

In vitro Untersuchungen zum Einfluss von Biertreber-Inhaltsstoffen auf Enzyme des Glucosestoffwechsels

Vom Fachbereich Chemie der Rheinland-Pfälzisch Technischen Universität Kaiserslautern-
Landau am Standort Kaiserslautern zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte Dissertation

DE- 386



vorgelegt von
Diplom Lebensmittelchemikerin
Daniela Becker
geboren in Pirmasens

Betreuerin: Prof. Dr. Elke Richling
Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 23. März 2023

Diese Arbeit entstand im Zeitraum von April 2017 bis März 2021 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Elke Richling an der TU Kaiserslautern im Fachbereich Chemie Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie.

Prüfungskommission

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Gabriele Hornung

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Elke Richling

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Werner Thiel

Ich danke Frau Prof. Dr. Elke Richling für die Überlassung des spannenden Themas und Herrn Prof. Dr. Werner Thiel für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur

Die Hummel hat eine Flügelfläche von $0,7 \text{ cm}^2$ und wiegt $1,2 \text{ g}$. Nach den Gesetzen der Aerodynamik ist es ihr nicht möglich zu fliegen. Das weiß sie aber nicht und fliegt trotzdem.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Inhaltsverzeichnis | 7 |
| Abkürzungsverzeichnis | 10 |
| Kurzzusammenfassung | 13 |
| Abstract | 14 |
| 1 Einleitung | 15 |
| 2 Stand der Wissenschaft | 17 |
| 2.1 Biertreber (brewer's spent grain, BSG) | 17 |
| 2.1.1 Prozess der Bierherstellung | 17 |
| 2.1.2 Nutzungsmöglichkeiten und Anwendungen | 18 |
| 2.1.3 Inhaltsstoffe | 20 |
| 2.1.3.1 Ballaststoffe | 20 |
| 2.1.3.2 Lipide | 24 |
| 2.1.3.3 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe | 26 |
| 2.1.3.3.1 Hydroxycimtsäuren | 26 |
| 2.1.3.3.2 Flavonoide | 31 |
| 2.1.3.3.3 Phenolamide | 33 |
| 2.2 Zuckerstoffwechsel | 35 |
| 2.2.1 Resorption und Verteilung | 35 |
| 2.2.2 Regulation und Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase | 37 |
| 2.2.3 Glykogenstoffwechsel | 38 |
| 2.2.4 Ausgewählte Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels | 39 |
| 2.2.4.1 α -Amylase | 39 |
| 2.2.4.2 α -Glucosidase | 40 |
| 2.2.4.3 Dipeptidylpeptidase IV | 42 |
| 2.2.4.4 Glykogenphosphorylase α | 43 |
| 2.2.5 <i>Diabetes mellitus</i> : Störung des Glucosestoffwechsels | 44 |
| 3 Problemstellung | 47 |
| 4 Ergebnisse und Diskussion | 49 |
| 4.1 Publikation 1: Influence of Brewer's Spent Grain Compounds on Glucose Metabolism Enzymes | 50 |
| 4.2 Publikation 2: Characterization of BSG extracts by tandem mass spectrometry and HPLC-DAD: ferulic acid dehydrodimers, phenolamides and oxylipins | 74 |
| 4.3 Publikation 3: Isolation of hordatine-rich fractions from BSG and their influence on glucose metabolism enzymes | 107 |
| 4.4 Isolierung von FA-Oligomere aus BSG | 131 |
| 4.4.1 Gewinnung und Ausbeute der F-Fractionen | 131 |
