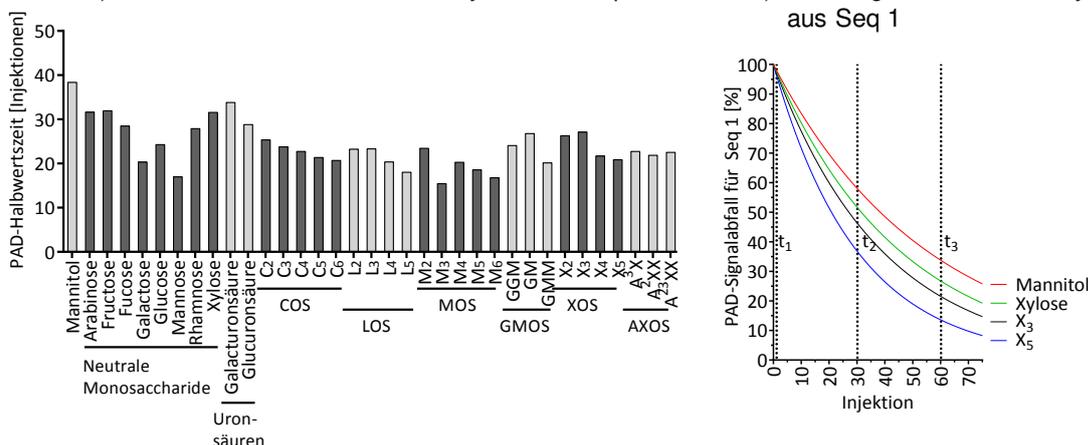


Abb. 14 Experimenteller Aufbau zur Bestimmung des PAD-Signalabfalls für 35 Analyten

(A) Experimenteller Aufbau zur Untersuchung des PAD-Signalabfalls über die Zeit. Das Experiment wurde in zwei Wiederholungen (Sequenzen, Seq) aufgeteilt, welche getrennt voneinander analysiert wurden. 10 unterschiedliche Konzentrationsstufen wurden in aufsteigender Ordnung gemessen. Alle 6 Analytmischungen (Mix 1-6) wurden in jeder Sequenz und in jeder Konzentrationsstufe (KF) gemessen. Konzentrationsstufe 5, dessen Konzentrationsfaktor als 1 definiert wurde, wurde in regelmäßigen Abständen zwischen den einzelnen Konzentrationsstufen gemessen. (B) PAD-Signalabfall am Beispiel von Glucose. **B1** zeigt die Rohdaten der zwei Sequenzen. **B2** zeigt dieselben Daten korrigiert durch den Konzentrationsfaktor. **B3** zeigt das auf Basis der transformierten Werte berechnete Modell der Zerfallskinetik erster Ordnung zur Beschreibung des Signalabfalls. (C) Vergleich des PAD-Signalabfalls für verschiedene Analyten. **C1** PAD-Halbwertszeit aller getesteten Analyten aus Seq 2 (Gleichung 9). **C2** zeigt den prozentualen Signalabfall von D-Mannitol, Xylose, X₃ und X₅.

Ermittlung des Abfalls des Detektorsignals

Die Signalstärke eines Detektors wird in der Regel über das Integral eines Analytpeaks (AUC, engl.: *area under the curve*) ausgedrückt. Die Rohwerte der ermittelten AUC für beide Messsequenzen sind für Glucose in Abbildung 14 B1 dargestellt (für alle anderen Analyten siehe Abb. A2 im Anhang). Die wiederholten Messungen bei Konzentrationsstufe 5 (schwarze Kreuze) zeigten eindeutig, dass das PAD-Signal über den Verlauf beider Sequenzen für alle Analyten abfiel. Ein Austausch der Goldelektrode und neue Kalibrierung der pH-Elektrode nach Seq 1 führte allerdings zu einer Regenerierung des PAD-Signals. Abbildung 14 B2 (bzw. Abb. A3) zeigt dieselben Werte, korrigiert mit dem Konzentrationsfaktor KF der jeweiligen Messung, was einen Vergleich der Werte unabhängig von der ursprünglich eingesetzten Analytkonzentration ermöglicht. Diese Transformation erlaubt es demnach, den Abfall der Signalstärke des Detektors für alle Proben nachzuverfolgen und zu vergleichen.

Dieser PAD-Signalabfall konnte weiterhin durch eine Regression über kleinste Quadrate einer Zerfallskinetik erster Ordnung (OPD, engl.: *one phase decay*) sehr gut beschrieben werden (vgl. Abb. 14 B3 für Glucose in Seq 1; Abb. A4 und A5 für alle weiteren Analyten in Seq 1 und Seq 2). In der Formel zur Beschreibung des PAD-Sensitivitätsabfalls über das OPD-Modell (Gleichung 8) bezeichnet $Y_{i,x}$ die PAD-Sensitivität eines Analyten i für die Injektion x und $Y_{i,(x=0)}$ die prozentuale PAD-Sensitivität zu Beginn der jeweiligen Sequenz ($Y_{i,(x=0)}=100\%$). Die Konstante K_i , welche den Verlauf des PAD-Sensitivitätsabfalls beschreibt, lässt sich für einen besseren Vergleich zwischen den Analyten auch als Halbwertszeit $t_{1/2,i}$ (Gleichung 9) ausdrücken.

$$Y_{i,x}[\%] = Y_{i,(x=0)} * e^{-K_i * x} \quad (\text{Gleichung 8})$$

$$t_{1/2,i} = \frac{\ln(2)}{K_i} \quad (\text{Gleichung 9})$$

Für die Berechnung des OPD-Modells für Monosaccharide, Uronsäuren und D-Mannitol wurden die Messwerte aller Konzentrationsstufen (Konz 1-10) verwendet. Für die Berechnung des OPD-Modells für Oligosaccharide wurden hingegen nur die Konzentrationsstufen bis Stufe 5 (Konz 1-5) berücksichtigt, da bei den Konzentrationsstufen über Stufe 5 (Konz 6-10) die Werte zunehmend unter den durch Stufe 5 vorgegebenen Kurvenverlauf fielen. Diese Abweichung lässt sich dadurch erklären, dass bei höheren Analytkonzentrationen nicht mehr zwingend ein linearer Zusammenhang zwischen Analytkonzentration und gemessenem Signal vorausgesetzt werden kann.

Durch das OPD-Modell konnte der PAD-Signalabfall für alle 35 Analyten mit einem durchschnittlichen Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,969 für Seq 1 und 0,950 für Seq 2 bestimmt werden. Die am wenigsten genau beschriebenen Substanzen waren Mannose (R^2 von 0,912 und 0,830), Galacturonsäure (R^2 von 0,939 und 0,922) und Galactose (R^2 von 0,939 und 0,857). Alle Parameter für die Bestimmung der OPD-Modelle sind in Tabelle A5 im Anhang angegeben.

Abbildung 14 C1 zeigt die aus der Konstante K abgeleitete PAD-Halbwertszeit der verschiedenen Analyten, welche charakteristisch für den individuellen Signalabfall eines jeden Analyten war. Die bestimmten Werte für K und die abgeleitete PAD-Halbwertszeit schwankten nur geringfügig zwischen den beiden gemessenen Sequenzen (vgl. Abb. A6) und blieben im Verhältnis zueinander relativ konstant. In beiden Sequenzen zeigte D-Mannitol die höchste PAD-Halbwertszeit. Die Hexosen Mannose, Glucose und Galactose zeigten eine niedrigere PAD-Halbwertszeit im Vergleich zu den Pentosen Arabinose und Xylose. Fructose, Fucose und Rhamnose wiesen ähnliche Werte verglichen mit den Pentosen auf. Galacturonsäure zeigte stets höhere Werte als Glucuronsäure. Die PAD-Halbwertszeiten von Oligosacchariden zeigten tendenziell einen Abfall bei steigendem DP für COS, LOS, MOS und zu einem gewissen Grad auch für XOS. M_3 stellte einen Ausreißer mit verhältnismäßig niedriger und X_3 einen Ausreißer mit relativ hoher PAD-Halbwertszeit innerhalb der jeweiligen Oligosaccharidtypen dar.

Die Auswirkungen der Unterschiede im PAD-Signalabfall werden bei einer Normalisierung über den internen Standard D-Mannitol sichtbar. So kann der Korrekturfaktor des PAD-Signalabfalls eines Analyten nicht notwendigerweise auf einen anderen Analyten übertragen werden, wie nachfolgend am Beispiel von D-Mannitol und X_5 gezeigt (Abb. 14 C2): Eine D-Mannitol-basierte Normalisierung von X_5 bei Injektion 30 und 60 ($Y_{D-Mannitol,(x=30)} = 58.3 \%$, $Y_{X_5,(x=30)} = 38.2 \%$; $Y_{D-Mannitol,(x=60)} = 33.4 \%$, $Y_{X_5,(x=60)} = 14.1 \%$) resultiert in einem Wert, der für Injektion 30 etwa 35 % und für Injektion 60 etwa 58 % niedriger ist als der echte Wert. Dieser Effekt kann nur umgangen werden, indem ein interner Standard verwendet wird, der eine ähnliche PAD-Halbwertszeit aufweist, wie der zu messende Analyt. In Abhängigkeit von Anzahl und struktureller Zusammensetzung der Analyten, können die PAD-Halbwertszeiten der Analyten in einer Probe stark variieren, sodass es schwierig sein kann, einen passenden internen Standard zu finden, dessen PAD-Halbwertszeit zu allen Analyten kompatibel ist.

Einfluss des PAD-Signalabfalls auf die Messung einer Standardgeraden

Die Auswirkungen des PAD-Signalabfalls zeigen sich insbesondere bei der Messung einer Standardgerade, wie am Beispiel der Analyten C_2 , L_2 , M_2 und X_2 für Seq 1 in Abbildung 15 A gezeigt. Konzentrationsstufe 5 wurde wiederholt über den Verlauf des Experiments gemessen,

welches mit einem PAD-Signalabfall einherging (vgl. Abb. 14 B, schwarze Kreuze) und sich in den Standardgeraden als Messschwankung zeigt (Abb. 15 A). Die zunehmend sinkende PAD-Sensitivität gegen Ende der Messsequenz resultierte in niedrigeren AUC-Werten unabhängig von der gemessenen Analytkonzentration. Dieser Effekt war am stärksten für höhere Analytkonzentrationen sichtbar, da die Kalibriergerade in aufsteigender Reihenfolge der Analytkonzentration gemessen wurde.

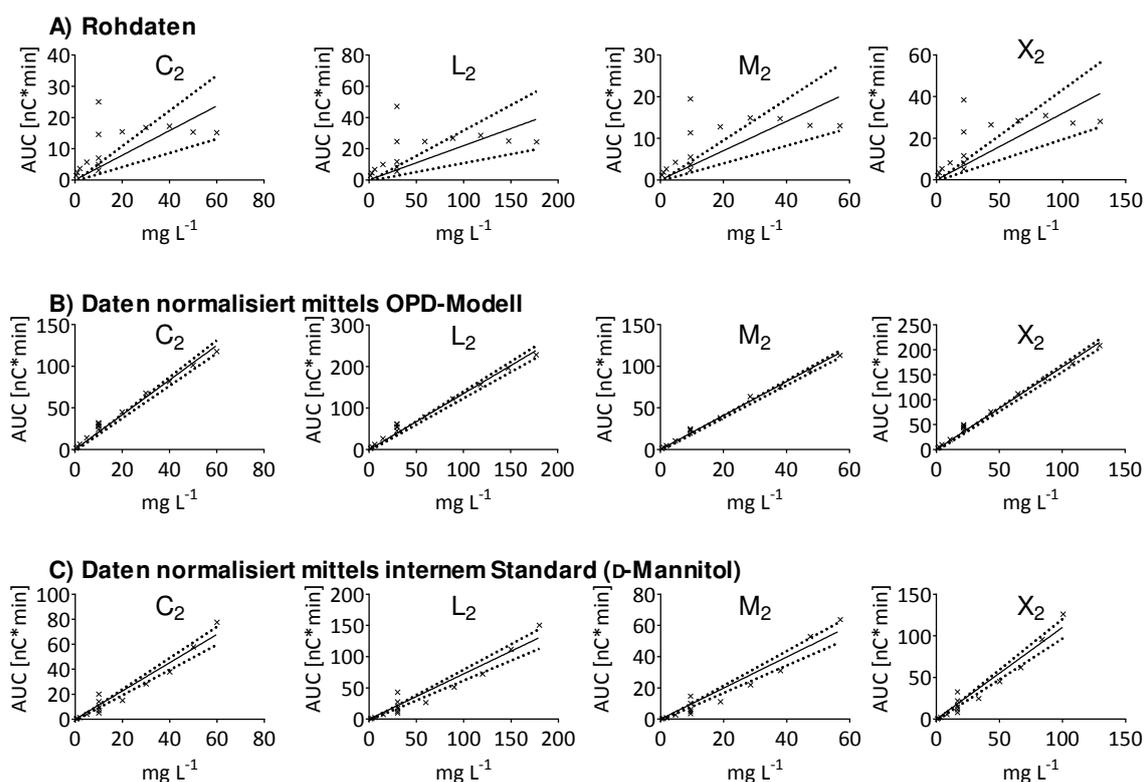


Abb. 15 Vergleich der Datennormalisierung über eine Zerfallskinetik erster Ordnung (OPD) und über ISTD für C_2 , L_2 , M_2 und X_2

(A) Rohdaten und abgeleitete Standardgeraden für C_2 , L_2 , M_2 und X_2 (Konfidenzintervall: 95 %). (B) OPD-normalisierte Daten und abgeleitete Standardgeraden (Konfidenzintervall: 95 %). (C) ISTD-normalisierte Daten und abgeleitete Standardgeraden (Konfidenzintervall: 95 %). Weitere OPD- und ISTD-normalisierte Daten der übrigen Analyten für Seq 1 und 2 finden sich in Abb. A7-10 im Anhang.

Um den Effekt des PAD-Signalabfalls auszugleichen, wurden zwei unterschiedliche Ansätze zur Normalisierung durchgeführt. Abbildung 15 B zeigt eine Normierung der Daten über das berechnete OPD-Modell. Die hierdurch transformierten Daten zeigten für alle 35 Analyten eine Standardgerade mit einem durchschnittlichen Bestimmtheitsmaß von 0,983 für Seq 1 und 0,974 für Seq 2 (für Details, siehe Tab. A6). Abbildung 15 C zeigt eine Normierung über den in jeder Probe mitgemessenen ISTD. Hierbei wurde ein geringeres Bestimmtheitsmaß von 0,941 in Seq 1 und 0,733 in Seq 2 erreicht. Während die Werte für Konzentrationsstufe 5 für die Normierung über das berechnete OPD-Modell nur marginal streuten, zeigten die über ISTD-normalierten Werte eine signifikante Streuung mit negativen Residuen zu Beginn der Messsequenz und positiven Residuen am Ende der Messsequenz.

Die gerichtete Abweichung der ISTD-normalisierten Daten von der Geradenform kann aus dem Unterschied der PAD-Halbwertszeiten der Analyten und des ISTD abgeleitet werden und ist in Gleichung 10-13 angegeben. In diesen Gleichungen beschreibt $AUC_{i,x}$ das gemessene Detektorsignal, c_i die Analytkonzentration, $m_{i,x}$ die Sensitivität des Detektors gegenüber Änderungen der Analytkonzentration, $Y_{i,x}$ den Sensitivitätsabfall des Detektors unabhängig von der Analytkonzentration und $\frac{AUC_{i,x,ISTD-norm}}{AUC_{i,x,OPD-norm}}$ den relativen Fehler einer Normierung über ISTD gegenüber einer Normierung über OPD-Modell für die Analyten i und Injektionen x .

$$AUC_{i,x,OPD-norm} = c_i * m_{i,x} * Y_{i,x} \quad (\text{Gleichung 10})$$

$$AUC_{i,x,ISTD-norm} = c_i * m_{i,x} * Y_{ISTD,x} \quad (\text{Gleichung 11})$$

$$\frac{AUC_{i,x,ISTD-norm}}{AUC_{i,x,OPD-norm}} = \frac{Y_{ISTD,x}}{Y_{i,x}} \quad (\text{Gleichung 12})$$

Basierend auf Gleichung 8 und $Y_{i,(t=0)} = 100\%$ kann Gleichung 12 zu Gleichung 13 vereinfacht werden.

$$\begin{aligned} \frac{AUC_{i,x,ISTD-norm}}{AUC_{i,x,OPD-norm}} &= \frac{Y_{ISTD,x}}{Y_{i,x}} = \frac{Y_{ISTD,(x=0)} * e^{-K_{ISTD}*x}}{Y_{i,(x=0)} * e^{-K_i*x}} && (\text{Gleichung 13}) \\ &= \frac{Y_{ISTD,(x=0)}}{Y_{i,(x=0)}} * e^{x*(K_i - K_{ISTD})} = e^{x*(K_i - K_{ISTD})} \end{aligned}$$

Dadurch, dass x und K_i immer positiv sind und für die untersuchten Analyte $K_i > K_{ISTD}$ gilt (vgl. Abb. 14 C1 und Abb. A6), ist der Exponent in Gleichung 13 stets positiv. Durch diesen Zusammenhang konnte die Beobachtung, dass die ISTD-basierte Normierung bei allen Analyten mit zunehmender Länge der Messsequenz zu steigenden Residuen führte (vgl. Abb. 15 C), erklärt werden.

Vergleich der PAD-Sensitivitäten unterschiedlicher Analyten

Um die individuelle Veränderung der PAD-Sensitivität verschiedener Analyte über die Zeit bzw. über die Messsequenz $m_{i,x}$ zueinander vergleichen zu können, wurden die PAD-Sensitivitäten der Analyten jeweils gegen die PAD-Sensitivität von Glucose normiert. Abbildung 16 zeigt die über Gleichung 14 ermittelte PAD-Sensitivität verschiedener Analyten $m_{i,x}$ geteilt durch die PAD-Sensitivität von Glucose $m_{i,Glucose}$ für drei Zeitpunkte bzw. Injektionen ($x = 1$; $x = 30$; $x = 60$) über den Verlauf von Seq 1.

$$m_{i,x} = m_{i,(x=0),OPD-norm} * \frac{AUC_{i,(x=0)}}{CF_{i,(x=0)}} * Y_{i,x} \quad (\text{Gleichung 14})$$

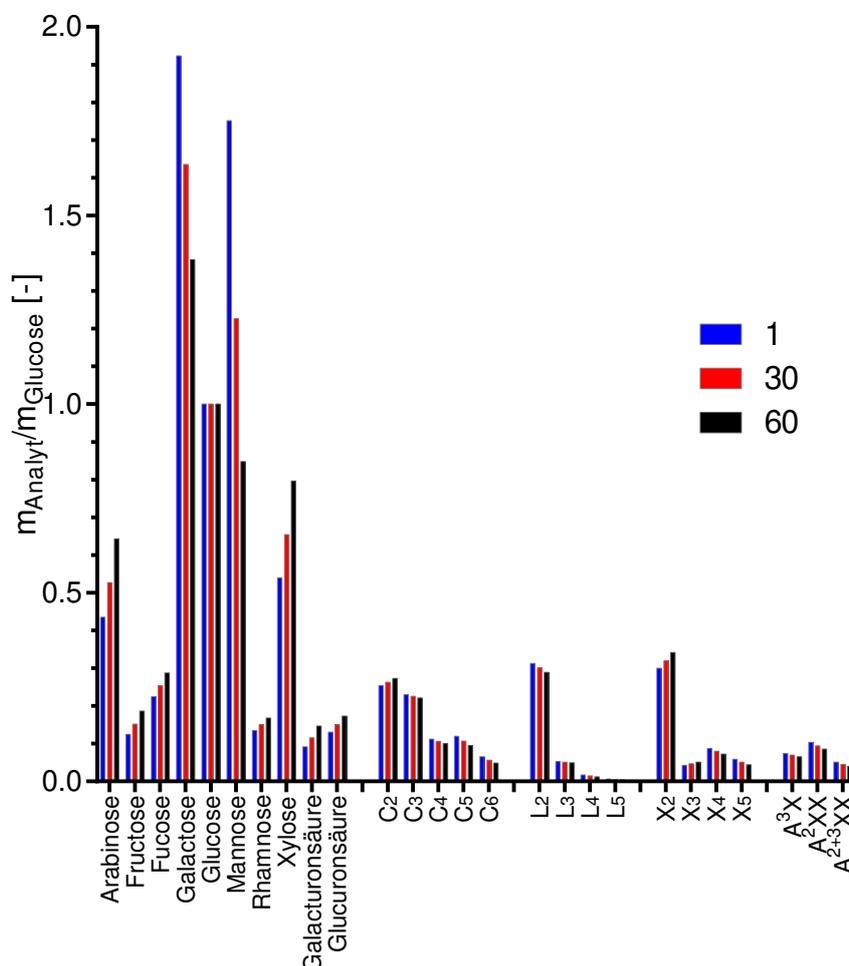


Abb. 16 PAD-Sensitivität verschiedener Analyten über die Zeit verglichen mit Glucose

PAD-Sensitivität von verschiedenen getesteten Analyten in Seq 1 für die Injektionen 1, 30 und 60 im Vergleich zu Glucose.

Alle Analyten, die höhere PAD-Halbwertszeiten aufwiesen als Glucose, zeigten steigende Werte und alle Werte, die niedrigere PAD-Halbwertszeiten aufwiesen als Glucose, fallende Werte über den Verlauf der Messsequenz. Gemittelt war die Reihenfolge der PAD-Analysensensitivitäten für Monosaccharide wie folgt: Erst die Hexosen Galactose, Glucose, Mannose; dann die Pentosen Arabinose und Xylose, und letztlich die weiteren Zucker Fructose und Fucose, sowie die Uronsäuren Galacturonsäuren und Glucuronsäure auf einem ähnlichen Level. Im Unterschied zu den Monosacchariden war die PAD-Sensitivität für Oligosaccharide erheblich niedriger und nahm mit steigendem Polymerisationsgrad für COS, LOS und XOS ab. Dies galt sowohl für eine über Massenkonzentration ($nC \cdot L/mg$) als auch für eine über molare Konzentration dargestellte Sensitivität ($nC/\mu M$) der Analyten (vgl. Abb. A11 und A12).

3.3 Herstellung von XOS und AXOS aus Arabinoxylan

3.3.1 Charakterisierung von Xylanasen

Übersicht über untersuchte Xylanasen

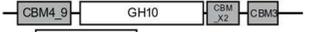
Endoxylanasen sind das zentrale Element für die enzymatische Herstellung von XOS und AXOS aus Arabinoxylan. Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine *Toolbox* an unterschiedlichen Xylanasen erarbeitet, mit dem Ziel, gezielt Oligosaccharide herstellen (Aktivität A, vgl. Kapitel 3.1.2) und modifizieren (Aktivität B) zu können. Eine Übersicht über die hierbei untersuchten Xylanasen ist in Tabelle 23 gegeben.

Von den 30 untersuchten Xylanasen enthielten 19 Enzyme ein GH10- und 9 Enzyme ein GH11-Modul. Das GH11-Modul war üblicherweise kleiner als das GH10-Modul und trat weniger oft mit CBM-Modulen assoziiert auf als GH10-Module (GH11: 5 von 9; GH10: 13 von 19). Dies zeigte sich ebenfalls in der Größenverteilung der Xylanasen: Die Hälfte der untersuchten GH11-Xylanasen hatte ein Molekulargewicht von unter 40 kDa und die Enzyme waren durchgehend kleiner als die kleinste GH10-Xylanase (42 kDa). Insgesamt wiesen 20 der 30 Xylanasen ein CBM-Modul auf, wobei es sich hierbei fast ausschließlich um die Module CBM6 und CBM4 Subfamilie 9 handelte. Während CBM6-Module gleichmäßig auf GH10- und GH11-Xylanasen verteilt waren, waren CBM4-Module der Subfamilie 9 ausschließlich mit GH10-Xylanasen assoziiert.

Tab. 23 Übersicht über die untersuchten Xylanasen

Organismus	Bezeichnung im Rahmen dieser Arbeit	Lokus	MW [kDa]	Struktur	Referenzen
<i>C. thermocellum</i>	ct-Xyn11A	Cthe_2972	74		Hayashi et al. (1999)
	ct-Xyn10C	Cthe_1838	70		Hayashi et al. (1997)
	ct-Xyn10D	Cthe_2590	72		Khan et al. (2010)
	ct-Xyn10Y	Cthe_0912	120		Gonçalves et al. (2015)
	ct-Xyn10Z	Cthe_1963	92		Khan et al. (2013)
	ct-Xyl5A	Cthe_2193	103		Zverlov et al. (2005)
	ct-Xyn30A	Cthe_3012	71		Blum et al. (2000)
	cs-Xyn11A	Cst_c19320	68		Grépinet et al. (1988)
	cs-Xyn10B	Cst_c07090	42		Blum et al. (2000)
	cs-Xyn10C1	Cst_c06620	114		Gonçalves et al. (2015)
<i>C. sterco-rarium</i>	Cst_c04930 (GH10)	Cst_c04930	58		Khan et al. (2013)
	Cst_c07550 (GH10)	Cst_c07550	49		Correia et al. et al. (2011)
	Cst_c10410 (GH105)	Cst_c10410	41		Labourel et al. (2016)
<i>Hb. hemi-cellulo-silytica</i>	hh-Xyn10A	T355_1554	78		Verma und Goyal (2014)
	hh-Xyn10B	T355_2050	48		Adelsberger et al. (2004)
	hh-Xyn10C	T355_698	59		Schwarz et al. (1990)
	hh-Xyn10D	T355_905	48		Fukumura et al. (1995)
	hh-Xyn11E	T355_1528	39		Adelsberger et al. (2004)
	hh-Xyn11F	T355_269	21		Schwarz et al. (1990)
	<i>Hv. saccin-cola</i>	SR1_339 (GH10)	SR1_339	73	
SR1_560 (GH11/11)		SR1_560	88		Diese Arbeit
SR1_565 (GH11)		SR1_556	67		Diese Arbeit
SR1_1204 (GH11)		SR1_1204	26		Diese Arbeit

Tab. 23 Übersicht über die untersuchten Xylanasen (Fortsetzung)

Organismus	Bezeichnung im Rahmen dieser Arbeit	Lokus	MW [kDa]	Struktur	Referenzen
<i>Hv. saccharicola</i>	SR1_1272 (GH10)	SR1_1272	163		Diese Arbeit
	SR1_1331 (GH11)	SR1_1331	24		Diese Arbeit
	SR1_1618 (GH10)	SR1_1618	65		Diese Arbeit
	SR1_2412 (GH10/11)	SR1_2412	87		Diese Arbeit
	SR1_2659 (GH10)	SR1_2659	120		Diese Arbeit
<i>C. cellulosi</i>	CCDG5_1677 (GH10)	CCDG5_1677	84		Diese Arbeit
	CCDG5_1852 (GH10)	CCDG5_1852	74		Diese Arbeit

Sofern Enzyme in der Literatur bereits erwähnt und benannt wurden, wurde die Benennung übernommen und mit einem Kürzel für den Ursprungsorganismus und jeweils die involvierten GH-Familien hinzugefügt. Wurde ein Enzym in der Literatur bisher noch nicht erwähnt oder benannt, wurde der Lokus mit der jeweiligen GH-Familie in einer Klammer dahinter als Bezeichnung verwendet.

Die angegebene strukturelle Annotation beruht auf der Analyse der Aminosäuresequenz des nativen Proteins. Das angegebene Molekulargewicht (MW) bezieht sich hingegen auf das Molekulargewicht des klonierten und exprimierten Proteins (ohne Signalpeptid, mit His-Tag). Für die strukturelle Annotation wurden nur GH- (weiße Kästen), CBM- (dunkelgraue Kästen), CE- (hellgraue Kästen) und Dockerin-Module (schwarze Kästen) berücksichtigt, und relativ zu ihrer Position in der Aminosäuresequenz auf dem Proteinrückgrat positioniert.

Optimale Reaktionsbedingungen

Für eine effiziente Verwendung von Xylanasen zur Herstellung von XOS und AXOS war es notwendig, die optimalen Reaktionsbedingungen zu finden, bei denen die Enzyme die höchste Aktivität zeigten. Alle untersuchten Xylanasen stammen aus Bakterien mit ähnlichen optimalen Wachstumsbedingungen zwischen 55-60 °C und pH 6-7 (Koeck, 2015). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Temperatur- und pH-Optimum der Xylanasen aus *Hb. hemicellulosilytica* stellvertretend für alle weiteren in dieser Arbeit untersuchten thermostabilen Xylanasen bestimmt. Die optimalen Reaktionsbedingungen der Xylanasen und ihre Aktivität bei optimalen Bedingungen sind in Tabelle 24 aufgezeigt.

Tab. 24 Optimale Reaktionsbedingungen und Aktivitäten der Xylanasen aus *Hb. hemicellulosilytica*

Name	T _{opt} [°C]	Temperatur-Toleranz [°C]	pH _{opt}	pH-Toleranz	Aktivität bei optimalen Bedingungen [U/mg]
hh-Xyn10A	65	60-70	6,0	5,0-7,5	66
hh-Xyn10B	45	40-50	6,0	5,5-6,5	2,5
hh-Xyn10C	62	50-65	6,0	4,5-7,5	160
hh-Xyn10D	60	45-62	6,0	4,5-7,5	271
hh-Xyn11E	57	45-65	5,5	5,0-7,0	645
hh-Xyn11F	60	43-63	5,5	5,0-6,5	43

T_{opt} = Temperatur, bei der ein Enzym die höchste Aktivität zeigt. pH_{opt} = pH-Wert, bei dem ein Enzym die höchste Aktivität zeigt. Zunächst wurde T_{opt} bei einem pH-Wert von 6,5 bestimmt. Basierend auf T_{opt} wurde anschließend pH_{opt} ermittelt. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte auf 0,5 % w/v Arabinoxylan (Weizen, mittlerer Viskosität) mittels DNSA-Assay. Die Grenzen für die Temperatur- und pH-Toleranz wurden auf 70 % der maximalen Aktivität gesetzt. Die Temperatur- und pH-Kurven zur Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen sind in Kapitel i.4 im Anhang dargestellt.

Alle untersuchten Xylanasen bevorzugten einen neutralen bis leicht sauren pH-Wert von etwa 6, unterschieden sich jedoch deutlich bei der optimalen Temperatur, welche zwischen 42-65 °C schwankte. Die GH10-Xylanasen hh-Xyn10A, hh-Xyn10C und hh-Xyn10D wiesen eine maximale Aktivität im Bereich 60-65 °C auf. Interessanterweise zeigte hh-Xyn10D, das einzige der drei Enzyme ohne CBM-Modul, die höchste Aktivität von 271 U/mg, welches 4,1fach höher als bei hh-Xyn10A (66 U/mg) und 1,7fach höher als bei hh-Xyn10C (160 U/mg) war. Für die GH11-Xylanasen hh-Xyn11E und hh-Xyn11F wurden ähnliche Temperatur- und pH-Optima wie für GH10-Xylanasen bei pH 6 und 57 °C bzw. 60 °C ermittelt. hh-Xyn11E zeigte unter den getesteten Xylanasen mit 645 U/mg die höchste Aktivität, welche doppelt so hoch war wie die der aktivsten GH10-Xylanase (271 U/mg, hh-Xyn10D).

Aktivität auf Oligosaccharide

Zur Herstellung von Oligosacchariden reicht die Betrachtung der Höhe der spezifischen Aktivitäten der Enzyme auf Polysaccharide allein nicht aus. Es ist zusätzlich wichtig, das genaue Substrat- und Produktspektrum der Xylanasen zu ermitteln. Diese Eigenschaft bestimmt, welche Oligosaccharide mit den Enzymen produziert werden können. Mit diesem Hintergrund

wurde im Verlauf dieser Arbeit das Substrat- und Produktspektrum verschiedener Xylanasen für den Abbau von XOS und AXOS untersucht. Hierfür wurden die Xylanasen mit den jeweiligen Oligosacchariden bei ihren optimalen Reaktionsbedingungen (falls bekannt, sonst bei 60 °C und pH 6,5) über Nacht inkubiert und die Hydrolyseprodukte über HPAEC-PAD analysiert. Das hierbei bestimmte Substrat- und Produktspektrum der untersuchten Xylanasen ist in Tabelle 25 dargestellt.

Tab. 25 Substrat- und Produktspektren von Xylanasen auf XOS und AXOS

Gruppe	Enzym	X ₅	A ³ X	A ² XX	XA ² XX	XA ³ XX	XA ²⁺³ XX	A ²⁺³ XX
1	GH11: hh-Xyn11E, hh-Xyn11F, ct-Xyn11A, cs-Xyn11A, SR1_1204, SR1_1331, SR1_560, SR1_565 GH105: Cst_c10410	X+X ₂ +X ₃ **	-	-	-	-	-	-
2a	GH10: hh-Xyn10A, hh-Xyn10C, ct-Xyn10D, ct-xyn10Z, ct-Xyn10Y, cs-Xyn10C1, SR1_618, SR1_2412, SR1_2659	X+X ₂ +X ₃ **	-	-	-		-	-
2b	GH10: hh-Xyn10D, cs-Xyn10B	X+X ₂ +X ₃ **	-	-				-
3	GH10: hh-Xyn10B, ct-Xyn10C, Cst_c07550	X+X ₂	-					

- = kein Abbau; * = unvollständiger Abbau bzw. nur geringe Aktivität; ** = je nach Enzym unterschiedliche Produktverteilung von X, X₂ und X₃; Pfeil = enzymatische Abspaltung in Richtung des nicht-reduzierenden Endes ausgehend von einer Arabinosylierung (schwarz) oder des reduzierenden Endes (rot) ausgehend von einer Arabinosylierung. Insgesamt wurden 25 verschiedene Xylanasen dazu verwendet, jeweils 7 verschiedene Oligosaccharide zu hydrolysieren. 20 mg/L des jeweiligen Oligosaccharids bzw. 40 mg/L des Oligosaccharidgemischs (XA²XX/XA³XX) wurden mit 2 mg/L des jeweiligen Enzyms falls bekannt bei dessen optimalen Reaktionsbedingungen, sonst bei 60 °C über Nacht inkubiert. Die Hydrolyseprodukte wurden mittels HPAEC-PAD und Vergleich der Retentionszeiten mit Oligosaccharidstandards oder Werten aus der Literatur ermittelt. Basierend auf den Hydrolyseprodukten wurden die eingesetzten Enzyme in Gruppen eingeteilt (erste Spalte). Weitere getestete Enzyme, die bei den gewählten Bedingungen keine Aktivität zeigten: Cst_c04930 und ct-Xyl5A. Enzyme aus Tabelle 23, die nicht getestet wurden: CCDG5_1677 (GH10), CCDG5_1852 (GH10), SR1_1272 (GH10), SR1_339 (GH10), Ct-Xyn30A

Es wurden insgesamt 25 der 30 untersuchten Xylanasen auf die Oligosaccharide X₅, A³X, A²XX, XA²XX, XA³XX, XA²⁺³XX und A²⁺³XX getestet. Für 23 Enzyme wurde eine Aktivität auf Oligosaccharide nachgewiesen und die Enzyme wurden basierend auf der Art der Aktivität in vier Gruppen aufgeteilt: Gruppe 1, Gruppe 2a, Gruppe 2b und Gruppe 3.

Alle untersuchten GH11-Xylanasen hatten ein sehr ähnliches Substratspektrum und wurden daher zu einer Gruppe (Gruppe 1) zusammengefasst. Für Enzyme dieser Gruppe wurde eine Aktivität auf XOS, aber nicht auf AXOS nachgewiesen. Das Enzym Cst_c10410 (GH105) wies ebenfalls nur auf unsubstituierten XOS, aber nicht auf AXOS eine Aktivität auf und wurde daher

ebenfalls Gruppe 1 zugeordnet. Generell war die Aktivität dieses Enzyms erheblich geringer als die Aktivitäten der GH11-Xylanasen.

Alle getesteten GH10-Xylanasen konnten neben XOS auch verschiedene AXOS hydrolysieren, wobei die Position der Hydrolyse stark von der Substitutionsstruktur des Oligosaccharids abhing. GH10-Xylanasen der Gruppen 2a und 2b waren nicht in der Lage, bei den getesteten AXOS das XOS-Rückgrat ausgehend von der Position der Arabinosylierung in Richtung des reduzierenden Endes des Oligosaccharids zu hydrolysieren. Stattdessen spalteten diese Enzyme endständige Xylosen ausgehend von der Position der Arabinosylierung in Richtung des nicht-reduzierenden Endes des Oligosaccharids (schwarze Pfeile) ab. Hierbei zeigten sich allerdings Unterschiede zwischen den Xylanasen der Gruppen 2a und 2b: Xylanasen der Gruppe 2a konnten die endständige Xylose am nicht-reduzierenden Ende vom Oligosaccharid XA^3XX , nicht aber von den Oligosacchariden XA^2XX und $XA^{2+3}XX$, abspalten. Xylanasen der Gruppe 2b können auch diese zwei Oligosaccharide abbauen, wobei die Umsetzung je nach Enzym nicht zwingend vollständig war. Dies zeigte sich insbesondere beim Abbau vom doppelt-arabinosylierten Oligosaccharid $XA^{2+3}XX$.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Xylanasen der Gruppe 2 von einer Arabinosylierung an Position O-2 stärker in ihrer Aktivität gehindert wurden als durch eine Arabinosylierung an Position O-3. Im durchgeführten Experiment schien dieser Effekt bei den Xylanasen der Gruppe 2a stärker ausgeprägt zu sein als bei den Xylanasen der Gruppe 2b. Strukturell unterschieden sich die Gruppen deutlich voneinander: So waren die zwei Xylanasen der Gruppe 2b verhältnismäßig klein (42 und 48 kDa) und wiesen neben dem GH10-Modul keine weiteren funktionellen Module auf. Im Vergleich hierzu waren die 9 Xylanasen der Gruppe 2a relativ groß (Mittelwert von 90 kDa) und verfügten alle über CBM-Module (CBM6 und CBM4 Subfamilie 9).

Grundsätzlich konnten auch die Xylanasen der Gruppe 3 sowohl XOS als auch AXOS hydrolysieren. Allerdings war die Substrat- bzw. Produktspezifität dieser Enzyme anders als die der Xylanasen der Gruppe 2: Xylanasen der Gruppe 3 schnitten das XOS-Rückgrat ausgehend von der Position der Arabinosylierung nicht in Richtung des nicht-reduzierenden Endes (wie bei Gruppe 2), sondern zum reduzierenden Ende hin (rote Pfeile). Dadurch waren diese Xylanasen in der Lage, auch die Oligosaccharide A^2XX und $A^{2+3}XX$ abzubauen, wozu die Xylanasen der Gruppe 2 nicht in der Lage waren. Strukturell wiesen zwei von den drei Enzymen keine CBM-Module auf und hatten mit 42 und 48 kDa ein eher niedriges Molekulargewicht für Xylanasen der GH10-Familie.

Verglichen mit den GH10-Xylanasen der Gruppe 2 wiesen die GH10-Xylanasen der Gruppe 3 tendenziell eine vergleichsweise niedrige spezifische Aktivität auf Polysaccharidsubstrate auf. So zeigte hh-Xyn10B (Gruppe 3) eine Aktivität von lediglich 2,5 U/mg, während hh-Xyn10A, hh-Xyn10C und hh-Xyn10D mit 66 U/mg, 160 U/mg und 271 U/mg eine 20 bis 100fach höhere spezifische Aktivität aufwiesen. Auch für die anderen GH10-Xylanasen der Gruppe 3 wurde qualitativ eine ähnlich niedrige Aktivität im Vergleich zu den GH10-Xylanasen der Gruppe 2 beobachtet. Die Ergebnisse legen somit nahe, dass eine isolierte Betrachtung der Höhe der spezifischen Aktivität von Enzymen auf Polysaccharide nicht zwingend ausreicht, um ihren biotechnologischen Nutzen im Hemicelluloseabbau einschätzen zu können.

3.3.2 Charakterisierung von α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen

Übersicht über untersuchte α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen

α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen sind wichtige Hilfsmittel für die enzymatische Herstellung und Modifizierung von XOS und AXOS. So können α -Arabinofuranosidasen z. B. dafür eingesetzt werden, um durch Xylanasen hergestellte AXOS in XOS zu überführen (Aktivität C, vgl. Kapitel 3.2.1) bzw. für Xylanasen überhaupt erst zugänglich zu machen. β -Xylosidasen könnten hingegen dafür verwendet werden, um gezielt Xylosen von AXOS abzuspalten (Aktivität B). Tabelle 26 enthält eine Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen.

Von den zwölf untersuchten α -Arabinofuranosidasen wiesen fünf GH43-Module und sieben GH51-Module auf. GH43-Module dieser Enzyme hatten meist ein kleineres Molekulargewicht als GH51-Module. Dennoch verfügten GH43- α -Arabinofuranosidasen oft über ein höheres Molekulargewicht als GH51- α -Arabinofuranosidasen, unter anderem da erstere oft mit CBM-Modulen assoziiert vorkamen. So wiesen vier von fünf GH43- α -Arabinofuranosidasen, aber keine einzige der getesteten GH51- α -Arabinofuranosidasen, ein CBM6-Modul auf. Von den fünf untersuchten β -Xylosidasen gehörten vier der Familie GH43 und eine der Familie GH3 an.

Tab. 26 Übersicht über die untersuchten α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen

Organismus	Bezeichnung im Rahmen dieser Arbeit	Lokus	MW [kDa]	Struktur		Referenzen	
				0	250		500
α-Arabinofuranosidasen							
<i>C. thermocellum</i>	Cthe_1271 (GH43)	Cthe_1271	75				Ahmed et al. (2013)
<i>C. sterco-rarium</i>	cs-Arf51B	Cst_c06040	57				Adelsberger et al. (2004) Schwarz et al. (1995)
	Cst_c07100 (GH43)	Cst_c07100	135				Schwarz et al. (1990) Zverlov et al. (2005a)
<i>Hb. hemi-cellulosi-lytica</i>	hh-Arf51A	T355_1502	59				Mechelke et al. (2017)
	hh-Arf51B	T355_0810	57				Mechelke et al. (2017)
	hh-Arf43C	T355_2049	61				Mechelke et al. (2017)
<i>Hv. saccin-cola</i>	SR1_555 (GH43)	SR1_555	54				Diese Arbeit
	SR1_556 (GH43)	SR1_556	77				Diese Arbeit
	SR1_561 (GH51)	SR1_561	58				Diese Arbeit
<i>C. cellulosi</i>	cc-Abf51a1	CCDG5_0827	57				*
	cc-Abf51a5	CCDG5_1107	58				*
	CCDG5_1601 (GH51)	CCDG5_1601	57				Diese Arbeit
β-Xylosidasen							
<i>C. sterco-rarium</i>	Cst_c09470 (GH43)	Cst_c09470	60				Adelsberger et al. (2004) Schwarz et al. (1990)
	cs-Bxl3B	Cst_c02510	83				Adelsberger et al. (2004) Schwarz et al. (1990)
<i>Hb. hemi-cellulo-silytica</i>	hh-Xyl43A	T355_0929	38				Mechelke et al. (2017)
<i>Hv. saccin-cola</i>	SR1_1700 (GH43)	SR1_1700	83				Diese Arbeit
	SR1_2736 (GH43)	SR1_2736	62				Diese Arbeit

Sofern Enzyme in der Literatur bereits erwähnt und benannt wurden, wurde die Benennung übernommen und mit einem Kürzel für den Ursprungsorganismus und jeweils die involvierten GH-Familien hinzugefügt. Wurde ein Enzym in der Literatur bisher noch nicht erwähnt oder benannt, wurde der Lokus mit der jeweiligen GH-Familie in einer Klammer dahinter als Bezeichnung verwendet. Ausnahmen bilden Cst_c07100 (GH43) und Cst_c09470 (GH43), welche in der Literatur bzw. Datenbanken zwar erwähnt, jedoch fälschlicherweise als Xylanase XynD sowie als α -Arabinofuranosidase ArfA bezeichnet wurden. * Für cc-Abf51a1 und cc-Abf51a5 liegt zwar eine Enzymbezeichnung vor (CaZY-Datenbank), jedoch wurde keine Referenz für die Charakterisierung der Enzyme gefunden.

Die angegebene strukturelle Annotation beruht auf der Analyse der Aminosäuresequenz des nativen Proteins. Das angegebene Molekulargewicht (MW) bezieht sich hingegen auf das Molekulargewicht des klonierten und exprimierten Proteins (ohne Signalpeptid, mit His-Tag). Für die strukturelle Annotation wurden nur GH- (weiße Kästen), CBM- (graue Kästen) und Dockerin-Module (schwarze Kästen) berücksichtigt, und relativ zu ihrer Position in der Aminosäuresequenz auf dem Proteinrückgrat positioniert.

Optimale Reaktionsbedingungen

Von den zwölf α -Arabinofuranosidasen und fünf β -Xylosidasen der Enzym-*Toolbox* wurden lediglich von den Enzymen aus *Hb. hemicellulosilytica* exemplarisch die optimalen Reaktionsbedingungen ermittelt. Ähnlich wie in Kapitel 3.1.2 sollte basierend auf diesen Ergebnissen der optimale Aktivitätsbereich der Enzyme der gesamten *Toolbox* geschätzt werden.

Während bei den Xylanasen die Aktivitätsbestimmung über die Messung freigesetzter reduzierender Zucker über DNSA-Assay ermittelt wurde, erfolgte die Bestimmung der α -Arabinofuranosidase- bzw. β -Xylosidase-Aktivität über einen Assay mit chromogenen pNP-Glycosid-Substraten. Die hierbei ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 27 aufgezeigt.

Tab. 27 Optimale Reaktionsbedingungen und Aktivitäten der α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen aus *Hb. hemicellulosilytica*

Name	T _{opt} [°C]	Temperatur-Toleranz [°C]	pH _{opt}	pH-Toleranz	Aktivität bei optimalen Bedingungen [U/mg]
hh-Arf51A	42	32-52	6,0	5,5-6,5	42
hh-Arf51B	60	48-70	5,5	5,0-6,5	45
hh-Arf43C	50	40-55	6,0	5,0-7,0	2.5
hh-Xyl43A	55	48-64	6,0	5,5-6,5	5.5

T_{opt} = Temperatur, bei der ein Enzym die höchste Aktivität zeigt. pH_{opt} = pH-Wert, bei dem ein Enzym die höchste Aktivität zeigt. Zunächst wurde T_{opt} bei einem pH-Wert von 6,5 bestimmt. Basierend auf T_{opt} wurde anschließend pH_{opt} ermittelt. Bestimmung der Aktivität erfolgte über einen pNP-Assay mit pNP- α -L-Arabinofuranosid für die α -Arabinofuranosidasen und pNP- β -D-Xylopyranosid für die β -Xylosidase als Substrat. Die Grenzen für die Temperatur- und pH-Toleranz wurden auf 70 % der maximalen Aktivität gesetzt. Die Temperatur- und pH-Kurven zur Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen sind in Kapitel i.4 im Anhang dargestellt.

Wie auch bei den Xylanasen betrug der optimale pH-Wert für die getesteten α -Arabinofuranosidasen und die β -Xylosidase etwa pH 6. Für jede der untersuchten α -Arabinofuranosidasen wurde eine unterschiedliche optimale Temperatur ermittelt, welche von 42 °C (hh-Arf51A) über 50 °C (hh-Arf43C) bis zu 60 °C (hh-Arf51B) reichte. Die beiden GH51- α -Arabinofuranosidasen hh-Arf51A und hh-Arf51B zeigten ähnliche spezifische Aktivitäten von 42 und 45 U/mg, welche fast 20fach höher waren als die der α -Arabinofuranosidase hh-Arf43C (2.5 U/mg). Sowohl die spezifische Aktivität als auch die optimalen Reaktionsbedingungen der β -Xylosidase hh-Xyl43A (55 °C; 5,5 U/mg) entsprachen in etwa denen der α -Arabinofuranosidase hh-Arf43C. Weiterhin zeigten beide GH43-Enzyme einen ähnlichen Abfall in der Enzymaktivität bei einer Verwendung eines Phosphat-Citrat-Puffersystems im Vergleich zu einem Puffersystem mit Acetat und MOPS (für Details, siehe Abb. A15).

Aktivität auf Oligosaccharide

Für eine Anwendung von α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen in der Herstellung und Modifizierung von Oligosacchariden ist es essentiell, ihr genaues Substrat- und Produktspektrum zu verstehen. So können z. B. Polysaccharide verschiedene komplexe und schwer abzubauen Substitutionsstrukturen aufweisen (vgl. Kapitel 1.1.2), für deren Abbau unterschiedliche Enzyme jeweils eine unterschiedliche Eignung aufweisen können. Ähnlich verhält es sich bei der gezielten Modifikation von Oligosacchariden, bei der Enzyme je nach Oligosaccharidstruktur unterschiedliche Spezifitäten zeigen können. Analog zu den Xylanasen wurden die untersuchten α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen ebenfalls dazu verwendet, um XOS und AXOS mit bekannter Struktur selektiv abzubauen und die Hydrolyseprodukte anschließend über HPAEC-PAD zu analysieren. Die hieraus abgeleiteten Substrat- und Produktspektren der untersuchten α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen sind in Tabelle 28 dargestellt.

Tab. 28 Substrat- und Produktspektren von α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen auf XOS und AXOS

Gruppe	Enzym	X ₅	A ³ X	A ² XX	XA ² XX	XA ³ XX	XA ²⁺³ XX	A ²⁺³ XX
Arf	cst_c07100 (GH43/43), cs-Arf51B	-						
	CCDG5_1601 (GH51)	-						
	hh-Arf51A, hh-Arf51B	-					-	
	cthe_1271 (GH43), SR1_555 (GH43), CCDG5_0827 (GH51)	-					-	-
Arf mit Xyl-Nebenaktivität	hh-Arf43C, CCDG5_1107 (GH51)	-					-	
Arf/Xyl	SR1_556 (GH43)	X ₁ X ₂ +X ₃ +X ₄					-	-
Xyl	cst_c09470 (GH43)	X	-	-				-
	hh-Xyl43A, cs-Bxl3B SR1_2736 (GH43), SR1_1700 (GH43)	X	-	-		-	-	-

Arf = α -Arabinofuranosidase/ α -Arabinofuranosidase-Aktivität; Xyl = β -Xylosidase/ β -Xylosidase-Aktivität; Gestrichelte Linie = enzymatische Abspaltung der Arabinosesubstitution/en; rote Pfeile: β -Xylosidase-Nebenaktivität von α -Arabinofuranosidasen; schwarze Pfeile: β -Xylosidase-Hauptaktivität; - = kein Abbau; * = unvollständiger Abbau bzw. nur geringe Aktivität; ** = vollständige α -Arabinofuranosidase- und unvollständige β -Xylosidase-Aktivität. 15 verschiedene Enzyme wurden dazu verwendet jeweils 7 verschiedene Oligosaccharide zu verdauen. Dafür wurden 20 mg/L des jeweiligen Oligosaccharids bzw. 40 mg/L des Oligosaccharidgemischs (XA²XX/XA³XX) mit 2 mg/L des jeweiligen Enzyms, falls bekannt bei dessen optimalen Reaktionsbedingungen, sonst bei 60 °C über Nacht inkubiert. Hydrolyseprodukte wurden durch Vergleiche mit Oligosaccharidstandards und durch Vergleiche der Retentionszeiten mit Werten aus der Literatur bestimmt. Die abgeleitete Hydrolyseposition im jeweiligen Oligosaccharid wurde markiert. Basierend auf den Hydrolyseprodukten wurden die eingesetzten Enzyme in Gruppen eingeteilt. Weitere getestete Enzyme, die bei den gewählten Bedingungen keine Aktivität aufwiesen: cst_c04990 (GH43), cs-Xyl43a1, cst_c11140 (GH43), cst_c11150 (GH43), cs-Xyl43b2, cthe_2196 (GH43), cthe_0015 (GH43/54), cthe_2138 (GH43/54).