| 4.4.2 Charakterisierung der F-Fractionen via HPLC-ESI(-)-MS/MS | 131 |
| 4.4.3 Einfluss der F-Fractionen auf α -Glucosidase | 158 |
| 4.4.4 Einfluss der F-Fractionen auf GP α | 159 |
| 4.5 Untersuchung ausgewählter Reinsubstanzen auf Enzyme des Glucosestoffwechsels | 161 |
| 5 Zusammenfassende Diskussion | 163 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 5.1 | A-Extrakte: Korrelation der Inhaltsstoffe mit der Enzyminhibition | 164 |
| 5.2 | Hordatinreiche Fraktionen: Rückschlüsse auf Hordatine als biologisch aktive Komponenten in A-Extrakten | 165 |
| 5.3 | HE- und HA-Extrakte: Korrelation der Inhaltsstoffe mit der Enzyminhibition | 167 |
| 5.4 | F-Fraktionen: Rückschlüsse auf FA-Oligomere als aktive Komponenten in den HE- und HA-Extrakten | 169 |
| 5.5 | Methodikbetrachtung | 171 |
| 6 | Zusammenfassung und Ausblick..... | 174 |
| 6.1 | Extraktcharakterisierung | 174 |
| 6.2 | Isolierung von Naturstoffen..... | 177 |
| 6.3 | Biologische Aktivität | 179 |
| 7 | Fazit | 182 |
| 8 | Material und Methoden | 184 |
| 8.1 | Materialien..... | 184 |
| 8.1.1 | Verbrauchsmaterialien | 184 |
| 8.1.2 | Geräte | 185 |
| 8.1.3 | Chemikalien | 188 |
| 8.2 | Aufarbeitung und Charakterisierung der BSG | 193 |
| 8.2.1 | BSG-Entfettung..... | 193 |
| 8.2.2 | Extraktherstellung Prozess 1 (A1–A3, HE1–HE3) | 193 |
| 8.2.3 | Extraktherstellung Prozess 2 (HE4–HE6, HA1–HA3) | 193 |
| 8.2.4 | Extraktherstellung Prozess 3 (A4–A7) | 194 |
| 8.2.5 | Aufreinigung der Extrakte..... | 194 |
| 8.2.6 | Übersicht und Extraktomenklatur..... | 195 |
| 8.2.7 | Bestimmung des <i>total phenolic content</i> (TPC) mittels Folin-Ciocalteu-Methode | 196 |
| 8.2.8 | Bestimmung des <i>total flavonoid content</i> (TFC) mittels AlCl ₃ -Methode..... | 197 |
| 8.2.9 | Charakterisierung mittels HPLC-DAD | 199 |
| 8.2.9.1 | Methode A: Identifikation | 199 |
| 8.2.9.2 | Methode B: Quantifizierung von Hydroxyzimtsäurederivaten | 199 |
| 8.2.9.3 | Methode C: Quantifizierung von Hordatinen als pCA-Äq | 200 |
| 8.2.10 | Strukturaufklärung und Charakterisierung mittels HPLC-ESI-MS/MS | 201 |
| 8.2.10.1 | Charakterisierung der BSG-Extrakte | 202 |
| 8.2.10.2 | Strukturaufklärung von DiFAs sowie Charakterisierung von Oxylipinen in Extrakten..... | 203 |
| 8.2.10.3 | Strukturaufklärung der Hordatine in Extrakten..... | 205 |
| 8.3 | In vitro-Enzyminhibitionsassay | 207 |
| 8.3.1 | α-Amylase-Inhibitionsassay | 208 |
| 8.3.2 | α-Glucosidase-Inhibitionsassay..... | 209 |
| 8.3.3 | Dipeptidylpeptidase IV-Inhibitionsassay | 210 |
| 8.3.4 | GPα-Inhibitionsassay | 212 |
| 8.4 | Isolierung von FA-Derivate aus BSG | 213 |
| 8.4.1 | Vorbehandlung des BSGs..... | 214 |
| 8.4.2 | Gewinnung mittels alkalischen Aufschlusses | 214 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 8.4.3 | Präparative Aufreinigung..... | 214 |
| 8.4.3.1 | GPC | 215 |
| 8.4.3.2 | Semi-präparative HPLC..... | 215 |
| 8.4.4 | Strukturaufklärung und Charakterisierung mittels HPLC-ESI-MS/MS | 217 |
| 8.5 | Isolierung von Hordatinen aus BSG..... | 219 |
| 8.5.1 | Gewinnung mittels Fest-Flüssig-Extraktion (SLE)..... | 219 |
| 8.5.2 | Aufreinigung mittels Säulung..... | 219 |
| 8.5.3 | Präparative HPLC..... | 219 |
| 8.5.4 | Strukturaufklärung und Charakterisierung mittels HPLC-ESI-MS/MS | 220 |
| 8.5.5 | Quantifizierung der Hordatine mittels HPLC-DAD | 222 |
| 8.6 | Deskriptive Statistik und Berechnungen | 222 |
| 8.6.1 | Bestimmung des <i>minimum significant ratios</i> (MSR)..... | 222 |
| 8.6.2 | Untersuchung der Unterschiede auf Signifikanz | 222 |
| 8.6.2.1 | Untersuchung der Varianzhomogenität..... | 222 |
| 8.6.2.2 | Prüfung auf Normalverteilung..... | 222 |
| 8.6.2.3 | Einseitiger Zwei-Stichproben t-Test | 223 |
| 8.6.3 | Validierungen der HPLC-DAD-Quantifizierungen | 223 |
| 8.6.4 | Korrelation | 224 |
| 8.6.4.1 | Rangkorrelation nach Kendall..... | 224 |
| 8.6.5 | Ausreißertest nach Nalimov | 225 |
| A. | Anhang..... | A |
| B. | Tabellenverzeichnis | H |
| C. | Abbildungsverzeichnis | L |
| D. | Dankeschön..... | R |
| E. | Literaturverzeichnis..... | S |
| F. | Lebenslauf..... | NN |
| G. | Veröffentlichungen | PP |
| H. | Eidstattliche Erklärung..... | QQ |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| ACN | Acetonitril |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| AUC | Fläche unter der Kurve; zur Quantifizierung herangezogener Wert (engl. <i>area under curve</i>) |
| AX | Arabinoxylane |
| BSG | Biertreber (engl. <i>brewer's spent grain</i>) |
| BZ | Blutzucker(wert), analog dem Blutglucosespiegel |
| bw | Bandbreite (engl. <i>band width</i>) |
| c | Konzentration (engl. <i>concentration</i>) |
| CA | Kaffeensäure |
| CAD | stoßaktiviertes Dissoziationsgas (engl. <i>collisionally activated dissociation gas</i>) |
| CÄq | Catechin-Äquivalente |
| CE | Kollisionsenergie (engl. <i>collision energy</i>) |
| CEP | Zelleintrittspotential (engl. <i>cell entrance potential</i>) |
| CES | engl. <i>collisional Energy Spread</i> |
| cpm | engl. <i>counts per minute</i> |
| CUR | engl. <i>curtain gas</i> |
| CXP | Zellaustrittspotential (engl. <i>cell exit potential</i>) |
| DAD | Diodenarray-Detektor |
| DiFA | Dehydrodimer der Ferulasäure; Ferulasäure-Dimer |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DP | engl. <i>declusterin potential</i> |
| DPP IV | Dipeptidylpeptidase IV |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EP | engl. <i>entrance potential</i> |
| ESI | Elektrosprayionisierung (engl. <i>electrospray ionisation</i>) |
| EtOAc | Ethylacetat |
| FA | Ferulasäure |
| FC | Folin Ciocalteu |
| FA-Äq | Ferulasäure-Äquivalente |
| GÄq | Gallussäure-Äquivalente |
| GC | Gaschromatographie (engl. <i>gas chromatography</i>) |
| GH | Glykosid-Hydrolase |
| GIP | <i>glucose-dependant insulotropic polypeptide</i> |
| GLP1 | <i>glucagon-like peptide 1</i> |
| Gly | Glycin |
| GP α | Glykogenphosphorylase α |
| GPC | Größenausschlusschromatographie |
| HCA | Hydroxycimtsäure |