Von den getesteten **α -Arabinofuranosidasen** waren nur Cst_c07100 (GH43/43) und cs-Arf51B in der Lage, die Arabinoseseitengruppen aller getesteten AXOS abzuspalten. Die anderen α -Arabinofuranosidasen zeigten eine vergleichsweise geringe Aktivität auf die doppelt-arabinosylierten Oligosaccharide $XA^{2+3}XX$ und $A^{2+3}XX$ („X“ steht in dieser Abkürzung für eine β -1,4-verknüpfte Xyloseeinheit, „ A^{2+3} “ steht für eine Xylose mit α -Arabinosylsubstituenten an Positionen 2 und 3. Links befindet sich das nicht-reduzierende Ende des Oligosaccharids, rechts das reduzierende Ende) im Vergleich zu den einfach-arabinosylierten Oligosacchariden A^3X , A^2XX , XA^2XX und XA^3XX . Weiterhin wurde für zwei Enzyme, hh-Arf43C und CCDG_1107 (GH51), eine β -Xylosidase-Nebenaktivität auf dem Oligosaccharid A^2XX ermittelt. Das Enzym SR1_556 (GH43) wurde im Rahmen dieser Arbeit der Klasse der α -Arabinofuranosidasen zugeordnet, zeigte auf Oligosacchariden jedoch ebenfalls eine relativ starke β -Xylosidase-Aktivität.

In der Literatur werden α -Arabinofuranosidasen je nach Aktivitätsspektrum in drei Gruppen aufgeteilt: AXH-m für α -Arabinofuranosidasen, die nur einfache Arabinosylierungen, AXH-d für solche, die nur doppelte Arabinosylierungen und AXH-m,d für α -Arabinofuranosidasen, welche sowohl einfache als auch doppelte Arabinosylierungen als Substrat erkennen (Biely et al., 2016; Borsenberger et al., 2014). Der häufigste Typ der α -Arabinofuranosidasen zeigt eine AXH-m-Aktivität, wie es auch bei den untersuchten α -Arabinofuranosidasen Cthe_1271 (GH43), SR1_555 (GH43), CCDG5_0827 (GH51) zu erkennen war. Teilweise können α -Arabinofuranosidasen mit AXH-m-Aktivität zusätzlich eine unterschiedlich ausgeprägte AXH-d-Aktivität auf endständig doppelt-arabinosylierten Oligosaccharide aufweisen, wie z. B. für hh-Arf51A und hh-Arf51B gezeigt. Je nach Höhe dieser Aktivität können diese Enzyme dann prinzipiell bereits der Gruppe AXH-m,d zugerechnet werden. Die höchste Resilienz gegenüber einem enzymatischen Abbau zeigen nicht-endständig doppelt-arabinosylierte Oligosaccharide. So vermochten im Rahmen dieser Arbeit nur zwei Enzyme, Cst_c07100 (GH43/43) und cs-Arf51B, das Oligosaccharid $XA^{2+3}XX$ vollständig zu X_4 abzubauen.

Die getesteten **β -Xylosidasen** zeigen im Vergleich zu den α -Arabinofuranosidasen eine weniger breite Diversität in ihrem Substrat- und Produktspektrum. So vermochten alle getesteten β -Xylosidasen, alle getesteten XOS (neben X_5 wurde auch X_4 , X_3 und X_2 getestet) zu Xylose abzubauen. Sobald die Oligosaccharide allerdings am nicht-reduzierenden Ende eine Arabinosylierung aufwiesen (A^3X , $A^{2+3}XX$, A^2XX), verloren die getesteten β -Xylosidasen die Fähigkeit, diese abzubauen. Endständige Xylosen am nicht-reduzierenden Ende von AXOS konnten je nach Enzym teilweise abgebaut werden. So konnten die Enzyme hh-Xyl43A, SR1_2736 (GH43) und SR1_1700 (GH43) die endständige Xylose am nicht-reduzierenden

Ende bei XA^2XX abspalten. cs-Bxl3B war in der Lage, zusätzlich noch die Xylose am nicht-reduzierenden Ende bei den Oligosacchariden XA^3XX und $XA^{2+3}XX$ abzuspalten. Generell zeigten die hier untersuchten β -Xylosidasen eine Präferenz für den Abbau von XA^2XX im Vergleich zu XA^3XX , während dies bei den Xylanasen genau umgekehrt war.

3.3.3 Herstellung von XOS und AXOS aus Arabinoxylan mittels Xylanasen und Charakterisierung der Produktspektren

Vergleich der Produktspektren verschiedener Enzyme mit Xylanase-Aktivität

Das Produktspektrum an Oligosacchariden, die durch Enzyme mit Xylanase-Aktivität aus Arabinoxylan freigesetzt werden können, stellt die Grundlage für die enzymatische Herstellung von XOS und AXOS aus Hemicellulose dar. Nachdem in Kapitel 3.3.2 ein grundlegendes Verständnis über die Substrat- und Produktspezifität verschiedener Xylanasen geschaffen wurde, soll in diesem Kapitel das Oligosaccharid-Produktspektrum der Xylanasen bei der Hydrolyse von Arabinoxylan aus Weizen untersucht werden. Der Vergleich der unterschiedlichen Produktspektren wurde zunächst getrennt über HPAEC-PAD und DC durchgeführt. Eine detailliertere Produktanalyse erfolgte anschließend durch eine Aufreinigung der Hydrolyseprodukte mittels präparativer DC. Die extrahierten Fraktionen wurden hierbei mittels HPAEC-PAD und MALDI-TOF vor und nach einer Hydrolyse der extrahierten Fraktionen mit einer α -Arabinofuranosidase analysiert.

Abbildung 17 zeigt die Einteilung von enzymatisch hergestellten Arabinoxylanhydrolysaten in drei Gruppen (A, B, C), wie sie durch eine Analyse mittels HPAEC-PAD unterschieden werden konnten. Zusätzlich zu den in Kapitel 3.3.1 beschriebenen GH10- und GH11-Xylanasen wurden in den Vergleich einige GH5-Enzyme (mit Ausnahme von ct-Xyl5A beides β -Glucanasen) mit Xylanase-Aktivität mit einbezogen, da sich ihr Produktspektrum deutlich von dem der anderen Xylanasen unterschied.

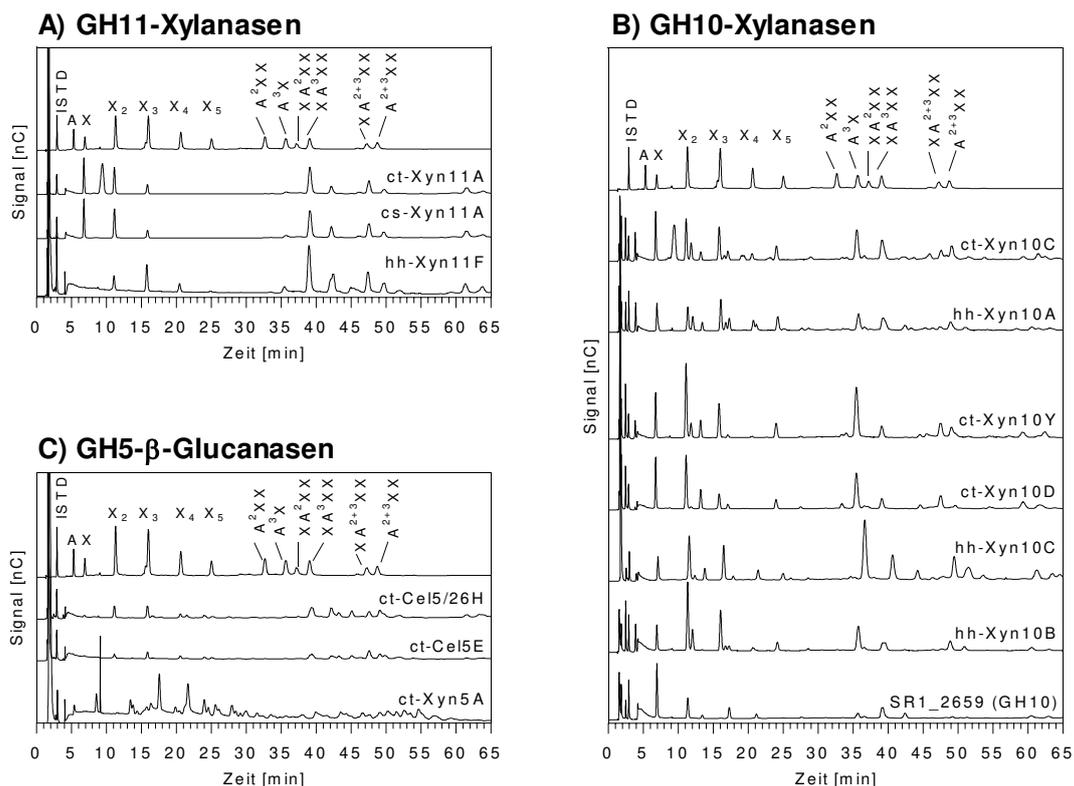


Abb. 17 HPAEC-PAD-Chromatogramme der charakteristischen Abbauspektren von Arabinoxylan aus Weizen nach einer Hydrolyse mit unterschiedlichen Enzymen mit Xylanase-Aktivität

Als Substrat wurde lösliches Arabinoxylan mittlerer Viskosität aus Weizen in einer Konzentration von 0,5 % w/v eingesetzt. Die Reaktion erfolgte bei pH 6,5 und 60 °C über Nacht. Für GH10- und GH11-Enzyme betrug die eingesetzte Enzymkonzentration 2-10 mg/L und für GH5-Enzyme 20 mg/L. Weitere getestete GH11-Xylanasen mit dem in (A) gezeigten Produktspektrum: hh-Xyn11E, SR1_560, SR1_565, SR1_1204, SR1_1331. Weitere getestete GH10-Xylanasen mit dem in (B) gezeigten Produktspektrum: ct-Xyn10Z, cs-Xyn10B, cs-Xyn10C1, hh-Xyn10D, SR1_1618, CCDG5_1852 und CCDG5_1677. Präsentierte Produktspektren von GH10-Xylanasen wurden so ausgewählt, dass die gesamte Breite der möglichen Hydrolyseprodukte gezeigt wird. Hierbei wurden komplexere Produktspektren nach oben (ct-Xyn10C) und weniger komplexe Produktspektren (SR1_2659) nach unten geordnet. Xylanasen mit einem von (A), (B) und (C) abweichendem Produktspektrum: Cst_c07550 (GH10) – α -Arabinofuranosidase-Nebenaktivität, führt zur Freisetzung von Arabinose und XOS. Peak bei 9 min beim Hydrolysat von ct-Xyn11A und ct-Xyn10C wurde als Saccharose identifiziert. Saccharose wurde für einige Enzymstammlösungen zur Stabilisierung beigesetzt. Kleinere Unterschiede in den Retentionszeiten sind auf Methoden-bedingte Schwankungen zurückzuführen.

Alle getesteten Xylanasen wiesen je nach GH-Familie ein charakteristisches Produktspektrum auf. Im Bereich zwischen 3 und 25 min fanden sich in den Chromatogrammen für GH11-Xylanasen (Abb. 17 A) fast ausschließlich XOS und Xylose. Eine Kinetik der Enzyme (Abb. A16 im Anhang) zeigte, dass sich im Laufe der Hydrolyse zu Beginn lange XOS (bis zu DP5) bildeten, welche im Laufe der Reaktion zu kurzkettigen XOS und schließlich in Teilen zu Xylose abgebaut wurden. Die Chromatogramme für die GH5-Enzyme mit Xylanase-Aktivität zeigten ebenfalls die Bildung von Produkten, deren Retentionszeiten denen von XOS entsprachen. Generell war die freigesetzte Menge an XOS im Vergleich zu GH11-Xylanasen aber erheblich niedriger. GH10-Xylanasen zeigten im Vergleich zu den GH11-Xylanasen und den GH5- β -Glucanasen ein

vergleichsweise komplexes Produktspektrum. So waren bei den entsprechenden Chromatogrammen zusätzlich zu XOS eine Vielzahl an Fingerprint-Peaks zwischen X_2 und X_3 (11-14 min) und X_3 und X_4 (15-20 min) zu erkennen.

Auch im Bereich des Chromatogramms mit Retentionszeiten zwischen 30 und 55 min unterschieden sich die Arabinoxylanhydrolysate der verschiedenen Enzymklassen deutlich voneinander. So zeigten GH11-Xylanasen z. B. einen markanten Peak bei der Retentionszeit von XA^3XX . Dieser Peak war bei GH10-Xylanasen erheblich niedriger ausgeprägt. Stattdessen zeigten GH10-Xylanasen einen Peak bei der Retentionszeit von A^3X oder A^3XX (beide Substanzen haben eine sehr ähnliche Retentionszeit, vgl. Abb. A1). Diese Ergebnisse passen zu den in Kapitel 3.3.1 aufgeführten charakteristischen Eigenschaften der GH10-Xylanasen, dass diese das Xylanrückgrat näher an einer Arabinosylierung an Position O-3 schneiden können (z. B. Abbau von XA^3XX zu A^3XX) als GH11-Enzyme. Sowohl GH11- als auch GH10-Xylanasen wiesen Peaks bei der Retentionszeit von $XA^{2+3}XX$ und $A^{2+3}XX$ auf, wobei hier kein deutlicher Unterschied zwischen den Xylanasen zu erkennen war. Eine feinere Deutung der weiteren aufgetretenen Peaks im Bereich zwischen 30 und 55 min war nur sehr begrenzt möglich, da für diese Peaks keine Strukturinformationen vorhanden waren. Basierend auf ihrer Retentionszeit kann lediglich angenommen werden, dass es sich hierbei um mindestens einfach oder sogar mehrfach-arabinosylierte AXOS handelte. Dies betraf insbesondere die Deutung der Chromatogramme der GH5-Enzyme mit Xylanase-Aktivität, welche im Vergleich zu den freigesetzten XOS besonders reich an diesen AXOS waren. Ein besonders auffälliges Produktspektrum besaß hierbei ct-Xyn5A, welches auf seine Aktivität als Arabinoxylanase zurückzuführen sein kann (Correia et al., 2011).

Bei der Analyse der Chromatogramme der Xylanasen fällt auf, dass weder A^2XX , noch XA^2XX freigesetzt wurden. Dies hängt damit zusammen, dass das hierfür notwendige Strukturelement, eine Xylose, welche am O-2, aber nicht am O-3 arabinosyliert ist, in diesem Substrat nicht vorkommt. Stattdessen sind alle einfachen Arabinosylierungen an Position O-3 der jeweiligen Xylose im Xylan-Rückgrat zu finden (McCleary et al., 2015). Es fällt weiterhin auf, dass die basierend auf der Aktivität auf Oligosacchariden unterschiedenen Aktivitätstypen der GH10-Xylanasen (Gruppe 2a, Gruppe 2b und Gruppe 3) sich nicht in einer Unterscheidung der Arabinoxylanhydrolysat-Produktspektren dieser Enzyme widerspiegeln. So zeigte ct-Xyn10C (Gruppe 3) ein ähnlich komplexes Produktspektrum wie hh-Xyn10A (Gruppe 2a). Genauso zeigte hh-Xyn10B (Gruppe 3) ein vergleichbar einfaches Produktspektrum wie hh-Xyn10C (Gruppe 2a). Interessanterweise waren die vielen Fingerprint-Peaks (Bereich: 11-20 min) der einzelnen GH10-Xylanasen verhältnismäßig spezifisch für die Enzyme und veränderten sich in ihrer Intensität im Verlauf einer Enzymkinetik kaum. Eine Ausnahme bilden jedoch Doppelpeaks

bei etwa 21 und etwa 24 min, welche sich im Verlauf einer Kinetik zu jeweils nur einem Peak reduzierten (vgl. Abbildung A16).

Die hier dargestellten Unterschiede im Produktspektrum der Xylanasen konnten auch, wie in Abbildung 18 gezeigt, durch DC analysiert werden. Auch diese Methode vermochte die charakteristischen Unterschiede im Produktspektrum der Xylanasen deutlich hervorzuheben.

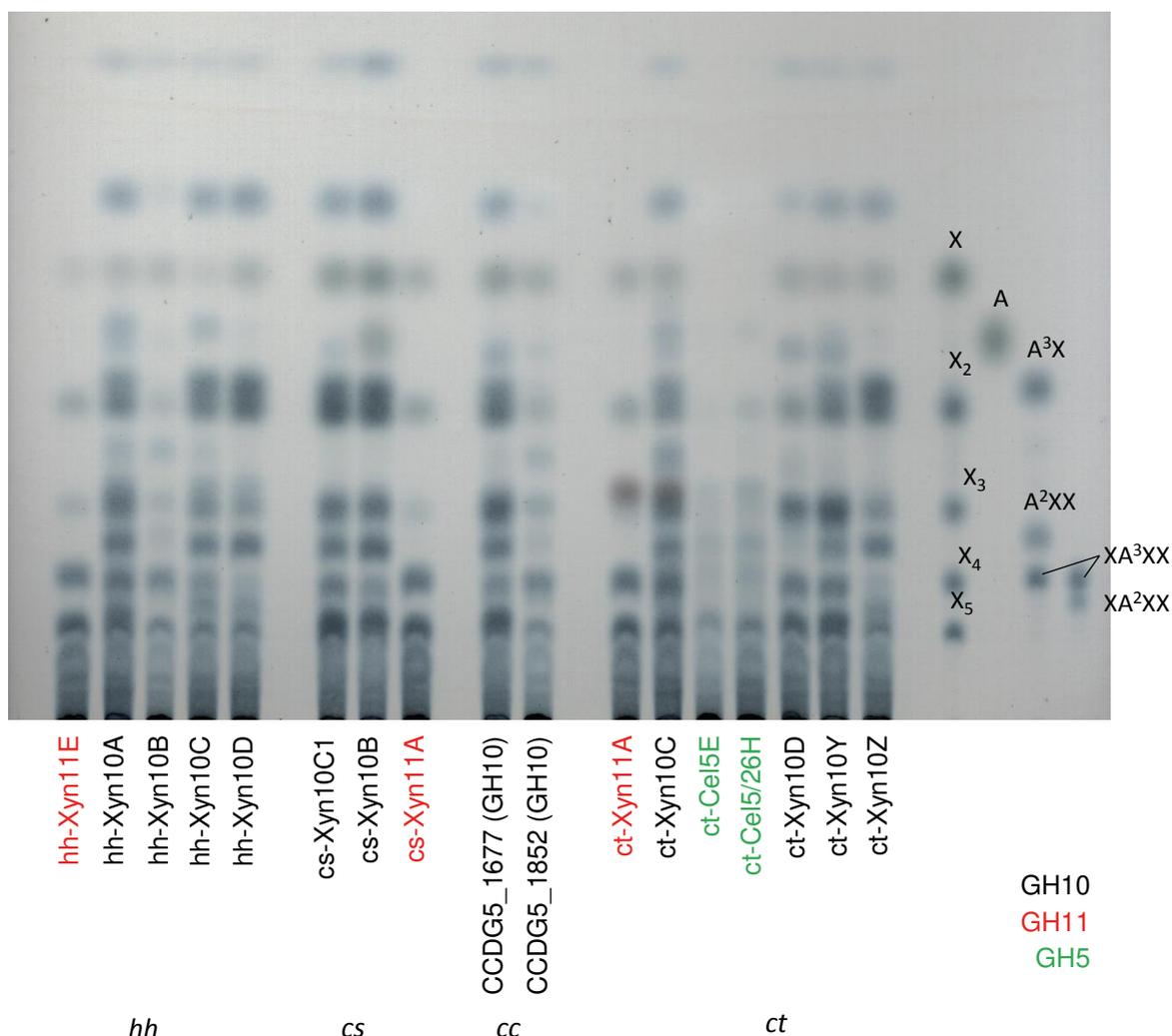


Abb. 18 DC charakteristischer Abbauspektren von Arabinoxylan aus Weizen nach einer Hydrolyse mit unterschiedlichen Enzymen mit Xylanase-Aktivität

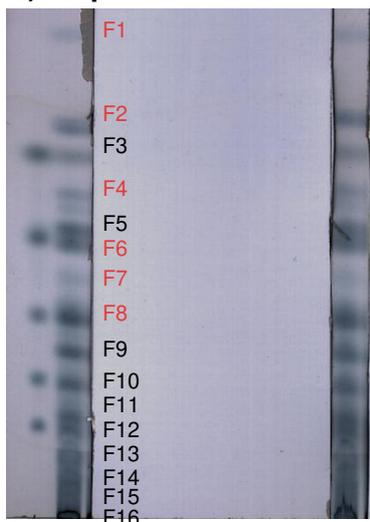
hh = *Hb. hemicellulosilytica*; cs = *C. stercorarium*; cc = *C. cellulosi*; ct = *C. thermocellum*. Als Substrat wurde Arabinoxylan aus Weizen in einer Konzentration von 0,5% w/v eingesetzt. Die Reaktion erfolgt bei 60 °C über Nacht. Für GH10- und GH11-Enzyme betrug die eingesetzte Enzymkonzentration 2-10 mg/L und für GH5-Enzyme 20 mg/L. Zur Trennung der Hydrolysate wurde Acetonitril-Wasser im Verhältnis 8:2 v/v verwendet. Rote Spots auf Höhe X₃ (ct-Xyn11A, ct-Xyn10C) stammen von Saccharose, welche zur Stabilisierung der Enzymstammflösung eingesetzt wurde.

So zeigten GH11-Xylanasen Spots im oberen Bereich des Chromatogramms nur auf Höhe der XOS, während GH10-Xylanasen auch darüber und dazwischen zahlreiche Spots aufwiesen. Ähnlich wie bei der Analyse mittels HPAEC-PAD gab es auch hier bei den GH10-Xylanasen Unterschiede bei der Verteilung und Intensität dieser für GH10 charakteristischen Spots.

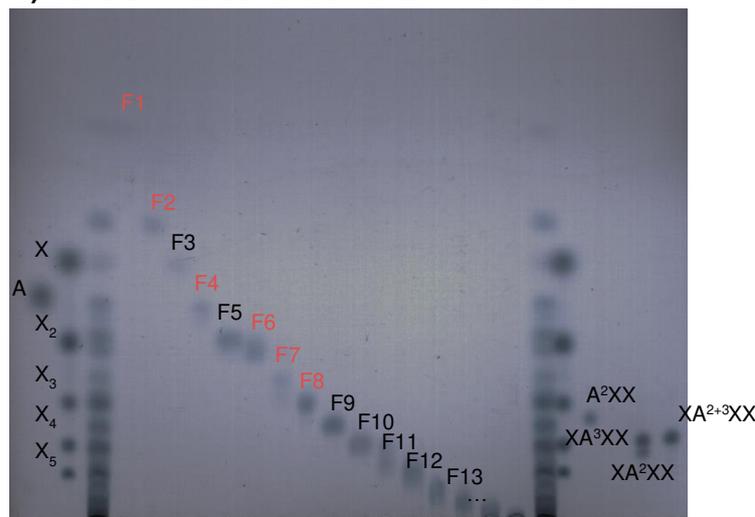
Weitere Produktanalyse mittels präparativer DC, HPAEC-PAD und MALDI-TOF

Mit dem Ziel, das Produktspektrum von GH10-Xylanasen besser zu verstehen, wurde eine präparative DC durchgeführt (siehe Abb. 19) und die extrahierten Fraktionen mittels HPAEC-PAD und MALDI-TOF weiter analysiert. Nach einer Behandlung der extrahierten Fraktionen mit hh-Arf43C wurden die Fraktionen erneut mit HPAEC-PAD und MALDI-TOF analysiert (siehe Tab. 29).

A) Präparative DC



B) Kontroll-DC der extrahierten Fraktionen



C) Zuordnung von Peaks aus HPAEC-PAD-Chromatogramm zu DC-Fractionen

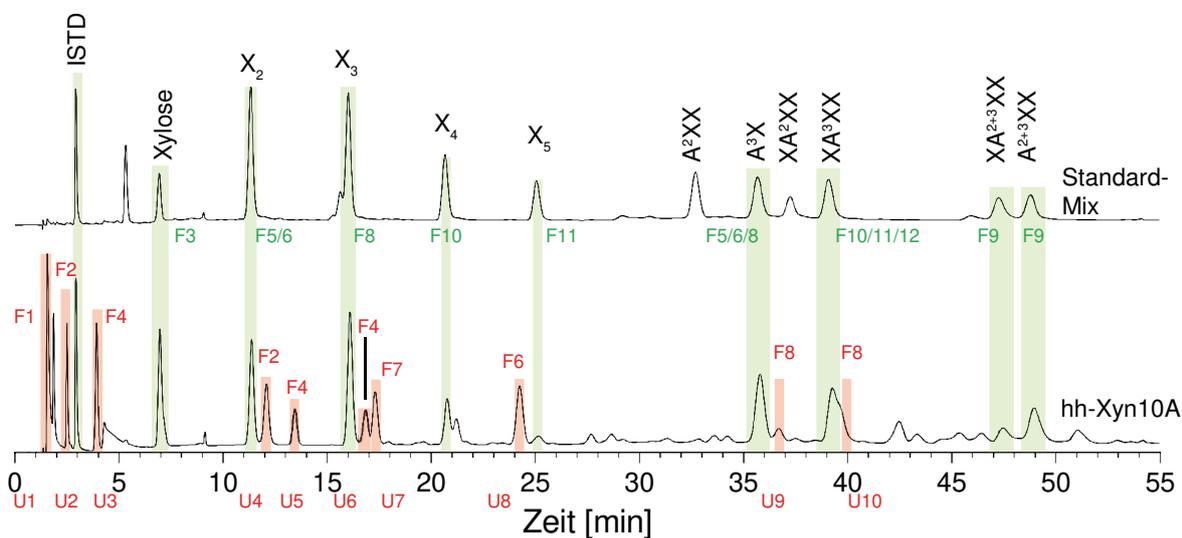


Abb. 19 Präparative DC und anschließende Analyse der extrahierten Fraktionen eines mittels hh-Xyn10A erzeugten Arabinoxylanhydrolysats

(A) Aufbau der präparativen DC. Die zwei gefärbten Streifen am Rand dienen als Orientierung zur Positionsbestimmung der zu extrahierenden Analyten. (B) DC der extrahierten und aufgereinigten Fraktionen. (C) Zuordnung von Peaks aus HPAEC-PAD-Chromatogramm zu DC-Fractionen. Rot markierte Fraktionen enthalten primär unbekannte Substanzen. Grün markierte Fraktionen enthalten primär bekannte Substanzen.

Tab. 29 Produkte nach hh-Arf43C-Behandlung der extrahierten DC-Fraktionen

Fraktion	Peaks	Produkte nach hh-Arf43C-Behandlung
F1	U1	-
F2	U2 + U4	A + U2
F4	U3 + U5 + U6	A + U3
F6	U8	A + X ₂ + U3*
F7	U7	A + X + X ₂ + X ₃ *
F8	U9+U10	A + X ₃ *

Die zweite Spalte enthält die Zuordnung der unbekannt Peaks (U) aus dem HPAEC-PAD-Chromatogramm zu den mittels präparativer DC extrahierten Fraktionen. Die dritte Spalte zeigt die Abbauprodukte nach Verdau der Fraktion mit hh-Arf43C. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass die Fraktionen Gemische von verschiedenen Analyten enthalten können. Freigesetzte XOS werden teilweise durch Dearabinosylierung von co-extrahierten bekannten Analyten (z. B. A³X, A³XX) gebildet. Sie stellen nicht zwingend ein Abbauprodukt der unbekannt Substanzen aus der zweiten Spalte dar. Die entsprechenden Zellen wurden mit einem Stern markiert.

Bei der präparativen DC wurden die Fraktionsgrenzen so gewählt, dass die getrennten Analyten vergleichsweise gut voneinander zu trennen waren, gleichzeitig aber auch eine jeweils hohe extrahierte Analytmenge erreicht wurde. Daher wurden zwei eng beieinanderliegende Spots mit verhältnismäßig niedriger Intensität in Fraktion 4 (vgl. Abb. 19 A, F4) vereint. Gleichzeitig wurden ebenso nah beieinanderliegende Analyten mit verhältnismäßig starker Intensität in unterschiedliche Fraktionen F5 und F6 getrennt. Wie in Abbildung 19 B aufgezeigt, konnten die Fraktionen zwar prinzipiell deutlich voneinander getrennt werden, jedoch gab es trotzdem vereinzelt Überlappungen zwischen den Fraktionen bezüglich der untersuchten Analyten. Dieser Effekt war stärker ausgeprägt, je näher die Fraktionen zueinander lagen, wie z. B. bei F5 und F6 oder bei Fraktionen über F10.

Nach einer HPAEC-PAD-Analyse der einzelnen Fraktionen war es möglich, die einzelnen Peaks des Chromatogramms bestimmten extrahierten DC-Fraktionen zuzuordnen. Die unbekannt, früh eluierende Substanz U1 (1,9 min) wurde der Fraktion F1 zugeordnet. U1 konnte durch eine hh-Arf43C-Behandlung von F1 nicht verdaut werden (Abb. 19 C). Die Substanzen U2 (2,6 min) und U4 (11,9 min) waren hauptsächlich in Fraktion F2 wiederzufinden. hh-Arf43C-Behandlung von F2 führte zum Abbau von U4 und zur Freisetzung von Arabinose und weiterem U2. Eine Bestimmung der Molekülmassen der Analyten in F1 und F2 mittels MALDI-TOF war nicht möglich.

In F4 wurden insgesamt 3 unbekannt Substanzen – U3: 3,9 min, U5: 12,1 min, U6: 16,9 min – nachgewiesen. Nach einer hh-Arf43C-Behandlung von F4 wurde Arabinose und eine erhöhte Konzentration von U3 gemessen. Dadurch, dass U5 und U6 zu U3 abgebaut wurden, kann angenommen werden, dass diese auf einem ähnlichen Strukturelement basieren. Da, ähnlich wie bei F1 und F2, auch bei F4 eine Bestimmung der Masse der Analyte über MALDI-TOF nicht möglich war, konnte bislang keine genauere Vorhersage der Struktur getroffen werden.

In F6 wurde neben A³X und X₂ zusätzlich U8 (24,4 min) nachgewiesen. Nach der hh-Arf43C-Behandlung von F6 wurde Arabinose, eine erhöhte Konzentration an X₂ und zusätzlich U3 detektiert. Die erhöhte Konzentration von X₂ konnte durch den Abbau von A³X erklärt werden, welches auch über MALDI-TOF nachverfolgt werden konnte (Abnahme des Signals für [Pentotriose-Na]⁺ ($m/z = 437,13$), Anstieg des Signals für [Pentobiose-Na]⁺ ($m/z = 305,08$)). U8 wurde, vermutlich unter Abspaltung von Arabinose, zu U3 abgebaut, wobei es unklar ist, ob hierbei nicht auch X₂ freigesetzt wurde. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass es sich bei U8 trotz einer sehr ähnlichen Retentionszeit zu der von X₅ nicht um dieses handelt, sondern um eine bisher unbekannte Substanz. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen U3, U5 und U6 vermutet.

In F7 wurde neben Spuren von U8 und kleinen weiteren Peaks hauptsächlich ein Peak für die unbekannte Substanz U7 (17,2 min) nachgewiesen. Durch den Verdau mit hh-Arf43C ließen sich die Peaks aus F7 zu Arabinose, Xylose, X₂, X₃ und U3 abbauen. Die Bildung von U3 war hierbei primär auf den Anteil von U8 in der unbehandelten Fraktion zurückzuführen. Eine Analyse mittels MALDI-TOF maß vor dem Verdau mit hh-Arf43C lediglich geringe Spuren einer Pentatetraose ($m/z = 596,17$) und nach dem Verdau etwas deutlicher Pentatriose ($m/z = 437,13$). Eine genaue strukturelle Zuordnung der unbekanntes Substanz U7, außer dass diese über eine α -Arabinofuranosidase abgebaut werden konnte, war basierend auf diesen Ergebnissen nicht möglich.

U9 und U10 konnten Fraktion F8 zugeordnet werden, jedoch lagen in dieser und allen weiteren Fraktionen stets komplexe Produktgemische vor. So enthielt F8 bereits einige der Substanzen, die im HPAEC-PAD Chromatogramm im Fingerprint-Bereich über 55 min erschienen. Da die Detektorsensitivität für diese längeren XOS und AXOS vergleichsweise gering ist (für Details, siehe Kapitel 3.2.3), waren diese Substanzen über HPAEC-PAD teilweise nur noch schwer nachzuweisen. Bei den weiteren Fraktionen wurden die extrahierten Oligosaccharide nicht mehr im linearen NaAcetat-Gradienten aufgetrennt, sondern erst im Spülschritt eluiert. Diese zunehmend komplexe Oligosaccharidzusammensetzung führte dazu, dass bei einer Analyse dieser Fraktionen mittels MALDI-TOF stets eine breite Verteilung an Molekülmassen für Oligosaccharide nachgewiesen wurde. Zusätzlich wurden die über MALDI-TOF gemessenen Molekülmassen für Oligosaccharide nach einer Behandlung der Fraktionen mit hh-Arf43C in ihrer Intensität erheblich stärker und die Größenverteilung der Oligosaccharide wurde breiter. So wurden bei Fraktion F15 vor der hh-Arf43C-Behandlung Oligosaccharide im Bereich DP10-14 und nach der Behandlung im Bereich DP 8-19 nachgewiesen. Bei Fraktion F16, welche der Basislinie der DC entspricht, konnte vor der hh-Arf43C-Behandlung nur DP 12-14 und nach der

Behandlung DP 10-23 nachgewiesen werden. Im Unterschied hierzu wurde im nicht aufgereinigten Arabinoxylanhydrolysat Oligosaccharide der Größe von DP2-11 gemessen.

Obwohl die hier durchgeführte Trennung und Analyse des Arabinoxylanhydrolyсата nicht direkt zu einer Strukturaufklärung der jeweiligen unbekannt Substanzen führte, stellt sie dennoch einen wertvollen Beitrag für ein besseres Verständnis über die Hydrolyseprodukte dar. So konnte eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit zwischen den Substanzen U3, U5, U6 und U8 nachgewiesen werden, da sich U5, U6 und U8 über eine α -Arabinofuranosidase partiell zu U3 abbauen ließen.

Neben dem Enzym hh-Xyn10A wurden zusätzlich auch Hydrolysate der Enzyme hh-Xyn10C und hh-Xyn10D untersucht. Hierbei zeigte sich dieselbe Verteilung der unbekannt Substanzen auf die extrahierten DC-Fractionen und auch die MALDI-TOF- und HPAEC-PAD-Analysen vor und nach einer hh-Arf43C-Behandlung führten jeweils zu vergleichbaren Ergebnissen. Die gleiche Vorgehensweise für die Untersuchung von Oligosacchariden wurde für die Produktspektren von hh-Xyn11E und cs-Xyn11A angewendet. Hierbei konnten jedoch keine unbekannt Analytpeaks bestimmten DC-Fractionen zugeordnet werden.

3.3.4 Herstellung von XOS mittels Xylanasen und α -Arabinofuranosidasen

Nachdem in den vorherigen Kapiteln die verfügbare Enzym-*Toolbox* und ihr Potential zur Oligosaccharidherstellung und -modifizierung genau beleuchtet wurde, soll die Enzym-*Toolbox* in diesem Kapitel dazu verwendet werden, verschiedene XOS- und AXOS-Produktmischungen herzustellen.

Prinzipiell wurde bereits sowohl für XOS als auch AXOS eine präbiotische Wirkung nachgewiesen (Broekaert et al., 2011). Dennoch wird in der Literatur oft der Fokus auf die Produktion von XOS gesetzt (Aachary und Prapulla, 2011). Dies kann zum einen daran liegen, dass XOS aus allen Xylan-basierten Polysacchariden, z. B. auch Glucuronoxylan, gebildet werden können, während sich die Herstellung von AXOS allein auf die Verwendung von Arabinoxylanen beschränkt. Zum anderen ist die Analyse von XOS aufgrund der niedrigeren Komplexität einfacher und stellt damit ein tendenziell einfacher in der Qualität zu kontrollierendes Produkt dar. Bezüglich der idealen Länge von Oligosacchariden für eine präbiotische Anwendung gibt es bisher noch keine eindeutigen Erkenntnisse. Damit diese Forschungsfrage besser beantwortet werden kann, muss allerdings zunächst die Grundlage für die Produktion unterschiedlicher Produktmischungen geschaffen werden.

Mit dem Ziel, möglichst unterschiedliche Oligosaccharidmischungen zu erzeugen, wurden in diesem Kapitel verschiedene Xylanasen dazu eingesetzt, in Kombination mit der α -Arabinofuranosidase hh-Arf43C XOS herzustellen. Dazu wurde Arabinoxylan aus Weizen mit den jeweiligen Xylanasen verdaut, der Reaktionsansatz thermisch inaktiviert und anschließend mit hh-Arf43C über Nacht inkubiert. Die Experimente zeigten, dass die Oligosaccharidverteilung, ähnlich wie auch schon in Kapitel 3.3.3 angedeutet, primär von der eingesetzten Enzymfamilie (GH11, GH10, GH5) abhing. Der Einfluss der Enzymfamilie auf die Oligosaccharidproduktverteilung war hierbei größer als der durch die Reaktionszeit. Beispiele für die grundsätzlich zu unterscheidenden Oligosaccharidverteilungen, welche durch die Xylanasen der Familien GH11, GH10 und GH5 erzeugt werden konnten, sind in Abbildung 20 dargestellt. Monosaccharide, deren Bildung idealerweise minimal sein sollte, sind hierbei rot, XOS, deren Ausbeute idealerweise maximal sein sollte, grün und AXOS, für die keine Quantifizierung möglich war, blau gefärbt.

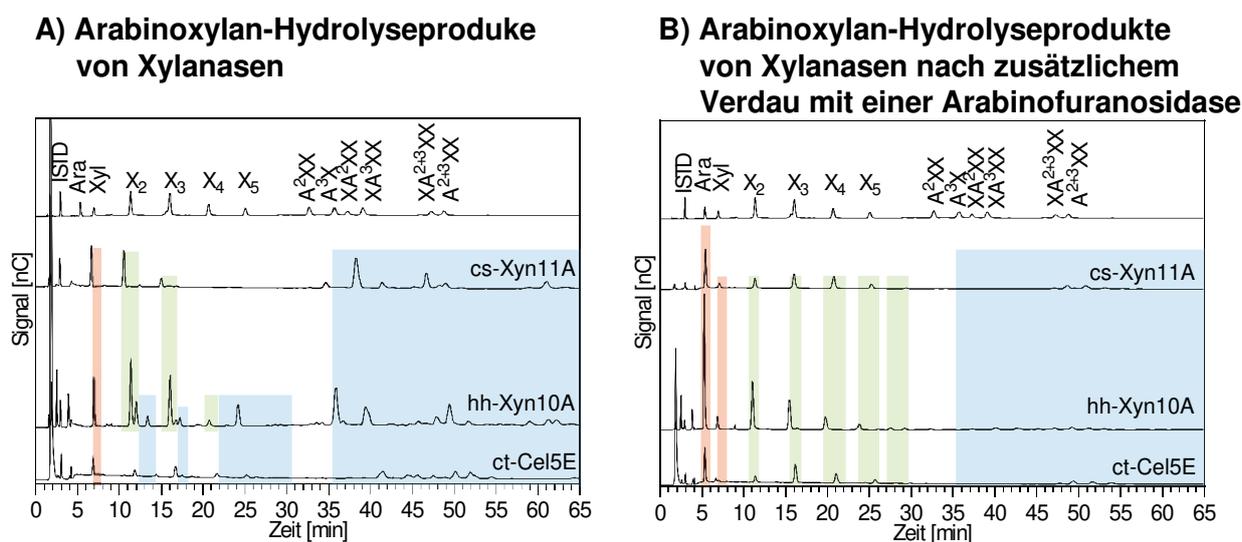


Abb. 20 Vergleich des Produktspektrums verschiedener Xylanase-Typen auf Arabinoxylan vor und nach einer α -Arabinofuranosidase-Behandlung

Für die präbiotische Oligosaccharidherstellung unerwünschte Monosaccharide sind in rot und erwünschte XOS in grün markiert. AXOS, für die keine genaue Quantifizierung möglich ist, sind blau markiert.

Vor der Hydrolyse mit hh-Arf43C wurden bei GH11-Xylanasen nur X_2 und X_3 als XOS und verschiedene längere AXOS (30-65 min im HPAEC-PAD-Chromatogramm) nachgewiesen. Nach dem Verdau mit hh-Arf43C verschob sich das Produktspektrum zu längeren XOS (bis X_5 nachweisbar), während die Konzentration der längeren AXOS sank. Beim Produktspektrum von GH10-Xylanasen wurden vor der Hydrolyse mit hh-Arf43C ebenfalls primär X_2 und X_3 als XOS und verschiedene längere AXOS nachgewiesen. Allerdings enthielt das Substrat zusätzlich auch kurze AXOS (11-14 min, 15-20 min im HPAEC-PAD-Chromatogramm). Diese kurzen AXOS wurden durch die anschließende Arf43C-Behandlung zu kurzen XOS umgesetzt. Dies

fürte dazu, dass der Schwerpunkt des Produktspektrums an XOS von GH10-Xylanasen nach der Behandlung mit hh-Arf43C bei X_2 lag und nicht wie bei GH11-Xylanasen zwischen X_3 und X_4 . Zusätzlich war die Menge an freigesetzten Monosacchariden sowohl vor als auch nach der hh-Arf43C-Behandlung bei GH10- höher als bei GH11-Xylanasen. Bei GH5-Enzymen mit Xylanase-Aktivität sind vor der hh-Arf43C-Behandlung kaum Peaks mit den Retentionszeiten von XOS, sondern fast ausschließlich längere AXOS nachzuweisen (30-65 min im HPAEC-PAD-Chromatogramm). Nach der hh-Arf43C-Behandlung ähnelte das XOS-Produktspektrum dem von GH11-Enzymen. Da die Xylanase-Aktivität von GH5-Enzymen im Vergleich zu GH10- und GH11-Enzymen vergleichsweise niedrig war und vom Produktspektrum keine Vorteile für die Oligosaccharidherstellung bot, wurde diese Enzymklasse für die Oligosaccharidherstellung nicht weiter berücksichtigt.

Zusätzlich zur qualitativen Untersuchung der Produktverteilung wurde die XOS-Herstellung auch quantitativ untersucht. Abbildung 21 zeigt die freigesetzte Menge an Xylose, Arabinose und XOS (X_2 - X_5) über den zeitlichen Verlauf des Arabinoxylanabbaus mithilfe der Enzyme cs-Xyn11A und hh-Xyn10A vor und nach einer anschließenden Behandlung mit hh-Arf43C. Die Experimente wurden prinzipiell noch mit weiteren GH10- und GH11-Enzymen durchgeführt, jedoch unterschieden sich die Ergebnisse nicht wesentlich von den hier gezeigten.

Vor der Behandlung mit hh-Arf43C wurde für cs-Xyn11A am Endpunkt der Kinetik eine Gesamt-XOS-Konzentration von 368 mg/L und für hh-Xyn10A von 517 mg/L ermittelt. Insgesamt konnte hierdurch bei cs-Xyn11A demnach etwa 7 % und bei hh-Xyn10A etwa 10 % des insgesamt eingesetzten Arabinoxylans (5000 mg/L) zu XOS umgesetzt werden. Der Endpunkt der Kinetik wurde bei cs-Xyn11A bereits nach etwa 3 h erreicht und stieg danach nur noch wenig an. Im Unterschied dazu zeigte sich bei hh-Xyn10A bis einschließlich 24 h eine kontinuierliche Veränderung der Gesamtausbeute an XOS und des Produktspektrums: Während nach 30 min 27 mg/L X_2 , 12 mg/L X_3 und 19 mg/L X_4 (Verhältnis: $X_2 : X_3 : X_4$ - 2,3 : 1,0 : 1,6) zu messen waren, verschob sich das Produktspektrum nach 24 h zu 359 mg/L X_2 , 129 mg/L X_3 und 29 mg/L X_4 (Verhältnis: $X_2 : X_3 : X_4$ - 2,8 : 1,0 : 0,2). Sowohl beim Verdau mit hh-Xyn10A als auch mit cs-Xyn11A nahm die Xylose-Konzentration über den Verlauf der Reaktion deutlich zu (am Ende: 17 mg/L bei cs-Xyn11A und 86 mg/L bei hh-Xyn10A).

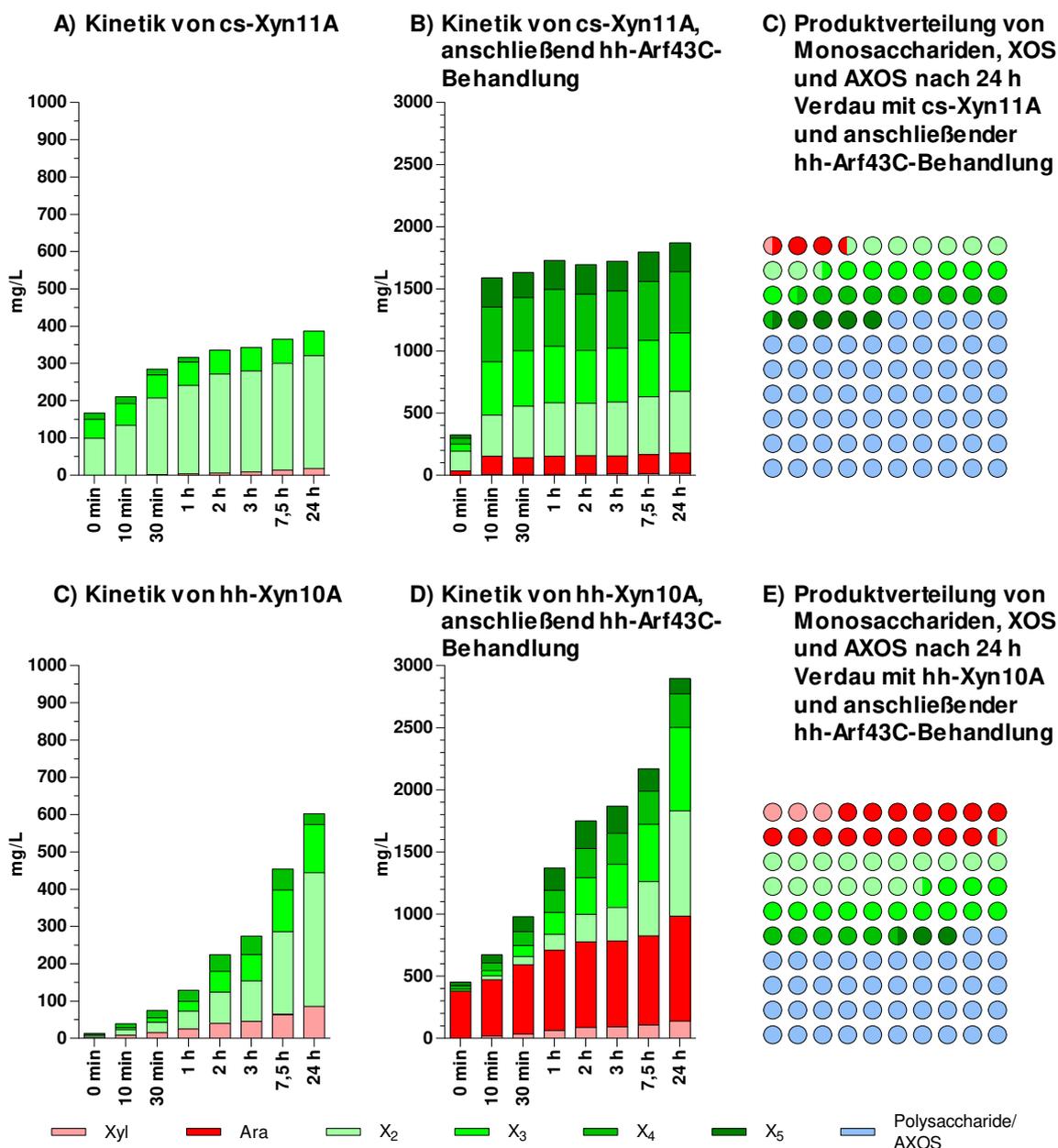


Abb. 21 Quantifizierung der freigesetzten Menge an Monosacchariden und XOS beim Abbau von Arabinoxylan mittels cs-Xyn11A und hh-Xyn10A vor und nach einer Behandlung mit hh-Arf43C

Nicht abgebautes Polysaccharid und AXOS wurden nicht direkt quantifiziert, sondern durch Berechnung der Differenz des eingesetzten Polysaccharids und quantifizierten XOS sowie Monosacchariden geschätzt. Als Substrat wurde 0,5% w/v Substrat und 5 mg/L cs-Xyn11A bzw. 5 mg/L hh-Xyn10A in einem Volumen von 1 mL eingesetzt. Für den anschließenden Verdau mit hh-Arf43C wurde 4 mg/L Enzym eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug etwa 18 h. (A) und (D) zeigen die freigesetzte Menge an Monosacchariden und XOS der Xylanasen über eine Reaktionszeit von 24 h. (B) und (E) zeigen die freigesetzte Menge an Monosacchariden und XOS derselben Messpunkte nach einer zusätzlichen Behandlung mit hh-Arf43C (5 mg/L). (C) und (E) zeigen die Produktverteilung der freigesetzten Monosaccharide und XOS in Relation zur eingesetzten Menge an Substrat (5 g/L). Ein Kreis entspricht hierbei einem Prozent.

Nach der Behandlung mit hh-Arf43C ergab sich für den Endpunkt der Kinetik für cs-Xyn11A eine Gesamt-XOS-Konzentration von 1693 mg/L und für hh-Xyn10A eine von 1912 mg/L. Dies entspricht für cs-Xyn11A als auch für hh-Xyn10A einer ähnlichen Gesamtausbeute an XOS von 34 % bzw. 38 % der insgesamt eingesetzten Menge an Arabinoxylan. Die finale XOS-Zusammensetzung wurde bei cs-Xyn11A hierbei bereits nach etwa 10 min erreicht (497 mg/L X₂, 471 mg/L X₃, 490 mg/L X₄ und 235 mg/L X₅; X₂: X₃: X₄: X₅ - 2,1 : 2,0 : 2,1 : 1,0). Ähnlich wie vor der hh-Arf43C-Behandlung veränderte sich die XOS-Zusammensetzung bei der Kinetik mit hh-Xyn10A laufend und erreichte erst nach 24 h ihren Endpunkt (847 mg/L X₂, 671 mg/L X₃, 270 mg/L X₄ und 124 mg/L X₅; X₂: X₃: X₄: X₅ - 2,5 : 2 : 0,8 : 0,4).

Auffälligerweise wurde bei den Hydrolysaten mit hh-Xyn10A erheblich mehr Arabinose freigesetzt als bei den Hydrolysaten mit cs-Xyn11A (840 mg/L für hh-Xyn10A und 160 mg/L für cs-Xyn11A). Dies kann teilweise über die bessere Eignung der bei GH10-Xylanasen gebildeten kleineren AXOS als Substrat für die α -Arabinofuranosidase hh-Arf43C erklärt werden (für Details, siehe Kapitel 3.3.1 und 3.3.2). Vor und nach der hh-Arf43C-Behandlung des Hydrolysats am Ende der Kinetik wurde für cs-Xyn11A die gleiche Xylose-Konzentration von etwa 17 mg/L bestimmt. Bei der hh-Arf43C-Behandlung des Hydrolysats für hh-Xyn10A wurde am Ende der Kinetik die Xylose-Konzentration von 86 auf 140 mg/L erhöht. Dies deutet darauf hin, dass im Produktspektrum von hh-Xyn10A mit Arabinose-substituierte Xylosen vorhanden sind, welche durch eine hh-Arf43C-Behandlung abgebaut werden können.

Neben der hier beschriebenen Nachbehandlung der Arabinoxylan-Hydrolysate mittels hh-Arf43C ist auch eine Vorbehandlung des Polysaccharids oder auch eine gleichzeitige Inkubation mit den Xylanasen möglich. Beide Ansätze hatten zur Folge, dass die entstehende XOS-Verteilung verhältnismäßig kurzkettig mit einem hohen Anteil an Xylose und die XOS-Ausbeute insgesamt niedriger war. Eine gleichzeitige Verwendung von GH10- und GH11-Xylanasen für die Herstellung von AXOS und XOS ähnelte im Produktspektrum dem von GH10-Xylanasen alleine. Dies ist dadurch zu erklären, dass die von GH11-Xylanasen tendenziell größeren AXOS von den GH10-Xylanasen weiter zu kleineren XOS und AXOS abgebaut wurden. Umgekehrt waren die GH11-Xylanasen aber nicht in der Lage, die durch GH10-Xylanasen hergestellten AXOS weiter abzubauen (für Details, siehe Kapitel 3.3.1).

Neben der löslichen Fraktion Arabinoxylan aus Weizen wurden auch weitere Xylan-basierte Substrate untersucht. Bei der Hydrolyse des unlöslichen Arabinoxylans aus Weizen sowie eines aus Gräsern (vgl. Tab. 10) ergab sich vor und nach einer hh-Arf43C-Behandlung das gleiche Produktspektrum wie bei der löslichen Fraktion von Arabinoxylan aus Weizen. Die Xylane aus Birke und aus Haferspreu wiesen keine Arabinosylierungen auf, sodass auch eine hh-Arf43C-

Vor- und Nachbehandlung nicht zu einer Freisetzung von Arabinose führte und somit keinen Einfluss auf die XOS-Bildung hatte. Ein Verdau mittels GH10- und GH11-Xylanasen führte bei beiden Polysacchariden zur Bildung von Xylose, X_2 und X_3 mit vergleichsweise niedriger Größenverteilung. Insbesondere bei den mittels GH10-Xylanasen hergestellten Hydrolysaten wurde eine vergleichsweise hohe Xylose-Konzentration gemessen.

In dieser Arbeit konnten XOS mit $DP > 5$, obwohl nachweisbar, nicht in die Quantifizierung mit aufgenommen werden, da hierfür keine Standards vorlagen. Auch wurden Peaks mit einer Retentionszeit bei X_5 nicht zwingend als X_5 gewertet, da es auch AXOS gibt, die zu einer ähnlichen Retentionszeit eluieren (siehe U8, Kapitel 3.3.3). Es ist anzunehmen, dass durch den Einsatz einer höheren Enzymmenge sowie einer optimierten Prozessführung zum einen eine Erhöhung der maximalen Ausbeute und zum anderen auch eine Veränderung des hergestellten Oligosaccharidspektrums möglich ist.

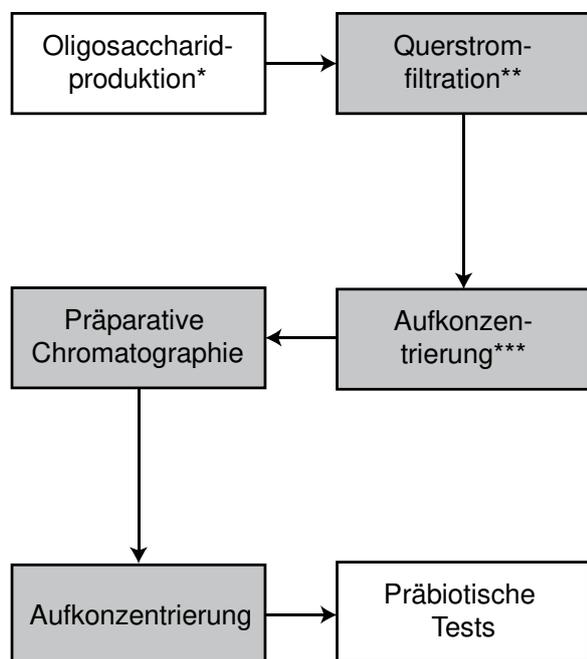
3.3.5 Präparative Aufreinigung von XOS und AXOS

In den bisherigen Kapiteln wurde der Fokus auf die enzymatische Generierung und Charakterisierung von XOS und AXOS gesetzt. In diesem Kapitel sollen nun verschiedene Methoden zur Prozessierung und Aufreinigung bereits generierter XOS- und AXOS-Lösungen vorgestellt werden.

Damit Oligosaccharidpräparationen als Präbiotika eingesetzt werden können, müssen diese verschiedene Anforderungen erfüllen. So ist es wichtig, dass die Präparationen frei von Monosacchariden sind. Weiterhin sollten sie weder niedermolekulare (z. B. Salze oder andere Puffer-elemente) noch makromolekulare Verunreinigungen (z. B. Partikel, Enzyme, Polysaccharidreste) aufweisen. Für die Herstellung von Oligosacchariden können neben verschiedenen Aufreinigungsprozessen zusätzlich auch Prozesse zum Einkonzentrieren und Trocknen der Oligosaccharidpräparationen notwendig sein.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein Prozess zur Aufreinigung von Oligosacchariden aus einem Arabinoxylanhydrolysat (Arabinoxylan aus Gräsern) als Vorbereitung für präbiotische Tests konzeptionell erarbeitet (Abb. 22 A) und partiell am Beispiel von einem Liter Arabinoxylanhydrolysat (1 % w/v, 5 mg/L hh-Xyn10A, 24 h) im eigenen Labor und zusammen mit Projektpartnern evaluiert.

A) Prozessschema zur Oligosaccharidherstellung für präbiotische Tests



B) DC der Oligosaccharidmischung nach Querstromfiltration und Aufkonzentrierung

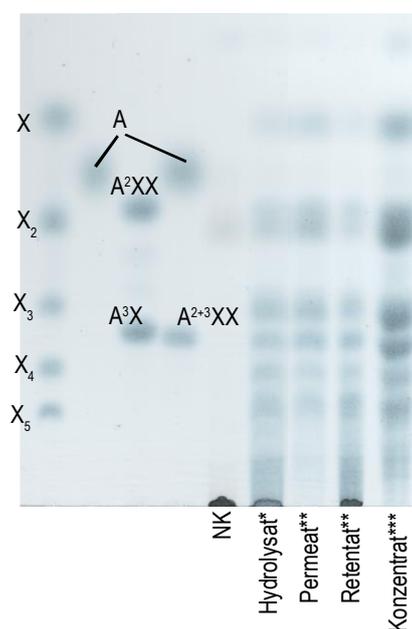


Abb. 22 Prozessschema zur Oligosaccharidherstellung sowie DC nach Querstromfiltration und Aufkonzentrierung eines Arabinoxylanhydrolysats

NK = Negativkontrolle. (A) zeigt ein mögliches Prozessschema von der enzymatischen Herstellung über verschiedene Aufreinigungsprozesse (grau) bis zur präbiotischen Untersuchung der Oligosaccharide. (B) zeigt eine DC-Analyse der ersten drei Prozessschritte des Herstellungsprozesses: Hydrolyse (*; Ansatzgröße: 1 L, 1 % w/v Arabinoxylan, 5 mg/L hh-Xyn10C), Permeat und Retentat aus Querstromfiltration (**; MWCO: 10 kDa) und Aufkonzentrierung (***; über Rotationsverdampfung).

Querstromfiltration

Der erste Schritt nach der enzymatischen Hydrolyse war die Querstromfiltration. Hierfür wurde eine 10 kDa MWCO Membran verwendet, durch welche niedermolekulare Substanzen, wie Salze, Puffer, Mono- und Oligosaccharide hindurchgelangen können (Permeat), aber makromolekulare Bestandteile wie Polysaccharide und Proteine zurückgehalten werden (Retentat). Das Permeat wurde anschließend weiteren Aufreinigungsprozessen unterzogen, während das Retentat als Reststoffstrom nicht weiter in die Oligosaccharidherstellung einfließt und in dieser Arbeit nicht weiter behandelt wurde.

Abbildung 22 B zeigt deutlich, dass nach der Filtration des Arabinoxylanhydrolysats das unverdaute Polysaccharid ausschließlich im Retentat zu finden war (Spot auf Basislinie), aber nicht im Permeat. Gleichzeitig blieb die Konzentration an Oligosacchariden im Retentat und Permeat annähernd gleich. Durch eine Diafiltration des Retentats mit ddH₂O konnte die Oligosaccharidkonzentration im Retentat gesenkt und dadurch Verluste an Oligosacchariden reduziert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Dieser Ansatz erforderte allerdings die Filtration einer relativ

konzentrierten Oligosaccharidlösung, welches mit einer langsamen Prozessierung sowie hoher Belastung für die Filtermembran einherging. Aus diesem Grunde wurde dieser Ansatz nur für Volumina unter 500 mL eingesetzt und für die Prozessierung dieses Ansatzes nicht verwendet.

Chromatographie

In der durch Kooperationspartner durchgeführten präparativen Chromatographie konnten generell nur geringe Probenvolumina eingesetzt werden. Daher wurde das über Querstromfiltration gewonnene Permeat (750 mL) über einen Rotationsverdampfer bis auf wenige Milliliter einkonzentriert (vgl. Abb. 22 B). Vom Kooperationspartner (Dr. Yannick Krauke, Knauer, Berlin) wurde die Oligosaccharidlösung anschließend mittels präparativer semikontinuierlicher Chromatographie (Chromatographiesäulensystem: Eurokat Na) gereinigt. Die hierbei erhaltenen Oligosaccharidfraktionen wurden anschließend an einen weiteren Projektpartner (Dr. Cristina Ripolles, ITENE, Valencia, Spanien) gesendet, der für die jeweiligen Fraktionen die präbiotischen Eigenschaften *in vitro* bestimmte.

Parallel wurden auch eigenständig die chromatographischen Trennsysteme HPLC mit Eurokat Na und Größenausschlusschromatographie (engl.: *size exclusion chromatography*, SEC) für eine präparative Trennung der Oligosacchariden etabliert. Eine Evaluierung der Trennleistung der Methoden konnte durch Messung von unbehandelten enzymatisch erzeugten Arabinoxylanhydrolysaten (keine Querstromfiltration und Aufkonzentrierung über Rotationsverdampfer) erreicht werden. Eine vorherige Prozessierung mit Querstromfiltration und Rotationsverdampfer führte allerdings zu einer geringeren Belastung für die eingesetzten Chromatographiesäulen. Eine entsprechende Probenvorbehandlung wurde demnach dann eingesetzt, wenn wiederholt große Probenvolumina präparativ aufgereinigt werden sollten. Die Trennleistung der etablierten HPLC- und SEC-Methode für die präparative Aufreinigung von XOS und AXOS aus Arabinoxylanhydrolysaten ist in Abbildung 23 aufgezeigt.

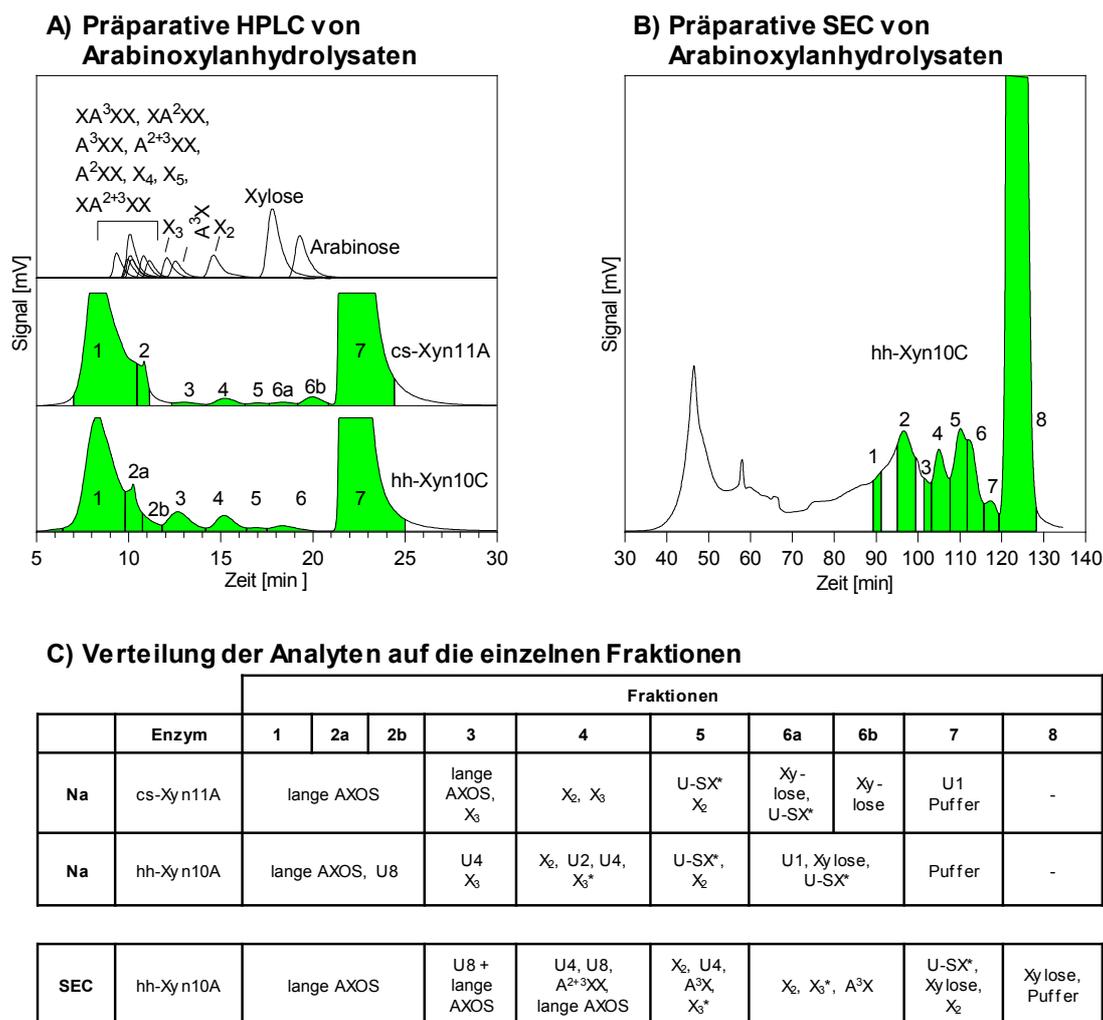


Abb. 23 Präparative Aufreinigung von Arabinoxylanhydrolysaten mittels HPLC und SEC
 Chromatogramme der präparativen HPLC (A) und präparativen SEC (B; Kombination aus Superdex™ Peptide 10/300 GL, Superdex™ 75 10/300 GL) zur Aufreinigung von einzelnen XOS und AXOS aus den Arabinoxylanhydrolysaten aus Gräsern 0,5% w/v mit 5 mg/L Enzym. Auftragsvolumen betrug jeweils 500 µL. (C) zeigt die Verteilung der Analyten auf die einzelnen gesammelten Fraktionen. * U-SX bezeichnet eine substratspezifische Verunreinigung der Arabinoxylanpräparation aus Gräsern.

Wie in Kapitel 3.2.1 bereits erläutert und in Abbildung 23 noch einmal ausführlich dargestellt, können einzelne Analyte eines Arabinoxylanhydrolysats durch HPLC mit einer Na-Säule kaum voneinander getrennt werden. Eine Fraktionierung in verschiedene Gruppen von Analyten war jedoch möglich. So zeigte sich bei der Analyse der gesammelten Fraktionen mittels HPAEC-PAD und DC, dass im Hydrolysat enthaltenes Polysaccharid und längere AXOS zwischen 6 und 12 min (Fraktionen 1-2b) eluierten wurden. Vergleichsweise kürzere AXOS und XOS fanden sich im Bereich zwischen 12 und 19 min (Fraktion 3-6a). Allerdings wurde ab 17,5 min zusätzlich Xylose eluiert (Fraktion 6a und b). Salze und Pufferanteile wurden ab 21 min eluiert und bildeten einen ausgeprägten Elutionspeak.

Bei der präparativen Trennung von Arabinoxylanhydrolysaten mittels SEC zeigt sich prinzipiell ein ähnliches Bild: Im Anfangsbereich des Chromatogramms wurde ebenfalls zunächst Polysaccharid (35-70 min), anschließend lange AXOS (89-107 min; Fraktion 1 bis 4), kurze AXOS (107-117 min, Fraktion 5-6) und schließlich Xylose, Salze und Puffersubstanzen (117-129 min, Fraktion 8) eluiert.

3.4 Herstellung von GMOS aus Glucomannan

3.4.1 Übersicht über untersuchte β -Glucanasen und β -Mannanasen

Die Herstellung von GMOS aus Glucomannan ist prinzipiell sehr ähnlich zur Herstellung von XOS und AXOS aus Arabinoxylan. So werden in beiden Fällen Enzyme gebraucht, die das Polysaccharidrückgrat so schneiden, dass Oligosaccharide freigesetzt werden (Aktivität A, vgl. Kapitel 3.1.2). Allerdings stehen für die Hydrolyse von Glucomannan gleich zwei Enzymklassen, nämlich β -Glucanasen und β -Mannanasen, zur Verfügung. Ein weiterer Unterschied resultiert daraus, dass Glucomannan kaum Substitutionen aufweist (vgl. Kapitel 1.1.2), sodass demnach auch keine akzessorischen Enzyme (Aktivität C) benötigt werden. Enzyme zur Modifizierung von GMOS (Aktivität B) wie β -Glucosidasen und β -Mannosidasen standen im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung und spielen für die Herstellung von Oligosacchariden auch nur eine geringere Rolle, sodass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten 40 β -Glucanasen und sechs β -Mannanasen, die eine Aktivität auf Glucomannan als Substrat zeigten, sind in Tabelle 30 gelistet.

Mit Ausnahme von ct-Cel8A und SR1_2270 (GH2) gehörten alle gefundenen Glucomannanabbauenden β -Glucanasen den Familien GH5 und GH9 an. Für andere GH-Familien, welche ebenfalls typisch für β -Glucanase-Aktivitäten sind, wie z. B. GH48 (ct-Cel48S, (Dror et al., 2005)), konnte unter den in dieser Arbeit getesteten Bedingungen hingegen keine Aktivität nachgewiesen werden. Von den zwölf GH5- β -Glucanasen waren insgesamt nur vier Enzyme mit einem CBM-Modul assoziiert (CBM3, CBM6, CBM17). Von den 28 GH9- β -Glucanasen wiesen hingegen insgesamt 23 Enzyme ein CBM-Modul auf. Hierbei waren die Module CBM3 (19 mal), CBM4 der Subfamilie 9 und CBM_X2 (jeweils drei mal) am häufigsten vertreten. Bei den β -Mannanasen gehörten vier der Familie GH26 und nur zwei der Familie GH5 an. Während keine der GH5- β -Mannanasen ein CBM-Modul aufwies, waren alle GH26-Mannanasen mit einem CBM-Modul (ausschließlich CBM35) assoziiert.

Tab. 30 Übersicht über die untersuchten β -Glucanasen und β -Mannanasen

Organismus	Bezeichnung im Rahmen dieser Arbeit	Lokus	MW [kDa]	Struktur		Referenzen	
				0	250		500
β-1,4-Endoglucanasen							
<i>C. thermocellum</i>	ct-Cel8A	Cthe_0269	53	GH8			Schwarz et al. (1986)
	ct-Cel5B	Cthe_0536	64	GH5			Beguin et al. (1983)
	ct-Cel9D	Cthe_0825	72	GH9			Joliff et al. (1986) Chauvaux et al. (1995)
	ct-Cel5E	Cthe_0797	90	GH5			Hall et al. (1988)
	ct-Cel9F	Cthe_0543	82	GH9, CBM3			Navarro et al. (1991)
	ct-Cel5G	Cthe_2872	63	GH5			Lemaire und Béguin (1993)
	ct-Cel5/26H	Cthe_1472	102	GH26, GH5, CBM3			Yagüe et al. (1990)
	ct-Cel9/44J	Cthe_0624	178	GH9, GH44			Arai et al. (2003) Ahsan et al. (1996)
	ct-Cel9K	Cthe_0412	101	CBM4_9, GH9			Kataeva et al. (1999)
	ct-Cel5L	Cthe_0405	58	GH5			Zverlov et al. (2005b)
	ct-Cel9N	Cthe_0043	82	GH9, CBM3, GH9, CBM3			Zverlov et al. (2003)
	ct-Cel5O	Cthe_2147	75	CBM3, GH5			Zverlov et al. (2002)
	ct-Cel9P	Cthe_0274	63	GH9			Zverlov et al. (2005b)
	ct-Cel9Q	Cthe_0625	80	GH9			Arai et al. (2001)
	ct-Cel9R	Cthe_0578	85	GH9, CBM3			Zverlov et al. (2005c)
	ct-Cel9T	Cthe_2812	69	GH9			Kurokawa et al. (2002)
	ct-Cel9U	Cthe_2360	105	GH9, CBM3, CBM3			Zverlov et al. (2005b)
	ct-Cel9V	Cthe_2760	110	GH9, CBM3, CBM3			Zverlov et al. (2005b)
	ct-Cel9W	Cthe_0745	82	GH9, CBM3			Zverlov et al. (2005b)
	ct-Cbh9A	Cthe_0413	138	CBM4_9, GH9, CBM3			Kataeva et al. (2005)
ct-Lec9A	Cthe_2761	80	GH9, CBM3			Zverlov et al. (2005b)	
ct-Lec9B	Cthe_0433	89	GH9, CBM3			Zverlov et al. (2005b)	
<i>C. sterco-rarium</i>	cs-Cel9Z	Cst_c18960	108	GH9, CBM3, CBM_X2, CBM3			Jauris et al. (1990)
<i>Hb. hemi-cellulosilytica</i>	T355_2138 (GH9)	T355_2138	110	GH9, CBM_X2, CBM_X2, CBM3			Koeck (2015)
	T355_438 (GH5)	T355_438	41	GH5			Koeck (2015)

Tab. 30 Übersicht über die untersuchten β -Glucanasen und β -Mannanasen (Fortsetzung)

Organismus	Bezeichnung im Rahmen dieser Arbeit	Lokus	MW [kDa]	Struktur		Referenzen
				0	250	
β-1,4-Endoglucanasen						
<i>Hv. saccharicola</i>	SR1_140 (GH5)	SR1_140	62	[GH5] [CBM3]		Diese Arbeit
	SR1_627 (GH5)	SR1_627	50	[GH5] [CBM3]		Diese Arbeit
	SR1_146 (GH9)	SR1_146	81	[GH9] [CBM3]		Diese Arbeit
	SR1_175 (GH9)	SR1_175	81	[GH9] [CBM3]		Diese Arbeit
	SR1_313 (GH9)	SR1_313	146	[GH9] [CBM4_9] [CBM4_9] [GH9]		Diese Arbeit
	SR1_376 (GH9)	SR1_376	80	[GH9] [CBM3]		Diese Arbeit
	SR1_590 (GH9)	SR1_590	61	[GH9] [CBM3]		Diese Arbeit
	SR1_614 (GH9)	SR1_614	86	[GH9] [CBM3]		Diese Arbeit
	SR1_1157 (GH5)	SR1_1157	60	[GH5] [CBM6]		Diese Arbeit
	SR1_1440 (GH9)	SR1_1440	107	[GH9] [CBM3]		Diese Arbeit
	SR1_1703 (GH5)	SR1_1703	62	[GH5] [CBM3]		Diese Arbeit
	SR1_1834 (GH9)	SR1_1834	77	[GH9] [CBM3]		Diese Arbeit
	SR1_2270 (GH2)	SR1_2270	97	[GH2]		Diese Arbeit
	SR1_2738 (GH9)	SR1_2738	106	[GH9] [CBM3]		Diese Arbeit
	SR1_2739 (GH9)	SR1_2739	79	[GH9] [CBM3]		Diese Arbeit
<i>C. cellulosi</i>	cc-Cel9Z (GH9)	CCDG5_1679	117	[GH9] [CBM3] [CBM17_28] [CBM17_28] [CBM17_28]		*
	CCDG5_1676 (GH9)	CCDG5_1676	77	[GH9] [CBM3]		Diese Arbeit
	CCDG5_0576 (GH5)	CCDG5_0576	94	[GH5] [CBM17_28] [CBM17_28]		Diese Arbeit
β-1,4-Endomannanasen						
<i>C. thermocellum</i>	ct-Man5A	Cthe_0821	60	[GH5]		Mizutani et al. (2014)
	ct-Man26A	Cthe_2811	67	[CBM35] [GH26]		Halstead et al. (1999)
	ct-Man26B (GH26)	Cthe_0032	37	[CBM35] [GH26]		Ghosh et al. (2013)
<i>C. sterco-rarium</i>	cs-Man26A	Cst_c11340	57	[CBM35] [GH26]		Gao et al. (2014)
<i>Hv. saccharicola</i>	SR1_613 (GH26)	SR1_613	64	[CBM35] [GH26]		Diese Arbeit
	SR1_2275 (GH5)	SR1_2275	60	[GH5]		Diese Arbeit

Sofern Enzyme in der Literatur bereits erwähnt und benannt wurden, wurde die Benennung übernommen und mit einem Kürzel für den Ursprungsorganismus und jeweils die involvierten GH-Familien hinzugefügt. Wurde ein Enzym in der Literatur bisher noch nicht erwähnt oder benannt, wurde der Locus mit der jeweiligen GH-Familie in einer Klammer dahinter als Bezeichnung verwendet. * Für cc-Cel9Z liegt zwar eine Enzymbezeichnung vor (Lombard et al. 2014), jedoch wurde keine Referenz für die Charakterisierung des Enzyms gefunden.

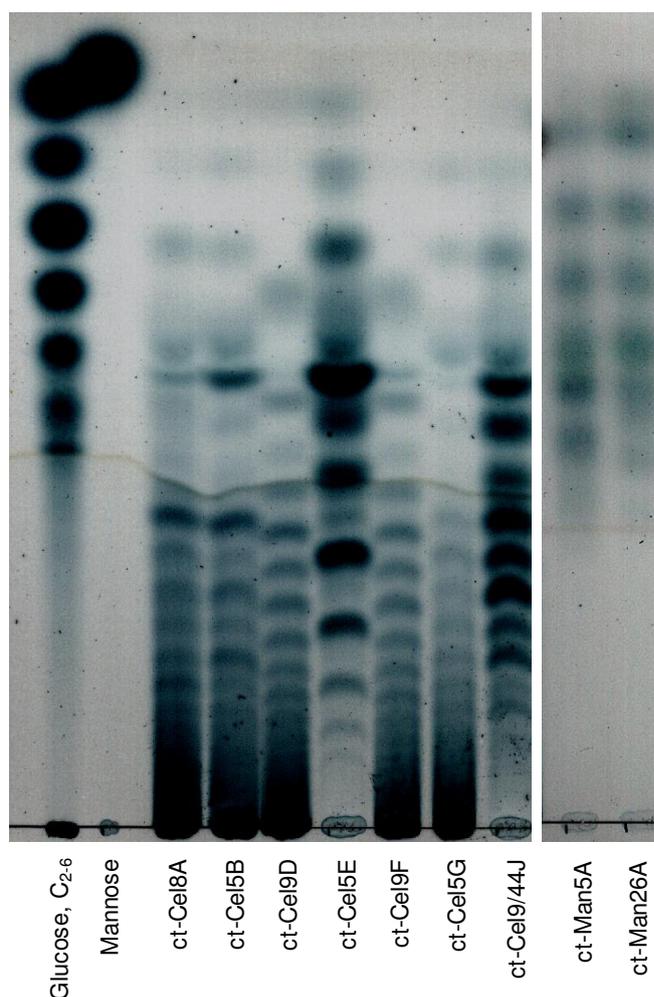
Die angegebene strukturelle Annotation beruht auf der Analyse der Aminosäuresequenz des nativen Proteins. Das angegebene Molekulargewicht (MW) bezieht sich hingegen auf das Molekulargewicht des klonierten und exprimierten Proteins (ohne Signalpeptid, mit His-Tag). Für die strukturelle Annotation wurden nur GH- (weiße Kästen), CBM- (dunkelgraue Kästen) und Dockerin-Module (schwarze Kästen) berücksichtigt, und relativ zu ihrer Position in der Aminosäuresequenz auf dem Proteinrückgrat positioniert.

3.4.2 Charakterisierung des Produktspektrums von β -Glucanasen und Mannanasen

Eine mittels DC und HPAEC-PAD durchgeführte Analyse enzymatisch erzeugter Glucmannanhydrolysate (vgl. Abb. 24 A) zeigte, dass β -Glucanasen (GH5 und GH9) und β -Mannanasen (GH5 und GH26) ein grundlegend unterschiedliches Produktspektrum erzeugten. Sowohl GH5- als auch GH9- β -Glucanasen zeigten bei der DC-Analyse beide eine Vielzahl an Spots mit einem gleichmäßigen Abstand zwischen den Spots, welches auf das Vorhandensein einer Vielzahl an unterschiedlichen Oligosacchariden hindeutete. Allerdings waren die Spots zwischen den GH5- und GH9- β -Glucanasen zueinander leicht versetzt. Dies deutete darauf hin, dass sich die Produktspektren zwischen den β -Glucanase-Typen grundlegend voneinander unterschieden und demzufolge die enthaltenen Oligosaccharide anders aufgebaut sein müssen. Die Verteilung der Spots für beide β -Glucanase-Typen (Spots im unteren Bereich der DC) deutete darauf hin, dass die erzeugten Oligosaccharide verglichen mit den Oligosaccharidstandards längerkettig waren. Im Vergleich dazu waren die über β -Mannanase hergestellten Oligosaccharide kürzer und fanden sich im oberen Bereich der DC.

Der Unterschied in den Produktspektren zwischen β -Glucanasen und β -Mannanasen war auch bei der Analyse mittels HPAEC-PAD deutlich ausgeprägt (vgl. Abb. 24 B). So zeigten GH5- β -Glucanasen und β -Mannanasen im früh eluierenden Bereich des Chromatogramms (5-14 min) mehr Peaks als GH9- β -Glucanasen (ct-Cel5B und ct-Cel9F in Abb. 24 B). Eine Interpretation des spät eluierenden Bereichs des Chromatogramms (>14 min) war komplexer, da in diesem Bereich die Intensität der Peaks deutlich schwächer war. Ähnlich wie bei der DC zeigten die Peaks der über GH5- und GH9- β -Glucanasen erzeugten Oligosaccharide einen leichten Versatz der Retentionszeiten zueinander. Dieser Versatz war in seiner Ausprägung so gering, dass dieser von der experimentell bedingten Variation der Retentionszeit („Shifting“) teilweise überdeckt wurde und keine Unterscheidung zwischen den Spektren möglich war. Prinzipiell war der hier beschriebene Versatz in der Migrationsdistanz (DC) und der Versatz bei der Retentionszeit (HPAEC-PAD) bei allen über GH5- und GH9- β -Glucanasen erzeugten Oligosaccharidmischungen mit Ausnahme von ct-Cel5E und ct-Cel9/44J wiederzufinden (vgl. Abb. A19-21 im Anhang). Die β -Glucanasen der Familien GH2 und GH8 (SR1_2270 und ct-Cel8A) zeigten das gleiche Produktspektrum wie GH5-Enzyme. Generell wurde bei allen β -Glucanasen eine Freisetzung von Glucose und bei β -Mannanasen zusätzlich eine Freisetzung von Mannose beobachtet.

A) Analyse von Glucomannan-Hydrolysaten mittels DC



B) Analyse von Glucomannan-Hydrolysaten mittels HPAEC-PAD

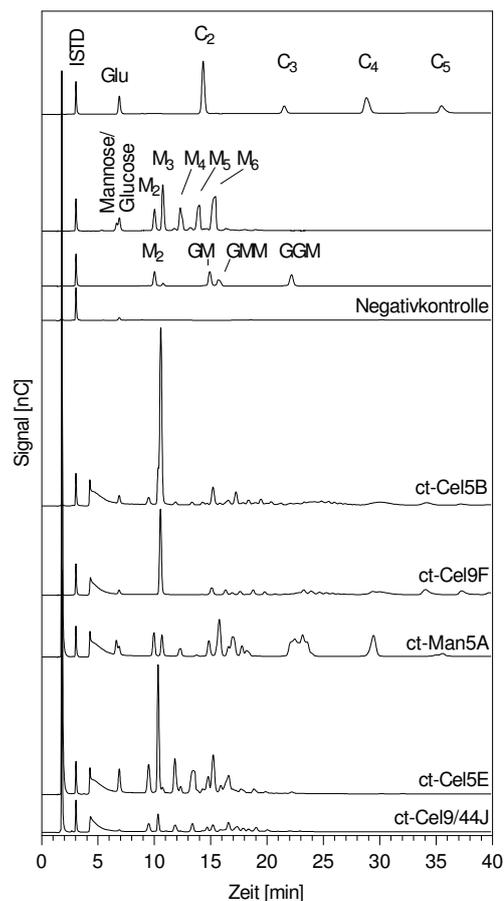


Abb. 24 Produktspektrum von β -Glucanasen und β -Mannanasen auf Glucomannan mittels DC und HPAEC-PAD

Hydrolyse des Glucomannans (0,125% w/v) erfolgte als Endpunktbestimmung (pH 6,5; 60 °C; etwa 18 h) mit einer Enzymkonzentration zwischen 2 und 5 mg/L. Die Produktspektren weiterer getesteter β -Glucanasen und β -Mannanasen finden sich in Abb. A19-21 im Anhang.

Von den 40 getesteten β -Glucanasen zeigten die Enzyme ct-Cel5E und ct-Cel9/44J den stärksten Glucomannanabbau mit jeweils distinktem Produktmuster, welches bei keinem der anderen Enzyme gefunden werden konnten. Bei der DC zeigte sich dies durch eine insgesamt niedrigere Anzahl an Spots, welche in Relation zu den anderen Spuren vergleichsweise intensiv gefärbt waren. Zusätzlich waren weniger Spots im unteren Bereich und stattdessen mehr Spots im oberen Bereich der DC zu finden. Der wenig intensive Spot auf Höhe des Polysaccharids (Basislinie) deutete weiterhin auf einen hohen Grad des Glucomannanabbaus durch diese Enzyme hin.

Diese Unterschiede zeigten sich auch im HPAEC-PAD-Chromatogramm, bei dem sowohl für ct-Cel5E als auch für ct-Cel9/44J im vorderen Bereich deutlich mehr und intensivere Peaks zu

finden waren (vgl. Abb. 25). Ein Vergleich der Retentionszeiten zeigte, dass ct-Cel5E im vorderen Bereich des Chromatogramms (5-14 min) weitestgehend dieselben Peaks aufwies wie ct-Cel9/44J. Allerdings zeigte ct-Cel5E noch einige zusätzliche Peaks im vorderen Bereich des Chromatogramms und unterschied sich im hinteren Bereich (>14 min) deutlich von dem Peakenspektrum von ct-Cel9/44J. Aufgrund der insgesamt höheren Abbauleistung der Enzyme ct-Cel5E und ct-Cel9/44J verglichen mit anderen Enzymen wurden zur GMOS-Herstellung aus Glucomannan hauptsächlich diese Enzyme verwendet. Aus diesem Grund wurde das Produktspektrum von ct-Cel5E und ct-Cel9/44J bei der Hydrolyse von Glucomannan genauer untersucht.

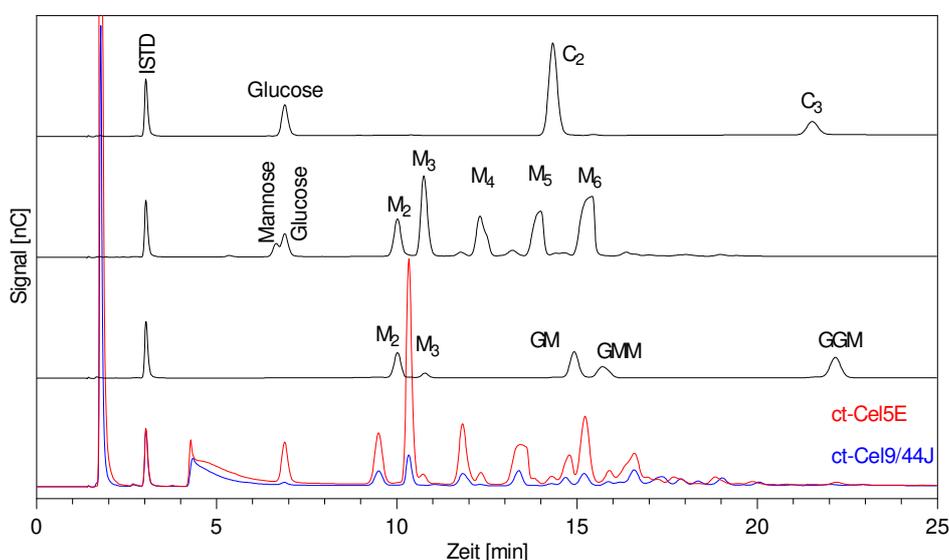


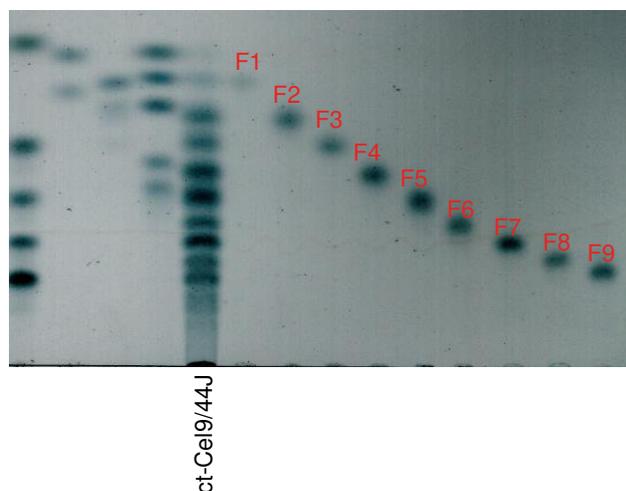
Abb. 25 Vergleich der Produktspektren von ct-Cel5E und ct-Cel9/44J via HPAEC-PAD

Hydrolyse des Glucomannans (0,125% w/v) erfolgte als Endpunktbestimmung (pH 6,5; 60 °C, etwa 18 h) mit einer Enzymkonzentration von jeweils 2 mg/L.

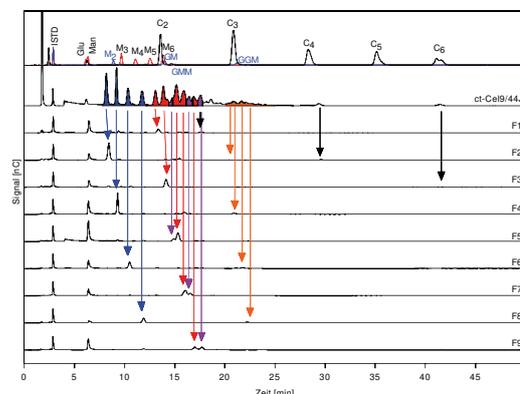
3.4.3 Detaillierte Produktanalyse des Produktspektrums von ct-Cel5E und ct-Cel9/44J bei der Hydrolyse von Glucomannan

Zur detaillierten Produktanalyse der Oligosaccharide aus dem über ct-Cel5E und ct-Cel9/44J hergestellten Glucomannanhydrolysat wurde analog wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben eine präparative DC durchgeführt. Die hierbei extrahierten Fraktionen wurden anschließend über HPAEC-PAD und MALDI-TOF analysiert. Die einzelnen Prozessschritte für die Produktanalyse eines Glucomannanhydrolysats sind als Beispiel für ct-Cel9/44J in Abbildung 26 dargestellt.

A) Präparative DC des mit ct-Cel9/44J erzeugten Hydrolysats aus Glucomannan



B) Analyse der einzelnen aufgereinigten Fraktionen mittels HPAEC-PAD



C) Analyse der einzelnen aufgereinigten Fraktionen mittels MALDI-TOF

Probe	Polymerisierungsgrad (Anzahl an Hexosen)								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hydr.	4	15	23	23	18	8	4	2	1
F1	100*	-	-	-	-	-	-	-	-
F2	81	19	-	-	-	-	-	-	-
F3	17	73	10	-	-	-	-	-	-
F4	-	85	12	2	-	-	-	-	-
F5	-	2	88	3	2	6	-	-	-
F6	30	-	52	14	-	-	5	-	-
F7	-	-	1	92	2	2	-	3	-
F8	-	-	-	82	15	-	-	-	3
F9	-	-	-	8	87	2	-	-	-

D) Visualisierung der Verteilung verschiedener Substanzen auf die aufgereinigten Fraktionen

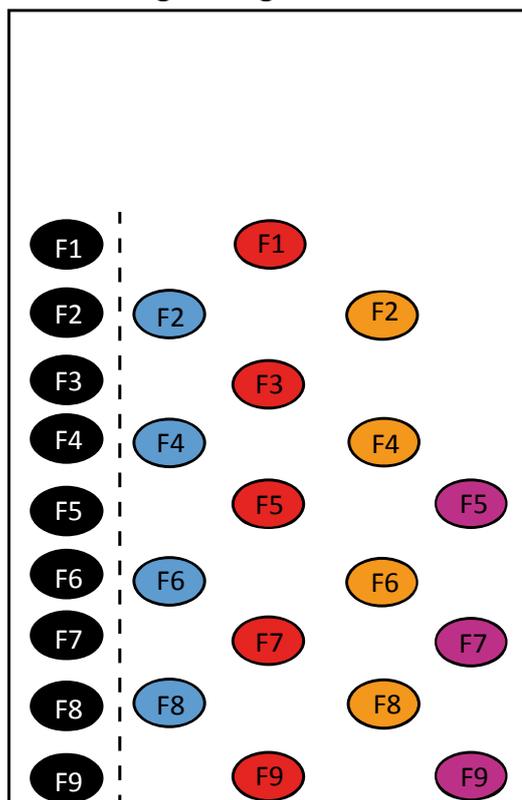


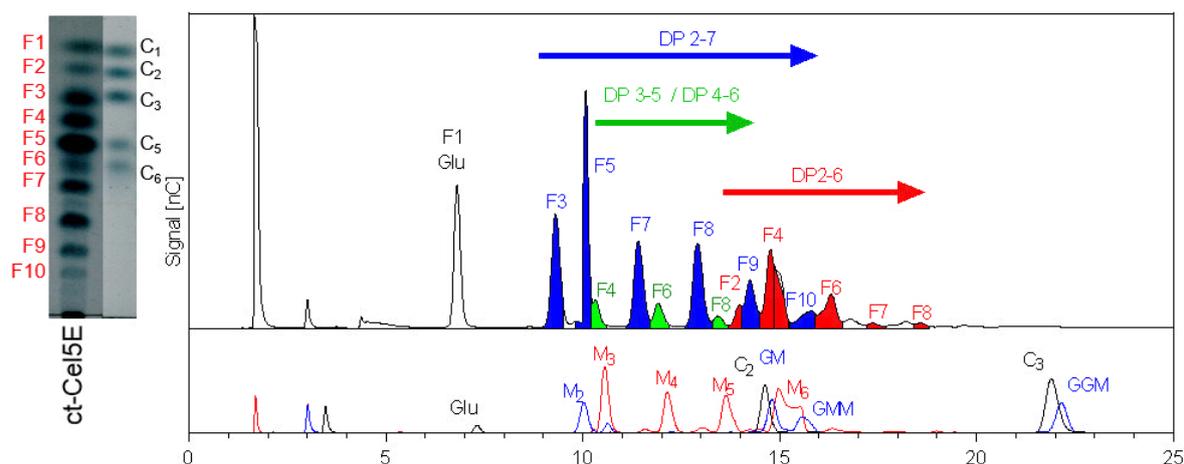
Abb. 26 Einzelne Analyseschritte zur Untersuchung des Produktspektrums von ct-Cel9/44J

Hydrolysebedingungen: 0,125% w/v Glucomannan, 2 mg/L Enzym, etwa 18 h. Die Farben in (B), (C) und (D) zeigen Zugehörigkeiten der jeweiligen Substanzen zu einer Gruppe mit einem postulierten ähnlichen Strukturelement. Bei der Analyse mittels MALDI-TOF (C) wurde die Summe der Intensitäten der jeweiligen Massen in einer Zeile insgesamt auf 100% gesetzt und die Intensitäten der jeweiligen Massen in Relation dazu gesetzt. (D) visualisiert schematisch, dass innerhalb einer extrahierten Fraktion mehrere verschiedene Substanzen vorhanden sein konnten.

Bei der präparativen DC konnten für das Produktspektrum beider Enzyme einzelne Spots (Abb. 26 A) isoliert werden. Bei der anschließenden Analyse mittels HPAEC-PAD zeigte sich, dass in diversen der aus der DC extrahierten Spots jeweils mehrere Peaks zu finden waren (Abb. 26 B). Dies deckte sich mit den Ergebnissen der MALDI-TOF-Analyse (Abb. 26 C), welche für fast alle aufgereinigten Fraktion mehrere Oligosaccharidmassen anzeigte. Die Ergebnisse machten deutlich, dass in einzelnen Spots mehrere verschiedene Oligosaccharide enthalten sein konnten. Basierend auf den angewendeten Analysemethoden war eine vollständige und eindeutige Strukturaufklärung dieser Oligosaccharide nicht möglich. Jedoch konnten, wie in Abbildung 27 gezeigt, Hinweise auf die Struktur einzelner Oligosaccharide bzw. strukturelle Zusammenhänge zwischen Oligosacchariden gewonnen werden. Diese Informationen wurden dazu genutzt, um ein besseres Verständnis für die HPAEC-PAD-Chromatographie von Glucomannanhydrolysaten zu erlangen.

Bei der Hydrolyse von Glucomannan mittels ct-Cel5E wurde Glucose freigesetzt, welche in Fraktion F1 bei der präparativen DC isoliert werden konnte. Auch bei der Hydrolyse mittels ct-Cel9/44J wurde Glucose freigesetzt, allerdings war die freigesetzte Menge zu niedrig, um die Glucose in einer DC-Fraktion zu extrahieren. Anschließend folgte im HPAEC-PAD-Chromatogramm für ct-Cel5E ein Bereich mit drei verschiedene Gruppen an Peaks (Abb. 27, eingefärbt in blau, grün, rot). Diese Gruppen zeichneten sich dadurch aus, dass ihre Vertreter sowohl in der DC als auch in der HPAEC-PAD in regelmäßigen Abständen zueinander eluierten. Dieses Elutionsverhalten deutete wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben auf eine ähnliche Grundstruktur der jeweiligen Oligosaccharide hin. Es ist anzunehmen, dass die Oligosaccharide dabei mit steigender Elutionszeit jeweils um eine Zuckereinheit verlängert wurden. Auch bei der Analyse mittels MALDI-TOF war ein sukzessives Ansteigen der detektierten Molekülmassen erkennbar. Auf diesen Daten basierend wurde ein Molekulargößenbereich für die einzelnen Oligosaccharid-Grundstrukturen abgeschätzt: DP2-7 für die „blaue“ Gruppe, DP3-5 oder DP4-6 für die „grüne“ Gruppe und DP2-6 für die „rote“ Gruppe. Eine genaue Bestimmung der Größen war jedoch nicht möglich, da keine Reinsubstanzen zum Vergleich vorlagen. Die MALDI-TOF-Daten deuteten weiterhin darauf hin, dass noch mehr solcher Oligosaccharid-Grundstrukturen im Glucomannanhydrolysat vorhanden waren, welche ebenfalls wie oben beschrieben bei der DC und HPAEC-PAD in regelmäßigen Abständen eluierten (z. B. DP7-10 in F5-8).

A) Produktspektrum von ct-Cel5E auf Glucomannan



B) Produktspektrum von ct-Cel9/44J auf Glucomannan

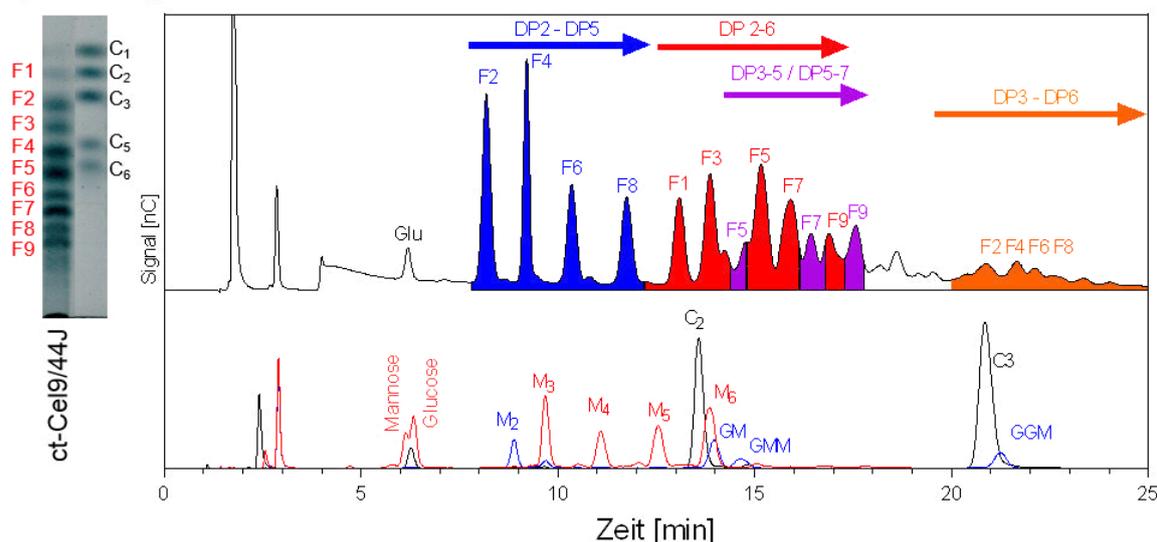


Abb. 27 Über präparative DC, MALDI-TOF und HPAEC-PAD genauer bestimmtes Produktspektrum der Enzyme ct-Cel5E und ct-Cel9/44J.

Bei den Hydrolysaten zeigen die Farben der Peaks ihre Zugehörigkeit zu einer Substanzgruppe mit einem postulierten ähnlichen Strukturelement. Die bei den Standards verwendeten Farben dienen lediglich einer besseren Zuordnung der Bezeichnungen zu den jeweiligen Peaks. Die Peakbezeichnungen über den Peaks (F1, F2, F3, etc.) markieren die Spots der DC (siehe abgebildete DC links), nach deren Extraktion die jeweiligen Peaks mittels HPAEC-PAD gemessen werden konnten.

Für das Produktspektrum von ct-Cel9/44J wurde ebenfalls die „blaue“ Oligosaccharidgruppe mit denselben Molekülmassen bis zu DP5 gefunden. Allerdings fehlte der Nachweis weiterer Peaks dieser Gruppe, wie sie bei ct-Cel5E (DP6 und DP7 in F9 und F10), gemessen wurden. Genauso fehlte beim Produktspektrum von ct-Cel9/44J der Nachweis der „grünen“ Oligosaccharidgruppe, welche demnach spezifisch für ct-Cel5E ist. Generell war eine Zuordnung der Peaks im Chromatogramm ab 14 min zunehmend durch die hohe Anzahl an Peaks erschwert: Die Glucomannanhydrolysate basierend auf ct-Cel5E und ct-Cel9/44J wiesen beide eine „rote“

Oligosaccharidgruppe (DP2-6) auf, welche durch verschiedene weitere Oligosaccharidgruppen überlagert war. So konnte insbesondere für ct-Cel9/44J noch eine „violette“ (DP3-5 oder DP5-7) und „orangene“ (vermutlich DP3-6) Oligosaccharidgruppe ausgemacht werden. Insgesamt war die Peakverteilung für das über ct-Cel9/44J erzeugte Glucomannanhydrolysat im spät eluierenden Bereich des Chromatogramms (> 14 min) komplexer als für ct-Cel5E.

Auf Basis der Struktur von Glucomannan sind verschiedene Möglichkeiten zur Erklärung der verschiedenen Oligosaccharid-Grundstrukturen gegeben. Mögliche Grundstrukturen wären z. B. GM, MG, GMG und MGM, welche am reduzierenden oder nicht-reduzierende Ende schrittweise jeweils um eine Mannose oder Glucose verlängert werden. Dabei ist schnell ersichtlich, welche Komplexität und Ähnlichkeit die hierbei erhaltenen Oligosaccharidstrukturen mit steigendem Polymerisierungsgrad annehmen können. Dies wurde auch im HPAEC-PAD-Chromatogramm von Glucomannanhydrolysaten abgebildet, bei dem mit steigender Retentionszeit und demnach steigendem Polymerisierungsgrad Peaks zunehmend zusammenrückten, ineinander übergingen und nicht mehr unterschieden werden konnten.

Auf Basis der Retentionszeit wurde die „grüne“ Oligosaccharidgruppe als Mannooligosaccharide (M_3 , M_4 , M_5) identifiziert. Durch Vergleiche mit verfügbaren Oligosaccharidstandards wurden weitere Oligosaccharid-Grundstrukturen für verschiedene Bereiche im Chromatogramm postuliert: So könnten die Oligosaccharide des Bereichs 14-18 min die Grundstruktur GM, verlängert zu GMM, GMMM, etc. und die Oligosaccharide des Bereichs 20-24 min die Grundstruktur GGM, verlängert zu GGMM, GGMMM, etc., enthalten. Diese Reihe könnte auf ähnliche Weise weiter fortgesetzt werden, wonach die Grundstruktur GGGM – verlängert zu GGGMM, GGGMMM, etc. – dann bei 29-31 min zu finden wäre und so weiter. Diese Peakbereiche waren vor allem im Produktspektrum von β -Mannanasen, aber auch bei unvollständigem Verdau mit β -Glucanasen, zu finden (vgl. Abb. 24 B).