| | |
|------------------|--|
| HCAA | Hydroxyzimtsäureamid |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high pressure liquid chromatography</i>) |
| IC ₅₀ | halbmaximale inhibitorische Konzentration |
| IS | engl. <i>ion spray voltage</i> |
| LIT | Ionenfalle (engl. <i>linear ion trap</i>) |
| LOD | Nachweisgrenze (engl. <i>limit of detection</i>) |
| LOQ | Bestimmungsgrenze (engl. <i>limit of quantification</i>) |
| MeOH | Methanol |
| MGAM | Maltase-Glucoamylase |
| MRM | engl. <i>Multiple reaction monitoring</i> |
| MS | Massenspektrometrie (engl. <i>mass spectrometry</i>) |
| MS/MS | Tandem-Massenspektrometrie |
| MW | Mittelwert |
| <i>m/z</i> | Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (engl. <i>mass-to-charge ratio</i>) |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NK | Negativkontrolle |
| PBS | phosphatgepufferte Lösung |
| <i>p</i> CA | <i>p</i> -Coumarsäure |
| <i>p</i> CA-Äq | <i>p</i> -Coumarsäure-Äquivalente |
| PK | Positivkontrolle |
| PP | Polypropylen |
| Pro | Prolin |
| RP-HPLC | engl. <i>Reversed phase</i> -HPLC |
| R-SD | Reststandardabweichung |
| R _t | Retentionszeit |
| SD | Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>) |
| SI | Sucrase-Isomaltase |
| SLE | Fest-Flüssig-Extraktion (engl. <i>solid liquid extraction</i>) |
| SPE | Festphasenextraktion (engl. <i>solid phase extraction</i>) |
| Tab. | Tabelle |
| T1DM | <i>Diabetes mellitus</i> Typ 1 |
| T2DM | <i>Diabetes mellitus</i> Typ 2 |
| TriHODA | Trihydroxyoctadecensäure (engl. <i>trihydroxyoctadecanoic acid</i>) |
| TriHOME | Trihydroxyoctadecensäure (engl. <i>trihydroxyoctadecenoic acid</i>) |
| TFC | engl. <i>Total flavonoid content</i> |
| TLC | Dünnschichtchromatographie (engl. <i>Thin layer chromatography</i>) |
| TPC | engl. <i>Total phenolic content</i> |
| TriFA | Ferulasäure-Trimer |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UE | Untereinheit |
| V _k | Variationskoeffizient |