Weitere Hinweise zur Aufklärung der Strukturbeziehungen konnten durch Kombination der β -Glucanasen und β -Mannanasen gewonnen werden (vgl. Abb. A22 und 23). So konnten mit Hilfe von ct-Cel5E und ct-Cel9/44J die über die β -Mannanase SR1_613 (GH26) gebildeten Peakbereiche bei 20-24 min und 29-31 min abgebaut werden. Genauso konnten mittels SR1_613 (GH26) die über ct-Cel5E und ct-Cel9/44J gebildeten Peaks ab DP4 der „blauen“ und „roten“ Oligosaccharidgruppe abgebaut werden. Aus letzterem könnte man postulieren, dass sich die „blaue“ Oligosaccharidgruppe aus den Oligosacchariden MG (DP2), MMG (DP3), MMMG (DP4) und MMMMG (DP5), etc., und sich die „rote“ Oligosaccharidgruppe aus den Oligosacchariden GM (DP2), GMM, (DP3), GMMM (DP4) und GMMMM (DP5), etc., zusammensetzt. Bei einem Glucomannanverdau mit ct-Cel9/44J und ct-Cel5E zusammen

gleich das Produktspektrum dem von ct-Cel5E allein. Hierbei spielt es keine Rolle, ob die Enzyme nacheinander oder zusammen eingesetzt werden. Demnach stellt das Produktspektrum von ct-Cel5E ein fortgeschritteneres Produktspektrum verglichen mit dem von ct-Cel9/44J dar.

Insgesamt konnte das Produktspektrum der einzelnen Enzyme auf Glucomannan auf Basis dieser Ergebnisse nicht abschließend aufgeklärt werden. Die hier beschriebenen Ergebnisse geben jedoch wertvolle Hinweise darüber, wie eine Analyse eines Glucomannanhydrolysats mittels DC und HPAEC-PAD interpretiert werden kann und wie verschiedene Oligosaccharidmischungen erzeugt werden können.

3.4.4 Präparative Aufreinigung von GMOS

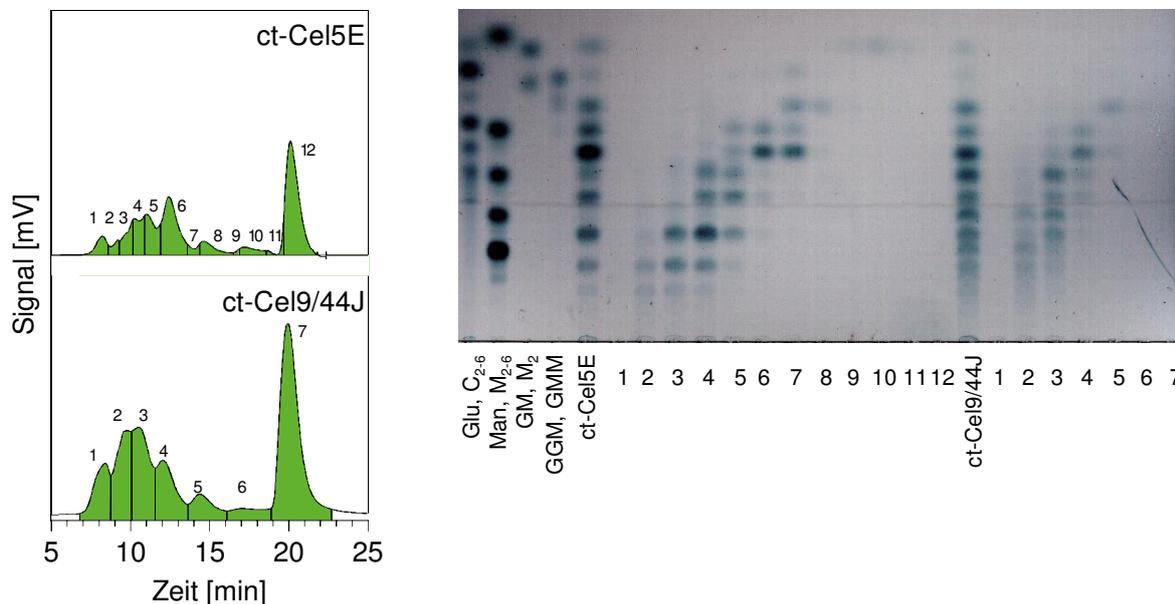
Ähnlich wie in Kapitel 3.3.5 für XOS und AXOS beschrieben, müssen auch hergestellte GMOS-Präparationen einem Aufreinigungsprozess unterzogen werden, damit sie als Präbiotika eingesetzt werden können. Neben der Abreicherung von Monosacchariden und Pufferbestandteilen kann es bei solchen Aufreinigungsprozessen zusätzlich vorteilhaft sein, ein Oligosaccharid-Produktgemisch in verschiedene Größenbereiche von Oligosacchariden zu fraktionieren.

Zur Abtrennung von Polysaccharid und zur Aufkonzentrierung von Oligosaccharid-enthaltenden Lösungen konnten, wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben, Querstromfiltration sowie ein Rotationsverdampfer eingesetzt werden. Für die weitere Aufreinigung wurden anschließend drei unterschiedliche Methoden untersucht: Präparative HPLC mit einer Na-Säule, präparative SEC mit einer Superdex™ 75 10/300 GL und sukzessive Solubilisierung von Oligosacchariden mittels eines Ethanol-Wasser-Gemischs.

Abbildung 28 zeigt den Einsatz präparativer HPLC und SEC zur Trennung der Oligosaccharide in den über ct-Cel5E und ct-Cel9/44J hergestellten Glucomannanhydrolysaten. Ähnlich wie bei der Analyse von Arabinoxylanhydrolysaten war eine Auftrennung einzelner Oligosaccharide nicht möglich. Stattdessen enthielten die verschiedenen Fraktionen jeweils eine Reihe an unterschiedlichen Spots und entsprechend viele Oligosaccharide. Beide Methoden konnten dazu eingesetzt werden, Glucose aus dem Glucomannanhydrolysat von ct-Cel5E zu entfernen (Fraktion F9/10 bei der Trennung mittels HPLC und F10 bei der Trennung mittels SEC). Ähnlich wie für die Präparation von XOS und AXOS sind SEC und HPLC daher für eine Vorbereitung von Glucomannanhydrolysat für präbiotische Tests durchaus geeignet. Obwohl nicht zwingend notwendig, ist vor dem Einsatz von HPLC und SEC eine Aufreinigung des Glucomannanhydrolysats über Querstromfiltration zu empfehlen. So zeigte sich in der Anwendung, dass

durch die Entfernung von Polysaccharid- und Enzymresten die Lebensdauer der eingesetzten Chromatographiesäulen erheblich verbessert wurde.

A) Präparative HPLC zur Aufreinigung von GMOS



B) Präparative SEC zur Aufreinigung von GMOS

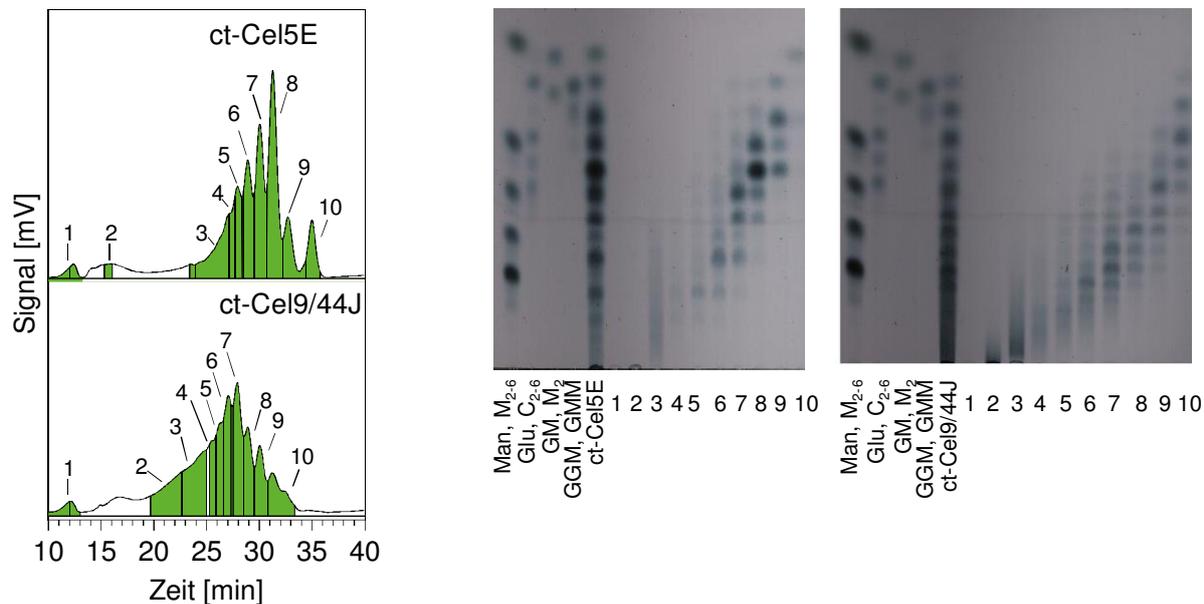


Abb. 28 Aufreinigung von GMOS mittels HPLC und SEC

Hydrolysebedingungen: 0,125% w/v Glucomannan, 5 mg/L Enzym, etwa 18 h. Für die SEC wurde eine Superdex™ Peptide 10/300 GL eingesetzt.

Ein alternativer Ansatz, insbesondere für die Prozessierung von größeren Mengen an Glucomannanhydrolysat, stellt die sukzessive Solubilisierung mit Ethanol-Wasser-Gemischen dar. Hierfür wurde ein 1 L-Ansatz Glucomannan (1% w/v, 10 mg/L ct-Cel9/44J, 60 °C, 48 h) mittels ct-Cel9/44J hergestellt, das Polysaccharid- und Enzymreste über Querstromfiltration (10 kDa

MWCO) aus dem Reaktionsansatz entfernt und dieses auf ein minimales Volumen von etwa 25 mL einkonzentriert (Abb. 29 A). Dieser Ansatz wurde anschließend in 100 % Ethanol resuspendiert, der Ethanol anschließend über Zentrifugation vom Pellet getrennt und das Pellet mit einem 95 % v/v Ethanol-Wasser-Gemisch resuspendiert. Durch weitere sukzessive Solubilisierungsschritte mit 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 55 % v/v Ethanol-ddH₂O-Gemischen wurde das Pellet schrittweise gelöst und schließlich in ddH₂O aufgenommen. Nach einer Aufkonzentrierung der jeweiligen Ethanol-ddH₂O-Gemische wurden diese mittels DC untersucht (vgl. Abb. 29).

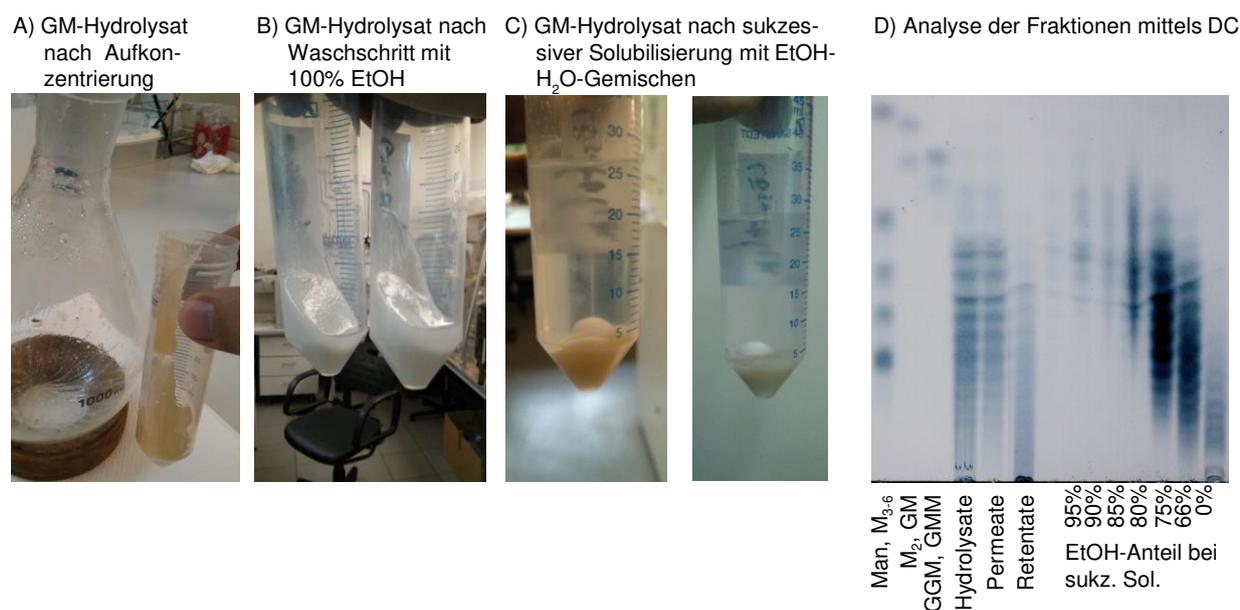


Abb. 29 Aufreinigung eines über ct-Cel9/44J hergestellten Glucomannanhydrolysats mittels sukzessiver Solubilisierung mit Ethanol-Wasser-Gemischen

Der weiße Punkt im Pellet in (C) und (D) zeigt einen Rührfisch. (D) zeigt den Verlauf des Oligosaccharidproduktspektrums während des Aufreinigungsprozesses, beginnend beim Hydrolysat, über Querstromfiltration (Permeat, Retentat) bis zur sukzessiven Solubilisierung (Sukz.Sol).

Durch den ersten Waschschrift konnte die Gelbfärbung aus dem Glucomannan-Hydrolysat entfernt werden (Abb. 29 A und B). In den darauffolgenden Waschschriften nahm das Volumen des Oligosaccharid-Pellets schrittweise ab. Hierbei wurde nach und nach ein weiterer gelber Feststoffanteil freigesetzt, welcher sich über die verschiedenen Waschschriften aber ebenfalls vollständig löste. Prinzipiell sollten bei hoher Ethanolkonzentration zunächst kürzere Oligosaccharide mit hoher Löslichkeit und bei fallender Ethanolkonzentration schrittweise auch längere Oligosaccharide mit niedrigerer Löslichkeit solubilisiert werden. Auf diesem Prinzip basierend konnte, wie in Abb. 29 D gezeigt, eine Fraktionierung der Oligosaccharide erreicht werden. Die höchste Konzentration an Oligosacchariden wurde dabei in den Fraktionen mit 75 % v/v und 66 % v/v Ethanol erreicht. In diesen Fraktionen waren im oberen und im unteren Bereich der DC vergleichsweise wenige Spots sichtbar. Auch beim umgekehrten Ansatz, der

sukzessiven Präzipitation eines Glucomannan-Hydrolysats (1 % w/v Glucomannan, 10 mg/L ct-Cel9/44J), konnte eine Fraktionierung von Oligosacchariden erreicht werden, die in der Oligosaccharidzusammensetzung der in Abb. 29 gezeigten Verteilung ähnelte.

Neben der hier dargestellten Herstellung und Prozessierung von Glucomannanhydrolysaten im 1-5 mL- und im 1000 mL-Maßstab (Aufreinigung über SEC und HPLC, Aufreinigung über sukzessive Solubilisierung), wurde zusätzlich eine Hochskalierung der Hydrolyse (1% w/v, Zell-extrakt aus *E. coli* nach Expression von ct-Cel9/44J im Fermenter) bis zu 4,5 L durchgeführt und dieser Ansatz an Projektpartner versendet. Hierbei stellte sich heraus, dass mit zunehmender Größe des Reaktionsansatzes die vergleichsweise hohe Viskosität des Substrats sich zunehmend negativ auf die Hydrolyse auswirkte. So zeigte sich, dass sich das Substrat aufgrund seiner stark Wasser-bindenden Eigenschaften kaum in einer Konzentration über 1 % w/v lösen ließ. Eingesetztes Enzym wies, vermutlich aufgrund der durch die hohe Viskosität begründete schlechtere Durchmischung, eine vergleichsweise geringere Hydrolyseeffizienz auf. Dies führte dazu, dass verglichen mit den Reaktionsansätzen in kleinen Maßstäben (mL-Maßstab), eine höhere Enzymkonzentration für die Hydrolyse notwendig war. Prinzipiell könnten und sollten diese Effekte durch eine angepasste Prozessführung, z. B. sukzessive Erhöhung der Substratkonzentration an Stelle des hier beschriebenen Satzverfahrens, minimiert werden.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der Enzymsammlung (Enzym-*Toolbox*) für die Herstellung von Oligosacchariden

Übersicht über die Enzym-*Toolbox*

Die Verwendung von Enzymen für die Herstellung von Oligosacchariden aus Hemicellulose stellt eine bereits früher eingesetzte Technologie dar (Otieno und Ahring, 2012). In der überwiegenden Anzahl der Studien wurden hierfür aus Pilzen stammende Enzyme in Form von kommerziell erhältlichen Enzympräparaten verwendet (Akpınar et al., 2007; Albrecht et al., 2009; Otieno und Ahring, 2012). Ein Nachteil dieses Ansatzes ist es, dass das detaillierte Substrat- und Produktspektrum der eingesetzten Enzymlösungen sowie die GH-Familien der eingesetzten Enzyme in der Auswertung oft nicht berücksichtigt wurden. Ein Vergleich der Eignung verschiedener Enzyme für die Oligosaccharidherstellung erfolgte üblicherweise über einen Vergleich ihrer Prozesstauglichkeit, ausgedrückt durch die pH- und Temperaturstabilität der Enzyme (Morgan et al., 2017). Enzymparameter wie das Substrat- und Produktspektrum wurden in diesem Zusammenhang oft vernachlässigt. Stattdessen wurde der Schwerpunkt oft auf die Verwendung unterschiedlicher Pflanzenteile als Quelle für Oligosaccharide und auf die Entwicklung verschiedener Vorbehandlungsverfahren zur Extraktion des Polysaccharids gesetzt (Otieno und Ahring, 2012).

Im Kontrast hierzu, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein anderer Ansatz verfolgt. Durch den Aufbau einer Enzym-*Toolbox* mit 96 bakteriellen Enzymen – 30 Xylanasen, 12 α -Arabinofuranosidasen, 5 β -Xylosidasen, 43 β -Glucanasen und 6 β -Mannanasen – wurde erstmals ein systematischer Vergleich der Substrat- und Produktspektren von gereinigten Einzelenzymen für ihren Einsatz in der Oligosaccharidherstellung ermöglicht. Der Fokus wurde hierbei auf enzymatische Aktivitäten gesetzt, die dazu verwendet werden können, XOS und AXOS aus Arabinoxylan und GMOS aus Glucomannan zu gewinnen.

Charakterisierung von Xylanasen

Bei der Untersuchung der 30 Xylanasen konnten vier unterschiedliche Substrat- bzw. Produktspektren unterschieden werden: Gruppe 1 (GH11 und GH105, siehe Tab. 25), deren Enzyme ausschließlich unsubstituierte XOS hydrolysieren, Gruppen 2a und 2b (GH10), deren Enzyme neben XOS zusätzlich AXOS bezogen auf die Position einer Arabinosylierung zum nicht-reduzierenden Ende hin hydrolysieren, und Gruppe 3, deren Enzyme neben unsubstituierten

XOS zusätzlich AXOS bezogen auf die Position einer Arabinosylierung zum reduzierenden Ende hin hydrolysieren konnten.

Eine vergleichbare Einteilung der Substratspezifität von Xylanasen wurde bereits durch Kormelink et al. (1993) und Biely et al. (1997) durchgeführt. Diese zeigten, dass GH11-Xylanasen mindestens drei nebeneinander liegende unsubstituierte Xylosen benötigen, damit eine Hydrolyse in diesem Bereich stattfinden kann (Biely et al., 2016). Ebenso wurde bereits beschrieben, dass GH10-Xylanasen das Xylanrückgrat im Vergleich zu GH11-Xylanasen näher an Arabinosylierungen hydrolysieren können. In diesen Studien wurde allerdings nicht beschrieben, dass I) GH10-Xylanasen unterschiedlich durch die Position einer Substitution inhibiert werden können (Xylanasen der Gruppe 2a vs. 2b) und II) verschiedene GH10-Xylanasen unterschiedlich von denselben Substitutionen inhibiert werden (Xylanasen der Gruppe 2 vs. Gruppe 3).

Der aufgezeigte Unterschied in der Substratspezifität zwischen Xylanasen der Gruppe 2a (werden von Arabinosylierungen an O-3 sterisch gehindert) und Gruppe 2b (werden von Arabinosylierungen an O-3 nicht sterisch gehindert) muss nicht zwingend auf eine unterschiedliche Substraterkennung hindeuten. Stattdessen kann dieser Unterschied auch durch generelle Unterschiede in der Höhe der Aktivität der Xylanasen erklärt werden. So ist es möglich, dass die Substraterkennung bei den Xylanasen der Gruppen 2a und 2b prinzipiell gleich ist, aber die Aktivität der Xylanasen bei Gruppe 2b generell höher als bei Gruppe 2a war. In diesem Fall könnte es sein, dass die eingesetzte Enzymaktivität für die Xylanasen der Gruppe 2b für eine Aktivität auf die Oligosaccharide XA^2XX und $XA^{2+3}XX$ ausreichte, nicht aber für die Xylanasen der Gruppe 2a. Um diesen Einflussfaktor auszuschließen, müssten die bisher qualitativ angelegten Experimente um verschiedene quantitative Elemente erweitert werden, wie z. B. Einbeziehung der generellen Aktivität der Enzyme, Einsetzen der gleichen spezifischen Aktivität und einer verkürzten Reaktionsdauer, um Inaktivierungseffekte zu vermeiden.

Ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von CBM-Modulen und der Substratspezifität der einzelnen Xylanasen auf Oligosaccharide ist möglich, konnte auf Basis der Ergebnisse aber nicht genauer bestimmt werden. Generell wirken CBM-Module jedoch vornehmlich auf makromolekularer Ebene, wie z. B. der Bindung eines Enzyms an ein unlösliches Polysaccharid, und nicht auf mikromolekularer Ebene, wie z. B. der Bindung eines Oligosaccharids in die Substratbindetasche des Enzyms (Ahmed et al., 2013b).

Allerdings konnte zwischen dem Vorhandensein von CBM-Modulen (CBM4 Subfamilie 9 und CBM6) in den Xylanasen aus *Hb. hemicellulosilytica* und einer generell höheren spezifischen

Aktivität verglichen mit Enzymen ohne CBM-Modul kein allgemeiner Zusammenhang gefunden werden. Dennoch ist es möglich, dass sich die ermittelte Aktivitätsreihenfolge der Enzyme für eine Hydrolyse anderer Polysaccharide mit einer höheren Substratbindeanforderung, wie z. B. unlösliche Substrate, verändert (Boraston et al., 2004). Sowohl für CBM6 als auch für CBM4 wurde bereits gezeigt, dass diese für eine Bindung des Enzyms an Xylan-basierte Substrate förderlich sein können (Gilbert, 2010; Talamantes et al., 2016).

Die in dieser Arbeit erarbeiteten neuen Erkenntnisse bezüglich der Substrat- und Produktspezifität von Xylanasen liefern wertvolle Hinweise darüber, wie diese Enzyme zielgerichtet für die Herstellung von Oligosacchariden (Aktivität A, vgl. Kapitel 3.1.2) oder auch für ihre Modifizierung (Aktivität B) eingesetzt werden können. Weiterhin legen die Erkenntnisse nahe, welche Enzyme synergistisch miteinander wirken könnten, was für eine Verbesserung der enzymatischen Hydrolyse von Hemicellulose genutzt werden kann.

Charakterisierung von β -Xylosidasen und α -Arabinofuranosidasen

Ähnlich wie für die Charakterisierung der Xylanasen wurde auch für die untersuchten α -Arabinofuranosidasen eine unterschiedliche Fähigkeit für den Abbau bestimmter AXOS ermittelt. Von den untersuchten Enzymen zeigten insbesondere die α -Arabinofuranosidasen des Aktivitätstyps AXH-m,d (cst_c07100 (GH43/43) und cs-Arf51B) die höchste Fähigkeit, sowohl einfach als auch spezifisch doppelt-arabinylierte AXOS abzubauen. Im Vergleich zu diesen zwei Enzymen waren die anderen Enzyme, entweder durch β -Xylosidase-Nebenaktivität oder dadurch, dass sie doppelte Arabinylierungen nicht hydrolysieren konnten, weniger für eine Anwendung in der XOS-Herstellung geeignet.

Obwohl es bekannt ist, dass α -Arabinofuranosidasen eine unterschiedlich hohe Aktivität auf unterschiedlich substituierte AXOS aufweisen können, wird dieses Kriterium bei der Charakterisierung neuer α -Arabinofuranosidasen häufig vernachlässigt (Borsenberger et al., 2014; McCleary et al., 2015; Mewis et al., 2016). Dies ist vor allem auf die geringe Verfügbarkeit der für die Experimente notwendigen AXOS, aber auch auf die hohen Anforderungen an die notwendige Oligosaccharidanalytik zurückzuführen. Idealerweise sollten die in dieser Arbeit qualitativ bestimmten Substratspezifitäten durch quantitative Daten, wie z. B. k_{cat} , K_m und K_i , sowohl für einfache als auch für doppelte AXOS ergänzt werden. Solche Daten können als Ergänzung zur Höhe der spezifischen Enzymaktivität dazu dienen, die Eignung von α -Arabinofuranosidasen für den Abbau pflanzlicher Biomasse genauer zu evaluieren und zu optimieren.

Insgesamt wurde von vier der insgesamt 17 α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen eine genaue Bestimmung der Enzymaktivität unter Verwendung verschiedener Puffer durchgeführt. Hierbei zeigte sich für die Enzyme aus GH-Familie 43 (hh-Arf43C und hh-Xyl43A) ein Einbruch in der Aktivität bei der Verwendung eines Phosphatpuffers. Dieser Effekt ist vermutlich auf den Entzug divalenter Calcium-Ionen im Phosphatpuffer zurückzuführen, welche für die Aktivität mancher GH43-Enzyme essentiell sind (Lee et al., 2013). Eine ähnliche Abhängigkeit von Calcium-Ionen wurde prinzipiell auch schon für Vertreter aus den Familien GH10, GH11 und GH51 beschrieben. Diese tritt jedoch weitaus seltener auf und ist oft mit der Funktion von CBMs assoziiert (Abou-Hachem et al., 2003; Ahmed et al., 2013a; Chen et al., 2015; Collins et al., 2005; Jalal et al., 2009), wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet.

Charakterisierung weiterer Enzyme

Um zu ermitteln, wie β -Glucanasen und β -Mannanasen ein heterogen aufgebautes Polysaccharid wie Glucomannan hydrolysieren, ist es notwendig, ihre Aktivität auf spezifische Oligosaccharide zu testen, ähnlich wie es für die Xylanasen, α -Arabinofuranosidasen und β -Xylosidasen durchgeführt wurde. Solche Oligosaccharide müssen sowohl Glucose und Mannose enthalten, als auch eine Mindestlänge aufweisen, sodass sie von den im Endo-Modus schneidenden Enzymen als Substrat erkannt werden können. Da die im Rahmen dieser Arbeit verfügbaren Oligosaccharide (C_{2-6} , M_{2-6} , Gemisch aus GM und MM, Gemisch aus GGM und GMM) diese Anforderungen nicht erfüllen, musste auf eine genauere Bestimmung des Substrat- und Produktspektrums der β -Glucanasen und β -Mannanasen verzichtet werden. Stattdessen wurde der Fokus auf eine Charakterisierung der mit diesen Enzymen aus Glucomannan freigesetzten Oligosaccharide gesetzt. Da alle untersuchten β -Glucanasen und β -Mannanasen bei 60 °C und pH 6,5 eine hohe Aktivität zeigten, wurde weiterhin auf eine genauere Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen verzichtet. Zudem sind für viele der getesteten β -Glucanasen und β -Mannanasen bereits entsprechende Daten vorhanden (vgl. Tab. 30).

β -Glucosidasen und β -Mannosidasen wurden im Rahmen dieser Arbeit unter den 239 untersuchten Enzymen nicht nachgewiesen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der Erstellung der Enzym-*Toolbox* auf diese Enzymklassen kein Schwerpunkt gesetzt wurde. So wurden Enzyme mit GH-Modulen, die typisch für eine β -Glucosidase- und β -Mannosidase-Aktivität sind, wie z.B. GH1 (He und Withers, 1997; Lombard et al., 2014), bei der Klonierung der Enzyme der jeweiligen Organismen bisher ausgelassen. Generell spielen β -Glucosidasen und β -Mannosidasen für die Herstellung von Oligosacchariden nur eine untergeordnete Rolle. So können sie nicht dazu eingesetzt werden, um neue Oligosaccharide zu erzeugen, sondern lediglich um

bereits erzeugte Oligosaccharide zu modifizieren. Im Zusammenhang mit Oligosacchariden wäre eine typische Anwendung für diese Enzyme z. B. ein sukzessiver Abbau von Glucomanno-oligosacchariden im Rahmen ihrer Strukturaufklärung (Albrecht et al., 2011).

4.2 Oligosaccharidanalytik

Charakterisierung von DC, HPLC-RI und HPAEC-PAD

Der zunehmende Einsatz von Oligosacchariden in Produkten aus der Lebensmittel-, Futtermittel- und Healthcare-Industrie verlangt nach der Entwicklung einer schnellen, robusten und flexiblen Analytik für Oligosaccharide. Durch die nahezu unbegrenzte Vielfalt an komplexen Oligosacchariden sind die Anforderungen an die Analytik entsprechend hoch gesetzt.

Ähnlich wie in dieser Studie, sind auch in der Literatur DC, HPLC-RI und HPAEC-PAD die vorherrschenden Methoden für die Oligosaccharidanalytik (Akpınar et al., 2007; Corradini et al., 2012; McCleary et al., 2015). In diesem Kontext ist es zwar generell bekannt, dass eine Trennung von Oligosacchariden mittels HPAEC-PAD eine bessere Trennleistung bietet als mittels HPLC-RI und DC. Es mangelt allerdings an einer Studie, welche die Leistungsfähigkeit dieser drei Methoden systematisch für die Trennung der gleichen Proben untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HPAEC-PAD, HPLC-RI und DC zum ersten Mal sowohl für eine breite Anzahl an linearen und verzweigten Oligosacchariden (XOS, AXOS, MOS, COS, GMOS, LOS) als auch für verschiedene enzymatisch erzeugte Polysaccharidhydrolysate (Arabinoxylan- und Glucomannanhydrolysate) durchgeführt. Die hierbei erzielten Ergebnisse ermöglichen es nun, die Eignung der unterschiedlichen Methoden für eine Trennung spezifischer Oligosaccharidmischungen abschätzen zu können und somit, je nach Fragestellung, die passende Methode auszuwählen. Für die Etablierung von analytischen Verfahren müssen neben der Trennschärfe der verwendeten Technologien weitere Parameter, wie z. B. die Verfügbarkeit, der technische Aufwand, die Geschwindigkeit und der Durchsatz der Technologie mit einbezogen werden. So bietet eine Trennung von Oligosacchariden mittels HPAEC-PAD zwar die beste Trennschärfe, jedoch ist diese für bestimmte Trennprobleme, z. B. einer Analyse von reinen XOS in Abwesenheit von AXOS, gar nicht notwendig. Für dieses Beispiel könnte die Anwendung der HPLC-RI Vorteile in Bezug auf Probendurchsatz (30 min/Probe anstelle von 90 min/Probe) und Möglichkeit zur präparativen Trennung gegenüber der HPAEC-PAD aufweisen. Für eine erste qualitative Untersuchung der Mono- und Oligosaccharidzusammensetzung eines Hydrolysats ist insbesondere eine Analyse mittels DC geeignet: Diese Methode

verbraucht verglichen mit den anderen Methoden verhältnismäßig wenig Probe, ist sehr sensitiv und kann mit geringem apparativen Aufwand durchgeführt werden.

Analyse der Retentionszeiten mittels HPAEC-PAD untersuchter Oligosaccharide

Die breite Anwendbarkeit der HPAEC-PAD für die Trennung verschiedener Polysaccharidhydrolysate wurde in der Literatur schon mehrfach beschrieben (Bhattacharyya und Rohrer, 2012; Cataldi et al., 2000; Corradini et al., 2013). Allerdings wurden bei den durchgeführten Trennungen häufig unterschiedliche Natriumacetat-Gradienten verwendet, sodass Retentionszeiten von Analyten aus einem Chromatogramm nicht zwingend auf andere Chromatogramme übertragen werden können. Eine Übertrag- bzw. Vergleichbarkeit der Retentionszeiten ist für die Chromatographie aber von hoher Bedeutung, da die Identifizierung von Analyten oft nur auf einem Vergleich von Retentionszeiten basiert.

Durch die systematische Analyse verschiedener Polysaccharidhydrolysate und Oligosaccharide unter denselben Messbedingungen wird in dieser Arbeit eine Plattform erstellt, welche dazu beiträgt, die HPAEC-PAD-basierte Analyse von Oligosacchariden besser zu verstehen und zu optimieren. So kann der in dieser Arbeit beschriebene lineare Zusammenhang zwischen Retentionsfaktoren und Polymerisationsgrad von Oligosacchariden dazu genutzt werden, um bei einer Analyse mittels HPAEC-PAD ein Gemisch von Oligosacchariden leichter strukturell zuzuordnen zu können.

Erstmals wurde der Zusammenhang zwischen Retentionsfaktor und Polymerisationsgrad von Oligosacchariden von Paskach et al. (1991) beschrieben. Allerdings wurden bei dieser Studie nur wenige Oligosaccharide sowie hauptsächlich nicht-natürliche Oligosaccharide mit einbezogen und es wurden für die Zuckeranalytik teilweise untypische Chromatographiesäulen, wie z. B. HPIC-ISD6, eingesetzt. Im Unterschied zu den linearen Oligosacchariden konnten die Reaktionszeiten von verzweigten AXOS mittels HPAEC-PAD, wie auch schon durch Kormelink et al. (1993) und McCleary et al. (2015) gezeigt, basierend auf ihrer Struktur nicht vorausgesagt werden.

Einfluss des PAD-Signalabfalls und der PAD-Sensitivität auf die Analyse von Oligosacchariden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Besonderheiten bei der Verwendung der HPAEC-PAD für die Analyse von Oligosacchariden im Detail analysiert: die Analyt-spezifische Abnahme der PAD-Sensitivität (PAD-Signalabfall) über die Lebensdauer einer Goldelektrode und die generell unterschiedliche PAD-Sensitivität für Oligosaccharide unterschiedlicher Struktur.

Dass der PAD-Signalabfall über die Lebensdauer einer Goldelektrode je nach Analyt unterschiedlich sein kann, wurde in der Literatur bisher nur vereinzelt angedeutet (Rohrer et al., 1998; Schäffler et al., 1996; Wefers und Bunzel, 2016). Durch diese Arbeit wurde erstmalig ein Vergleich des PAD-Signalabfalls für 35 verschiedene Analyte durchgeführt und mit Hilfe einer Zerfallskinetik erster Ordnung mathematisch beschrieben (Mechelke et al., 2017). Die hieraus abgeleitete Erkenntnis, dass sich das Verhältnis von PAD-Sensitivitäten verschiedener Analyten über den Verlauf einer Messsequenz verändern kann, hat einen hohen Einfluss auf die quantitative Analytik. So verhindert dieser Effekt, dass durch die Verwendung eines internen Standards der PAD-Signalabfall von einem Analyten auf einen anderen Analyten umgerechnet werden kann. Die Halbwertszeit für den PAD-Signalabfall nahm hierbei mit steigendem Polymerisierungsgrad der Oligosaccharide stetig ab und verdeutlicht damit, dass dieser Effekt insbesondere bei der Analyse von Oligosacchariden zunehmend an Bedeutung gewinnt.

Der genaue Wert der Halbwertszeit für den PAD-Signalabfall hängt von vielen Faktoren ab, wie der Art der Goldelektrode (Folienelektrode oder permanente Elektrode), der Probenmatrix, der Probenvorbereitung und der Probenbeladung, und kann sogar durch die pH-Ag/AgCl Referenzelektrode beeinflusst werden. Dies führt dazu, dass sich die Analyt-spezifischen Halbwertszeiten des PAD-Signalabfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit zwischen einzelnen Sequenzen und zwischen Laboren unterscheiden und stets individuell bestimmt werden müssten.

Basierend auf diesen Ergebnissen ist eine genaue Quantifizierung von Analyten nur über die regelmäßige Messung von externen Standards möglich. Bei diesem sog. „Bracketing“ (engl. für Einklammern) wird die PAD-Sensitivität von Analyten basierend auf den die Probe umrahmenden externen Standards geschätzt. Idealerweise sollte für diese Schätzung nicht wie oft üblich eine lineare Funktion, sondern eine Zerfallskinetik erster Ordnung verwendet werden. Auf dieses Bracketing kann nur verzichtet werden, wenn garantiert werden kann, dass:

- I) der PAD-Signalabfall so gering ist, dass er vernachlässigt werden kann,
- II) die PAD-Halbwertszeit des PAD-Signalabfalls für alle Analyten gleich ist,
- III) der Effekt der Analytkonzentration-abhängigen Sensitivität sich deutlich stärker auswirkt als der PAD-Signalabfall, sodass letzterer vernachlässigt werden kann.

Hierbei ist insbesondere die generelle Verminderung des PAD-Sensitivitätsabfalls erstrebenswert, da dies auch mit einer generell längeren Lebensdauer der Goldelektroden einhergeht. Dass dies auch für die Messung von Oligosacchariden erreicht werden kann, wurde bereits in einer Studie von Rivière et al. (2013) gezeigt. In dieser Studie wurde bei einer konsekutiven

Messung von 30 Proben in Folge mit einer permanenten Goldelektrode für XOS und AXOS kein signifikanter Abfall im PAD-Signal nachgewiesen.

Obwohl eine Bestimmung der PAD-Sensitivität für verschiedene Oligosaccharidtypen bereits zahlreich durchgeführt wurde, wie z. B. für XOS (Li et al., 2013), Fructooligosaccharide (FOS; Ammeraal et al., 1991; Timmermans et al., 1994), Maltooligosaccharide (Sasagawa et al., 1989), menschliche Muttermilchligosaccharide (Kunz et al., 1996) und für eine Reihe an Homo- und Heterooligosacchariden (Paskach et al., 1991), mangelt es bisher dennoch an einer umfassenden Studie, welche die verschiedenen Sensitivitäten miteinander vergleicht und weiterführend interpretiert. So wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig übergreifend für alle untersuchten Oligosaccharidtypen (COS, LOS und XOS) gezeigt, dass die PAD-Sensitivität für Oligosaccharide erheblich geringer ist als für die Monosaccharide, aus denen sie bestehen, und mit steigendem Polymerisierungsgrad weiter abnimmt.

Diese Abnahme der PAD-Sensitivität wurde für einzelne Oligosaccharidtypen, wie z. B. FOS, bereits beschrieben, allerdings mangelte es bislang an einem Vergleich über viele Oligosaccharidtypen hinweg (Borromei et al., 2009). Die starke Schwankung, die die PAD-Sensitivität für verschiedene Analyte haben kann, muss vor allem bei der qualitativen Oligosaccharidanalytik beachtet werden. So kann die Analytkonzentration eines unbekanntes Peaks trotz kleiner Peakfläche vergleichsweise hoch sein und muss bei der Interpretation von HPAEC-PAD-Chromatogrammen beachtet werden. Dies gilt insbesondere für die Analyse von Oligosacchariden, bei denen die PAD-Sensitivität besonders stark variieren kann, und nicht für alle Peaks im Chromatogramm Referenzsubstanzen vorhanden sind (Ballance et al., 2005).

Weitere Methoden in der Zuckeranalytik

Neben DC, HPLC-RI und HPAEC-PAD stellt insbesondere die Kapillarelektrophorese eine weitere, oft eingesetzte Methode für die Trennung von komplexen Oligosaccharidgemischen dar. So zeigten Abballe et al. (2007) für Kapillarelektrophorese (CZE, engl.: *capillary zone electrophoresis*) eine nur geringfügig schlechtere Trennung von Dextrooligosacchariden als mit HPAEC-PAD (CZE: Trennung bis etwa DP30; HPAEC-PAD: Trennung bis etwa DP45). Albrecht et al. (2009) zeigten sogar einen Vorteil der Kapillarelektrophorese gegenüber der HPAEC-PAD in der Analyse von Gluco- und Mannooligosaccharidgemischen. Hierbei ermöglichte die Kapillarelektrophorese eine leichtere Zuordnung der Oligosaccharide zu ihrem Polymerisierungsgrad als es bei der HPAEC-PAD möglich war. Generell wurde auch schon gezeigt, dass die Kapillarelektrophorese für eine Trennung von XOS eingesetzt werden kann (Coulier et al., 2013), allerdings gibt es bisher noch keine Information darüber, inwiefern diese Technologie auch für eine Trennung von verzweigten Oligosacchariden, wie z. B. AXOS, geeignet ist.

Im Unterschied zu DC, HPLC-RI und HPAEC-PAD müssen für die Kapillarelektrophorese die Analyten vor der Trennung mit einem UV- oder Fluoreszenz-Chromophor funktionalisiert werden, damit sie mit einem UV- bzw. Fluoreszenz-Detektor gemessen werden können (Abballe et al., 2007; Albrecht et al., 2009; Albrecht et al., 2011). Eine Verwendung dieser Detektoren bietet den Vorteil, dass das Detektorsignal und die Analytsensitivität stabiler und eine Quantifizierung somit leichter durchzuführen ist als bei einer Quantifizierung über PAD. Andererseits ist dies mit einem Mehraufwand in der Probenvorbereitung verbunden und setzt voraus, dass alle Analyten gleichmäßig funktionalisiert werden können. Dies könnte insbesondere bei der Funktionalisierung von komplexeren Oligosacchariden, wie z. B. AXOS, problematisch sein.

Durch die Ergänzung der HPAEC-PAD oder auch der Kapillarelektrophorese um ein Massenspektrometer (MS) können viele der jeweiligen Nachteile der Methoden, wie z. B. der Signalinstabilität (HPAEC-PAD) und der Notwendigkeit der Funktionalisierung (Kapillarelektrophorese) überwunden werden (Coulter et al., 2013). Zusätzlich kann über eine Massenspektrometereinheit eine Bestimmung des Polymerisierungs- oder auch Substitutionsgrad von Oligosacchariden on-line erfolgen, wodurch die strukturelle Bestimmung der Oligosaccharide erheblich erleichtert wird. Allerdings ist der hierfür notwendige technische Aufwand hoch, so muss für eine Elektronenspray-Ionisationen bei einer HPAEC-PAD-MS der Laufmittelfluss geteilt, der Natriumacetat- bzw. Natriumhydroxid-Anteil im Laufmittel durch einen Suppressor reduziert und mit einer zweiten Pumpe Acetonitril zum Laufmittel hinzugefügt werden (Coulter et al., 2013).

4.3 Herstellung von Oligosacchariden aus Hemicellulose

Analyse des Produktspektrums von Xylanasen bei der Hydrolyse von Arabinoxylan

Die enzymatische Herstellung von Oligosacchariden aus Arabinoxylan wurde im Rahmen dieser Arbeit unter zwei unterschiedlichen Schwerpunkten bearbeitet. Zum einen wurden die Produktspektren von insgesamt 30 Xylanasen im Detail miteinander verglichen. Hierbei war es das Ziel, Enzyme zu identifizieren, mit denen ein breites Spektrum an XOS und AXOS produziert werden kann. Zum anderen wurde durch Kombination ausgewählter Xylanasen und einer α -Arabinofuranosidase gezielt XOS hergestellt und die Ausbeute quantifiziert.

Bei der Analyse der Produktspektren der Xylanasen konnten in dieser Arbeit distinkte Produktmuster für Enzyme der Familien GH10 und GH11, wie auch schon durch Biely et al. (1997) und Kormelink et al. (1993) beschrieben, aber zusätzlich auch von GH5-Enzymen unterschieden werden. Einige dieser Unterschiede im Peakmuster konnten durch Vergleiche mit Standards

(McCleary et al., 2015) bestimmten Oligosaccharidstrukturen zugewiesen und teilweise auch durch die unterschiedliche Substrat- und Produktspezifität der eingesetzten Enzyme erklärt werden. Ein Beispiel hierfür ist die bevorzugte Bildung von A^3XX bei GH10-Enzymen im Vergleich zu XA^3XX bei GH11-Enzymen, was darauf zurückzuführen ist, dass GH11-Enzyme im Gegensatz zu GH10-Enzymen endständige Xyloseeinheiten in direkter Nähe zu arabinosylierten Xylosen nicht abspalten können.

In diesem Zusammenhang wurden allerdings auch verschiedene Peaks beschrieben (U1-8, vgl. Abb. 19), welche in ihrer Retentionszeit deutlich von den verfügbaren AXOS-Standards abweichen. Eine weitere Analyse mittels präparativer DC und Verdau mit einer α -Arabinofuranosidase zeigte, dass es sich bei diesen Peaks vermutlich um kurze AXOS handelt. Eine genauere Strukturanalyse mittels MALDI-TOF war nicht möglich. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein: So waren die verwendeten MALDI-TOF-Bedingungen nicht dafür geeignet, Analyten mit einem Molekulargewicht unter 310 Da zu messen, da in diesem Bereich durch die Kristallisationsmatrix bedingt ein starkes Rauschen die Detektion von Analyten erschwerte. Dies erfordert vergleichsweise hohe Reinheiten und hohe Konzentrationen der Analyte, um diese zuverlässig detektieren zu können, was mit den angewendeten Präparationsmethoden nicht erreicht werden konnte. Weiterhin kann die Detektierbarkeit von Oligosacchariden auch stark von der Substitutionsstruktur des Analyten abhängen. So zeigten AXOS prinzipiell ein deutlich niedrigeres Signal zu Rauschverhältnis bei einer Messung mittels MALDI-TOF als lineare XOS (getestet mit den Oligosaccharidstandards A^3X vs. X_3 und A^2XX vs. X_4).

Generell wurde in der Literatur schon eine große Zahl AXOS beschrieben und Peaks im HPAEC-PAD-Chromatogramm zugeordnet, wie z. B. A^2XX , A^3X , XA^2XX , XA^3XX , $XA^{2+3}XX$, $A^{2+3}XX$ (Kormelink et al., 1993; McCleary et al., 2015; Pastell et al., 2008; Rivière et al., 2013). Allerdings weisen alle diese beschriebenen Oligosaccharide im HPAEC-PAD-Chromatogramm eine vergleichsweise lange (>30 min) und nicht, wie die in dieser Arbeit als unbekannte Substanzen U1-8 beschriebenen Oligosaccharide, eine kurze Retentionszeit (<30 min) auf. Dass diese charakteristischen Peaks in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurden, könnte teilweise darauf zurückzuführen sein, dass in den jeweiligen Studien bei der HPAEC-PAD-Analytik der Natriumacetat-Gradient zu steil für einen Nachweis dieser Oligosaccharide gewählt wurde. Hierdurch würden einige dieser Substanzen zusammen mit den Oligosacchariden X_2 und X_3 eluieren und nicht als unbekannte Substanzen erkennbar sein. Auch werden diese Substanzen nur bei der Verwendung von GH10-Xylanasen gebildet und treten zudem nicht bei allen Xylan-basierten Substraten auf.

Eine detailliertere Analyse dieser Peaks ist insofern interessant, als dass sie eine differenziertere Unterscheidung der Produktspektren von GH10-Xylanasen ermöglicht. Welchen Einfluss die Bildung dieser Substanzen auf die Wirkung von Präbiotika aus Arabinoxylan hat, ist allerdings unklar und muss noch bestimmt werden. Hierbei stellt eine erste Aufreinigung und strukturelle Charakterisierung solcher Oligosaccharide oft den ersten Schritt zur Bestimmung ihres präbiotischen Potentials dar (Pastell et al., 2008; Pastell et al., 2009).

Üblicherweise werden für die präparative Aufreinigung von Oligosacchariden HPLC und vor allem SEC eingesetzt (Funk et al., 2005; McCleary et al., 2015). Während lineare Oligosaccharide über diese Methoden vergleichsweise gut aufgereinigt werden können, ist dies bei substituierten Oligosacchariden wie AXOS teilweise nur noch schwer möglich. Über die präparative DC wird eine Plattform gegeben, mit welcher AXOS in verhältnismäßig kurzer Zeit und mit niedrigem instrumentellen Aufwand, aber auch nur in niedriger Konzentration extrahiert werden können. Im Vergleich zu der in der Literatur primär eingesetzten SEC, war im Rahmen dieser Arbeit die präparative DC insbesondere bei der Trennung von kurzen Oligosacchariden besser geeignet.

Gezielte Herstellung von XOS aus Arabinoxylan

Basierend auf den ermittelten Produktspektren wurden jeweils die GH10- und GH11-Xylanasen hh-Xyn10A und cs-Xyn11A in Kombination mit der α -Arabinofuranosidase hh-Arf43C dazu eingesetzt, um gezielt XOS (DP2-5) herzustellen. Hierbei wurde für hh-Xyn10A eine Ausbeute von 38 % und für cs-Xyn11A eine Ausbeute von 34 % erzielt. Bei der Bewertung dieser Ausbeuten muss allerdings beachtet werden, dass bislang weder eine Optimierung der eingesetzten Substrat- und Enzymauswahl, der Substrat- und Enzymmenge, noch des eingesetzten Prozesses stattfand. So sollte z. B. durch die Verwendung einer α -Arabinofuranosidase mit einer stärkeren AXH-d-Aktivität, wie z. B. cs-Arf51B, bereits eine Steigerung der Produktausbeute zu erreichen sein.

Die in der Literatur erreichten Ausbeuten an gezielt hergestellten XOS variieren je nach untersuchtem Substrat und eingesetzter Methode stark (Otieno und Ahring, 2012). Üblicherweise wird das Polysaccharid nicht kommerziell erworben, sondern durch alkalische oder saure Vorbehandlung direkt aus Pflanzenbiomasse extrahiert. Auch wird durch diese Vorbehandlung oftmals ein Großteil der Arabinosylierungen vom Polysaccharid gelöst oder es wird ein Polysaccharid gewählt, das einen niedrigen Grad der Arabinosylierung aufweist (Aachary und Prapulla, 2009). In beiden Fällen kann bei der anschließenden enzymatischen Behandlung auf eine α -Arabinofuranosidase verzichtet werden. Für die Herstellung von XOS aus Maiskolben

wurde von Achary und Prapulla (2009) basierend auf alkalischer Vorbehandlung und enzymatischer Hydrolyse (Xylanase) eine Ausbeute von etwas über 80 % erreicht. Im Unterschied hierzu betrug die Ausbeute bei der Herstellung von XOS aus Weizenkleie über eine Xylanase aus *Bacillus subtilis* durch Wang et al. (2009) etwa 30 %.

Diese in der Literatur bestimmten Angaben zur Produktausbeute sind teilweise schwierig zu bewerten, da XOS als Produkt nicht genau definiert sind. So handelte es sich z. B. bei 80 % der von Achary und Prapulla hergestellten XOS um X_2 . Im Vergleich dazu reichte der Polymerisationsgrad der bei Wang et al. (2009), aber auch der in dieser Arbeit hergestellten Oligosaccharide bis DP5. Auch weist das bei Achary und Prapulla eingesetzte Xylan keine Arabinose-seitengruppen auf, sodass von Natur aus für dieses Polysaccharid eine höhere Ausbeute erreicht werden kann als für das in dieser Arbeit verwendete lösliche Arabinoxylan aus Weizen, welches zu 38 % (Herstellerangaben) aus Arabinose besteht.

Obwohl die enzymatische Hydrolyse mittels Xylanasen eine oft eingesetzte Technologie für die Herstellung von XOS ist, wurde der Einfluss der GH-Familie der eingesetzten Xylanase auf das Oligosaccharidspektrum bisher kaum untersucht. So wurde erst von Morgan et al. (2017) gezeigt, dass GH10-Xylanasen besser für eine XOS- bzw. AXOS-Produktion aus Arabinoxylan aus Weizen geeignet sind als GH11-Xylanasen. Dieser Vergleich beruhte allerdings primär auf einem Vergleich der pH- und Temperaturstabilität der Enzyme und bezog lediglich die Bildung von kurzkettigen (X_2 - X_4), aber nicht von länger-kettigen XOS bzw. AXOS mit ein. Würde das quantifizierte Produktspektrum auf längere Oligosaccharide erweitert werden, würde die Produktausbeute für GH11-Xylanasen im Vergleich zu GH10-Xylanasen ansteigen. Dies liegt daran, dass GH11-Xylanasen, wie in dieser Arbeit gezeigt, dazu tendieren, längere, und GH10-Xylanasen kürzere XOS zu bilden.

Herstellung von GMOS aus Glucomannan

Die Herstellung von GMOS aus Glucomannan ist verglichen mit der Herstellung von XOS und AXOS noch wenig untersucht. Während bei der Herstellung von XOS und AXOS häufig auch chemische und physikalische Verfahren eingesetzt werden (Akpınar et al., 2009; Otieno und Ahring, 2012), werden für die Herstellung von GMOS ausschließlich Enzyme verwendet (Gómez et al., 2017). Üblicherweise beschränkt man sich auf die Herstellung eines Glucomannanhydrolysats mit β -Mannanasen oder β -Glucanasen und setzt dieses Hydrolysat direkt als potentielles Präbiotikum ein (Al-Ghazzewi und Tester, 2010; Tester und Al-Ghazzewi, 2016).

Eine Optimierung der Oligosaccharidherstellung für bestimmte Oligosaccharide, wie es für XOS und AXOS teilweise durchgeführt wurde (Morgan et al., 2017; Pastell et al., 2009), ist bei GMOS

bisher kaum möglich. Eine Ursache hierfür ist zum Teil die Schwierigkeit der Quantifizierung aus Glucomannan hergestellter Oligosaccharide. Dies wiederum ist auf die hohe Vielfalt an Oligosacchariden in Glucomannanhydrolysaten, ihrer schwierigen Trennung und der geringen Anzahl vorhandener Referenzsubstanzen zurückzuführen. Daher werden für die Beschreibung der strukturellen Zusammensetzung von Glucomannanhydrolysaten oft nur die für die Hydrolyse eingesetzten Enzyme und die Größenverteilung des Oligosaccharidgemischs angegeben (Albrecht et al., 2011; Al-Ghazzewi et al., 2007; Tester und Al-Ghazzewi, 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 49 unterschiedliche Enzyme für den Abbau von Glucomannan eingesetzt und ihr Produktmuster im Detail verglichen. Dieser systematische Vergleich ermöglicht eine Unterscheidung im Produktmuster der 43 β -Glucanasen zu den 6 β -Mannanasen, aber auch eine Unterscheidung der Produktmuster innerhalb der β -Glucanasen. So konnte den GH5- und GH9- β -Glucanasen ein jeweils für die Enzymfamilie charakteristisches Produktspektrum zugeordnet werden. Weiterhin wurde insbesondere für die Enzyme ct-Cel5E und ct-Cel9/44J eine besonders hohe Abbauleistung mit einem jeweils individuellen Produktspektrum ermittelt. Eine anschließende Analyse der Hydrolyseprodukte mittels präparativer DC, HPAEC-PAD und MALDI-TOF liefert erste strukturelle Hinweise über die gebildeten Oligosaccharide.

Der nächste Schritt wäre nun, zu ermitteln, wie hoch das präbiotische Potential der mit Hilfe der Enzym-*Toolbox* herstellbaren Glucomannanhydrolysate ist bzw. wie sich das präbiotische Potential von Glucomannanhydrolysaten mit Hilfe der Enzym-*Toolbox* verbessern lässt. In diesem Zusammenhang konnten Albrecht et al. (2009) bereits zeigen, dass über β -Glucanasen hergestelltes Glucomannanhydrolysat stärker durch das menschliche Darmmikrobiom verstoffwechselt wird als über β -Mannanasen hergestelltes Glucomannanhydrolysat. Hieraus haben Albrecht et al. auch ein höheres präbiotisches Potential für über β -Glucanase erzeugte Glucomannanhydrolysate abgeleitet. Mit den durch die Enzym-*Toolbox* gegebenen Möglichkeiten zur Herstellung verschiedener Mischungen an Oligosacchariden, insbesondere durch die Unterschiede im Produktspektrum der β -Glucanasen, können die von Albrecht et al. (2009) erzielten Ergebnisse eventuell noch weiter spezifiziert werden.

In dieser und in vielen weiteren Arbeiten (Albrecht et al., 2011; Tester und Al-Ghazzewi, 2016) wurde für die Herstellung von MOS und GMOS ausschließlich Glucomannan der Teufelszunge verwendet. Dieses Polysaccharid wurde ausgewählt, da es bereits breiten Einzug in die Lebensmittelbranche gefunden hat und dessen Anwendung im Lebensmittelbereich etabliert ist. Zusätzlich ist es in Form von hochreinem Pulver in großen Mengen verfügbar, welches den Einsatz dieses Polysaccharids im Labor vereinfacht. Sollte Glucomannan aus anderen Quellen,

wie z.B. Forstabfällen, verwendet werden, ist dies mit hohem experimentellen Aufwand verbunden.

Da sich die Zusammensetzung des Glucomannans je nach Quelle des Polysaccharids stark unterscheiden kann (Gómez et al., 2017), lassen sich die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse für Glucomannan aus der Teufelszunge nicht direkt auf eine Valorisierung anderer Polysaccharide, wie Glucomannan aus Forstabfällen, übertragen. Die Unterschiede werden sich vermutlich sowohl auf die Aktivität der getesteten Enzyme als auch auf die Vielfalt der erzeugten Oligosaccharide auswirken. Die Ergebnisse können dazu verwendet werden, die Herstellung neuer potentieller Präbiotika zu verbessern, tragen aber nicht direkt dazu bei, die Wertschöpfung pflanzlicher Reststoffströme zu verbessern.

Präparative Aufreinigung von Oligosacchariden

Die für die Aufreinigung von Oligosacchariden eingesetzten Verfahren hängen stark von dem eingesetzten Substrat und der für die Hydrolyse eingesetzten Technologie ab. So können der Einsatz hoher Temperaturen in Kombination mit sauren oder alkalischen Bedingungen zur Bildung von Maillard-Produkten, aber auch von Furfural und Hydroxymethylfurfural führen. Diese Nebenprodukte führen zu einer gelblichen Färbung des Hydrolysats, sind teilweise toxisch und müssen für eine präbiotische Anwendung aus dem Polysaccharidhydrolysat entfernt werden. Dies kann durch einen „Decoloring“-Schritt (engl. für Entfärbung) z.B. mittels Ionenaustausch- und Aktivkohle-Chromatographie erreicht werden (Makishima et al., 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit kam es auch bei der enzymatischen Herstellung von Oligosacchariden aus Arabinoxylan und Glucomannan im großen Maßstab (>100 mL), nicht aber im kleinen Maßstab (<5 mL), zu einer leichten Gelbfärbung der Hydrolysate. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass die lange Reaktionsdauer von bis zu 24 h bei einer Temperatur von 60 °C für die Bildung von Nebenprodukten ausreichen könnte. Diese Anreicherung von Nebenprodukten (Gelbfärbung) wurde beim Einkonzentrieren im Rotationsverdampfer (ebenfalls bei 60 °C) weiter verstärkt, konnte allerdings in den anschließenden Waschschrinen mit Ethanol bzw. durch die Anwendung von Chromatographie aus dem Produktgemisch wieder entfernt werden.

Generell sollte bei der Herstellung von Oligosacchariden aus Hemicellulose die Bildung von Monosacchariden vermieden werden, da diese kein präbiotisches Potential aufweisen. Zum einen kann hierfür die Bildung von Monosacchariden bei der Hydrolyse gemindert werden, z. B. durch Auswahl geeigneter Polysaccharide und Enzyme (Aachary und Prapulla, 2011; Bian et al., 2013; Otieno und Ahring, 2012). Zum anderen können gebildete Monosaccharide aus der Produktmischung entfernt werden, wie z. B. durch eine chromatographische Aufreinigung, was

jedoch die Kosten des Herstellungsprozesses erhöht. Eine Alternative hierzu stellt die gezielte enzymatische Überführung von bei der XOS-Produktion gebildeter Xylose zu Xylitol dar, welches als Zuckeraustauschstoff in der Lebensmittelindustrie eingesetzt wird und zu einer Wertsteigerung der Produktmischung führen kann (Jimeno, 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden bei allen hergestellten Oligosaccharidpräparationen auch Monosaccharide. Generell war die Freisetzung von Monosacchariden bei der Herstellung von Oligosacchariden aus Glucomannan (hauptsächlich Glucose und etwas Mannose) geringer als bei der Herstellung von Oligosacchariden aus Arabinoxylan (hauptsächlich Xylose). Allerdings konnten alle freigesetzten Monosaccharide, genauso wie Pufferbestandteile, sowohl mittels SEC als auch mittels HPLC-RI aus den Reaktionsansätzen entfernt und Oligosaccharidpräparationen mit ausreichender Reinheit für präbiotische Tests erreicht werden.

Zusätzlich war durch diese Methoden auch eine partielle Anreicherung bestimmter Oligosaccharidfraktionen möglich. Inwiefern letzteres dazu beitragen kann, eine Oligosaccharidmischung bezogen auf eine Präbiotik-Anwendung aufzuwerten, ist allerdings noch nicht geklärt. Üblicherweise wird eine selektive Aufreinigung von einzelnen Oligosacchariden nur für eine Strukturaufklärung von Oligosacchariden, nicht aber als Vorbereitung für die Herstellung von Präbiotika eingesetzt (Otieno und Ahring, 2012).

Die hier beschriebene chromatographische Aufreinigung ist in der industriellen Umsetzung vergleichsweise teuer. Je nach Anwendung der Oligosaccharide kann es sinnvoll sein, auf diese Art der Aufreinigung zu verzichten und andere Technologien zu verwenden. So zeigte die im Rahmen dieser Arbeit verwendete sukzessive Solubilisierung mittels Ethanol-Wasser-Gemischen zur Aufreinigung von GMOS verglichen mit den chromatographischen Methoden einen nur geringfügig niedrigen Grad der Trennung.

Mit der umgekehrten Methode, der sukzessiven Ethanol-fällung, konnte ebenfalls eine vergleichbar gute Fraktionierung der Oligosaccharide erreicht werden. Im Unterschied zur sukzessiven Solubilisierung konnte diese Methode nicht nur für die Aufreinigung von GMOS, sondern auch von XOS und AXOS eingesetzt werden, wie auch schon durch Swennen et al. (2006) gezeigt. Die sukzessive Ethanol-fällung hatte gegenüber der sukzessiven Solubilisierung den Vorteil, dass auf eine vorherige Prozessierung des Hydrolysats mittels Querstromfiltration vor der Präzipitation verzichtet werden konnte, da sich das Polysaccharid bei etwa 50 % v/v Ethanol selektiv ausfällen ließ. Allerdings war es auch kaum möglich, den Ethanolanteil hierbei auf über 90 % v/v zu erhöhen, da das Gesamtvolumen des Ansatzes hierbei exponentiell anstieg.

Eine weitere Technologie, mit der die Reinheit von Oligosaccharidlösungen erhöht werden kann und im Vergleich zur Chromatographie besser für eine Prozessierung großer Volumina geeignet ist, ist die Querstromfiltration (Swennen et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Technologie sowohl zur Entfernung von Feststoffanteilen im Polysaccharidhydrolysat als auch zur Entfernung nicht umgesetzten Polysaccharids eingesetzt werden. Eine Fraktionierung nach verschiedenen Größenbereichen, wie von Akpinar et al. (2007) gezeigt, konnte in dieser Arbeit aber nicht erreicht werden. Hierfür war die sukzessive Solubilisierung mittels Ethanol-Wasser-Gemischen und Chromatographie besser geeignet.

4.4 Eignung von XOS, AXOS und GMOS als Präbiotika

Die in dieser Arbeit hergestellten Oligosaccharidpräparationen (XOS, AXOS und GMOS) wurden im Rahmen eines europäischen Verbundprojekts (Valor Plus, Förderungsnummer 613802) verschiedenen Projektpartnern für eine detaillierte Bestimmung der präbiotischen Eigenschaften der Präparationen zur Verfügung gestellt. Die präbiotischen Tests sollten hierbei unter anderem die selektive Wachstumsförderung bestimmter probiotischer Bakterienstämme durch die Oligosaccharidpräparationen umfassen und die präbiotischen Eigenschaften mit kommerziellen Präparaten vergleichen.

Da aus den hierzu durchgeführten Arbeiten allerdings keine eindeutigen Erkenntnisse bezüglich der präbiotischen Wirkung der hergestellten Oligosaccharidpräparationen ermittelt werden konnten, soll nachfolgend stattdessen eine theoretische Evaluation des Präbiotikkonzepts erfolgen. Hierbei soll sowohl das theoretische Grundgerüst des Präbiotikkonzepts erklärt und eine Übersicht über verschiedene Präbiotika geschaffen, als auch im Detail die präbiotische Wirkung von XOS, AXOS und GMOS diskutiert werden.

Probiotika

Die positiven gesundheitlichen Effekte von Präbiotika beruhen auf der hohen Bedeutung von Mikrobiomen, insbesondere des Darmmikrobioms, für den menschlichen Körper. Um den Einsatz von Präbiotika für Mensch und Tier besser beurteilen zu können, ist es daher notwendig, die vielfältigen Funktionen der verschiedenen gesundheitsrelevanten Mikrobiome im Detail zu verstehen. Das Darmmikrobiom umfasst 1,3fach mehr Bakterien als der menschliche Körper Zellen aufweist und verfügt über 100fach mehr Gene als das menschliche Genom (Griffin et al., 2015; Sender et al., 2016). Hinzu kommen noch diverse Viren, Pilze, Archaeen, Phagen, Protozoen und weitere Eukaryoten (Bouter et al., 2017). Die Darmflora ist komplex, passt sich der Ernährung an und erfüllt essentielle Funktionen im Körper. Diese umfassen unter anderem

Immunmodulation, Unterstützung bei der Verdauung, Versorgung der Darmepithelschicht mit Energie und verschiedene endokrine Funktionen (Bouter et al., 2017).

Für ein leichteres Verständnis der mikrobiellen Vielfalt der Darmflora werden Darmbakterien oft in potentiell schädliche und potentiell gesundheitsförderliche Bakterien eingeteilt. Potentiell schädliche Bakterien können zur Entwicklung von Durchfall, Infektionen, Darmfäulnis, Leberschäden und Darmkrebs beitragen. Gesundheitsförderliche Bakterien, sog. probiotische Bakterien, sollen hingegen das Wachstum von schädlichen Bakterien inhibieren, zur Stimulation der Immunfunktion beitragen, die Verdauung verbessern und an der Synthese von wichtigen Metaboliten mitwirken.

Eine gesunde Darmflora zeichnet sich durch einen hohen Anteil der probiotischen Bakterien Bifidobakterien und Lactobacilli aus, weswegen diese sehr oft fermentierten Milchprodukten, wie z.B. Joghurt, zugegeben werden, um die Darmflora zu verbessern. Eine wichtige Voraussetzung für die Wirksamkeit von Probiotika ist, dass sie in ausreichender Menge und in keimfähigem Zustand durch den oberen Verdauungstrakt bis hin zum Dickdarm gelangen. Genauso ist es aber auch wichtig, dass dort eine Umgebung vorherrscht, in der die Probiotika proliferieren können. Hierzu zählt z.B. die Möglichkeit für Probiotika, an das intestinale Epithelium binden zu können, um nicht aus dem Darm herausgespült zu werden. Dies hängt sowohl vom Zustand der Zellen nach dem Transfer in den Darm, der Zusammensetzung der Darmflora, als auch den Nährstoffbedingungen und dem pH-Wert innerhalb des Darms ab. Die Nährstoffbedingungen haben weiterhin einen großen Einfluss auf die Regulierung des Stoffwechsels der Probiotika bezüglich ihrer metabolischen Produkte, wie z.B. kurzer Fettsäuren (SCFA, engl.: *small chain fatty acids*), und somit ihrer potentiellen gesundheitsförderlichen Effekte. Letztendlich hat sich hieraus das Konzept der Präbiotika abgeleitet, die als Nährstoffe für Probiotika dienen, und im Darm ein Milieu schaffen sollen, bei dem Probiotika ihre positive Wirkung besser entfalten können. Die Kombination von Prä- und Probiotika wird weiterhin als Synbiotika definiert (Gibson und Roberfroid, 1995).

Die Vielfalt an möglichen Substanzen, die eine präbiotische Wirkung im Darm aufweisen können, ist groß und umfasst verschiedene Klassen an Oligosacchariden. Neben den kommerziell etablierten Präbiotika FOS und GOS sind hierbei vor allem die in dieser Arbeit untersuchten Oligosaccharidklassen XOS, AXOS und GMOS von besonderer Bedeutung, da diese vergleichsweise kostengünstig aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen werden können (Broekaert et al., 2011; Tester und Al-Ghazzewi, 2016).

Definition von Präbiotika

Die Definition von Präbiotika wurde seit ihrer Einführung von Gibson und Roberfroid (1995) mehrfach präzisiert (Bindels et al., 2015; Gibson, 2004; Roberfroid, 2007; Roberfroid et al., 2010). Um eine Substanz als Präbiotikum bezeichnen zu können, müssen demnach folgende Bedingungen erfüllt sein:

1. Präbiotika dürfen weder im Magen durch die Magensäure noch im Dünndarm durch menschliche Enzyme hydrolysiert werden. Diese Bedingung wurde mittlerweile abgeschwächt: So muss das Präbiotikum nicht vollständig unverdaulich sein, sondern es reicht aus, wenn eine wirksame Menge des Wirkstoffs nach Durchlaufen des oberen gastrointestinalen Trakts in den Dickdarm gelangt (Gibson und Roberfroid, 1995; Roberfroid, 2007).
2. Das Präbiotikum muss ein selektives Substrat für ein einzelnes oder eine limitierte Anzahl an gesundheitsförderlichen Bakterien sein, ihr Wachstum fördern oder sie metabolisch aktivieren. Die Betrachtung des Effekts eines Präbiotikums auf ein isoliertes Probiotikum reicht für diese Aussage nicht aus, da bei diesem Ansatz Wechselwirkungen der Darmflora vernachlässigt werden (Roberfroid, 2007).
3. Ein Präbiotikum muss dazu beitragen, im Darm eine gesundheitsförderliche Darmflora-zusammensetzung einzustellen. Kennzahlen hierfür umfassen z.B. die Zunahme der probiotischen Bifidobakterien in Abhängigkeit zu der täglichen Aufnahme an Präbiotikum (Palframan et al., 2003; Roberfroid, 2007) oder aber auch das Artenreichtum der Darmflora (Moreno et al., 2017).
4. In der aktuellsten Neuformulierung des Begriffs Präbiotika von Bindels et al. (2015) wird der Fokus von der Wachstumsförderung bestimmter probiotischer Bakterien auf die Wirksamkeit auf die gesamte Darmflora verschoben. So muss eine Veränderung der Darmflora-zusammensetzung nicht zwingend durch Wachstumsförderung bestimmter Bakterien verändert werden, sondern kann auch mit der Verstoffwechslung von Präbiotika zu wichtigen Metaboliten, die die Darmflora beeinflussen, einhergehen.
5. Letztendlich muss gezeigt werden, dass das Präbiotikum systemische Effekte ausübt und die Gesundheit des Wirtes verbessert. Dies kann nur über Tier-basierte Studien und anschließende klinische Studien am Menschen gezeigt werden (Gibson, 2004).

Nach dieser Definition ist die Stoffklasse von Präbiotika nicht genau definiert und kann Stoffklassen wie Peptide, Proteine, Lipide und Lignine umfassen. Üblicherweise werden unter Präbiotika allerdings nichtverdaubare Kohlenhydrate mit DP 2-10 verstanden (Gibson, 2004; Gibson und Roberfroid, 1995).

Der erste Hinweis auf eine präbiotische Wirkung eines Oligosaccharids wird oft durch die Ermittlung der Wachstumsförderung von einzelnen probiotischen Bakterienstämmen hergeleitet (Zweiter Punkt der Bedingungen für die Definition von Präbiotika), da die notwendigen Experimente mit einem vergleichsweise geringen experimentellen Aufwand einhergehen. So wurden auch einige der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Oligosaccharid-Präparationen auf diese Weise von einem Projektpartner auf ihre präbiotischen Eigenschaften untersucht (Ergebnisse nicht gezeigt). Da bei diesen Experimenten allerdings die komplexen Wechselwirkungen der Darmflora nicht miteinbezogen werden können und keine Aussagen über systemische Effekte möglich sind, kann hieraus allerdings noch keine eindeutige Aussage über die tatsächliche präbiotische Wirkung abgeleitet werden.

Positive gesundheitliche Effekte von Präbiotika

Generell sind die mit Präbiotika assoziierten, positiven gesundheitlichen Effekte ebenso vielfältig, wie die der Darmflora zugeordneten biologischen Funktionen. Besonderes Augenmerk erhält hierbei der Einsatz der Präbiotika zur generellen Verbesserung der Darmflora, der Verminderung des Risikos einer Darminfektion, der verbesserten Mineralienabsorption, der Immunmodulation und der Darmkrebsvorbeugung (van Craeyveld et al., 2008). Der Großteil dieser Effekte hängt mit der mikrobiellen Bildung von SCFA zusammen, weswegen die SCFA-Bildung zusammen mit der selektiven Wachstumsförderung bestimmter Probiotika (z. B. Bifidusfaktor – explizite Wachstumsförderung von Bifidobakterien) als Indikator für die Wirksamkeit potentieller Präbiotika verwendet wird (Gibson und Roberfroid, 1995; Roberfroid, 2007). Eine Übersicht über mögliche positive Effekte von Präbiotika ist in Abbildung 30 angegeben.

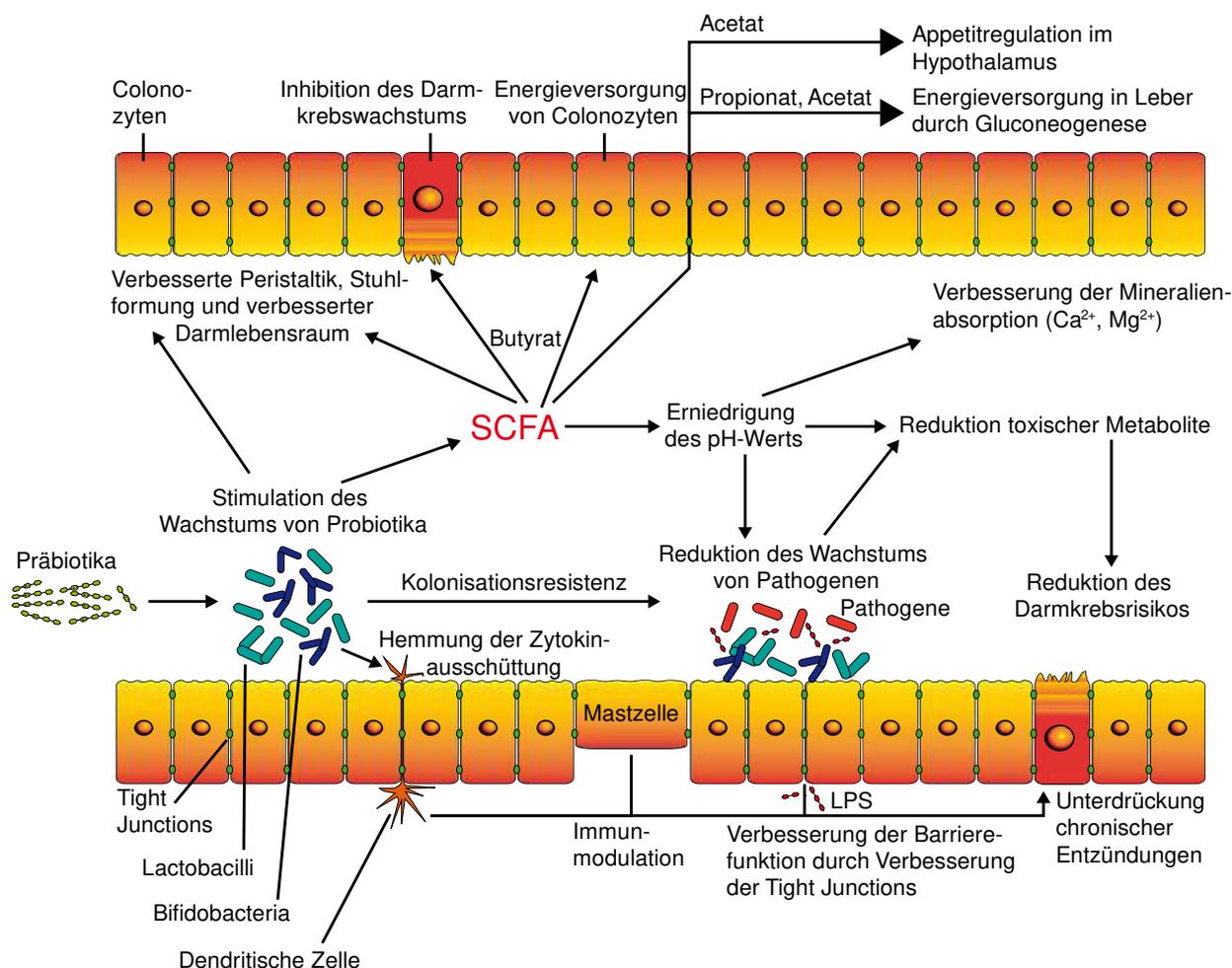


Abb. 30 Potentielle Wirkungen von Präbiotika auf die Darmflora und auf die Gesundheit des Wirts
 Grundschemata der Graphik wurde adaptiert von Aachary und Prapulla (2009) und mit weiteren Wirkmechanismen nach Francino (2017), Bultman (2017), Bouter et al. (2017) und Dahl et al. (2017) erweitert. SCFA = kurze Fettsäuren (engl. small chain fatty acids), LPS = Lipopolysaccharide.

Übersicht über Präbiotika und potentielle Präbiotika

Seit der ersten Definition des Präbiotikkonzepts anhand von Fructooligosacchariden bzw. Inulin von Gibson und Roberfroid (1995) wurden stetig neue Oligosaccharidklassen beschrieben, welche als potentielle Präbiotika bezeichnet werden. Für eine klare Klassifizierung als Präbiotika müssen Oligosaccharide wie oben erläutert viele Bedingungen erfüllen. Da gerade der Nachweis der ganzheitlichen positiven Effekte auf den menschlichen Körper aufwendig ist, und oft nur durch Tier- und klinische Ernährungsstudien erbracht werden kann, können nur wenige der potentiell präbiotischen Oligosaccharide tatsächlich als Präbiotika bezeichnet werden (Roberfroid, 2007). Eine Übersicht über potentielle Präbiotika, einschließlich der in dieser Arbeit untersuchten XOS, AXOS und GMOS, ist in Tabelle 31 angegeben.

Tab. 31 Übersicht über industriell relevante Präbiotika und Präbiotikakandidaten

Oligosaccharid-Klasse	Abk.	Präbiotik-Status	Weitere Informationen	Referenzen
Aus Hemicellulose hydrolytisch hergestellt				
Xylooligosaccharide	XOS	Bestätigt		Yang et al. (2015) Finegold et al. (2014)
Arabinoxylooligosaccharide	AXOS	Bestätigt	Hergestellt aus pflanzlichen Restströmen, wie z.B. Getreiden und Gräsern	Sanchez et al. (2009) Broekaert et al. (2011) Geraylou et al. (2013) Gomez et al. (2015) Poesen et al. (2016)
Mannooligosaccharide	MOS	Kandidat	Hergestellt aus pflanzlichen Restströmen wie der Teufelszunge	Belorkar und Gupta (2016)
Glucomannooligosaccharide	GMOS	Kandidat	oder aus Zellwandbestandteilen von Hefen	Tester und Al-Ghazzewi (2016) Al-Ghazzewi et al. (2012)
Aus Pektin hergestellt				
Arabinooligosaccharide	AOS	Kandidat	Können aus Zuckerrüben gewonnen werden	Belorkar und Gupta (2016)
Pektinooligosaccharide	POS	Kandidat	Können aus höheren Pflanzen wie Früchten und Gemüse extrahiert werden	Belorkar und Gupta (2016)
Aus Di- bzw. Monosacchariden transglykosidisch synthetisiert				
Galactooligosaccharide	GOS	Bestätigt	Produziert aus Lactose über Transglycosylierung mittels Galactosidase	Roberfroid (2007)
Fructooligosaccharide	FOS	Bestätigt	Kann hydrolytisch aus Inulin gewonnen werden, wird üblicherweise jedoch basierend auf Sucrose synthetisiert	Gibson (2004), Crittenden und Playne (1996)
Glucoligosaccharide	GOS	Kandidat	Synthetisiert durch Glucosetransfer mittels Glucosyltransferase von Sucrose zu Maltose	Gibson (2004), Crittenden und Playne (1996)
Weitere Oligosaccharide				
Chitinooligosaccharide	COS	Kandidat	Können aus Krustentierschalen wie Garnelen hergestellt werden	Belorkar und Gupta (2016)
Muttermilcholigosaccharide*	HMO	Kandidat	Die biologische Wirkung von HMOs ist als sehr hoch zu betrachten, allerdings ist eine industrielle Herstellung bisher nicht möglich	Bode (2012) Belorkar und Gupta (2016)
Malto- und Isomaltooligosaccharide	MOS/ IMOS	Bestätigt	Produziert aus Stärke; fördert Bildung von Butyrat	Gibson (2004) Roberfroid (2007)
Lactosucrose		Kandidat	Produziert aus Mix an Lactose und Sucrose mit dem Enzym β -Fructofuranosidase; fördert Wachstum von Bifidobakterien	Gibson (2004), Crittenden und Playne (1996)
Lactulose		Bestätigt	Disaccharid, das durch Isomerisierung der Lactose gewonnen wird	Roberfroid (2007) Carvalho et al. (2013)

* Ein natürliches maternales Präbiotikum, kann jedoch noch nicht im industriellen Maßstab hergestellt werden, sodass es schwierig ist, den präbiotischen Effekt in klinischen Studien zu bestätigen. Die angegebenen Oligosaccharidtypen umfassen teilweise eine Vielzahl an Untergruppen, wie z. B. bei den Malto-/Isomaltooligosacchariden, welche zusätzlich die Untergruppen Isomaltooligosaccharide (IMOS), Alternan-Oligosaccharide, Mutanoligosaccharide, cyclische Isomaltooligosaccharide, lineare und verzweigte Maltooligosaccharide und Oligodextrine umfassen können.

Industriell werden Oligosaccharide bisher entweder durch Transglykosylierungen aus Mono- und Disacchariden synthetisiert oder durch gezielte Hydrolyse von üblicherweise pflanzlichen Polysacchariden hergestellt. Unabhängig von der Herstellungsmethode ist es bei allen Oligosaccharidpräparationen von essentieller Bedeutung, dass sie frei von Monosacchariden sind.

Monosaccharide können zwar von der Darmflora verstoffwechselt werden, weisen hierbei allerdings keine präbiotischen Eigenschaften auf, wie die selektive Wachstumsförderung von Probiotika oder einer verbesserten SCFA-Ausschüttung. Weiterhin werden Monosaccharide vom Körper teilweise absorbiert und gelangen nicht zwingend in den Dickdarm zur Darmflora (Aachary und Prapulla, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Ziel einer niedrigen Konzentration an Monosacchariden im Oligosaccharid-Produktgemisch durch eine spezifische chromatographische Aufreinigung (XOS und AXOS) und eine generell niedrige Bildung von Monosacchariden (GMOS) erreicht werden.

Neben der Entwicklung einer neuen Ernährungsplattform zur Verbesserung der Darmflora steht beim hydrolytischen Ansatz zur Präbiotikaherstellung vor allem auch die verbesserte Wertschöpfung von Reststoffströmen im Vordergrund. Im europäischen Verbundprojekt Valor Plus, in dessen Rahmen diese Arbeit durchgeführt wurde, wurde dieser Ansatz daher als große Chance gesehen, die Wertschöpfung von Hemicellulose aus Bioraffinerie-Prozessen grundlegend zu verbessern. Basierend auf den im Projekt bearbeiteten nachwachsenden Rohstoffen, wie z. B. Weizenstroh und Kiefernholz, wurde der Fokus auf den Abbau von Xylan bzw. Arabinoxylan und Mannan bzw. Glucomannan gesetzt, welche mengenmäßig die wichtigsten Hemicellulosen dieser Rohstoffe darstellen. Die hieraus ableitbaren und für das Projekt relevanten Oligosaccharidtypen waren demnach XOS, AXOS, MOS und GMOS.

Unabhängig von der präbiotischen Wirkung kann eine Verwendung von Oligosacchariden als Lebensmittelfüllstoff eine wichtige Anwendungsmöglichkeit darstellen, die verglichen mit der Biotreibstoffherstellung eine hohe Wertschöpfung bietet (Crittenden und Playne, 1996). So haben Oligosaccharide teilweise strukturgebende Eigenschaften und können dazu angewendet werden, bei Lebensmitteln das Mundgefühl zu verbessern. Hierdurch können Oligosaccharide in einigen Lebensmitteln als kalorienarmer Ersatz für Zucker und Fette eingesetzt werden und führen dadurch indirekt zu einer Verbesserung der menschlichen Gesundheit. Für eine derartige Anwendung von Oligosacchariden sind insbesondere Softdrinks, Backwaren und Milchprodukte hervorzuheben (Aachary und Prapulla, 2011).

Der Vorteil dieses Wertschöpfungsansatzes ist es, dass für eine solche Anwendung die oft kostspieligen und aufwendigen Verfahren zur Ermittlung präbiotischer Eigenschaften von Oligosacchariden nicht erforderlich sind. Stattdessen reicht für den Vertrieb der Oligosaccharide eine Ermittlung der Unbedenklichkeit bei ihrem Verzehr nach Novel-Food-Verordnung eventuell schon aus. Bei einer solchen Anwendung von Oligosacchariden muss allerdings auf für Präbiotika-typische Gesundheitsansprüche verzichtet werden, sodass das Produkt eventuell weniger hochpreisig verkauft werden kann als reguläre Präbiotika. Je geringer wiederum der

Verkaufspreis der Oligosaccharide ist, desto preis- und kostensensitiver werden die herzustellenden Oligosaccharide. Diese Anforderungen können Oligosaccharidtypen, welche aus Pflanzenreststoffen gewonnen werden, eventuell leichter erfüllen als solche Oligosaccharidtypen, welche aus vergleichsweise teureren Quellen stammen.

Je nach Anwendung der Oligosaccharide gewinnen neben den präbiotischen zunehmend auch physikochemische Eigenschaften der Oligosaccharide an Bedeutung. Hierbei zeigen sich durchaus Unterschiede zwischen den verschiedenen Oligosaccharidtypen. So zeichnen sich XOS durch eine hohe Thermo- und pH-Stabilität verglichen mit FOS aus (Broekaert et al., 2011), was insbesondere für einen Einsatz bei Softdrinks und manchen Milchprodukten relevant sein kann. GMOS weisen im Vergleich zu XOS eine hohe Gel-bildende Wirkung auf und sind dadurch für einen Form-gebenden Einsatz in Lebensmitteln besser geeignet als weniger Gel-bildende Oligosaccharidtypen (Gómez et al., 2017). Aus den breiten Anwendungsmöglichkeiten von Oligosacchariden resultieren entsprechend viele Anforderungen, welche eventuell nicht durch einen einzelnen Oligosaccharidtyp, sondern erst durch die Entwicklung verschiedener Oligosaccharidtypen erfüllt werden können.

Vergleich der präbiotischen Wirkung verschiedener Präbiotika

Nachdem in der vorliegenden Arbeit verschiedene Technologien zur gezielten Herstellung und Modifizierung von XOS und AXOS beschrieben wurden, stellt sich die Frage, inwiefern diese Technologien für die Herstellung von Präbiotika relevant sind. So geht jede Form der Modifizierung der Oligosaccharide bzw. daraus resultierende zusätzliche Aufreinigungsschritte mit erhöhten Kosten für eine industrielle Umsetzung der Technologie einher. Der hierbei entstehende Mehrwert in der präbiotischen Wirkung oder auch Ausbeute des Gesamtprozesses muss die Mehrkosten in der Herstellung überwiegen.

So wurde bei der im Verbundprojekt Valor Plus durchgeführten Lebenszyklusanalyse für die Herstellung von Oligosacchariden aus Hemicellulose die Produktaufreinigung als der mit Abstand höchste Kostenfaktor bestimmt (Ergebnisse nicht gezeigt). Ein weiteres Ergebnis der Analyse war es, dass eine Reduzierung bzw. Vereinfachung der Aufreinigungsprozesse die Herstellungskosten für Oligosaccharide entscheidend reduzieren kann und dies entscheidend für die wirtschaftliche Rentabilität des gesamten Wertschöpfungsprozesses ist. In diesem Zusammenhang muss auch untersucht werden, wie hoch die präbiotische Leistung von XOS und AXOS im Vergleich zu anderen Präbiotika, wie z. B. FOS, ist, da dies ein entscheidendes Kriterium für die Anwendung und den Verkaufspreis der Oligosaccharide darstellt. Eine Studie, die sich genau dieser Frage widmete und über die auch eine Aussage über die präbiotischen

Eigenschaften der in dieser Arbeit hergestellten XOS- und AXOS-Präparationen abgeleitet werden kann, wurde von Mäkeläinen et al. (2010) durchgeführt.

In dieser Studie verwendeten Mäkeläinen et al. ein simuliertes Darmmodell mit humanem Fäzes als Inokulum, um das präbiotische Potential von vier unterschiedlichen XOS-Präparationen zu ermitteln und mit dem präbiotischen Potential von FOS (DP2-7; Raftilose™, etabliertes Präbiotikum) zu vergleichen. Die vier getesteten XOS-Präparationen hatten dabei eine Größenverteilung von DP2, D1-5, DP2-10 und DP35-40; letzteres nachfolgend als Xylan bezeichnet. Als Indikatoren für die Präbiotikeigenschaften der Oligosaccharidpräparationen wurde unter anderem ihre Fähigkeit untersucht, zugefüttert zum Darmmodell das Wachstum von Probiotika zu fördern, die Bildung von SCFA zu erhöhen und die Bildung von BCFA (engl.: *branched chain fatty acids*) sowie biogenen Aminen zu senken.

Hierbei zeigte sich, dass die XOS-Präparationen DP2, DP1-5 und DP2-10 zu einem erhöhten Wachstum von Bifidobakterien, Lactobacillen und für DP1-5 und DP2-10 zusätzlich auch vom besonders probiotisch wirksamen *Bifidobacterium lactis* führten. Für diese drei Präparationen konnte auch eine Zunahme der SCFA-Bildung im Darmmodell gemessen werden. Auch bei den Experimenten mit dem getesteten Xylan wurde eine leichte Zunahme an Bifidobakterien gemessen, welche jedoch nicht von einer erhöhten Bildung von SCFA begleitet wurde. Stattdessen wurde eine vergleichsweise hohe Konzentration an BCFA und biogenen Aminen gemessen (Indikatoren für den Abbau von Proteinen), was darauf hindeutet, dass das Xylan nur wenig verstoffwechselt wurde. Verglichen mit den anderen Präparationen war neben Xylan auch für die XOS-Präparation DP2-10 die Konzentration an BCFA- und biogenen Aminen relativ hoch. Auch dies deutet darauf hin, dass diese Präparation (DP2-10) verglichen mit den anderen Präparationen (DP1-5, DP2-5) etwas schlechter verstoffwechselt wurde. Generell war die Veränderung des Mikrobioms bei einer Zufütterung der XOS-Präparationen mit DP1-5 und DP2-10 ähnlicher zueinander als zu der Präparation, welche fast ausschließlich DP2 enthielt.

FOS führten ähnlich wie XOS zu einem Anstieg in der Konzentration an Bifidobakterien, allerdings wurde das Wachstum jeweils unterschiedlicher Spezies gefördert. So zeigten Mäkeläinen et al., dass über XOS eine spezifische Wachstumsförderung von *Bifidobacterium lactis* und über FOS eine spezifische Wachstumsförderung von *Bifidobacterium longum* erzielt werden konnte. Daraus lässt sich ableiten, dass mit verschiedenen Oligosaccharidmischungen auf unterschiedliche Probiotika spezialisierte, sich ergänzende Präbiotika entwickelt werden könnten.

Generell können durch die Ergebnisse dieser *in vitro* Experimente keine direkten Aussagen über komplexe gesundheitliche Effekte getroffen werden. So ist es unklar, inwiefern sich die

vergleichsweise niedrigen, durch Mäkeläinen et al. aufgezeigten Unterschiede der präbiotischen Eigenschaften zwischen kurz- und langkettigen XOS (DP2, DP1-5, DP2-10) tatsächlich auf gesundheitliche Effekte auswirken. Es ist z. B. möglich, dass die *in vitro* bestimmte niedrigere mikrobielle Verstoffwechslung der langkettigen Oligosaccharide einen positiven Effekt auf die *in vivo* Präbiotik-Eigenschaften nach sich zieht: Bestimmte Mikroorganismen, wie z. B. *Bacteroides* und *Roseburia*, bilden im Darm Xylanasen (Broekaert et al., 2011), welche längere XOS abbauen können. Durch eine sukzessive Freisetzung kürzerer XOS aus längeren XOS könnte eine gleichmäßigere Präbiotik-Wirkung im gesamten Darm ermöglicht werden.

Neben XOS können auch AXOS – sofern der Grad der Arabinosylierung nicht zu hoch ist – vollständig in der Darmflora abgebaut werden (Broekaert et al., 2011). Die Abbaugeschwindigkeit von einfach-arabinosylierten AXOS ist hierbei nur geringfügig langsamer als die Abbaugeschwindigkeit von XOS. Dies ist im Einklang mit der Beobachtung, dass für Bifidobakterien bereits eine Vielzahl an α -Arabinofuranosidasen nachgewiesen und beschrieben wurden. Allerdings unterscheidet sich das Spektrum der gebildeten SCFA bei der Verstoffwechslung von AXOS und XOS. So werden beim Abbau von AXOS im Vergleich zu XOS weniger Laktat und stattdessen mehr Propionat gebildet. Wie sich dies *in vivo* auf das präbiotische Potential der jeweiligen Oligosaccharide auswirkt ist jedoch unklar, da der Abbau der Oligosaccharide und die Freisetzung von SCFA auf einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Organismen beruht (Broekaert et al., 2011).

Sowohl für XOS als auch für AXOS konnte demnach ein hohes präbiotisches Potential bestimmt werden. Eine detaillierte Unterscheidung im präbiotischen Potential basierend auf dem Grad der Polymerisierung und Arabinosylierung der Oligosaccharide ist bisher jedoch nur eingeschränkt möglich (Broekaert et al., 2011). So ist der mikrobielle Abbau von doppelt-arabinosylierten AXOS zwar langsamer als der von XOS und einfach-arabinosylierten AXOS, allerdings ist es nicht klar, ob eine langsame Verstoffwechslung bezüglich des präbiotischen Effekts als positiv oder negativ einzustufen ist (Morgan et al., 2017; Pastell et al., 2009). Es ist auch noch nicht geklärt, ob diese detaillierten Informationen über die präbiotische Wirkung von einzelnen Oligosacchariden über *in vitro* Tests überhaupt ermittelt werden können, oder diese Aussagen erst über aufwendige Ernährungsstudien zugänglich sind (Mäkeläinen et al., 2010).

Auch die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Oligosaccharidpräparationen wurden von einem Projektpartner (Dr. Cristina Ripolles, ITENE, Valencia, Spanien) auf ihre präbiotischen Eigenschaften getestet. Dafür wurden verschiedene aufgereinigte AXOS- sowie GMOS-Präparationen mit definierter Produktverteilung ($DP > 3$) in *in vitro* Wachstumsversuchen mit verschiedenen probiotischen Testkeimen, wie z. B. *Bifidobacterium bifidum*, *B. lactis*, *B. longum*,

B. infantis und *Lactobacillus casei*, eingehend untersucht (Ergebnisse nicht gezeigt). Sowohl für die AXOS-Präparation mit DP >3 (über semikontinuierliche Chromatographie aufgereinigt vom Projektpartner Dr. Yannick Krauke, Knauer, Berlin) als auch für die über sukzessive Solubilisierung aufgereinigten GMOS-Präparationen (insbesondere die Fraktion mit 85% Ethanol) konnte hierbei eine Wachstumsförderung der kommerziellen probiotischen Testkeime nachgewiesen werden.

Wie bereits erläutert, lässt sich hieraus allerdings noch keine eindeutige Aussage über das tatsächliche präbiotische Potential der Oligosaccharid-Präparationen ableiten. Hierfür wäre als nächster Schritt die Ermittlung des Einflusses der Oligosaccharidpräparationen auf das Wachstum eines Gemischs von Mikroorganismen (idealerweise Fäzes), z. B. in einem simulierten Darmmodell wie von Mäkeläinen et al. (2010) durchgeführt, sinnvoll. Dabei müsste neben dem Wachstum der zentralen probiotischen Bakteriengattungen und dem Abbau der Oligosaccharide, auch die Freisetzung von weiteren Präbiotik-relevanten Parametern, wie z. B. die Bildung von SCFA, gemessen werden. Für eine genaue Abschätzung des präbiotischen Effekts von Oligosacchariden wären Ernährungsstudien, erst bei Tiermodellen und anschließend beim Menschen, letztlich unerlässlich.

Verglichen mit XOS und AXOS ist über die Verstoffwechslung von GMOS aus Glucomannan im Darm nur wenig bekannt. Im Unterschied zu den klassischen Präbiotika, wie FOS und GOS, werden für GMOS alternative Anwendungsmöglichkeiten postuliert und getestet, wie z. B. als Präbiotika zur Verbesserung des Vaginal- und Hautmikrobioms (Al-Ghazzewi et al., 2012; Tester et al., 2012; Tester und Al-Ghazzewi, 2016). Für eine Ermittlung der Eignung von Oligosacchariden für eine solche Anwendung müsste entsprechend das Prüfverfahren angepasst und neue geeignete Testsysteme entwickelt werden.

Generell beschränken sich der Markt und der Einsatz von Oligosacchariden allerdings auf die traditionelle Anwendung zur Verbesserung des Darmmikrobioms. Der globale Markt an Oligosacchariden wird dabei deutlich von asiatischen Firmen dominiert, wie z. B. Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Shandong Baolingbao Biotechnology Co., Ltd. und Quantum Hi-tech Biological Co. Ltd. Diese Firmen setzen primär auf die Produktion von FOS, GOS und IMOS, wobei zunehmend auch XOS zum Produktportfolio hinzugefügt werden, wie z. B. durch die Firma Shandong Longlive Bio-Technology oder New Francisco Biotechnology Corporation (LP Information, 2017; QYResearch Group, 2017).

4.5 Ausblick

Obwohl Oligosaccharide im asiatischen Raum bereits breit angewendet werden und im Markt der funktionellen Lebensmittel etabliert sind, findet der Zugang von Oligosacchariden zum europäischen Markt vergleichsweise langsam statt (Otieno und Ahring, 2012). Ein Grund hierfür ist, dass die in der Literatur beschriebenen positiven gesundheitlichen Effekte von Oligosacchariden sehr generisch und ungenau formuliert sind: Zum einen werden für fast alle unverdaulichen Oligosaccharide potentiell positive gesundheitsförderlichen Effekte beschrieben bzw. postuliert. Zum anderen umfassen diese potentiell gesundheitsförderlichen Effekte sehr viele komplexe Bereiche, wie z. B. diverse immunologische Funktionen oder die Vorbeugung von Darmkrebs, und beruhen auf Interaktionen zwischen Darmmikrobiom und menschlicher Gesundheit, die noch nicht genau verstanden sind (Aachary und Prapulla, 2011; Otieno und Ahring, 2012; Tester und Al-Ghazzewi, 2016). Tatsächlich konnten insbesondere solche sehr allgemeinen Gesundheitsansprüche von Oligosacchariden im Rahmen von Ernährungsinterventionsstudien am Menschen bisher nicht nachgewiesen werden bzw. wurden in Europa durch die EFSA (European Food Safety Authority) als Gesundheitsanspruch für verschiedene Oligosaccharide nicht anerkannt (EFSA, 2011). Die von der EFSA akzeptierten Gesundheitsansprüche umfassen bisher lediglich die Reduktion der postprandialen Glucose-Konzentration (I), die Verbesserung der Stuhlhäufigkeit und –konsistenz (II) und die Möglichkeit der Erhöhung der täglichen Ballaststoffaufnahme (III), wenn nicht-verdauliche Oligosaccharide in Lebensmitteln, z. B. als Ersatz für Zucker, eingesetzt werden (EFSA, 2010, 2012, 2014). Obwohl diese akzeptierten Gesundheitsansprüche bisher geringer ausfallen als in der Literatur postuliert, zeigen sie dennoch deutlich das große Potential von Oligosacchariden als Lebensmittelzutat zur Verbesserung der westlichen Ernährung.

Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Abbau von Hemicellulose zu Oligosacchariden birgt somit in vielerlei Hinsicht das Potential, einen positiven Beitrag für die Gesellschaft zu leisten. Zum einen wird hierdurch ein Weg eröffnet, Restströmen pflanzlicher Biomasse eine verbesserte Wertschöpfung zukommen zu lassen. Zum anderen kann der Einsatz von Oligosacchariden dazu beitragen, sowohl in der Lebensmittel-, Futtermittel- als auch der Healthcare-Branche, neuartige und für die menschliche Gesundheit verbesserte Produkte zu generieren. Hierbei stellt die etablierte Enzym-*Toolbox* als auch die Oligosaccharidanalytik eine wertvolle Plattform dar, durch welche die Herstellung unterschiedlicher neuer Oligosaccharid-basierter Produkte ermöglicht wird.

Bis zu einer Umsetzung dieser Vision müssen jedoch noch viele grundlegende Fragen geklärt werden. Dazu gehört ein detailliertes Verständnis über das menschliche und tierische Mikrobiom, insbesondere dem Zusammenspiel zwischen Prä- und Probiotika im Kontext der komplexen Darmflora, sowie die Entwicklung effizienter industrieller Prozesse zur Herstellung, Aufreinigung und Anwendung von Oligosacchariden.

5 Literaturverzeichnis

- 1 Aachary, A.A., Prapulla, S.G., 2009. Value addition to corncob: production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. *Biores. Technol.* 100 (2), 991–995.
- 2 Aachary, A.A., Prapulla, S.G., 2011. Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 10 (1), 2–16.
- 3 Abballe, F., Toppazzini, M., Campa, C., Uggeri, F., Paoletti, S., 2007. Study of molar response of dextrans in electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* 1149 (1), 38–45.
- 4 Abdelmalek, B.E., Driss, D., Kallel, F., Guargouri, M., Missaoui, H., Chaabouni, S.E., Ayadi, M.A., Bougatef, A., 2015. Effect of xylan oligosaccharides generated from corncobs on food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters of *Dicentrarchus labrax* fingerlings. *Fish Physiol. Biochem.* 41 (6), 1587–1596.
- 5 Abou-Hachem, M., Olsson, F., Nordberg Karlsson, E., 2003. Probing the stability of the modular family 10 xylanase from *Rhodothermus marinus*. *Extremophiles* 7 (6), 483–491.
- 6 Adelsberger, H., Hertel, C., Glawischnig, E., Zverlov, V.V., Schwarz, W.H., 2004. Enzyme system of *Clostridium stercorarium* for hydrolysis of arabinoxylan: reconstitution of the *in vivo* system from recombinant enzymes. *Microbiol.* 150 (7), 2257–2266.
- 7 Ahmed, S., Luis, A.S., Bras, J.L.A., Ghosh, A., Gautam, S., Gupta, M.N., Fontes, C.M., Goyal, A., 2013a. A novel α -L-arabinofuranosidase of family 43 glycoside hydrolase (Ct43Araf) from *Clostridium thermocellum*. *PLoS ONE* 8 (9), e73575.
- 8 Ahmed, S., Luis, A.S., Brás, J.L.A., Fontes, Carlos M. G. A., Goyal, A., 2013b. The family 6 carbohydrate-binding module (Ct CBM6B) of *Clostridium thermocellum* α -L-arabinofuranosidase binds xylans and thermally stabilized by Ca^{2+} ions. *Biocatal. Biotransform.* 31 (4), 217–225.
- 9 Ahsan, M.M., Kimura, T., Karita, S., Sakka, K., Ohmiya, K., 1996. Cloning, DNA sequencing, and expression of the gene encoding *Clostridium thermocellum* cellulase CelJ, the largest catalytic component of the cellulosome. *J. Bacteriol.* 178 (19), 5732–5740.
- 10 Akpınar, O., Ak, O., Kavas, A., Bakir, U., Yılmaz, L., 2007. Enzymatic Production of Xylooligosaccharides from Cotton Stalks. *J. Agric. Food Chem.* 55 (14), 5544–5551.
- 11 Akpınar, O., Erdogan, K., Bostancı, S., 2009. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. *Carbohydr. Res.* 344 (5), 660–666.
- 12 Albrecht, S., van Muiswinkel, G., Schols, H.A., Voragen, A., Gruppen, H., 2009. Introducing capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection (CE-LIF) for the characterization of konjac glucomannan oligosaccharides and their *in vitro* fermentation behavior. *J. Agric. Food Chem.* 57 (9), 3867–3876.
- 13 Albrecht, S., van Muiswinkel, G.C., Xu, J., Schols, H.A., Voragen, A.G., Gruppen, H., 2011. Enzymatic production and characterization of konjac glucomannan oligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 59 (23), 12658–12666.
- 14 Al-Ghazzewi, F.H., Khanna, S., Tester, R.F., Piggott, J., 2007. The potential use of hydrolysed konjac glucomannan as a prebiotic. *J. Sci. Food Agric.* 87 (9), 1758–1766.
- 15 Al-Ghazzewi, F.H., Tester, R.F., 2010. Effect of konjac glucomannan hydrolysates and probiotics on the growth of the skin bacterium *Propionibacterium acnes* *in vitro*. *Int. J. Cosmet. Sci.* 32 (2), 139–142.
- 16 Al-Ghazzewi, F.H., Tester, R.F., Alvani, K., 2012. The synbiotic effects of konjac glucomannan hydrolysates (GMH) and lactobacilli on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*. *Nutr. Food Sci.* 42 (2), 97–101.
- 17 Ali, M.K., Fukumura, M., Sakano, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K., 1999. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding the *Clostridium stercorarium* xylanase C in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (9), 1596–1604.

- 18 Alonso, D.M., Bond, J.Q., Dumesic, J.A., 2010. Catalytic conversion of biomass to biofuels. *Green Chem.* 12 (9), 1493.
- 19 Alvarez, C., Reyes-Sosa, F.M., Diez, B., 2016. Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microb. Biotechnol.* 9 (2), 149–156.
- 20 Ammeraal, R.N., Delgado, G.A., Tenbarge, F.L., Friedman, R.B., 1991. High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection of linear and branched glucose oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 215 (1), 179–192.
- 21 Arai, T., Araki, R., Tanaka, A., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K., 2003. Characterization of a cellulase containing a family 30 carbohydrate-binding module (CBM) derived from *Clostridium thermocellum* CelJ: importance of the CBM to cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* 185 (2), 504–512.
- 22 Arai, T., Ohara, H., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K., 2001. Sequence of celQ and properties of celQ, a component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57 (5-6), 660–666.
- 23 Artzi, L., Dassa, B., Borovok, I., Shamshoum, M., Lamed, R., Bayer, E.A., 2014. Cellulosomics of the cellulolytic thermophile *Clostridium clariflavum*. *Biotechnol. Biofuels* 7, 100.
- 24 Bali, V., Panesar, P.S., Bera, M.B., Panesar, R., 2013. Fructo-oligosaccharides: Production, purification and potential applications. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*
- 25 Ballance, S., Holtan, S., Aarstad, O.A., Sikorski, P., Skjak-Braek, G., Christensen, B.E., 2005. Application of high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and statistical analysis to study oligosaccharide distributions – a complementary method to investigate the structure and some properties of alginates. *J. Chromatogr. A* 1093 (1-2), 59–68.
- 26 Barak, S., Mudgil, D., 2014. Locust bean gum: processing, properties and food applications--a review. *Int. J. Biol. Macromol.* 66, 74–80.
- 27 Bayer, E.A., Belaich, J.-P., Shoham, Y., Lamed, R., 2004. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 521–554.
- 28 Beer, 1852. Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Ann. Phys. Chem.* 162 (5), 78–88.
- 29 Beguin, P., Cornet, P., Millet, J., 1983. Identification of the endoglucanase encoded by the celB gene of *Clostridium thermocellum*. *Biochimie* 65 (8-9), 495–500.
- 30 Belorkar, S.A., Gupta, A.K., 2016. Oligosaccharides: a boon from nature's desk. *AMB Express* 6 (1), 82.
- 31 Bhattacharyya, L., Rohrer, J.S., 2012. Applications of Ion Chromatography for Pharmaceutical and Biological Products. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA.
- 32 Bian, J., Peng, F., Peng, X.-P., Peng, P., Xu, F., Sun, R.-C., 2013. Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 127, 236–241.
- 33 Biely, P., Singh, S., Puchart, V., 2016. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. *Biotechnol. Adv.* 34 (7), 1260–1274.
- 34 Biely, P., Vrsanská, M., Tenkanen, M., Kluepfel, D., 1997. Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* 57 (1-3), 151–166.
- 35 Bindels, L.B., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Walter, J., 2015. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12 (5), 303–310.
- 36 Blum, D.L., Kataeva, I.A., Li, X.L., Ljungdahl, L.G., 2000. Feruloyl esterase activity of the *Clostridium thermocellum* cellulosome can be attributed to previously unknown domains of XynY and XynZ. *J. Bacteriol.* 182 (5), 1346–1351.
- 37 Blumer-Schuette, S.E., Brown, S.D., Sander, K.B., Bayer, E.A., Kataeva, I., Zurawski, J.V., Conway, J.M., Adams, Michael W. W., Kelly, R.M., 2014. Thermophilic lignocellulose deconstruction. *FEMS Microbiol Rev* 38 (3), 393–448.

- 38 Bode, L., 2012. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiol.* 22 (9), 1147–1162.
- 39 Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J., 2004. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* 382 (Pt 3), 769–781.
- 40 Borromei, C., Cavazza, A., Merusi, C., Corradini, C., 2009. Characterization and quantitation of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides in fermented milks by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Sep. Sci.* 32 (21), 3635–3642.
- 41 Borsenberger, V., Dornez, E., Desrousseaux, M.-L., Massou, S., Tenkanen, M., Courtin, C.M., Dumon, C., O'Donohue, M.J., Faure, R., 2014. A (1)H NMR study of the specificity of α -L-arabinofuranosidases on natural and unnatural substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1840 (10), 3106–3114.
- 42 Bouguer, P., 1729. Essai d'optique, sur la gradation de la lumière, Paris, 164 ff.
- 43 Bouter, K.E., van Raalte, D.H., Groen, A.K., Nieuwdorp, M., 2017. Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis of Obesity and Obesity-Related Metabolic Dysfunction. *Gastroenterol.*
- 44 Brandt, A., Gräsvisk, J., Hallett, J.P., Welton, T., 2013. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chem.* 15 (3), 550.
- 45 Broekaert, W.F., Courtin, C.M., Verbeke, K., Van de Wiele, Tom, Verstraete, W., Delcour, J.A., 2011. Prebiotic and other health-related effects of cereal-derived arabinoxylans, arabinoxylan-oligosaccharides, and xylooligosaccharides. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51 (2), 178–194.
- 46 Brown, R.M., 2004. Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 42 (3), 487–495.
- 47 Bultman, S.J., 2017. Interplay between diet, gut microbiota, epigenetic events, and colorectal cancer. *Mol. Nutr. Food Res.* 61 (1).
- 48 Burgess, R.R., 2009. Chapter 20 Protein Precipitation Techniques, in: , Guide to Protein Purification, 2nd Edition. Chapter 20 Protein Precipitation Techniques, vol. 463. Methods in Enzymology. Elsevier, pp. 331–342.
- 49 Busse-Wicher, M., Gomes, T.C.F., Tryfona, T., Nikolovski, N., Stott, K., Grantham, N.J., Bolam, D.N., Skaf, M.S., Dupree, P., 2014. The pattern of xylan acetylation suggests xylan may interact with cellulose microfibrils as a twofold helical screw in the secondary plant cell wall of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell. Mol. Biol.* 79 (3), 492–506.
- 50 Carvalho, A., Neto, P., da Silva, D.F., Pastore, G.M., 2013. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Res. Int.* 51 (1), 75–85.
- 51 Cataldi, T.R., Campa, C., Benedetto, G.E. de, 2000. Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: the potential is still growing. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 368 (8), 739–758.
- 52 Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P.L., Srivastava, A.K., 2016. Bacterial xylanases: Biology to biotechnology. *3 Biotech* 6 (2).
- 53 Chakravorty, U., Hubert, M.-H., Nøstbakken, L., 2009. Fuel Versus Food. *Annu. Rev. Resour. Econ.* 1 (1), 645–663.
- 54 Chauhan, P.S., Puri, N., Sharma, P., Gupta, N., 2012. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93 (5), 1817–1830.
- 55 Chauvaux, S., Souchon, H., Alzari, P.M., Chariot, P., Beguin, P., 1995. Structural and functional analysis of the metal-binding sites of *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelD. *J. Biol. Chem.* 270 (17), 9757–9762.
- 56 Chen, C.-C., Ko, T.-P., Huang, J.-W., Guo, R.-T., 2015. Heat- and Alkaline-Stable Xylanases: Application, Protein Structure and Engineering. *ChemBioEng Rev.* 2 (2), 95–106.

- 57 Chinga-Carrasco, G., 2011. Cellulose fibres, nanofibrils and microfibrils: The morphological sequence of MFC components from a plant physiology and fibre technology point of view. *Nanoscale Res. Lett.* 6 (1), 417.
- 58 Chua, M., Baldwin, T.C., Hocking, T.J., Chan, K., 2010. Traditional uses and potential health benefits of *Amorphophallus konjac* K. Koch ex N.E.Br. *J. Ethnopharmacol.* 128 (2), 268–278.
- 59 Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29 (1), 3–23.
- 60 Corradini, C., Cavazza, A., Bignardi, C., 2012. High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications. *Int. J. Carbohydr. Chem.* 2012 (1), 1–13.
- 61 Corradini, C., Lantano, C., Cavazza, A., 2013. Innovative analytical tools to characterize prebiotic carbohydrates of functional food interest. *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (13), 4591–4605.
- 62 Correia, M., Mazumder, K., Brás, J., Firbank, S.J., Zhu, Y., Lewis, R.J., York, W.S., Fontes, C., Gilbert, H.J., 2011. Structure and function of an arabinoxylan-specific xylanase. *J. Biol. Chem.* 286 (25), 22510–22520.
- 63 Coulier, L., Zha, Y., Bas, R., Punt, P.J., 2013. Analysis of oligosaccharides in lignocellulosic biomass hydrolysates by high-performance anion-exchange chromatography coupled with mass spectrometry (HPAEC–MS). *Biores. Technol.* 133, 221–231.
- 64 Crittenden, R.G., Playne, M.J., 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.* 7 (11), 353–361.
- 65 Dahl, W.J., Agro, N.C., Eliasson, A.M., Mialki, K.L., Olivera, J.D., Rusch, C.T., Young, C.N., 2017. Health Benefits of Fiber Fermentation. *J. Am. Coll. Nutr.* 36 (2), 127–136.
- 66 Dror, T.W., Rolider, A., Bayer, E.A., Lamed, R., Shoham, Y., 2005. Regulation of major cellulosomal endoglucanases of *Clostridium thermocellum* differs from that of a prominent cellulosomal xylanase. *J. Bacteriol.* 187 (7), 2261–2266.
- 67 Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G.3., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J.F., Qin, X., Muzny, D.M., Ayele, M., Gibbs, R.A., Csorgo, B., Posfai, G., Weinstock, G.M., Blattner, F.R., 2008. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J. Bacteriol.* 190 (7), 2597–2606.
- 68 Ebringerová, A., Hromádková, Z., Heinze, T., 2005. Hemicellulose, in: Heinze, T. (Ed.), Polysaccharides I, vol. 186. Advances in Polymer Science. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 1–67.
- 69 European Food Safety Authority (EFSA), 2010. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal* 8 (3), 1462.
- 70 European Food Safety Authority (EFSA), 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to galacto oligosaccharides (GOS) and reduction of gastro intestinal discomfort (ID 763) and decreasing potentially pathogenic microorganisms (ID 765) pursuant to Article 13(1) of Regulation. *EFSA Journal* 9 (4), 2060.
- 71 European Food Safety Authority (EFSA), 2014. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to AlphaGOS® and a reduction of post-prandial glycaemic responses pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 12 (10), 3838.
- 72 Fauré, R., Courtin, C.M., Delcour, J.A., Dumon, C., Faulds, C.B., Fincher, G.B., Fort, S., Fry, S.C., Halila, S., Kabel, M.A., Pouvreau, L., Quemener, B., Rivet, A., Saulnier, L., Schols, H.A., Driguez, H., O'Donohue, M.J., 2009. A Brief and Informationally Rich Naming System for Oligosaccharide Motifs of Heteroxylans Found in Plant Cell Walls. *Aust. J. Chem.* 62 (6), 533.
- 73 Finegold, S.M., Li, Z., Summanen, P.H., Downes, J., Thames, G., Corbett, K., Dowd, S., Krak, M., Heber, D., 2014. Xylooligosaccharide increases bifidobacteria but not lactobacilli in human gut microbiota. *Food Funct.* 5 (3), 436–445.

- 74 Francino, M.P., 2017. The Gut Microbiome and Metabolic Health. *Curr Nutr Rep* 6 (1), 16–23.
- 75 Fukumura, M., Sakka, K., Shimada, K., Ohmiya, K., 1995. Nucleotide sequence of the *Clostridium stercorarium* xynB gene encoding an extremely thermostable xylanase, and characterization of the translated product. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59 (1), 40–46.
- 76 Funk, C., Ralph, J., Steinhart, H., Bunzel, M., 2005. Isolation and structural characterisation of 8-O-4/8-O-4- and 8-8/8-O-4-coupled dehydrotriferulic acids from maize bran. *Phytochem.* 66 (3), 363–371.
- 77 Gao, J., Jiang, L., Leng, L., Hong, N., Zhang, S., Zhou, Y., Chen, Y., Qi, Y., Zhang, Z., Zhang, 2014. Decolor Four M.A.X.A.: iGEM Project - Team from Tongji. <http://2014.igem.org/Team:Tongji/project>. Letzter Zugriff: 26 November 2017.
- 78 Gasparič, J., Churáček, J., 1978. Laboratory handbook of paper and thin-layer chromatography. E. Horwood; Halsted Press, Chichester, Eng, New York, 362 pp.
- 79 Geraylou, Z., Souffreau, C., Rurangwa, E., Maes, G.E., Spanier, K.I., Courtin, C.M., Delcour, J.A., Buyse, J., Ollevier, F., 2013. Prebiotic effects of arabinoxylan oligosaccharides on juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) with emphasis on the modulation of the gut microbiota using 454 pyrosequencing. *FEMS microbiol. ecol.* 86 (2), 357–371.
- 80 Ghosh, A., Luís, A.S., Brás, J., Fontes, C., Goyal, A., 2013. Thermostable recombinant β -(1→4)-mannanase from *C. thermocellum*: biochemical characterization and manno-oligosaccharides production. *J. Agric. Food Chem.* 61 (50), 12333–12344.
- 81 Gibson, G.R., 2004. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clin. Nutr. Suppl.* 1 (2), 25–31.
- 82 Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125 (6), 1401–1412.
- 83 Gilbert, H.J., 2010. The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. *Plant Physiol.* 153 (2), 444–455.
- 84 Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., Bogel-Lukasik, R., 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Biores. Technol.* 101 (13), 4775–4800.
- 85 Goldemberg, J., 2008. The Brazilian biofuels industry. *Biotechnol. Biofuels* 1 (1), 6.
- 86 Gomez, B., Miguez, B., Veiga, A., Parajo, J.C., Alonso, J.L., 2015. Production, Purification, and in Vitro Evaluation of the Prebiotic Potential of Arabinoxylooligosaccharides from Brewer's Spent Grain. *J. Agricult. Food Chem.* 63 (38), 8429–8438.
- 87 Gómez, B., Míguez, B., Yáñez, R., Alonso, J.L., 2017. Manufacture and Properties of Glucomannans and Glucomannooligosaccharides Derived from Konjac and Other Sources. *J. Agricult. Food Chem.* 65 (10), 2019–2031.
- 88 Gonçalves, G.A.L., Takasugi, Y., Jia, L., Mori, Y., Noda, S., Tanaka, T., Ichinose, H., Kamiya, N., 2015. Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse. *Enzym. Microbiol. Technol.* 72, 16–24.
- 89 Grépinet, O., Béguin, P., 1986. Sequence of the cellulase gene of *Clostridium thermocellum* coding for endoglucanase B. *Nucleic Acids Res.* 14 (4), 1791–1799.
- 90 Griffin, J.L., Wang, X., Stanley, E., 2015. Does our gut microbiome predict cardiovascular risk? A review of the evidence from metabolomics. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 8 (1), 187–191.
- 91 Hall, J., Hazlewood, G.P., Barker, P.J., Gilbert, H.J., 1988. Conserved reiterated domains in *Clostridium thermocellum* endoglucanases are not essential for catalytic activity. *Gene* 69 (1), 29–38.
- 92 Halstead, J.R., Vercoe, P.E., Gilbert, H.J., Davidson, K., Hazlewood, G.P., 1999. A family 26 mannanase produced by *Clostridium thermocellum* as a component of the cellulosome contains a domain which is conserved in mannanases from anaerobic fungi. *Microbiol.* 145 (Pt 11), 3101–3108.

- 93 Harrison, P., Malins, C.J., Searle, S.Y., Baral, A., Turley, D., Hopwood, L., 2014. WASTED: Europe's untapped resource: An assessment of Advanced Biofuels from Wastes & Residues.
- 94 Hayashi, H., Takehara, M., Hattori, T., Kimura, T., Karita, S., Sakka, K., Ohmiya, K., 1999. Nucleotide sequences of two contiguous and highly homologous xylanase genes *xynA* and *xynB* and characterization of *XynA* from *Clostridium thermocellum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51 (3), 348–357.
- 95 He, M.-x., Wang, J.-l., Qin, H., Shui, Z.-x., Zhu, Q.-l., Wu, B., Tan, F.-r., Pan, K., Hu, Q.-c., Dai, L.-c., Wang, W.-g., Tang, X.-y., Hu, G.Q., 2014. Bamboo: a new source of carbohydrate for biorefinery. *Carbohydr. Polym.* 111, 645–654.
- 96 He, S., Withers, S.G., 1997. Assignment of Sweet Almond β -Glucosidase as a Family 1 Glycosidase and Identification of Its Active Site Nucleophile. *J. Biol. Chem.* 272 (40), 24864–24867.
- 97 He, Y.L., Ding, Y.F., Long, Y.Q., 1991. Two cellulolytic *Clostridium* species: *Clostridium cellulosi* sp. nov. and *Clostridium cellulofermentans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (2), 306–309.
- 98 Jalal, A., Rashid, N., Rasool, N., Akhtar, M., 2009. Gene cloning and characterization of a xylanase from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain R5. *J. Biosci. Bioeng.* 107 (4), 360–365.
- 99 Jauris, S., Rücknagel, K.P., Schwarz, W.H., Kratzsch, P., Bronnenmeier, K., Staudenbauer, W.L., 1990. Sequence analysis of the *Clostridium stercorarium* *celZ* gene encoding a thermoactive cellulase (Avicelase I): identification of catalytic and cellulose-binding domains. *Mol. Gen. Genet.* 223 (2), 258–267.
- 100 Jimeno, M.R., 2016. Lignofood Report Summary. Lignofood. http://cordis.europa.eu/result/rcn/192544_en.html. Letzter Zugriff: 25 November 2017.
- 101 Johnson, D.C., Lacourse, W.R., 1990. Liquid chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum electrodes. *Anal. Chem.* 62 (10), 589A–597A.
- 102 Joliff, G., Béguin, P., Aubert, J.P., 1986. Nucleotide sequence of the cellulase gene *celD* encoding endoglucanase D of *Clostridium thermocellum*. *Nucleic Acids Res.* 14 (21).
- 103 Kataeva, I., Li, X.L., Chen, H., Choi, S.K., Ljungdahl, L.G., 1999. Cloning and sequence analysis of a new cellulase gene encoding *CelK*, a major cellulosome component of *Clostridium thermocellum*: evidence for gene duplication and recombination. *J. Bacteriol.* 181 (17), 5288–5295.
- 104 Kataeva, I.A., Brewer, J.M., Uversky, V.N., Ljungdahl, L.G., 2005. Domain coupling in a multimodular cellobiohydrolase *CbhA* from *Clostridium thermocellum*. *FEBS Lett.* 579 (20), 4367–4373.
- 105 Khan, M.I.M., Sajjad, M., Ali, I., Ahmad, S., Akhtar, M.W., 2010. Influence of transposition and insertion of additional binding domain on expression and characteristics of xylanase C of *Clostridium thermocellum*. *J. Biotechnol.* 150 (1), 1–5.
- 106 Khan, M.I.M., Sajjad, M., Sadaf, S., Zafar, R., Niazi, U.H.K., Akhtar, M.W., 2013. The nature of the carbohydrate binding module determines the catalytic efficiency of xylanase Z of *Clostridium thermocellum*. *J. Biotechnol.* 168 (4), 403–408.
- 107 Koeck, D.E., 2015. Isolierung und Charakterisierung von cellulolytischen Bakterien aus der mikrobiellen Lebensgemeinschaft in Biogasanlagen. Lehrstuhl für Mikrobiologie, Freising.
- 108 Koeck, D.E., Ludwig, W., Wanner, G., Zverlov, V.V., Liebl, W., Schwarz, W.H., 2015. *Herbinix hemicellulosilytica*, gen. nov., sp. nov., a thermophilic cellulose-degrading bacterium isolated from a thermophilic biogas reactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- 109 Koeck, D.E., Mechelke, M., Zverlov, V.V., Liebl, W., Schwarz, W.H., 2016. *Herbivorax saccincola* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic, anaerobic, thermophilic bacterium isolated via in sacco enrichments from a lab scale biogas reactor. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*

- 110 Koeck, D.E., Wibberg, D., Maus, I., Winkler, A., Albersmeier, A., Zverlov, V.V., Liebl, W., Puhler, A., Schwarz, W.H., Schluter, A., 2014a. Complete genome sequence of the cellulolytic thermophile *Ruminoclostridium cellulosi* wild-type strain DG5 isolated from a thermophilic biogas plant. *J. Biotechnol.* 188, 136–137.
- 111 Koeck, D.E., Zverlov, V.V., Liebl, W., Schwarz, W.H., 2014b. Comparative genotyping of *Clostridium thermocellum* strains isolated from biogas plants: genetic markers and characterization of cellulolytic potential. *Syst. Appl. Microbiol.* 37 (5), 311–319.
- 112 Kogut, M.H., Arsenault, R.J., 2016. Editorial: Gut Health: The New Paradigm in Food Animal Production. *Front. Vet. Sci.* 3, 71.
- 113 Kormelink, F.J., Gruppen, H., Viëtor, R.J., Voragen, A.G., 1993. Mode of action of the xylan-degrading enzymes from *Aspergillus awamori* on alkali-extractable cereal arabinoxylans. *Carbohydr. Res.* 249 (2), 355–367.
- 114 Kunz, C., Rudloff, S., Hintelmann, A., Pohlentz, G., Egge, H., 1996. High-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection and molar response factors of human milk oligosaccharides. *J. Chromatogr. B* 685 (2), 211–221.
- 115 Kurokawa, J., Hemjinda, E., Arai, T., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K., 2002. *Clostridium thermocellum* cellulase CelT, a family 9 endoglucanase without an Ig-like domain or family 3c carbohydrate-binding module. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 (4-5), 455–461.
- 116 Labourel, A., Crouch, L.I., Bras, J.L.A., Jackson, A., Rogowski, A., Gray, J., Yadav, M.P., Henrissat, B., Fontes, C., Gilbert, H.J., Najmudin, S., Basle, A., Cuskin, F., 2016. The Mechanism by Which Arabinoxylanases Can Recognize Highly Decorated Xylans. *J. Biol. Chem.* 291 (42), 22149–22159.
- 117 Lambert, J.H., 1760. Photometria, sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae., Augsburg.
- 118 Lamed, R., Setter, E., Bayer, E.A., 1983. Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* 165 (2), 828–836.
- 119 Lee, C.C., Braker, J.D., Grigorescu, A.A., Wagschal, K., Jordan, D.B., 2013. Divalent metal activation of a GH43 β -xylosidase. *Enzym. Microbiol. Technol.* 52 (2), 84–90.
- 120 Lemaire, M., Béguin, P., 1993. Nucleotide Sequence of the celG Gene of *Clostridium thermocellum* and Characterization of Its Product, Endoglucanase CelG. *J. Bacteriol.* 175 (11), 3353–3360.
- 121 Li, H., Qing, Q., Kumar, R., Wyman, C.E., 2013. Chromatographic determination of 1, 4- β -xylooligosaccharides of different chain lengths to follow xylan deconstruction in biomass conversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40 (6), 551–559.
- 122 Li, L., Ruan, H., Ma, L.-l., Wang, W., Zhou, P., He, G.-q., 2009. Study on swelling model and thermodynamic structure of native konjac glucomannan. *J. Zhejiang University. Sci. B* 10 (4), 273–279.
- 123 Li, M., Pu, Y., Ragauskas, A.J., 2016. Current Understanding of the Correlation of Lignin Structure with Biomass Recalcitrance. *Front. Chem.* 4, 45.
- 124 Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42 (Database issue), 5.
- 125 LP Information, 2017. 2017-2022 Global Top Countries Prebiotics Market Report. <http://www.orbisresearch.com/reports/index/2017-2022-global-top-countries-prebiotics-market-report>. Letzter Zugriff: 5 September 2017.
- 126 Maier, S.K., Bashkueva, K., Rosli, C., Skerra, A., Kuster, B., 2014. PAS-cal: A repetitive peptide sequence calibration standard for MALDI mass spectrometry. *Proteom.* 14 (21-22), 2427–2431.
- 127 Mäkeläinen, H., Forssten, S., Saarinen, M., Stowell, J., Rautonen, N., Ouwehand, A.C., 2010. Xylo-oligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and *Bifidobacterium lactis* in a simulated colon model. *Benef. Microbes* 1 (1), 81–91.

- 128 Makishima, S., Mizuno, M., Sato, N., Shinji, K., Suzuki, M., Nozaki, K., Takahashi, F., Kanda, T., Amano, Y., 2009. Development of continuous flow type hydrothermal reactor for hemicellulose fraction recovery from corncob. *Biores. Technol.* 100 (11), 2842–2848.
- 129 McCleary, B.V., McKie, V.A., Draga, A., Rooney, E., Mangan, D., Larkin, J., 2015. Hydrolysis of wheat flour arabinoxylan, acid-debranched wheat flour arabinoxylan and arabino-xylo-oligosaccharides by β -xylanase, α -L-arabinofuranosidase and β -xylosidase. *Carbohydr. Res.* 407, 79–96.
- 130 Mechelke, M., Herlet, J., Benz, J.P., Schwarz, W.H., Zverlov, V.V., Liebl, W., Kornberger, P., 2017. HPAEC-PAD for oligosaccharide analysis-novel insights into analyte sensitivity and response stability. *Anal. Bioanal. Chem.*
- 131 Mewis, K., Lenfant, N., Lombard, V., Henrissat, B., 2016. Dividing the Large Glycoside Hydrolase Family 43 into Subfamilies: a Motivation for Detailed Enzyme Characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 82 (6), 1686–1692.
- 132 Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31 (3), 426–428.
- 133 Mishra, A., Malhotra, A.V., 2009. Tamarind xyloglucan: A polysaccharide with versatile application potential. *J. Mater. Chem.* 19 (45), 8528.
- 134 Mizutani, K., Sakka, M., Kimura, T., Sakka, K., 2014. Essential role of a family-32 carbohydrate-binding module in substrate recognition by *Clostridium thermocellum* mannanase CtMan5A. *FEBS Lett.* 588 (9), 1726–1730.
- 135 Moreira, L.R.S., Filho, E.X.F., 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79 (2), 165–178.
- 136 Moreno, F.J., Corzo, N., Montilla, A., Villamiel, M., Olano, A., 2017. Current state and latest advances in the concept, production and functionality of prebiotic oligosaccharides. *Curr. Opin. Food Sci.* 13, 50–55.
- 137 Morgan, N.K., Wallace, A., Bedford, M.R., Choct, M., 2017. Efficiency of xylanases from families 10 and 11 in production of xylo-oligosaccharides from wheat arabinoxylans. *Carbohydr. Polym.* 167, 290–296.
- 138 Mudgil, D., Barak, S., Khatkar, B.S., 2014. Guar gum: processing, properties and food applications-A Review. *J. Food Sci. Technol.* 51 (3), 409–418.
- 139 Navarro, A., Chebrou, M.C., Béguin, P., Aubert, J.P., 1991. Nucleotide sequence of the cellulase gene celF of *Clostridium thermocellum*. *Res. Microbiol.* 142 (9), 927–936.
- 140 Nielsen, H., 2017. Predicting Secretory Proteins with SignalP. *Methods Mol. Biol.* 1611, 59–73.
- 141 Otieno, D.O., Ahring, B.K., 2012. The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). *Carbohydr. Res.* 360, 84–92.
- 142 Palframan, R., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2003. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letts. Appl. Microbio.* 37 (4), 281–284.
- 143 Pandey, M.P., Kim, C.S., 2011. Lignin Depolymerization and Conversion: A Review of Thermochemical Methods. *Chem. Eng. Technol.* 34 (1), 29–41.
- 144 Paskach, T.J., Lieker, H.-P., Reilly, P.J., Thielecke, K., 1991. High-performance anion-exchange chromatography of sugars and sugar alcohols on quaternary ammonium resins under alkaline conditions. *Carbohydr. Res.* 215 (1), 1–14.
- 145 Pastell, H., Tuomainen, P., Virkki, L., Tenkanen, M., 2008. Step-wise enzymatic preparation and structural characterization of singly and doubly substituted arabinoxyloligosaccharides with non-reducing end terminal branches. *Carbohydr. Res.* 343 (18), 3049–3057.
- 146 Pastell, H., Westermann, P., Meyer, A.S., Tuomainen, P., Tenkanen, M., 2009. In vitro fermentation of arabinoxylan-derived carbohydrates by bifidobacteria and mixed fecal microbiota. *J. Agric. Food Chem.* 57 (18), 8598–8606.

- 147 Poesen, R., Evenepoel, P., Loor, H. de, Delcour, J.A., Courtin, C.M., Kuypers, D., Augustijns, P., Verbeke, K., Meijers, B., 2016. The Influence of Prebiotic Arabinoxylan Oligosaccharides on Microbiota Derived Uremic Retention Solutes in Patients with Chronic Kidney Disease: A Randomized Controlled Trial. *PLoS ONE* 11 (4), e0153893.
- 148 QYResearch Group, 2017. Global Oligosaccharide Market Professional Survey Report 2017. <http://www.reportsnreports.com/reports/995490-global-oligosaccharide-market-professional-survey-report-2017.html>. Letzter Zugriff: 5 September 2017.
- 149 Rincon, M.T., Cepeljnik, T., Martin, J.C., Lamed, R., Barak, Y., Bayer, E.A., Flint, H.J., 2005. Unconventional mode of attachment of the *Ruminococcus flavefaciens* cellulosome to the cell surface. *J. Bacteriol.* 187 (22), 7569–7578.
- 150 Rivière, A., Eeltink, S., Pierlot, C., Balzarini, T., Moens, F., Selak, M., Vuyst, L. de, 2013. Development of an ion-exchange chromatography method for monitoring the degradation of prebiotic arabinoxylan-oligosaccharides in a complex fermentation medium. *Anal. Chem.* 85 (10), 4982–4990.
- 151 Roberfroid, M., 2007. Prebiotics: the concept revisited. *J. Nutr.* 137 (3 Suppl 2), 830.
- 152 Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.-J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck, A.M., Meheust, A., 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* 104 Suppl 2, 63.
- 153 Rohrer, J. Technical Note 21: Optimal Settings for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates Using the Dionex ED40 Electrochemical Detector. Thermo Fisher Scientific. Letzter Zugriff: 15 September 2017.
- 154 Rohrer, J.S., Thayer, J., Weitzhandler, M., Avdalovic, N., 1998. Analysis of the N-acetylneuraminic acid and N-glycolylneuraminic acid contents of glycoproteins by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Glycobiol.* 8 (1), 35–43.
- 155 Sanchez, J.I., Marzorati, M., Grootaert, C., Baran, M., van Craeyveld, V., Courtin, C.M., Broekaert, W.F., Delcour, J.A., Verstraete, W., van de Wiele, T., 2009. Arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) affect the protein/carbohydrate fermentation balance and microbial population dynamics of the Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem. *Microb. Biotechnol.* 2 (1), 101–113.
- 156 Sasagawa, T., Sakamoto, Y., Hirose, T., Yoshida, T., Kobayashi, Y., Sato, Y., Koizumi, K., 1989. Prediction of retention times in ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr. A* 485, 533–540.
- 157 Schäffler, K.J., Mrel du boil, P. G., Walford, S.N., 1996. HPAEC: Some Precautions required for the reliable Analysis of Carbohydrates. *Proc. S. Afr. Sug. Technol. Assoc.* 70, 241–250.
- 158 Schwarz, W.H., Adelsberger, H., Jauris, S., Hertel, C., Funk, B., Staudenbauer, W.L., 1990. Xylan degradation by the thermophile *Clostridium stercorarium*: cloning and expression of xylanase, beta-D-xylosidase, and alpha-L-arabinofuranosidase genes in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170 (1), 368–374.
- 159 Schwarz, W.H., Bronnenmeier, K., Krause, B., Lottspeich, F., Staudenbauer, W.L., 1995. Debranching of arabinoxylan: properties of the thermoactive recombinant α -L-arabinofuranosidase from *Clostridium stercorarium* (ArfB). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43 (5), 856–860.
- 160 Schwarz, W.H., Gräbnitz, F., Staudenbauer, W.L., 1986. Properties of a *Clostridium thermocellum* Endoglucanase Produced in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51 (6), 1293–1299.
- 161 Searle, S.Y., Malins, C.J., 2016. Waste and residue availability for advanced biofuel production in EU Member States. *Biomass and Bioenergy* 89, 2–10.
- 162 Sender, R., Fuchs, S., Milo, R., 2016. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.*

- 163 Sethiya, N.K., 2016. Review on Natural Growth Promoters Available for Improving Gut Health of Poultry: An Alternative to Antibiotic Growth Promoters. *Asian J. Poult. Sci.* 10 (1), 1–29.
- 164 Sigrist, C.J.A., Castro, E. de, Cerutti, L., Cuche, B.A., Hulo, N., Bridge, A., Bougueleret, L., Xenarios, I., 2013. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.* 41 (Database issue), D344-7.
- 165 Spinner, J., 2013. Prebiotics market to hit \$4.8 billion by 2018. <http://www.nutraingredients.com/Suppliers2/Prebiotics-market-to-hit-4.8-billion-by-2018>. Letzter Zugriff: 5 September 2017.
- 166 Studier, F.W., 2005. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* 41 (1), 207–234.
- 167 Swennen, K., Courtin, C., van der Bruggen, B., Vandecasteele, C., Delcour, J.A., 2005. Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxylooligosaccharides with different structures. *Carbohydr. Polym.* 62 (3), 283–292.
- 168 Swennen, K., Courtin, C.M., Lindemans, G.C., Delcour, J.A., 2006. Large-scale production and characterisation of wheat bran arabinoxylooligosaccharides. *J. Sci. Food Agric.* 86 (11), 1722–1731.
- 169 Talamantes, D., Biabini, N., Dang, H., Abdoun, K., Berlemont, R., 2016. Natural diversity of cellulases, xylanases, and chitinases in bacteria. *Biotechnol. Biofuels* 9, 133.
- 170 Tester, R., Al-Ghazzewi, F., Shen, N., Chen, Z., Chen, F., Yang, J., Zhang, D., Tang, M., 2012. The use of konjac glucomannan hydrolysates to recover healthy microbiota in infected vaginas treated with an antifungal agent. *Benef. Microbes* 3 (1), 61–66.
- 171 Tester, R.F., Al-Ghazzewi, F.H., 2016. Beneficial health characteristics of native and hydrolysed konjac (*Amorphophallus konjac*) glucomannan. *J. Sci. Food Agricult.* 96 (10), 3283–3291.
- 172 Timmermans, J.W., van Leeuwen, M.B., Tournois, H., Wit, D.d., Vliegenthart, J.F., 1994. Quantitative Analysis of the Molecular Weight Distribution of Inulin by Means of Anion Exchange HPLC with Pulsed Amperometric Detection. *J. Carbohydr. Chem.* 13 (6), 881–888.
- 173 Tuck, C.O., Perez, E., Horvath, I.T., Sheldon, R.A., Poliakoff, M., 2012. Valorization of biomass: deriving more value from waste. *Sci.* 337 (6095), 695–699.
- 174 Tuomela, M., 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: A review. *Biores. Technol.* 72 (2), 169–183.
- 175 van Craeyveld, V., Swennen, K., Dornez, E., Van de Wiele, Tom, Marzorati, M., Verstraete, W., Delaedt, Y., Onagbesan, O., Decuypere, E., Buyse, J., Ketelaere, B. de, Broekaert, W.F., Delcour, J.A., Courtin, C.M., 2008. Structurally different wheat-derived arabinoxylooligosaccharides have different prebiotic and fermentation properties in rats. *J. Nutr.* 138 (12), 2348–2355.
- 176 van den Brink, J., Vries, R.P. de, 2011. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91 (6), 1477–1492.
- 177 van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol. Adv.* 30 (6), 1458–1480.
- 178 Verma, A.K., Goyal, A., 2014. In silico structural characterization and molecular docking studies of first glucuronoxylan-xylanohydrolase (Xyn30a) from family-30 glycosyl hydrolase (GH30) from *Clostridium thermocellum*. *Molekuliarnaia biologija* 48 (2), 322–332.
- 179 Vries, R.P. de, Visser, J., 2001. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65 (4), 497–522.
- 180 Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Wang, C., 2009. Enzymatic preparation of wheat bran xylooligosaccharides and their stability during pasteurization and autoclave sterilization at low pH. *Carbohydr. Polym.* 77 (4), 816–821.

- 181 Wang, Y., Liu, J., Li, Q., Wang, Y., Wang, C., 2014. Two natural glucomannan polymers, from Konjac and Bletilla, as bioactive materials for pharmaceutical applications. *Biotechnol. Lett.*
- 182 Wefers, D., Bunzel, M., 2016. Arabinan and Galactan Oligosaccharide Profiling by High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD). *J. Agric. Food Chem.* 64 (22), 4656–4664.
- 183 Wood, T.M., Bhat, K., 1988. Methods for measuring cellulase activities, in: , Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose, vol. 160. Methods in Enzymology. Elsevier, pp. 87–112.
- 184 Yagüe, E., Béguin, P., Aubert, J.P., 1990. Nucleotide sequence and deletion analysis of the cellulase-encoding gene celH of *Clostridium thermocellum*. *Gene* 89 (1), 61–67.
- 185 Yang, J., Summanen, P.H., Henning, S.M., Hsu, M., Lam, H., Huang, J., Tseng, C.-H., Dowd, S.E., Finegold, S.M., Heber, D., Li, Z., 2015. Xylooligosaccharide supplementation alters gut bacteria in both healthy and prediabetic adults: a pilot study. *Front. Physiol.* 6, 216.
- 186 Zhang, C., Chen, J.-d., Yang, F.-Q., 2014. *Konjac glucomannan*, a promising polysaccharide for OCDDS. *Carbohydr. Polym.* 104, 175–181.
- 187 Zhang, Z., Khan, N.M., Nunez, K.M., Chess, E.K., Szabo, C.M., 2012. Complete monosaccharide analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal. Chem.* 84 (9), 4104–4110.
- 188 Zhivin, O., Dassa, B., Moraïs, S., Utturkar, S.M., Brown, S.D., Henrissat, B., Lamed, R., Bayer, E.A., 2017. Unique organization and unprecedented diversity of the *Bacteroides (Pseudobacteroides) cellulosolvens* cellulosome system. *Biotechnol. Biofuels* 10, 211.
- 189 Zverlov, V.V., Schantz, N., Schmitt-Kopplin, F., Schwarz, W.H., 2005. Two new major subunits in the cellulosome of *Clostridium thermocellum*: xyloglucanase Xgh74A and endoxylanase Xyn10D. *Microbiol.* 151 (10), 3395–3401.
- 190 Zverlov, V.V., Schwarz, W.H., 2008. The *Clostridium thermocellum* cellulosome - the paradigm of a multienzyme complex. Uni Publishers, Tokyo, Japan. Biotechnology of Lignocellulose Degradation and Biomass Utilization, 2008.
- 191 Zverlov, V.V., Velikodvorskaya, G.A., Schwarz, W.H., 2002. A newly described cellulosomal cellobiohydrolase, CelO, from *Clostridium thermocellum*: investigation of the exo-mode of hydrolysis, and binding capacity to crystalline cellulose. *Microbiol.* 148 (Pt 1), 247–255.
- 192 Zverlov, V.V., Velikodvorskaya, G.A., Schwarz, W.H., 2003. Two new cellulosome components encoded downstream of celI in the genome of *Clostridium thermocellum*: the non-processive endoglucanase CelN and the possibly structural protein CseP. *Microbiol.* 149 (Pt 2), 515–524.

Anhang

i.1 Weitere Informationen zur Konzentration, Reinheit und Retentionszeit für die HPAEC-PAD verwendeter Oligosaccharide

Sofern möglich, wurde die Reinheit aller kommerziell erhältlichen Oligosaccharide, nachdem sie in ddH₂O zu einer Stammlösung gelöst wurden, über enzymatischen Abbau und nachfolgender Quantifizierung der Monosaccharide bestimmt. Für den Abbau von XOS und AXOS wurden hierfür die Enzyme XylA aus *Hb. hemicellulosilytica* und cs-Arf51B aus *C. stercorarium* und für den Abbau von COS und LOS das Enzym ACCELLERASE® BG (DuPont, Wilmington, USA) eingesetzt. Auf den enzymatischen Abbau von MOS wurden aufgrund eines Mangels einer hierfür benötigten β -Mannosidase verzichtet. Weiterhin war auch bei den verwendeten Oligosaccharidgemischen keine Quantifizierung möglich bzw. sinnvoll.

Die bestimmten Konzentrationen für alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Carbohydrate, welche die Basis für alle weiteren quantitativen Analysen darstellen, sind in Tab. A1 angegeben.

Tab. A1 Konzentration und Reinheit der Analytstammlösungen für die qualitative und quantitative Mono- und Oligosaccharidbestimmung via HPAEC-PAD

Name	Konzentration	Name	Konzentration	Name	Konzentration
Xylose	1,89 g/L	X ₂	16,8 g/L	C ₂	10,0 g/L
Arabinose	1,96 g/L	X ₃	8,6 g/L	C ₃	24,6 g/L
Mannose	2,00 g/L	X ₄	9,0 g/L	C ₄	10,7 g/L
Glucose	2,08 g/L	X ₅	8,6 g/L	C ₅	11,0 g/L
Fructose	1,99 g/L	A ³ X	11,3 g/L	C ₆	9,5 g/L
Fucose	1,99 g/L	A ² XX	10,6 g/L	L ₂	10,0 g/L
Galactose	2,00 g/L	A ²⁺³ XX	7,9 g/L	L ₃	10,0 g/L
Rhamnose	9,00 g/L	XA ²⁺³ XX	10,9 g/L	L ₄	10,0 g/L
Glucuronsäure	2,0 g/L			L ₅	10,0 g/L
Galacturonsäure	1,8 g/L				

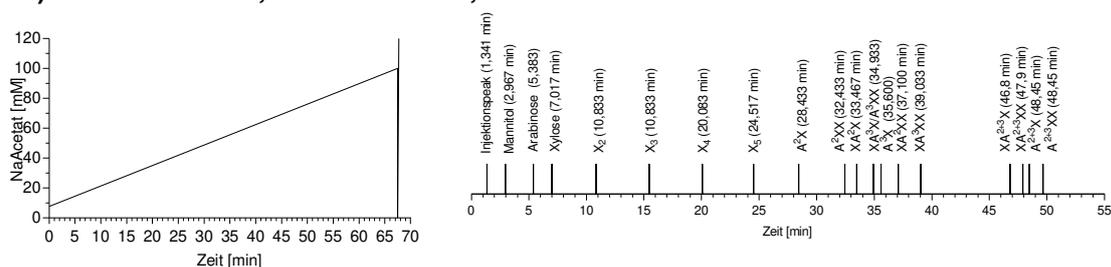
Ursprünglich wurden alle Monosaccharide und Uronsäuren mit Ausnahme von Rhamnose auf 2 g/L und alle Oligosaccharide sowie Rhamnose auf 10 g/L eingewogen und in ddH₂O gelöst. Abweichungen sind auf eine niedrige Reinheit der Oligosaccharidpräparationen, hygroskopisch gebundenes Wasser und Hersteller-bedingte Schwankungen der eingewogenen Analytmenge zurückzuführen. Typische Kontaminanten für Oligosaccharidpräparationen waren andere teilweise unbekannte Oligosaccharide.

Eine Übersicht über die Retentionszeiten der in dieser Arbeit untersuchten Mono- und Oligosaccharidstandards findet sich in Tabelle A2. Eine Übersicht über die Retentionszeiten von in dieser Arbeit untersuchten und hergestellten AXOS verglichen mit den Retentionszeiten aus anderen Studien finden sich in Abbildung A1.

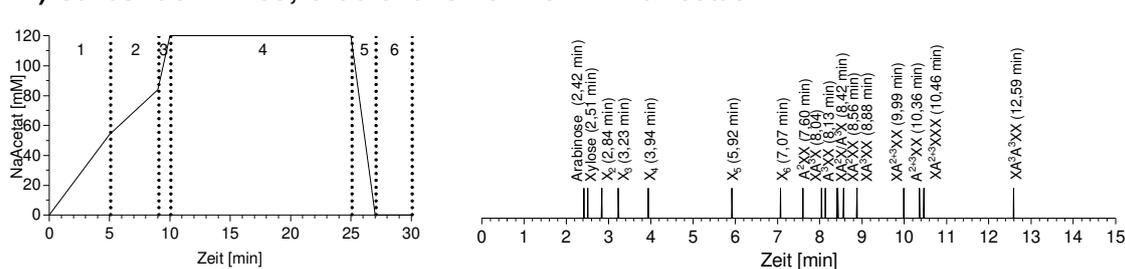
Tab. A2 Retentionszeiten der in dieser Arbeit untersuchten Mono- und Oligosaccharidstandards

Name	Retentionszeit	Name	Retentionszeit
D-Mannitol	3,02 min	Glucotetraose B	34,15 min
Arabinose	5,47 min	Glucotetraose C	42,25 min
Fructose	8,21 min	M ₂	9,75 min
Fucose	3,62 min	M ₃	10,45 min
Galactose	6,92 min	M ₄	11,95 min
Glucose	6,92 min	M ₅	13,55 min
Mannose	6,58 min	M ₆	14,92 min
Rhamnose	4,50 min	GM	14,62 min
Xylose	7,15 min	GMM	15,37 min
Galacturonsäure	51,23 min	GGM	21,78 min
Glucuronsäure	55,80 min	X ₂	11,53 min
C ₂	14,27 min	X ₃	16,20 min
C ₃	21,45 min	X ₄	20,90 min
C ₄	28,73 min	X ₅	25,33 min
C ₅	35,37 min	A ³ X	36,03 min
C ₆	41,28 min	A ² XX	33,03 min
L ₂	18,78 min	A ²⁺³ XX	49,87 min
L ₃	38,00 min	XA ² XX	37,68 min
L ₄	50,87 min	XA ³ XX	39,57 min
L ₅	65,10 min	XA ²⁺³ XX	48,18 min

A) CarboPac PA 1; Gradient von 7,5-100 mM NaAcetat



B) CarboPac PA 200; Gradient von 0-120 mM NaAcetat



C) CarboPac P1 200; Gradient von 0-400 mM NaAcetat

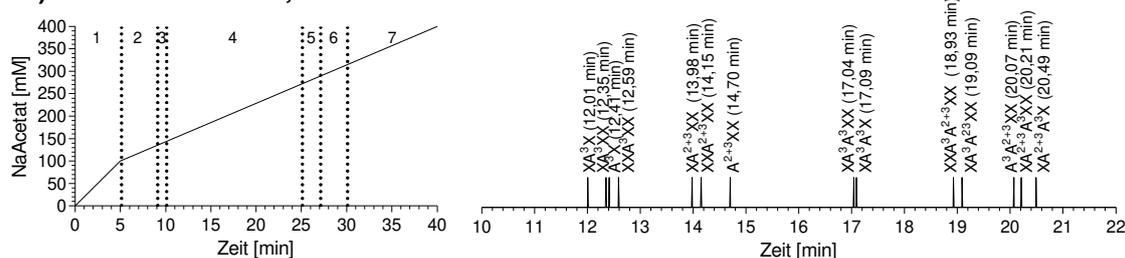


Abb. A1 Übersicht über die Retentionszeiten verschiedener XOS und AXOS bei einer Analyse mittels HPAEC-PAD unter Verwendung verschiedener Chromatographiesäulen und verschiedener Gradienten
(A) zeigt schematisch die Retentionszeiten von XOS und AXOS bei ihrer Analyse unter der Verwendung eines einstufigen Natriumacetat-Gradienten von 7,5 mM bis 100 mM Natriumacetat mit einer CarboPac PA1-Säule. Die hier aufgeführten Messzeiten wurden als Referenz für alle Zuordnungen von XOS und AXOS in dieser Arbeit herangezogen. **(B)** zeigt schematisch die Retentionszeiten von XOS und AXOS bei ihrer Analyse unter der Verwendung eines vierstufigen Natriumacetat-Gradienten von 0 mM bis 120 mM Natriumacetat mit einer CarboPac PA200-Säule nach McCleary et al. (2015). **(C)** zeigt schematisch die Retentionszeiten von XOS und AXOS bei ihrer Analyse unter der Verwendung eines sechsstufigen Natriumacetat-Gradienten von 0 mM bis 400 mM Natriumacetat mit einer CarboPac PA1-Säule nach Kormelink et al. (1993). Die Zahlen in den Chromatogrammen zu den Natriumacetat-Gradienten geben unterschiedliche Phasen mit unterschiedlichen Steigungen des Natriumacetat-Gradienten an.

i.2 Experimenteller Aufbau für die Bestimmung des Detektorsignalabfalls bei Messungen mit HPAEC-PAD

Tab. A3 Probenzusammensetzung für die Bestimmung des Detektorsignalabfalls bei Messungen mit HPAEC-PAD

Mix 1		Mix 2		Mix 3	
Glucose	10,4, mg/L	Galactose	10,0 mg/L	Fucose	9,99 mg/L
M ₃	10,0 mg/L	M ₂	9,5 mg/L	Fructose	9,99 mg/L
M ₆	10,0 mg/L	M ₅	10,0 mg/L	Mannose	10,0 mg/L
C ₃	24,6 mg/L	C ₄	10,7 mg/L	M ₄	10,0 mg/L
Galacturonsäure	9,2 mg/L	C ₆	9,5 mg/L	GM, M ₂	20,0 mg/L of mix
L ₃	30,0 mg/L	X ₃	8,6 mg/L	C ₅	1,1 mg/L
		L ₄	30,0 mg/L	L ₅	30,0 mg/L
		Glucuron- säure	10,0 mg/L		
Mix 4		Mix 5		Mix 6	
Rhamnose	9,0 mg/L	X ₂	16,8 mg/L	X ₄	9,0 mg/L
Arabinose	9,8 mg/L	X ₅	8,6 mg/L	A ³ X	11,3 mg/L
Xylose	9,4 mg/L			A ² XX	10,6 mg/L
GMM, GGM	20,0 mg/L of mix			A ²⁺³ XX	7,9 mg/L
C ₂	10,0 mg/L				
L ₂	30,0 mg/L				

Tab. A4 Messequenz für die Bestimmung des PAD-Signalabfalls bei Messungen mit HPAEC-PAD

1. Sequenz

Kalibrierung der pH-Elektrode, Messung von einem Checkstandard			
Inj. Nr.	Mix	Konz.	Kommentar
0	Checkstandard		
1	Mix1	1	
2	Mix2	1	
3	Mix3	1	
4	Mix4	1	
5	Mix5	1	
6	Mix6	1	
7	Mix1	5	
8	Mix2	5	
9	Mix3	5	
10	Mix4	5	
11	Mix5	5	
12	Mix6	5	
13	Mix1	2	
14	Mix2	2	
15	Mix3	2	
16	Mix4	2	
17	Mix5	2	
18	Mix6	2	
19	Mix1	3	
20	Mix2	3	
21	Mix3	3	
22	Mix4	3	
23	Mix5	3	
24	Mix6	3	
25	Mix1	5	
26	Mix2	5	
27	Mix3	5	
28	Mix4	5	
29	Mix5	5	
30	Mix6	5	
31	Mix1	4	
32	Mix2	4	
33	Mix3	4	
34	Mix4	4	
35	Mix5	4	
36	Mix6	4	
37	Mix1	6	
38	Mix2	6	
39	Mix3	6	
40	Mix4	6	
41	Mix5	6	
42	Mix6	6	
43	Mix1	5	
44	Mix2	5	
45	Mix3	5	
46	Mix4	5	
47	Mix5	5	
48	Mix6	5	Stromausfall nach 42 min
49	Mix1	7	
50	Mix2	7	
51	Mix3	7	
52	Mix4	7	
53	Mix5	7	
54	Mix6	7	
55	Mix1	8	

56	Mix2	8	
57	Mix3	8	
58	Mix4	8	
59	Mix5	8	
60	Mix6	8	
61	Mix1	5	
62	Mix2	5	
63	Mix3	5	
64	Mix4	5	
65	Mix5	5	
66	Mix6	5	
67	Mix1	9	
68	Mix2	9	
69	Mix3	9	
70	Mix4	9	
71	Mix5	9	
72	Mix6	9	
73	Mix1	10	
74	Mix2	10	
75	Mix3	10	
76	Mix4	10	
77	Mix5	10	
78	Mix6	10	
79	Mix1	5	
80	Mix2	5	
81	Mix3	5	
82	Mix4	5	
83	Mix5	5	
84	Mix6	5	

2. Sequenz

Einbau neuer Goldelektrode, Kalibrierung der pH-Elektrode, Messung von 7 Checkstandards			
Inj. Nr.	Mix	Konz.	Kommentar
85-92	Checkstandard		
93	Mix1	1	
94	Mix2	1	
95	Mix3	1	
96	Mix4	1	
97	Mix5	1	
98	Mix6	1	
99	Mix1	2	
100	Mix2	2	
101	Mix3	2	
102	Mix4	2	
103	Mix5	2	
104	Mix6	2	
105	Mix1	5	
106	Mix2	5	
107	Mix3	5	
108	Mix4	5	
109	Mix5	5	
110	Mix6	5	
111	Mix1	3	
112	Mix2	3	
113	Mix3	3	
114	Mix4	3	
115	Mix5	3	
116	Mix6	3	

117	Mix1	4	
118	Mix2	4	
119	Mix3	4	
120	Mix4	4	
121	Mix5	4	
122	Mix6	4	
123	Mix1	5	
124	Mix2	5	
125	Mix3	5	
126	Mix4	5	
127	Mix5	5	
128	Mix6	5	
129	Mix1	6	
130	Mix2	6	
131	Mix3	6	
132	Mix4	6	
133	Mix5	6	
134	Mix6	6	
135	Mix1	7	
136	Mix2	7	
137	Mix3	7	
138	Mix4	7	
139	Mix5	7	
140	Mix6	7	
141	Mix1	5	
142	Mix2	5	
143	Mix3	5	
144	Mix4	5	
145	Mix5	5	
146	Mix6	5	
147	Mix1	8	
148	Mix2	8	
149	Mix3	8	
150	Mix4	8	
151	Mix5	8	
152	Mix6	8	
153	Mix1	9	
154	Mix2	9	
155	Mix3	9	
156	Mix4	9	
157	Mix5	9	
158	Mix6	9	
159	Mix1	5	
160	Mix2	5	
161	Mix3	5	
162	Mix4	5	
163	Mix5	5	
164	Mix6	5	
165	Mix1	10	
166	Mix2	10	
167	Mix3	10	
168	Mix4	10	
169	Mix5	10	
170	Mix6	10	

i.3 Daten für die Bestimmung des Detektorsignalabfalls bei Messungen mit HPAEC-PAD

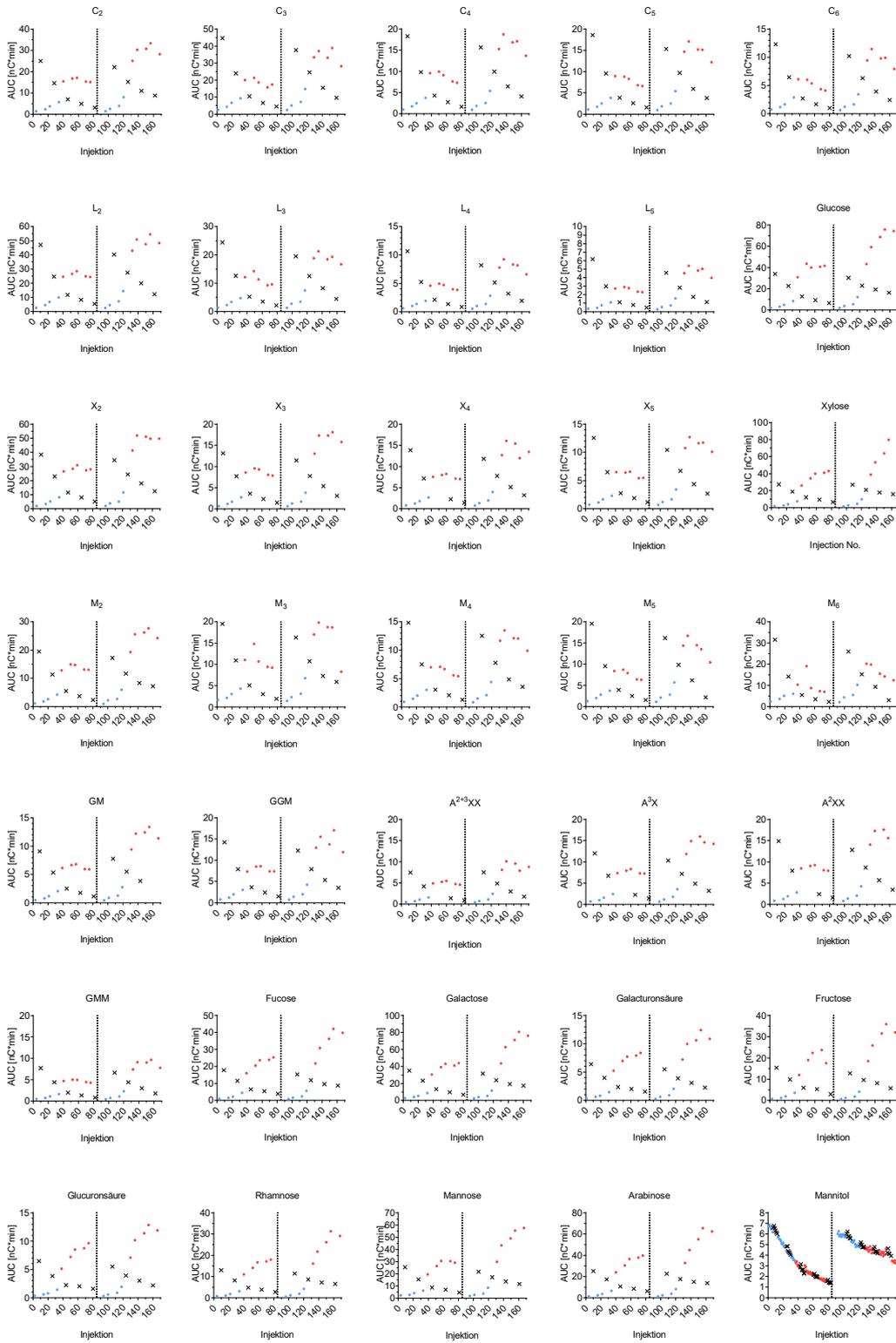


Abb. A2 Fläche unter der Kurve (AUC) als Rohdaten für beide Sequenzen
 Messungen der Analyten in Konz 1-4 sind als blaue und Konz 6-10 als rote Punkte und Messungen der Analyte in Konz 5 sind als schwarze Kreuze dargestellt.

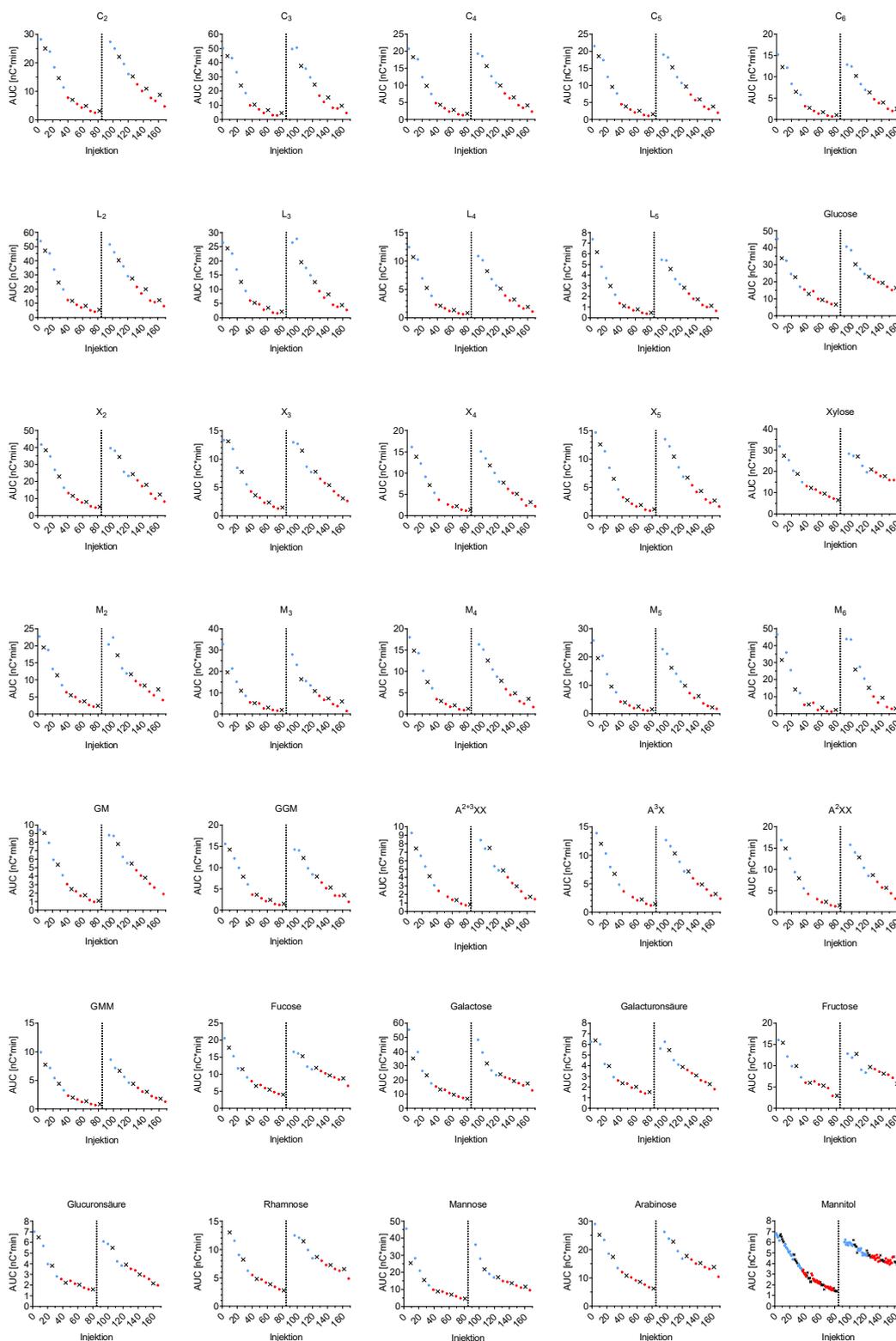


Abb. A3 Fläche unter der Kurve (AUC) korrigiert durch den Konzentrationsfaktor (KF) für jeden Konzentrationslevel

Messungen der Analyten in Konz 1-4 sind als blaue und Konz 6-10 als rote Punkte und Messungen der Analyte in Konz 5 sind als schwarze Kreuze dargestellt.

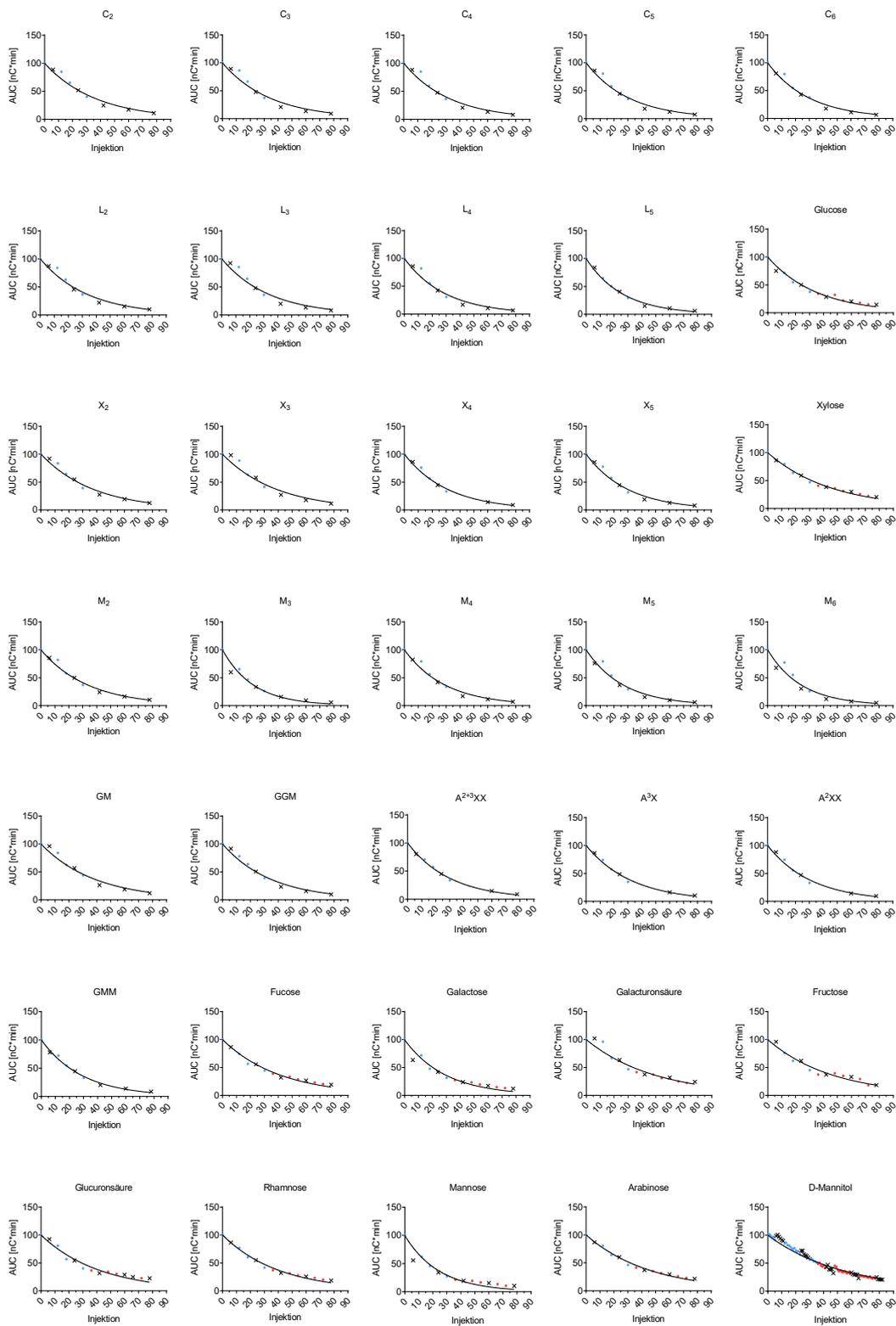


Abb. A4 Modell einer Zerfallskinetik erster Ordnung zur Beschreibung des Detektorsignalabfalls für Seq 1
 Messungen der Analyten in Konz 1-4 sind als blaue und Konz 6-10 als rote Punkte und Messungen der Analyte in Konz 5 sind als schwarze Kreuze dargestellt. Diese Graphen bilden die Basis für die Berechnung der K-Faktoren des Detektorsignalabfalls für alle Analyten.

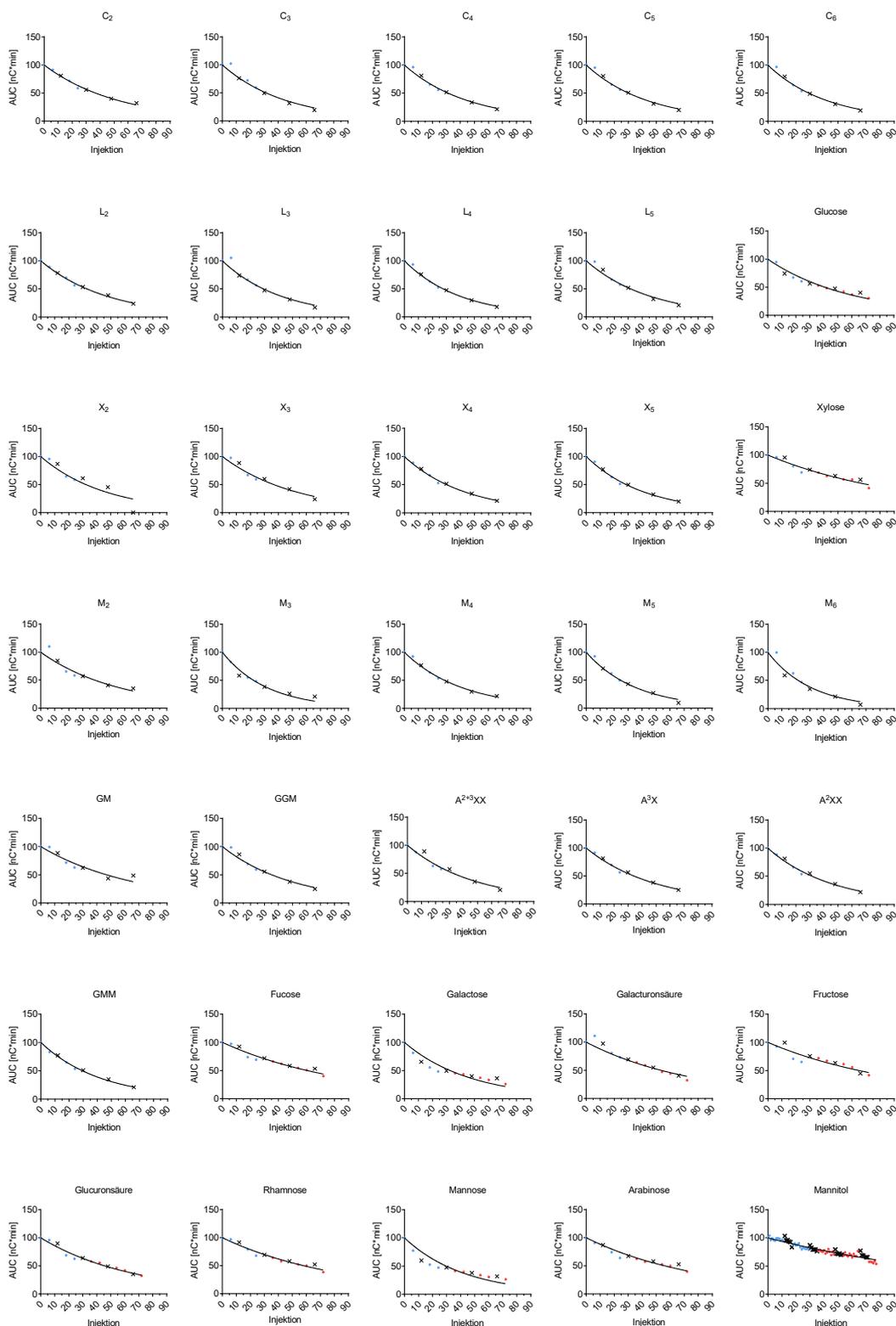


Abb. A5 Modell einer Zerfallskinetik erster Ordnung zur Beschreibung des Detektorsignalabfalls für Seq 2
 Messungen der Analyten in Konz 1-4 sind als blaue und Konz 6-10 als rote Punkte und Messungen der Analyte in Konz 5 sind als schwarze Kreuze dargestellt. Diese Graphen bilden die Basis für die Berechnung der K-Faktoren des Detektorsignalabfalls für alle Analyten.

Tab. A 5 Ergebnisse der Regression (Methode der kleinsten Quadrate) für das Modell des Zerfalls erster Ordnung für die Beschreibung des Detektionsabfalls verschiedener Analyten für beide Messesequenzen.

	Seq 1						Seq 2					
	K	K _{error}	Halbwertszeit	Df	R ²	Anzahl Punkte	K	K _{error}	Halbwertszeit	Df	R ²	Anzahl Punkte
A ²⁺³ XX	0,0328	0,0010	21,13	7	0,995	8	0,0212	0,0015	32,77	7	0,962	8
Arabinose	0,0219	0,0006	31,59	13	0,987	14	0,0124	0,0006	56,01	12	0,936	13
A ³ X	0,0305	0,0012	22,74	7	0,992	8	0,0203	0,0007	34,21	7	0,989	8
A ² XX	0,0317	0,0016	21,85	7	0,987	8	0,0220	0,0009	31,55	7	0,987	8
C ₂	0,0273	0,0018	25,35	8	0,970	9	0,0189	0,0006	36,65	7	0,990	8
C ₃	0,0292	0,0026	23,77	8	0,954	9	0,0221	0,0018	31,41	7	0,957	8
C ₄	0,0305	0,0024	22,73	8	0,963	9	0,0223	0,0012	31,14	7	0,980	8
C ₅	0,0325	0,0022	21,36	8	0,972	9	0,0230	0,0011	30,17	7	0,983	8
C ₆	0,0335	0,0021	20,69	8	0,975	9	0,0238	0,0013	29,17	7	0,978	8
Fructose	0,0217	0,0010	31,93	13	0,962	14	0,0107	0,0008	65,02	12	0,866	13
Fucose	0,0244	0,0007	28,47	13	0,982	14	0,0115	0,0005	60,41	12	0,951	13
Galactose	0,0341	0,0021	20,31	13	0,939	14	0,0213	0,0015	32,55	12	0,857	13
Galacturonsäure	0,0205	0,0013	33,82	13	0,939	14	0,0130	0,0009	53,35	12	0,922	13
GGM	0,0288	0,0017	24,05	8	0,979	9	0,0197	0,0013	35,11	7	0,969	8
Glucose	0,0285	0,0011	24,29	13	0,975	14	0,0169	0,0007	40,94	12	0,957	13
Glucuronsäure	0,0238	0,0012	29,13	13	0,955	14	0,0151	0,0006	45,83	12	0,968	13
GM	0,0259	0,0019	26,78	8	0,966	9	0,0148	0,0015	46,83	7	0,904	8
GMM	0,0344	0,0013	20,13	8	0,991	9	0,0235	0,0007	29,48	7	0,992	8
L ₂	0,0299	0,0022	23,22	8	0,967	9	0,0211	0,0005	32,91	7	0,995	8
L ₃	0,0297	0,0027	23,31	8	0,953	9	0,0237	0,0022	29,27	7	0,947	8
L ₄	0,0340	0,0027	20,36	8	0,964	9	0,0251	0,0010	27,57	7	0,989	8
L ₅	0,0385	0,0012	18,03	8	0,994	9	0,0219	0,0015	31,69	7	0,969	8
M ₂	0,0296	0,0017	23,42	8	0,977	9	0,0179	0,0022	38,81	7	0,892	8
M ₃	0,0449	0,0036	15,44	8	0,955	9	0,0311	0,0021	22,30	7	0,962	8
M ₄	0,0342	0,0022	20,28	8	0,974	9	0,0242	0,0009	28,68	7	0,990	8
M ₅	0,0373	0,0028	18,57	8	0,966	9	0,0281	0,0014	24,69	7	0,984	8
M ₆	0,0413	0,0041	16,78	8	0,944	9	0,0320	0,0032	21,68	7	0,943	8
D-Mannitol	0,0186	0,0003	37,29	82	0,972	83	0,0064	0,0001	107,90	76	0,895	77
Mannose	0,0408	0,0031	16,98	13	0,912	14	0,0234	0,0018	29,67	12	0,830	13
Rhamnose	0,0249	0,0007	27,89	13	0,985	14	0,0119	0,0005	58,22	12	0,962	13
X ₂	0,0264	0,0017	26,28	8	0,973	9	0,0215	0,0032	32,29	7	0,874	8
X ₃	0,0256	0,0023	27,10	8	0,949	9	0,0189	0,0014	36,75	7	0,957	8
X ₄	0,0319	0,0016	21,70	7	0,987	8	0,0230	0,0007	30,16	7	0,993	8
X ₅	0,0332	0,0019	20,86	8	0,979	9	0,0242	0,0008	28,61	7	0,990	8
Xylose	0,0220	0,0005	31,56	13	0,989	14	0,0104	0,0005	66,53	12	0,940	13
Durchschnitt					0,969						0,950	
Median					0,972						0,962	
Standardabweichung zwischen den Bestimmtheitsmaßen					0,018						0,044	

Für die Regression wurde der erste Messpunkt auf 100% festgelegt. Df = Freiheitsgrade (engl.: degree of freedom). Anzahl Punkt = Anzahl der Punkte, die für die Regression berücksichtigt wurden. Für die neutralen Monosaccharide und Uronsäuren wurden Konz 1-10 und für die Oligosaccharide Konz 1-6 berücksichtigt.

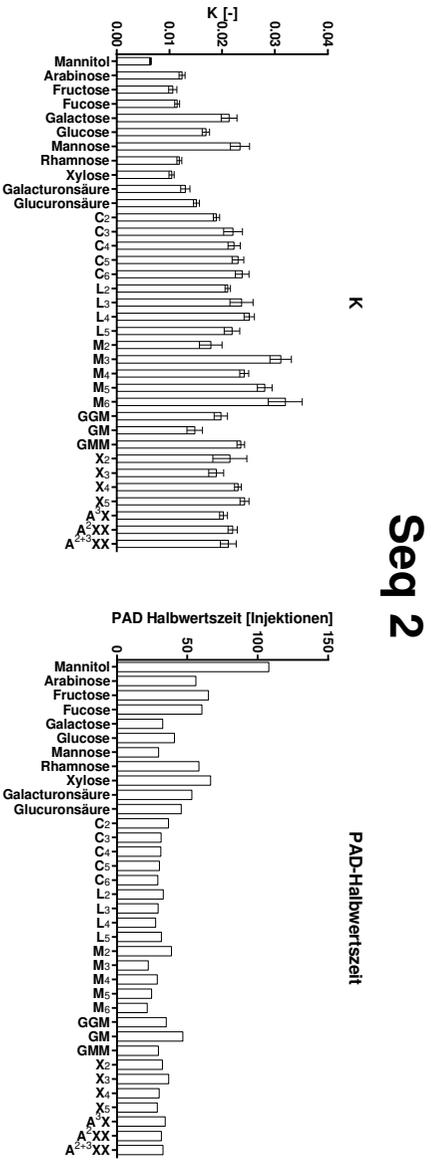
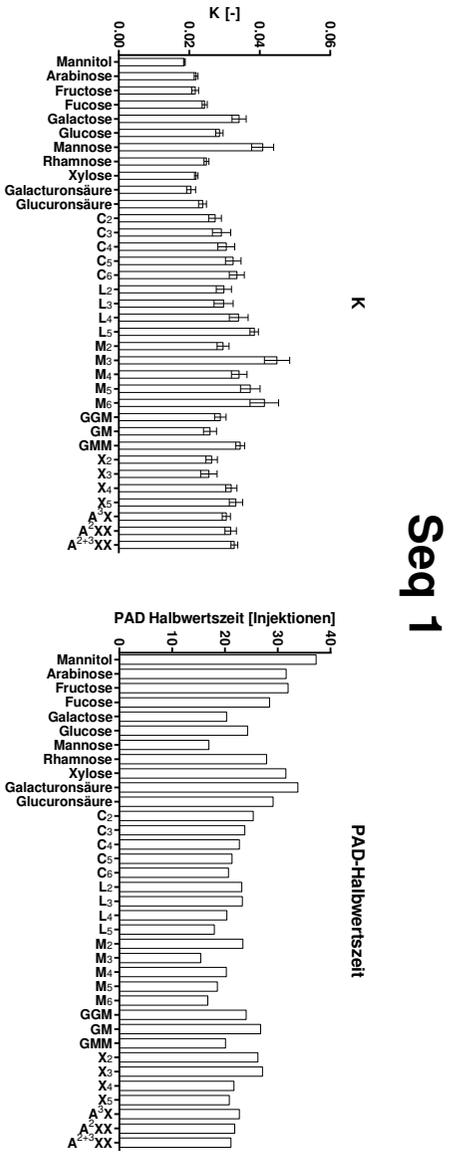


Abb. A6 Balkendiagramm für die Konstante K und die abgeleitete PAD-Halbwertszeit zur Beschreibung der Zerfallskinetik erster Ordnung des Detektorsignals für verschiedene Analyten

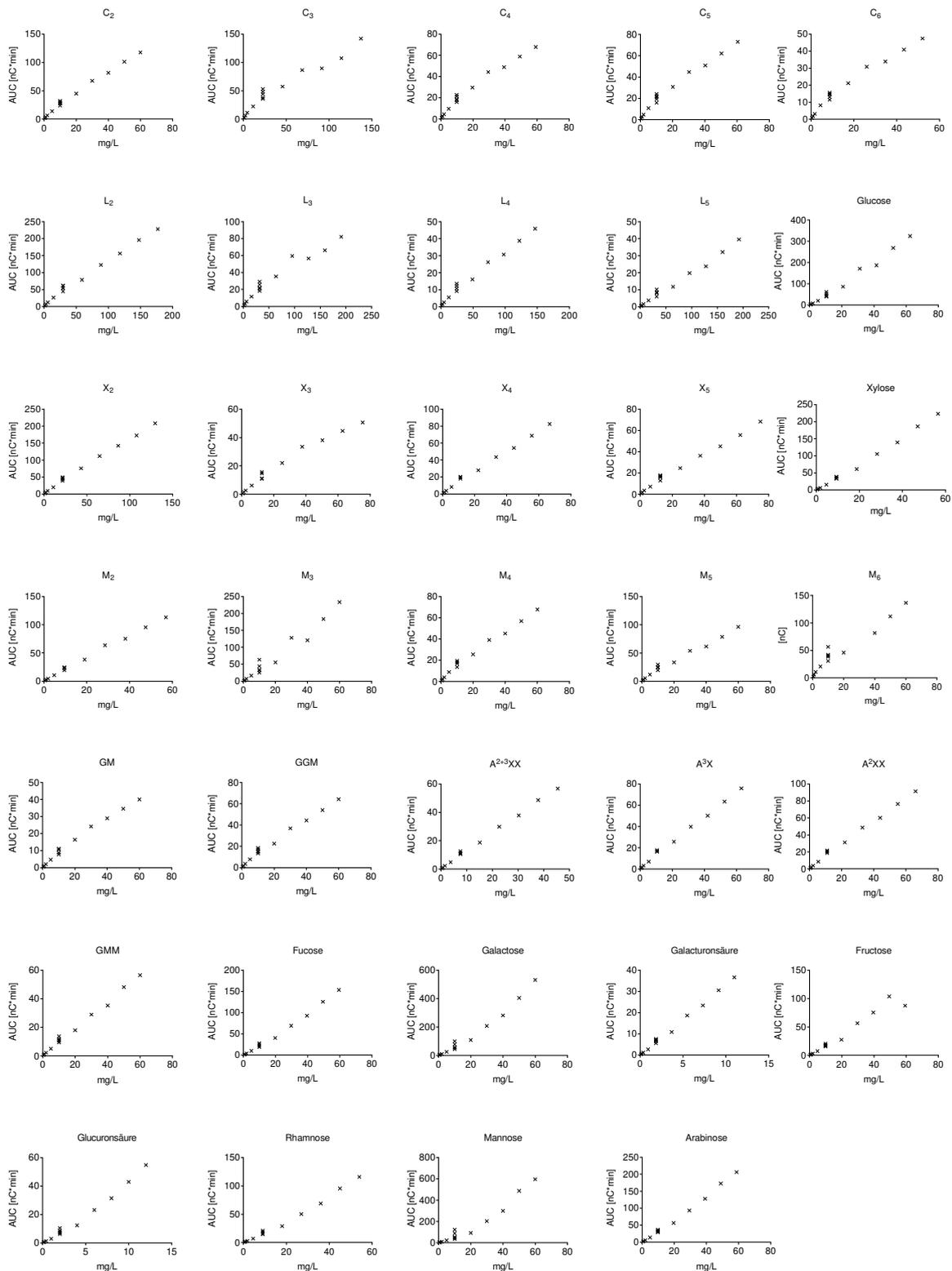


Abb. A7 Über Zerfallskinetik erster Ordnung normierte Daten für die Bestimmung der Kalibriergeraden für Seq 1

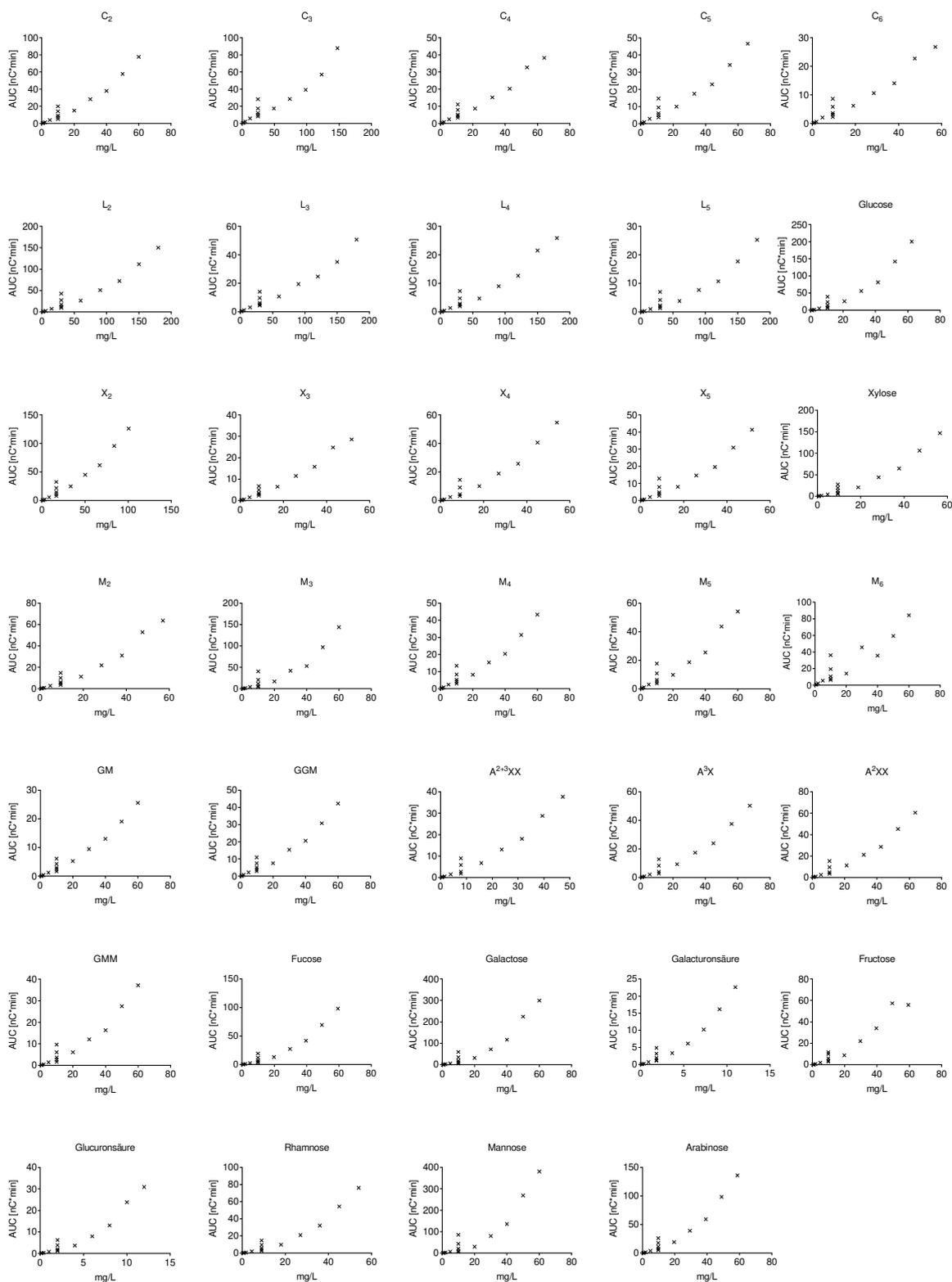


Abb. A8 Über internen Standard normierte Daten für die Bestimmung der Kalibriergeraden für Seq 1

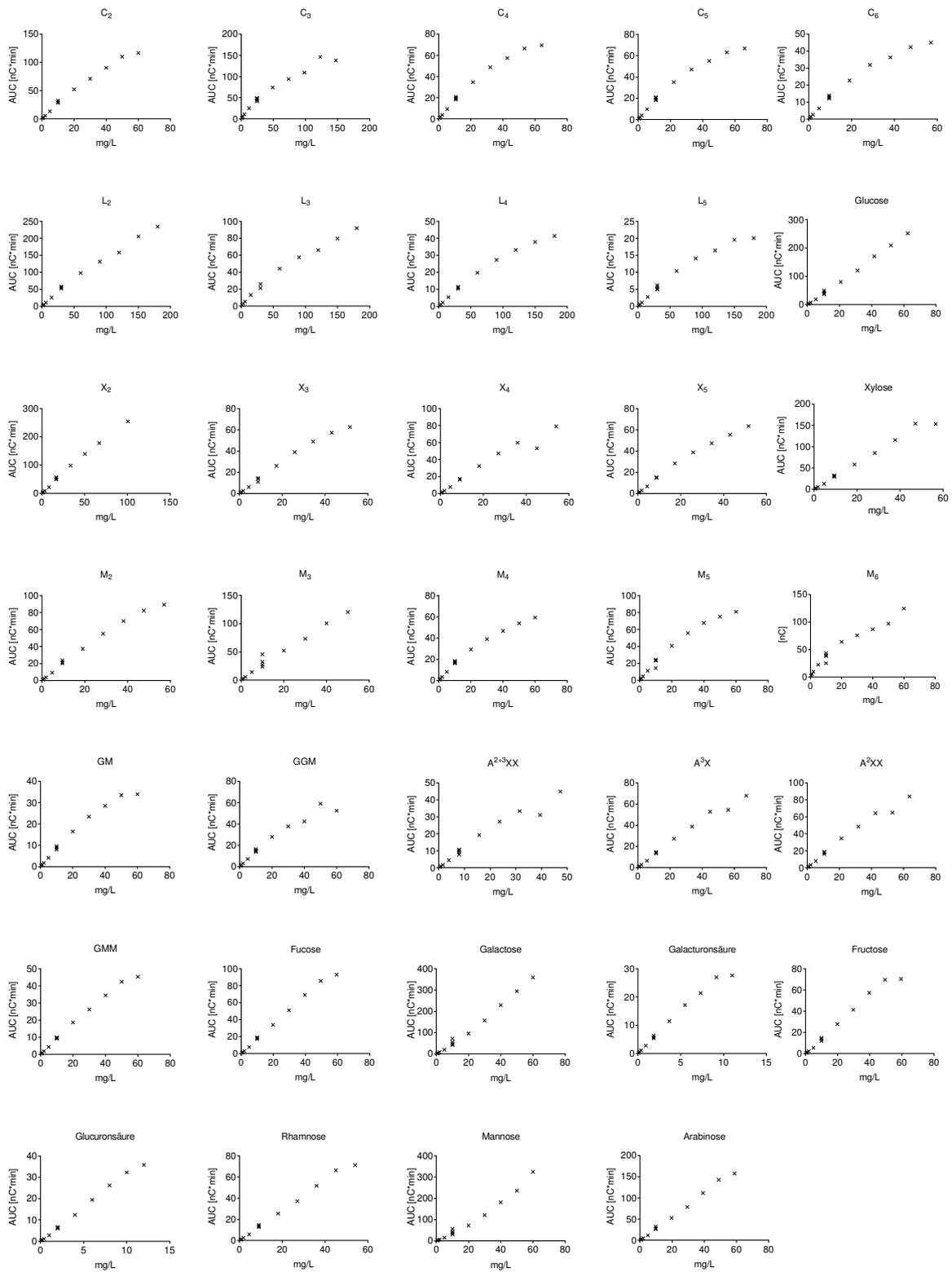


Abb. A9 Über Zerfallskinetik erster Ordnung normierte Daten für die Bestimmung der Kalibriergeraden für Seq 2

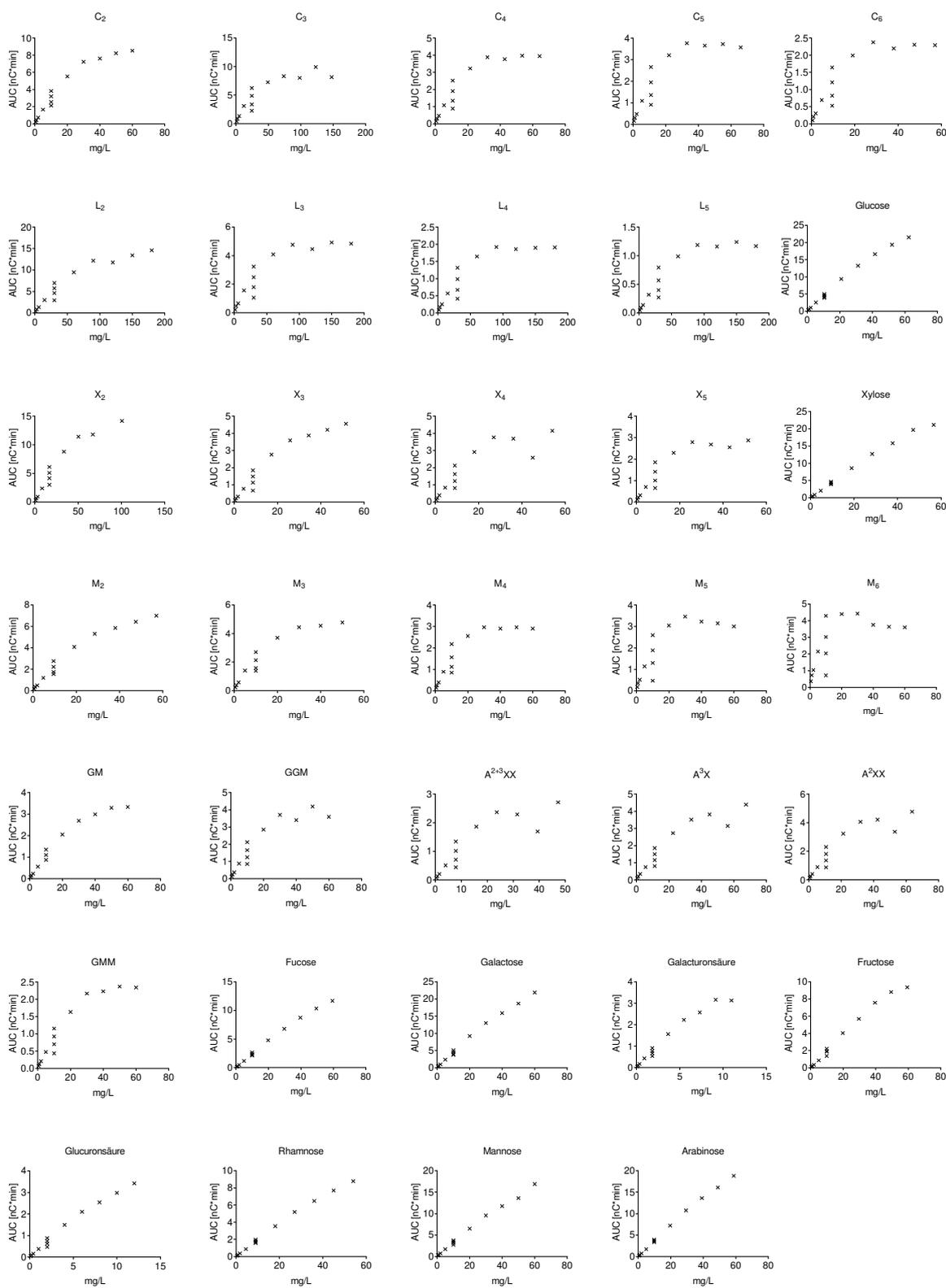


Abb. A10 Über internen Standard normierte Daten für die Bestimmung der Kalibriergeraden für Seq 2

Tab. A 6 Ergebnisse der Kalibrationsgerade für die Normierung über Zerfall erster Ordnung und internen Standard für beide Sequenzen.

	Seq 2, Normierung über Zerfall erster Ordnung			Seq 2, Normierung über internen Standard			Seq 3, Normierung über Zerfall erster Ordnung			Seq 3, Normierung über internen Standard		
	m	mSTABW	R ²	m	mSTABW	R ²	m	mSTABW	R	m	mSTABW	R ²
A ²⁺³ XX	1,270	0,011	0,999	0,492	0,028	0,953	0,961	0,043	0,959	0,065	0,007	0,669
Arabinose	3,405	0,058	0,995	0,288	0,021	0,924	2,780	0,035	0,997	0,336	0,005	0,994
A ³ X	1,216	0,015	0,997	0,287	0,016	0,954	1,050	0,030	0,984	0,075	0,006	0,789
A ² XX	1,400	0,019	0,996	0,436	0,025	0,954	1,369	0,043	0,980	0,088	0,009	0,714
C ₂	2,049	0,045	0,990	0,388	0,019	0,963	2,155	0,069	0,979	0,178	0,013	0,818
C ₃	1,045	0,049	0,950	0,267	0,016	0,940	1,108	0,060	0,935	0,081	0,010	0,484
C ₄	1,238	0,048	0,967	0,403	0,016	0,974	1,249	0,058	0,953	0,083	0,009	0,622
C ₅	1,277	0,045	0,972	0,563	0,025	0,967	1,167	0,059	0,945	0,077	0,009	0,510
C ₆	0,985	0,042	0,959	0,477	0,019	0,974	0,905	0,043	0,950	0,056	0,007	0,524
Fructose	1,763	0,092	0,951	0,170	0,010	0,942	1,323	0,038	0,985	0,176	0,005	0,982
Fucose	2,477	0,047	0,994	0,222	0,017	0,917	1,667	0,027	0,995	0,211	0,004	0,990
Galactose	7,964	0,316	0,974	0,730	0,066	0,889	5,784	0,108	0,994	0,387	0,009	0,986
Galacturonsäure	3,307	0,034	0,998	0,332	0,024	0,926	2,804	0,081	0,984	0,335	0,014	0,954
GGM	1,106	0,025	0,990	0,309	0,016	0,959	1,060	0,057	0,940	0,084	0,008	0,700
Glucose	5,042	0,120	0,990	0,472	0,037	0,912	4,020	0,026	0,999	0,377	0,010	0,982
Glucuronsäure	4,234	0,124	0,985	0,416	0,034	0,905	3,133	0,042	0,997	0,307	0,009	0,979
GM	0,709	0,018	0,986	0,129	0,006	0,969	0,657	0,028	0,961	0,069	0,005	0,868
GMM	0,941	0,012	0,997	0,265	0,017	0,939	0,822	0,019	0,990	0,051	0,004	0,786
L ₂	1,324	0,024	0,993	0,252	0,014	0,954	1,362	0,031	0,989	0,099	0,008	0,785
L ₃	0,458	0,024	0,941	0,116	0,005	0,966	0,551	0,022	0,967	0,037	0,004	0,552
L ₄	0,322	0,008	0,989	0,106	0,006	0,954	0,258	0,010	0,966	0,015	0,002	0,551
L ₅	0,201	0,003	0,994	0,090	0,006	0,928	0,130	0,006	0,953	0,009	0,001	0,612
M ₂	2,020	0,029	0,996	0,343	0,019	0,951	1,724	0,050	0,983	0,146	0,009	0,884
M ₃	3,663	0,135	0,976	0,961	0,081	0,899	2,479	0,043	0,995	0,123	0,011	0,737
M ₄	1,165	0,031	0,985	0,415	0,022	0,956	1,107	0,048	0,959	0,068	0,008	0,495
M ₅	1,621	0,042	0,986	0,665	0,037	0,950	1,545	0,071	0,954	0,074	0,010	0,346
M ₆	2,251	0,094	0,969	1,195	0,079	0,941	2,177	0,115	0,935	0,094	0,018	-0,255
Mannose	8,865	0,509	0,949	0,888	0,093	0,861	4,839	0,180	0,977	0,289	0,006	0,990
Rhamnose	2,043	0,048	0,991	0,189	0,015	0,914	1,394	0,022	0,995	0,174	0,003	0,990
X ₂	1,635	0,023	0,996	0,241	0,012	0,962	2,625	0,047	0,995	0,176	0,014	0,820
X ₃	0,735	0,026	0,973	0,149	0,006	0,976	1,331	0,037	0,985	0,106	0,007	0,873
X ₄	1,246	0,019	0,995	0,388	0,022	0,954	1,472	0,070	0,955	0,090	0,010	0,622
X ₅	0,922	0,017	0,993	0,328	0,017	0,958	1,325	0,040	0,981	0,073	0,008	0,586
Xylose	3,849	0,056	0,996	0,325	0,023	0,928	2,979	0,078	0,987	0,407	0,009	0,989
Durchschnitt			0,983			0,941			0,974			0,733
Median			0,990			0,952			0,980			0,785
Durchschnittliche Standardabweichung der Bestimmtheitsmaße			0,016			0,027			0,020			0,257

Für die Kalibriergeraden wurde der Y-Achsenabschnitt gleich Null gesetzt

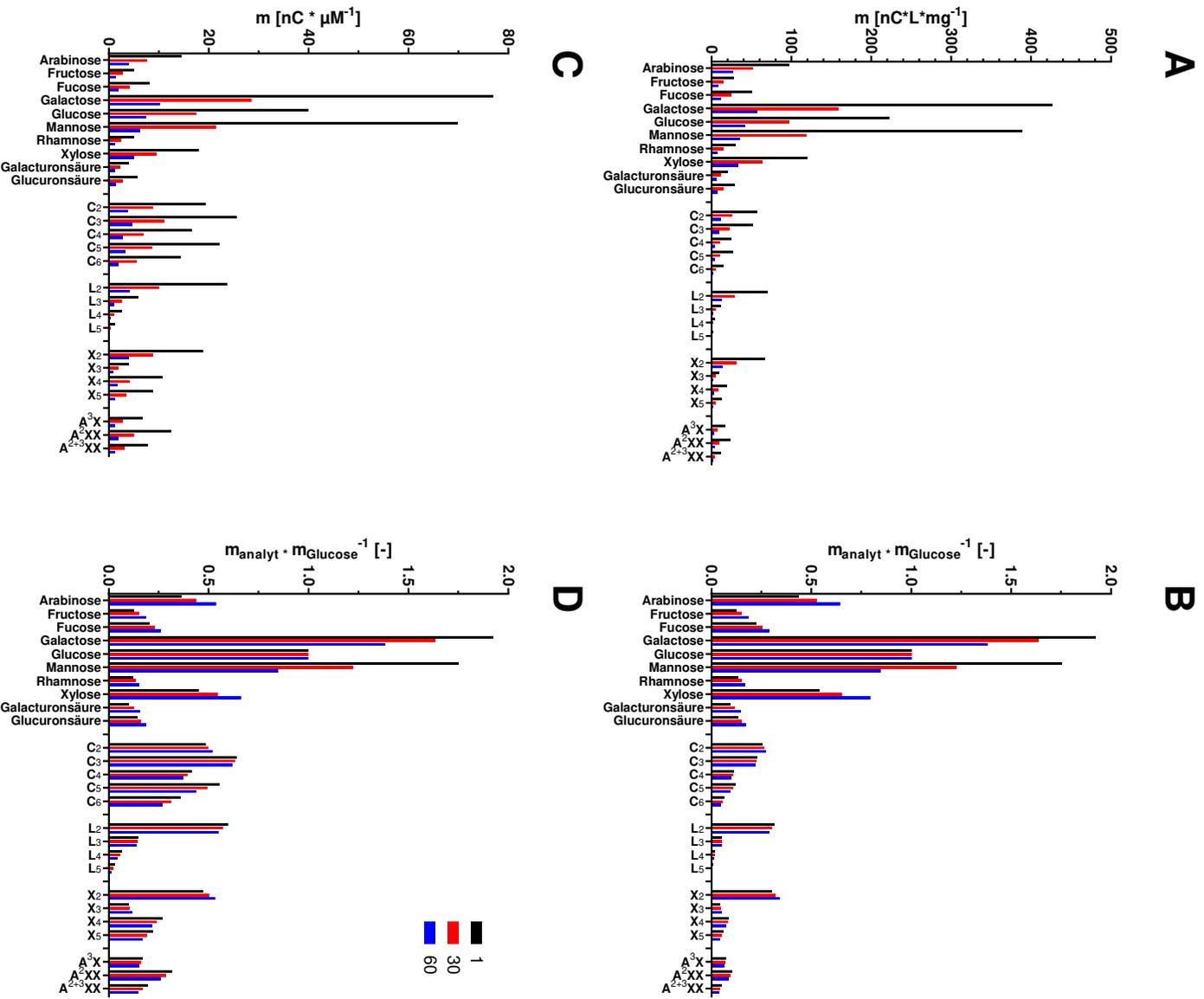


Abb. A11 Darstellung der Veränderung des Detektorsignals von Injektion 1 bis Injektion 60 in Seq 1

(A) zeigt die über die massenbasierte Konzentration der Analyten berechnete Sensitivität des Detektors. (B) zeigt die über massenbasierte Konzentration berechnete Sensitivität des Detektors verglichen mit der von Glucose. (C) zeigt die über molare Konzentration berechnete Sensitivität des Detektors. (D) zeigt die über molare Konzentration berechnete Sensitivität verglichen mit Glucose.

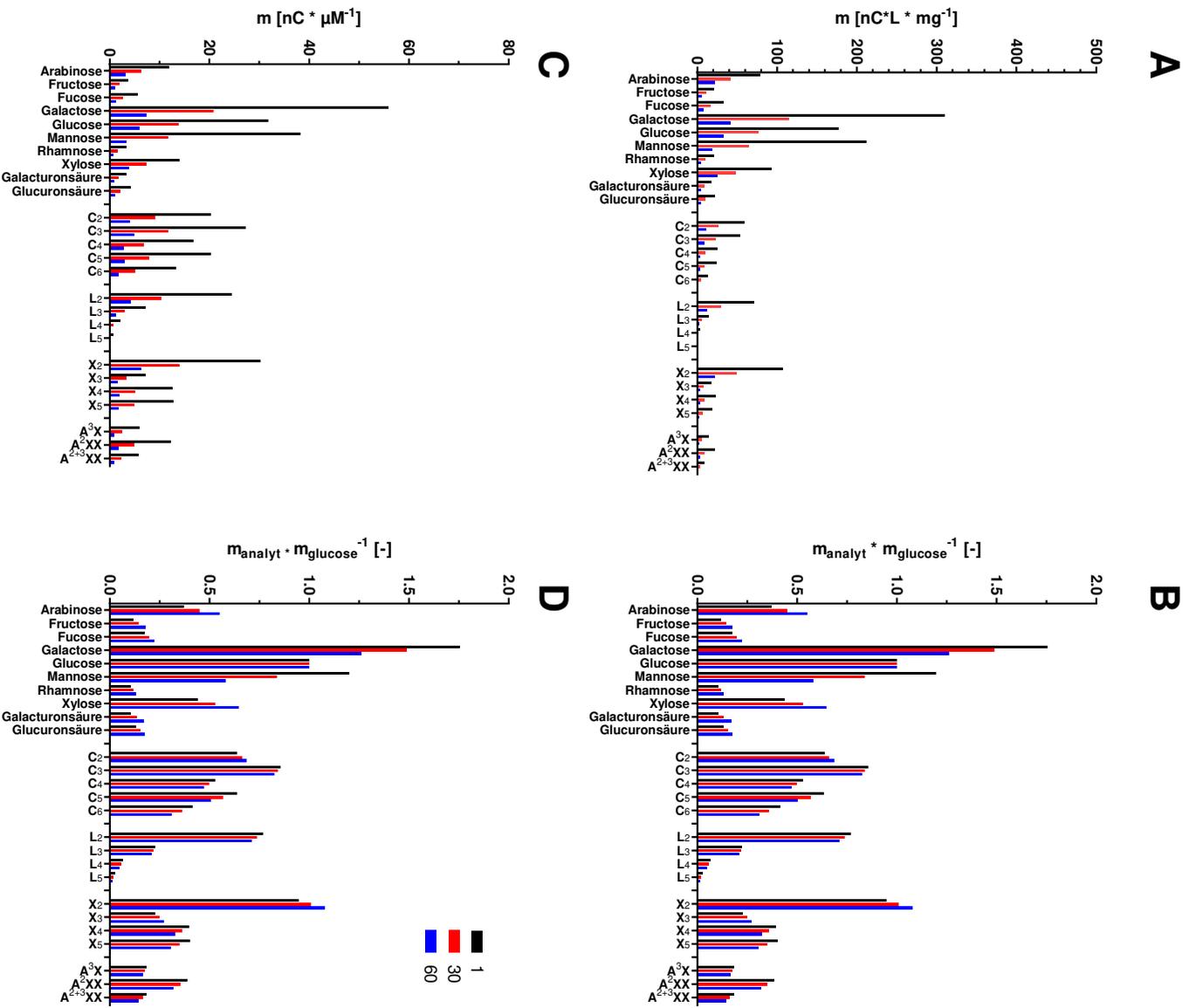


Abb. A12 Darstellung der Veränderung des Detektorsignals von Injektion 1 bis Injektion 60 in Seq 2

(A) zeigt die über die massenbasierte Konzentration der Analyten berechnete Sensitivität des Detektors. (B) zeigt die über massenbasierte Konzentration berechnete Sensitivität des Detektors verglichen mit der von Glucose. (C) zeigt die über molare Konzentration berechnete Sensitivität des Detektors. (D) zeigt die über molare Konzentration berechnete Sensitivität verglichen mit Glucose.

i.4 Bestimmung des pH- und T-Optimums der Xylanasen, α -Arabinoxylanosidasen und β -Xylosidasen aus *Hb. hemicellulosilytica*

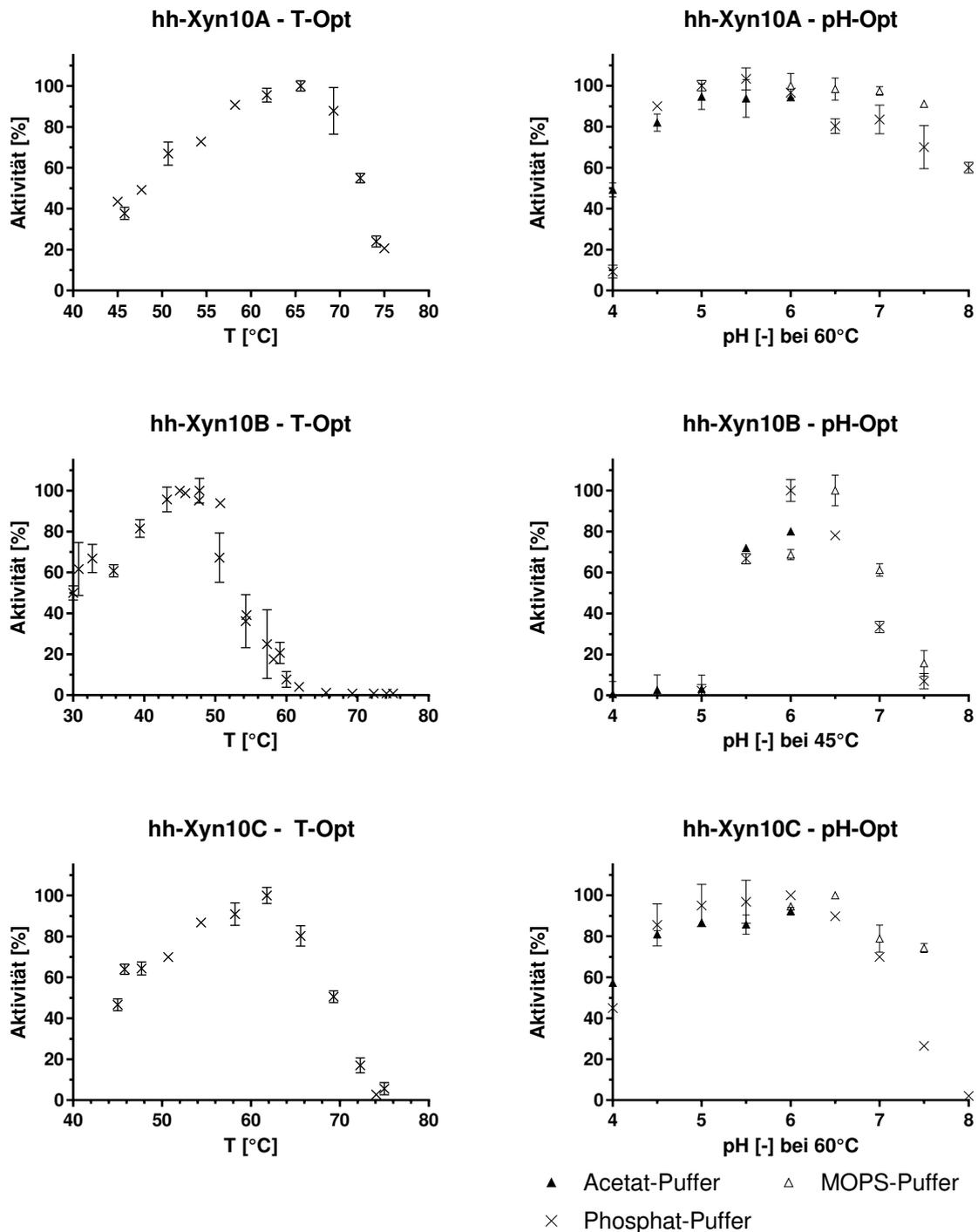


Abb. A13 Temperatur- und pH-Optimum der Xylanasen hh-Xyn10A, hh-Xyn10B und hh-Xyn10C
Bestimmung der Aktivität erfolgte auf 0,5 % w/v Arabinoxylan aus Weizen (mittlerer Viskosität) mittels DNSA-Assay.

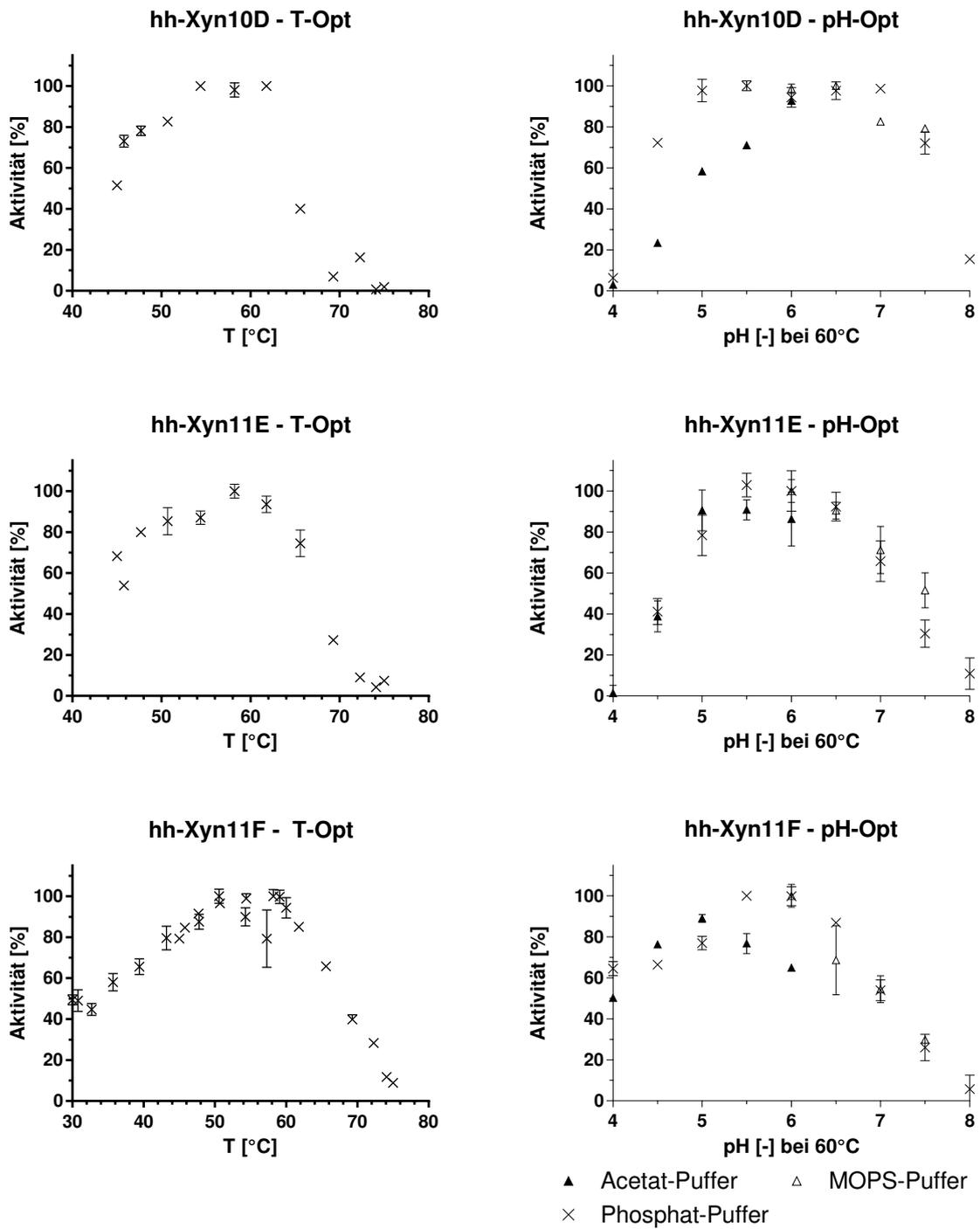


Abb. A14 Temperatur- und pH-Optimum der Xylanasen hh-Xyn10D, hh-Xyn11E und hh-Xyn11F
Bestimmung der Aktivität erfolgte auf 0,5 % w/v Arabinoxylan aus Weizen (mittlerer Viskosität) mittels DNSA-Assay.

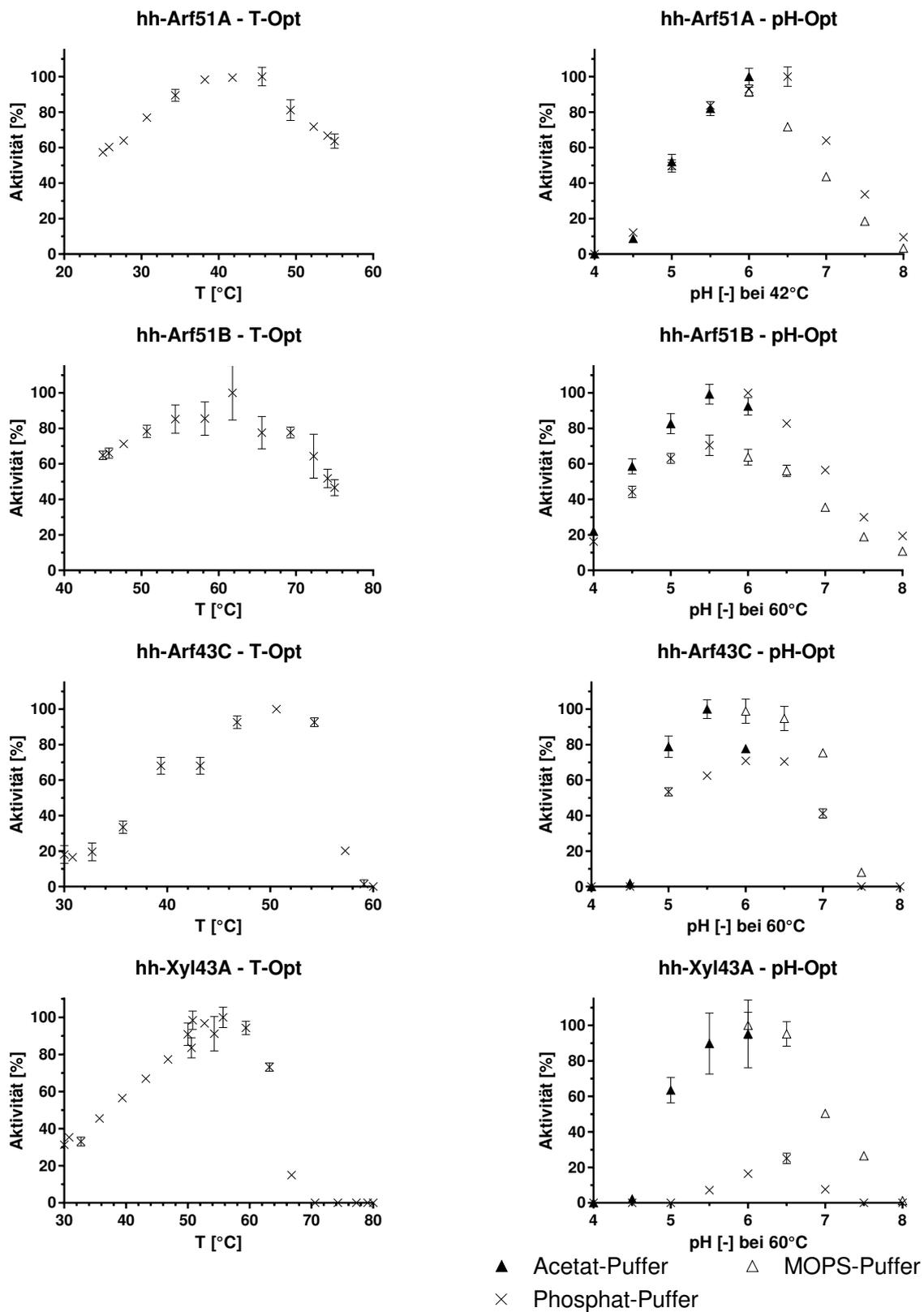
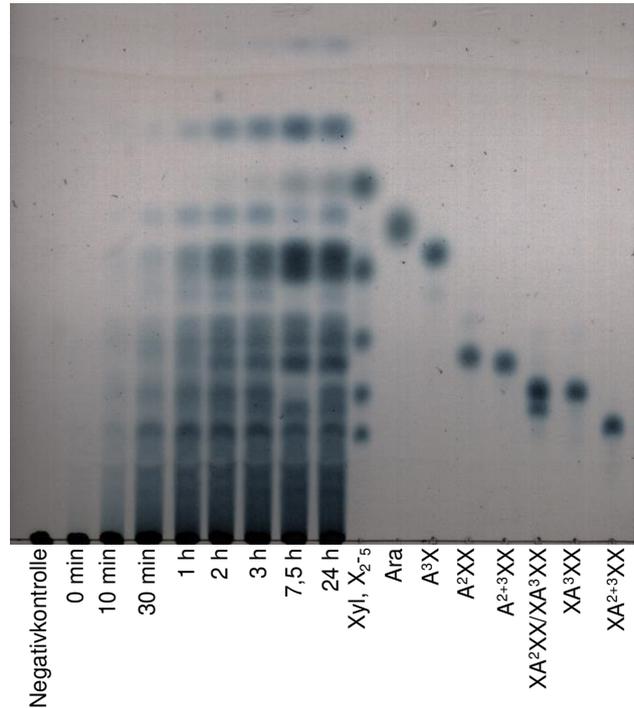
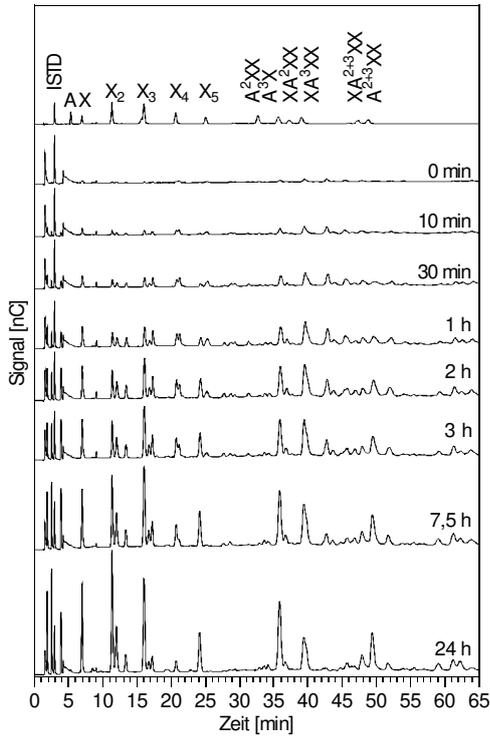


Abb. A15 Temperatur- und pH-Optimum der α -Arabinofuranosidasen hh-Arf51A, hh-Arf51B und hh-Arf43C sowie der β -Xylosidase hh-Xyl43A

Bestimmung der Aktivität erfolgte über einen pNP-Assay mit pNP- α -L-Arabinofuranosid für die α -Arabinofuranosidasen und pNP- β -D-Xylopyranosid für die β -Xylosidase als Substrat.

i.5 Enzymkinetiken von Xylanasen

A) Enzymkinetik von hh-Xyn10C auf Arabinoxylan



B) Enzymkinetik von cs-Xyn11A auf Arabinoxylan

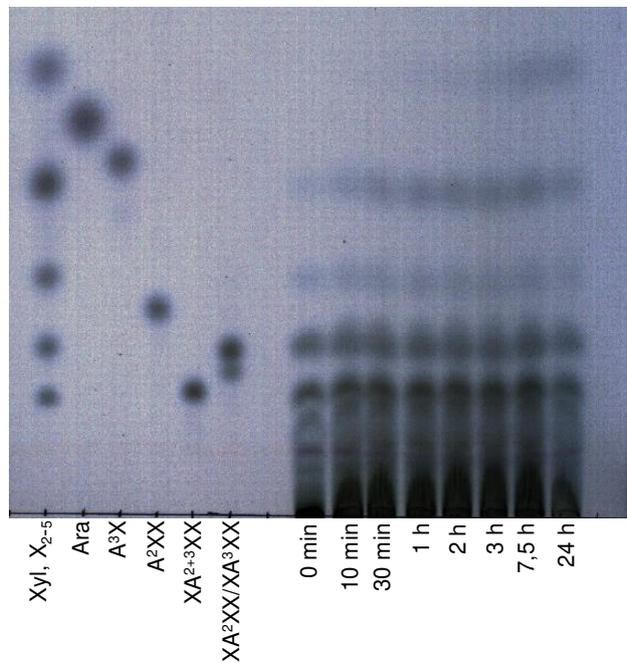
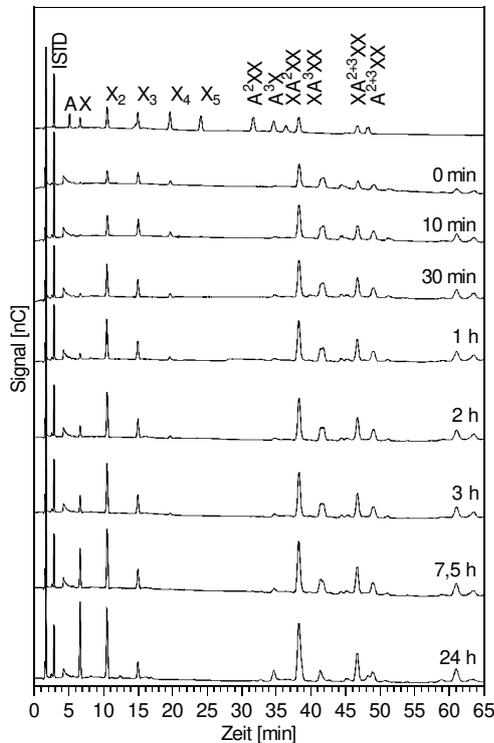
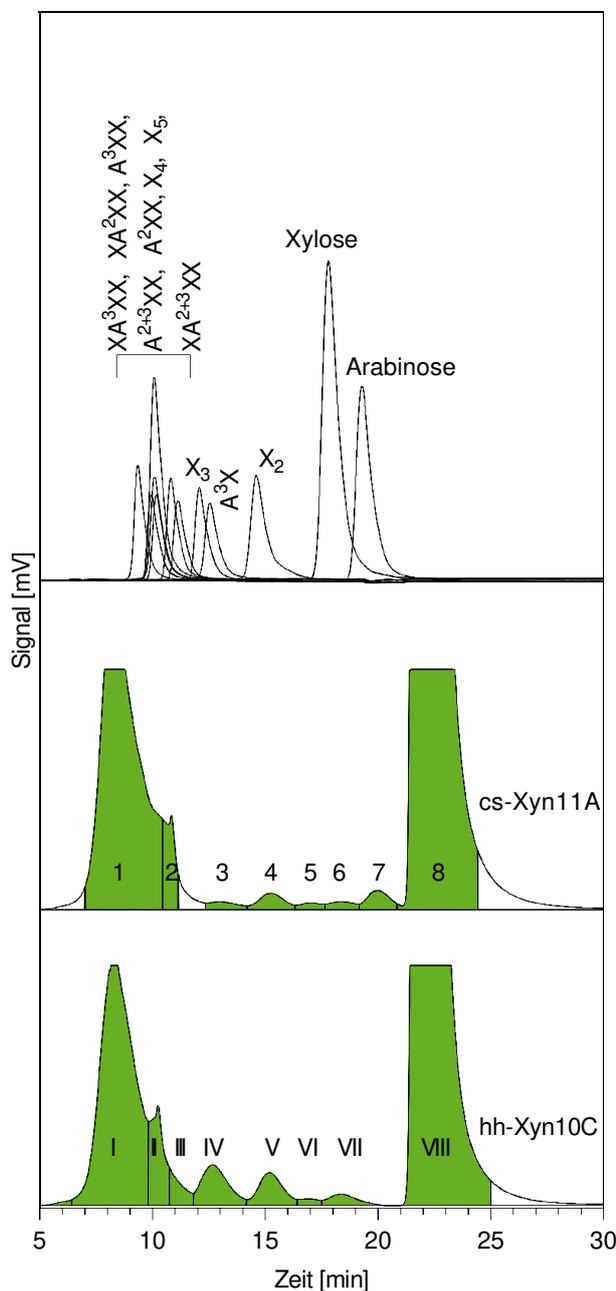


Abb. A16 Enzymkinetik der Xylanasen hh-Xyn10C und cs-Xyn11A auf Arabinoxylan (Weizen)

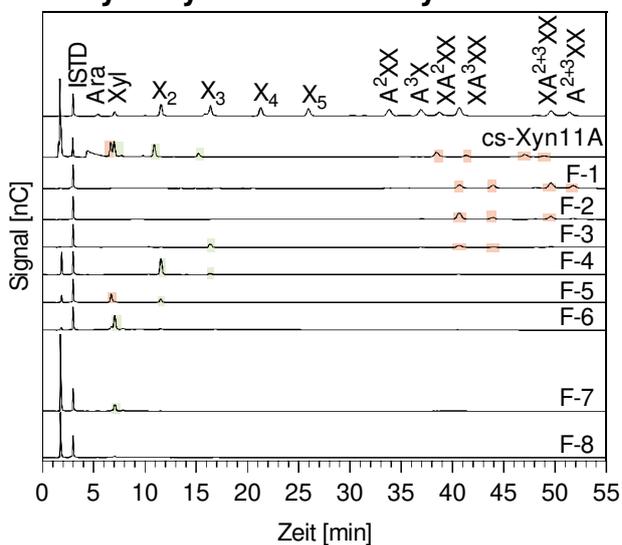
Für die Hydrolyse des Arabinoxylans wurden 0,5 % w/v Arabinoxylan aus Weizen und 5 mg/L hh-Xyn10C bzw. 1 mg/L cs-xyn11A eingesetzt. Analyse erfolgte über HPAEC-PAD (links) und DC (rechts). Laufmittel für DC bestand aus einem Acetonitril-ddH₂O-Gemisch im Verhältnis 8:2 v/v.

i.6 Präparative Aufreinigung von XOS und AXOS mittels HPLC und SEC

A) Präparative HPLC von Arabinoxylanhydrolysaten



B) HPAEC-PAD-Analyse der Fraktionen des Arabinoxylanhydrolysats von hh-Xyn10C



C) HPAEC-PAD-Analyse der Fraktionen des Arabinoxylanhydrolysats von cs-Xyn11A

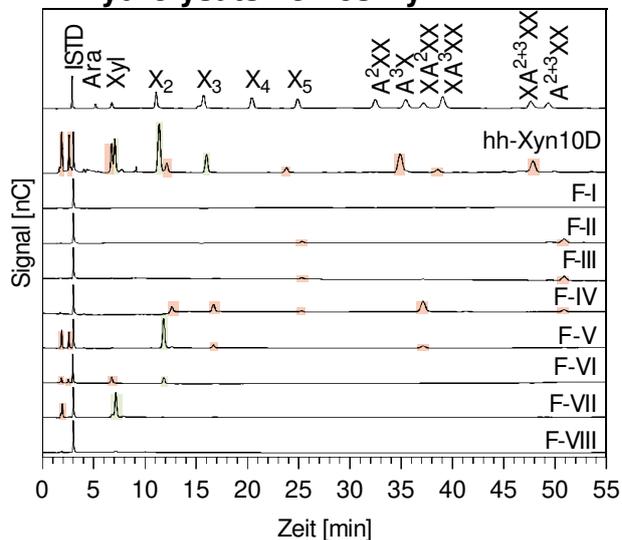


Abb. A17 Präparative Aufreinigung von XOS und AXOS mittels HPLC mit Na-Säule

Für die Hydrolyse des Arabinoxylans wurden 0,5 % w/v Arabinoxylan aus Gräsern und 5 mg/L hh-xyn10C bzw. 1 mg/L cs-xyn11A eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 24 h. Analyse der gesammelten Fraktionen mittels HPAEC-PAD. XOS sind in grün und AXOS in rot markiert.

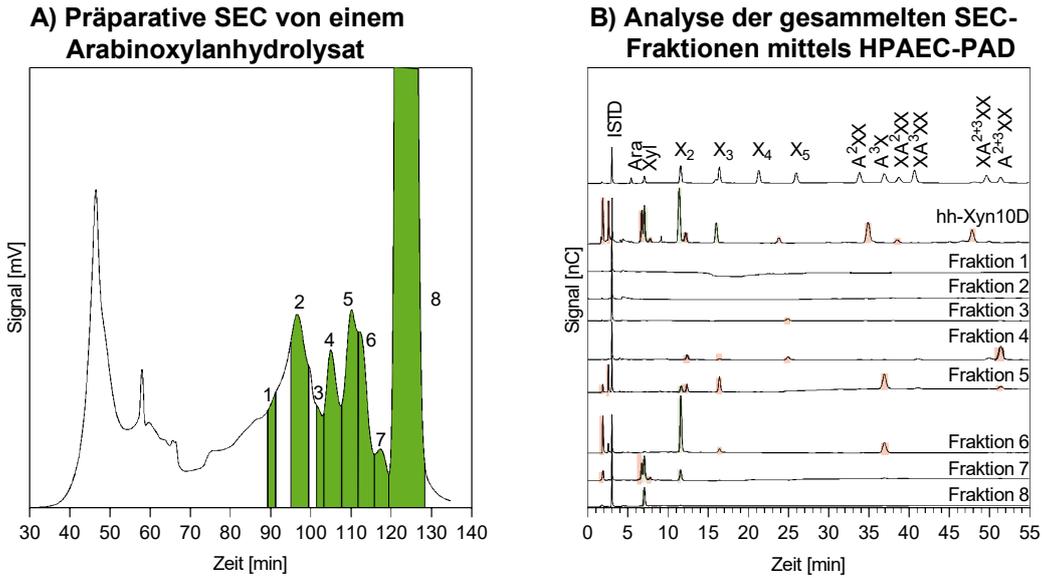


Abb. A18 Präparative Aufreinigung von XOS und AXOS mittels SEC

Für die Hydrolyse des Arabinoxylans wurden 0,5 % w/v Arabinoxylan aus Gräsern und 5 mg/L hh-xyn10C eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 24 h Analyse der gesammelten Fraktionen mittels HPAEC-PAD. XOS sind in grün und AXOS in rot markiert.

i.7 Endpunktbestimmung der Produktspektren von β -Glucanasen und β -Mannanasen auf Glucomannan

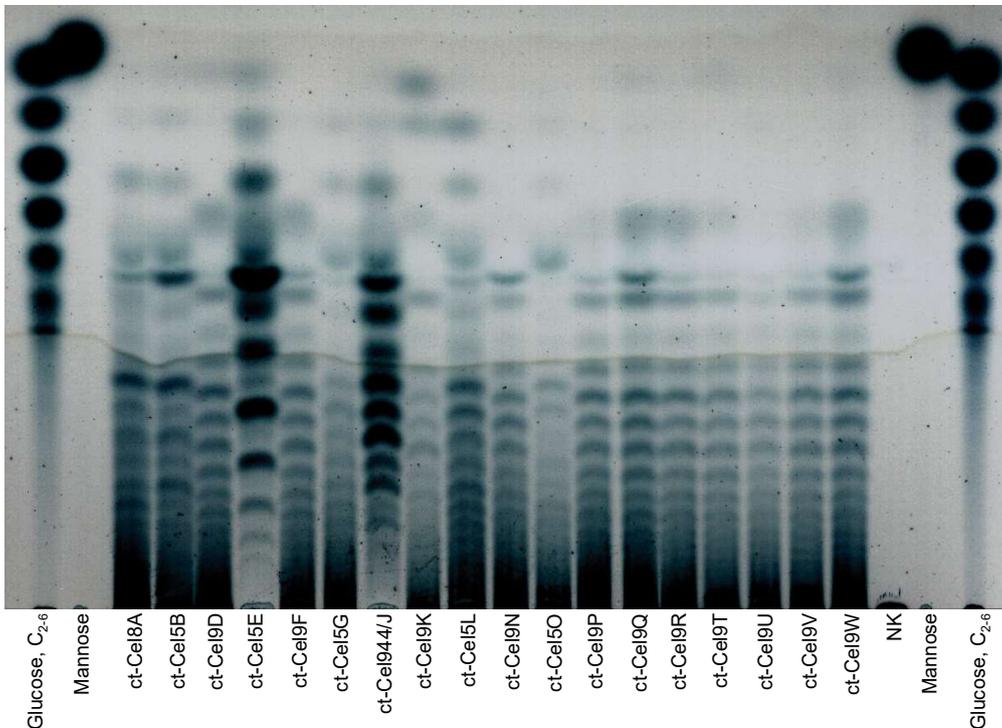


Abb. A19 DC der Endpunktbestimmung des Produktspektrums von β -Glucanasen aus *C. thermocellum* auf Glucomannan

NK = Negativkontrolle. Für die enzymatische Hydrolyse wurden 0,125 % w/v Glucomannan und 1-5 mg/L Enzym eingesetzt. Laufmittel für DC bestand aus einem Butanol-Ethanol-ddH₂O-Gemisch im Verhältnis 5:5:4 v/v/v.

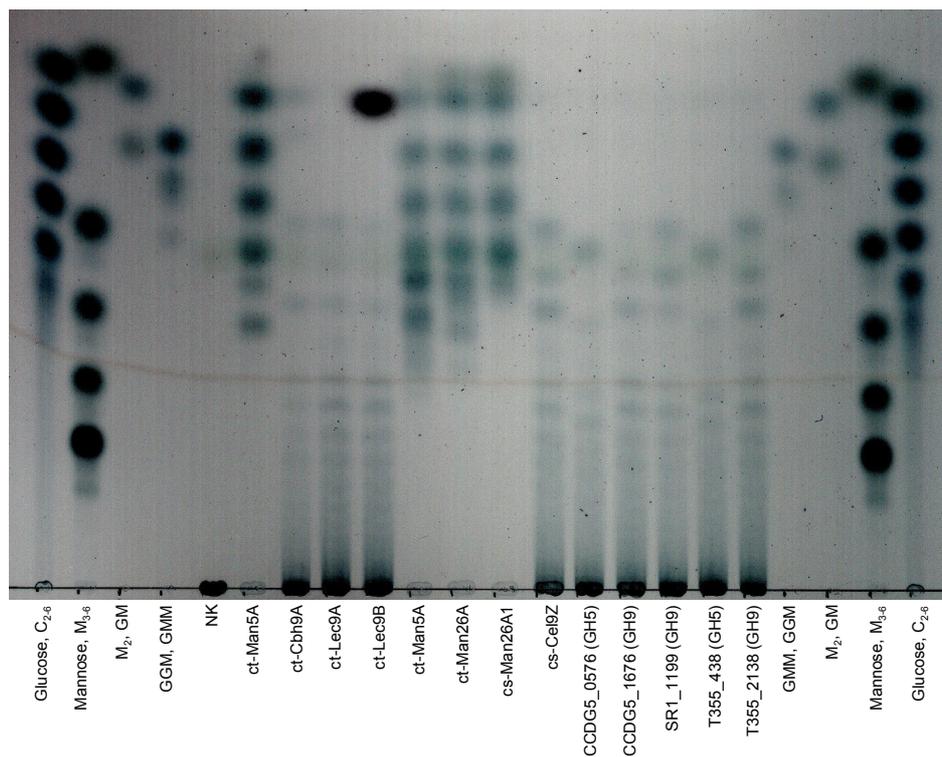


Abb. A20 DC der Endpunktbestimmung des Produktspektrums von β -Glucanasen und β -Mannanasen aus *C. thermocellum* und *C. cellulosi* auf Glucomannan

NK = Negativkontrolle. Für die enzymatische Hydrolyse wurden 0,125 % w/v Glucomannan und 1-5 mg/L Enzym eingesetzt. Laufmittel für DC bestand aus einem Butanol-Ethanol-ddH₂O-Gemisch im Verhältnis 5:5:4 v/v/v.

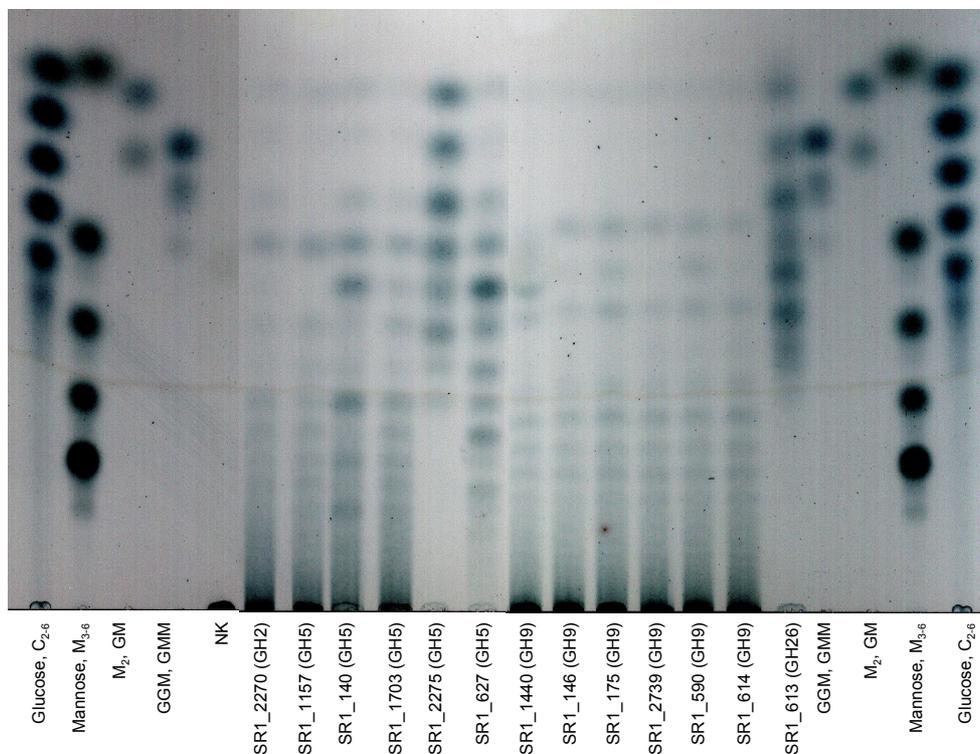


Abb. A21 DC der Endpunktbestimmung des Produktspektrums von β -Glucanasen und β -Mannanasen aus *Hv. saccharicola* auf Glucomannan

NK = Negativkontrolle. Für die enzymatische Hydrolyse wurden 0,125 % w/v Glucomannan und 1-5 mg/L Enzym eingesetzt. Laufmittel für DC bestand aus einem Butanol-Ethanol-ddH₂O-Gemisch im Verhältnis 5:5:4 v/v/v.

i.8 Kombinatorik von β -Glucanasen und β -Mannanasen bei der Hydrolyse von Glucomannan

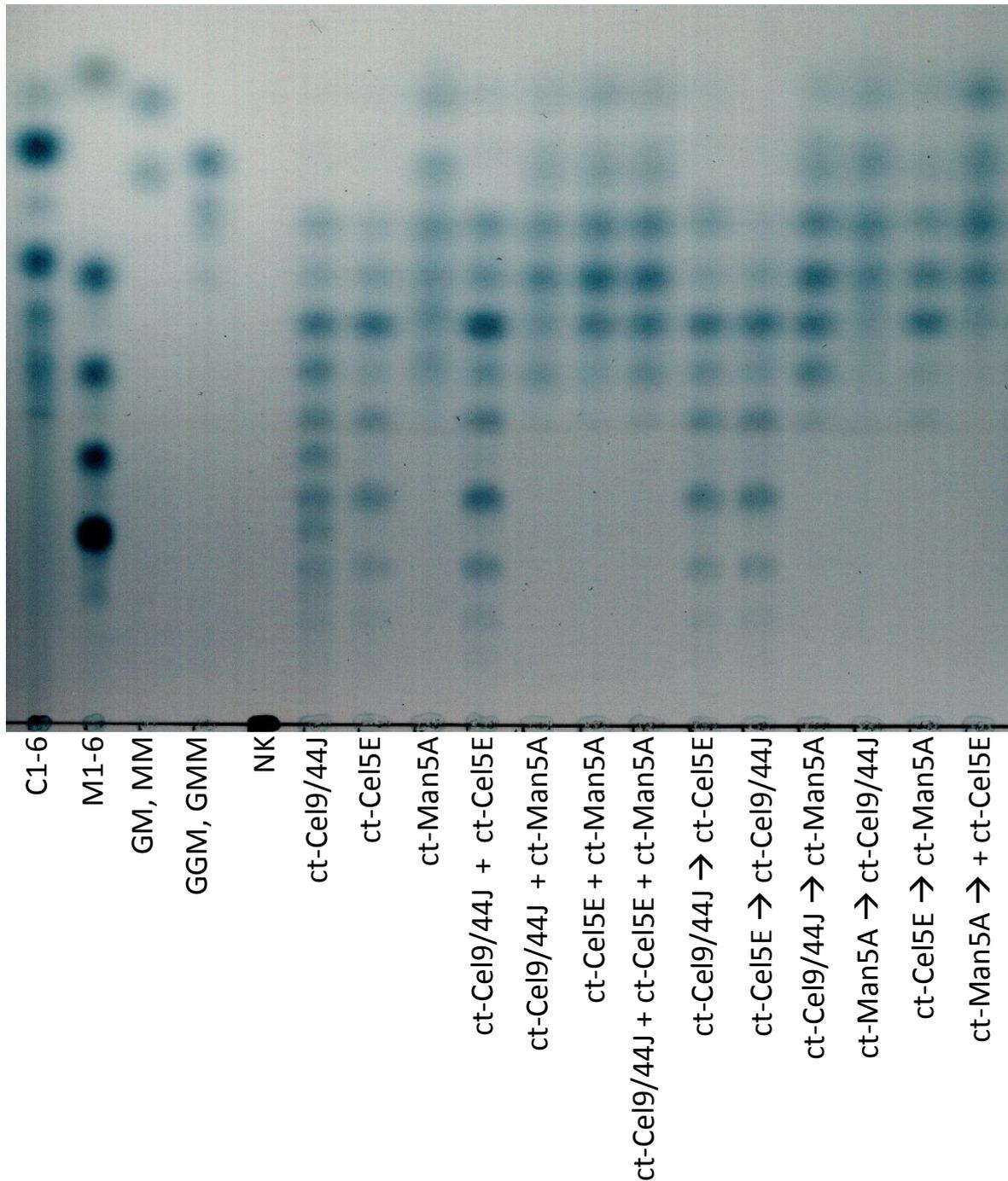


Abb. A22 DC der Kombination verschiedener Enzyme zum Abbau von Glucomannan

NK = Negativkontrolle. Für die enzymatische Hydrolyse wurden 0,125 % w/v Glucomannan und 5 mg/L Enzym eingesetzt. Bei einem zweistufigen Verdau wurde der Reaktionsansatz nach dem ersten Verdau (Pfeil) durch eine 10 min Inkubation bei 95 °C inaktiviert, bevor neues Enzym für den zweiten Verdau hinzugegeben wurde. Laufmittel für DC bestand aus einem Butanol-Ethanol-ddH₂O im Verhältnis 5:5:4 v/v/v.

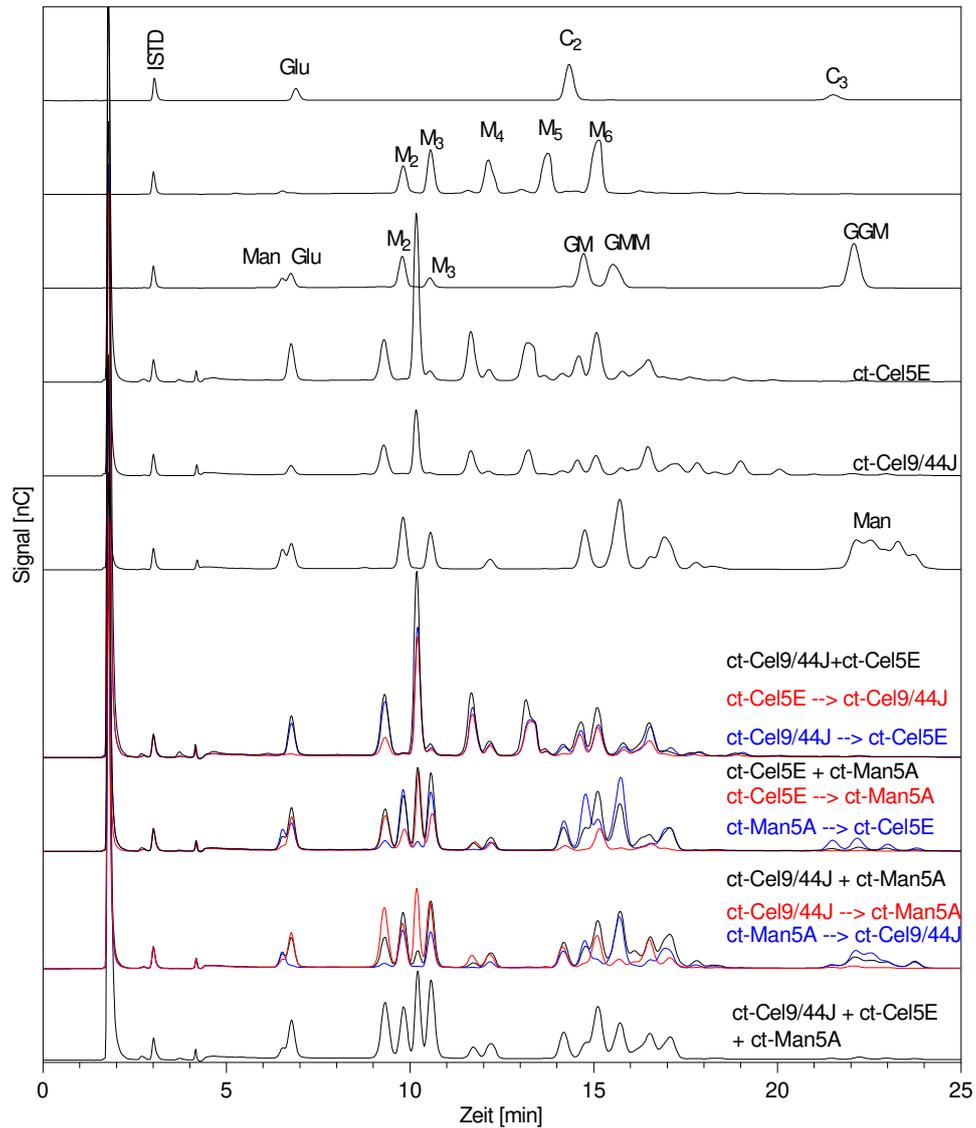


Abb. A23 HPAEC-PAD-Analyse der Kombinationen verschiedener Enzyme zum Abbau von Glucomannan
 Bei einem zweistufigen Verdau wurde der Reaktionsansatz nach dem ersten Verdau (Pfeil) durch eine 10 min Inkubation bei 95 °C inaktiviert, bevor neues Enzym für den zweiten Verdau hinzugegeben wurde.

ii Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

iii Lebenslauf

Berufserfahrung und Praktika

09/2014 - 11/2017

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Technische Universität München

Promotion zum Thema "Enzymatische Hydrolyse von Hemicellulose zu Oligosacchariden" als Teil des EU FP7 Projekts ValorPlus (FP7-KBBE-2013-7-613802)

- Entwicklung und Screening von neuen Enzymen zum gezielten Abbau von Hemicellulose
- Entwicklung verschiedener analytischer Systeme zur Quantifizierung und Charakterisierung von Mono- und Oligosacchariden
- Koordinierung, Durchführung und Präsentation des Arbeitspakets Hemicellulosewertschöpfung im internationalen Umfeld (WP Leader)

04/2015 - heute

Research Scholar bei PreScouter, Inc., Evanston, IL (USA)

- Scouting und Bewertung neuer Technologien zur Lösung wissenschaftlicher Unternehmensprobleme von Klienten
- Zusammenarbeit mit anderen Research Scholars in internationalen Teams
- Präsentation der Ergebnisse vor Klienten
- Team Lead seit 08/2015

07/2014 - 09/2014
&
04/2013 - 09/2013

Praktikum bei der Clariant Produkte (Deutschland) GmbH, Biotech & Renewables Center, Abteilung Biochemie, München

- Entwicklung und Charakterisierung neuer Katalysatoren für die Herstellung von Bulkchemikalien
- Technologietransfer von universitärer Forschung zur industriellen Anwendung

09/2011 - 12/2011

Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik, Technische Universität München

- Charakterisierung der Kristallisation therapeutischer und nicht-therapeutischer Proteine im Mikroliter- und im Liter-Maßstab

06/2007 - 07/2007

Praktikum bei der PLANTA (Angewandte Pflanzengenetik und Biotechnologie GmbH), Einbeck

- Klonierungen in *E. coli* und *A. tumefaciens*, Ablauf der Markeranalyse von Probenenernte bis Datenauswertung, Isoenzym- und Wirkstoffanalyse

Ausbildung

- 10/2011 - 05/2014 **Masterstudium Industrielle Biotechnologie** (Note 1,4)
Technische Universität München
- Masterarbeit im Fachgebiet für Industrielle Biokatalyse zum
Thema: „Etablierung und Optimierung einer nachhaltigen
Produktionsplattform zur Synthese eines Diterpenoids in *E. coli*“
(Note 1,0)
- 10/2008 - 08/2011 **Bachelorstudium Molekulare Biotechnologie** (Note 1,5)
Technische Universität München
- Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik zum
Thema: “Optimierung der Kristallisationsausbeute eines
therapeutischen Proteins” (Note 1,0)
- 06/2007 **Erwerb der allgemeinen Hochschulreife** (Note 1,7)