| | |
|------------------|---------------------------------|
| V-V _k | Verfahrensvariationskoeffizient |
| V-SD | Verfahrensstandardabweichung |

Kurzzusammenfassung

Die Regulation des Glucosestoffwechsels und damit einhergehend die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase sind essenzielle Prozesse des menschlichen Körpers zur Energiegewinnung. Ein dauerhaft erhöhter Blutglucosespiegel ist pathologisch und gilt als Symptom der Krankheit *Diabetes mellitus*. Seine steigende Inzidenz sowie Prävalenz weltweit [Magliano und Boyko, 2021], zeigen die Notwendigkeit der Suche nach Medikamenten auf, wobei Pflanzenextrakten eine tragende Rolle zukommen kann [Alam *et al.*, 2022]. Die Nutzung von Nebenprodukten greift zusätzlich den Nachhaltigkeitsaspekt auf, was Biertreber (BSG) als Ausgangsmaterial entsprechender Untersuchungen interessant macht. Mit über 39 Millionen Tonnen weltweit pro Jahr stellt er das Hauptnebenprodukt der Bierindustrie dar und wird bislang vordergründig als Futtermittel verwendet [Mussatto, 2014]. Aktuelle Studien zeigten seinen Nutzen zur Erhöhung des Nährwertes von Lebensmitteln auf [Sahin *et al.*, 2021; Pratap Singh *et al.*, 2020]. Zudem wurden bioaktive Inhaltsstoffe wie Flavonoide oder Hydroxyzimtsäuren (HCA) aus BSG extrahiert, wobei letztere Bestandteil der Arabinoxylane sind [Stefanello *et al.*, 2018]. Neben antioxidativen Wirkungen sind HCA als Inhibitoren einiger Enzyme des Glucosestoffwechsels beschrieben. Ferula- (FA) und Kaffeesäure (CA) erwiesen sich als potente α -Glucosidase-Inhibitoren *in vitro* [Adisakwattana *et al.*, 2009], FA zeigte zudem einen starken Einfluss auf Enzyme des Glykogenstoffwechsels [Narasimhan *et al.*, 2015a; Narasimhan *et al.*, 2015b]. Mittels verschiedener Methoden wie Fest-Flüssig-Extraktion (SLE) oder alkalischer Hydrolysen wurden verschiedene Extraktgruppen (HA, HE, A) aus drei BSG-Chargen (BSG 1–3) hergestellt, charakterisiert und *in vitro* auf ihren Einfluss gegenüber α -Glucosidase, α -Amylase, Dipeptidylpeptidase IV und Glykogenphosphorylase α (GP α) untersucht. Die Extrakte aus alkalischer Hydrolyse (HE) wiesen einen deutlich höheren Gesamtphenol (TPC)- und Gesamtflavonoidgehalt (TFC) auf als die A- (SLE) und HA-Extrakte (SLE aus Rückstand der alkalischen Hydrolyse). Potente Inhibition wurde v.a. durch die A-Extrakte gegenüber α -Glucosidase und GP α beobachtet. Eine Korrelation der Inhibition mit dem TPC und TFC konnte nicht festgestellt werden. HPLC-ESI-MS/MS- Experimente zeigten zudem die deutlichen Unterschiede der Extraktgruppen, wobei HCA-Derivate als Leitsubstanzen der HE- und HA-Extrakte und Hordatine als Hauptkomponenten der A-Extrakte nachgewiesen wurden. Die Hordatin- wie auch HCA-Gehalte wurden semiquantitativ bestimmt, wobei letztere signifikant geringer in HA- als HE-Extrakten war. Sowohl die FA-Dehydrodimere (DiFA) als auch Hordatine waren kommerziell nicht erhältlich, weshalb sie aus BSG isoliert wurden. In beiden Isolierungen wurden Fraktionen erhalten (37 F-Fraktionen aus DiFA-Isolierung, zehn H-Fraktionen aus Hordatin-Isolierung), welche charakterisiert und im α -Glucosidase- und GP α -Inhibitionsassay untersucht wurden. Zwei H-Fraktionen hemmten α -Glucosidase und deuteten auf Hordatin-Glykoside oder den Präkursor *p*-Coumaroylagmatin als möglichen Inhibitor hin. Zahlreiche F-Fraktionen hemmten GP α , wobei trimere Ferulasäurederivate als Inhibitoren postuliert wurden. Eindeutige Rückschlüsse auf die inhibierenden Komponenten der Extrakte waren aufgrund der geringen Ausbeuten und damit kleinen Stichprobenzahl sowie den semiquantitativen Bestimmungen schwierig. Zudem rückten Oxylipine als Inhaltsstoffe fast aller Extrakte sowie der F-Fraktionen in den Fokus. Ein GP α - und α -Glucosidase-hemmendes Potential von BSG-Extrakten bzw. isolierter Phytochemikalien konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden.

Abstract

The regulation of glucose metabolism and thus the maintenance of glucose homeostasis are essential processes of human metabolism necessary for gaining energy. A persistently increased blood glucose level is pathological and is considered the primary symptom of the disease *diabetes mellitus*. Its increasing incidence as well as prevalence worldwide [Magliano und Boyko, 2021; World Health Organization, 2016] points out the need of searching for medicines, with plant extracts playing a major role [Alam *et al.*, 2022]. The use of agricultural by-products further addresses the issue of sustainability, which makes brewer's spent grain (BSG) an interesting source. With over 39 million tons worldwide per year, it represents the main by-product of the beer industry and so far, has been predominantly used as animal feed [Mussatto, 2014]. Recent studies indicated its potential benefits in increasing the nutritional value of food [Sahin *et al.*, 2021; Pratap Singh *et al.*, 2020]. Moreover, bioactive constituents such as flavonoids or hydroxycinnamic acids (HCA) have been extracted from BSG, the latter being a component of arabinoxylans [Stefanello *et al.*, 2018]. In addition to antioxidant effects, HCAs have been described as inhibitors of several enzymes involved in glucose metabolism. Ferulic (FA) and caffeic acid were found to be potent α -glucosidase inhibitors *in vitro* [Adisakwattana *et al.*, 2009], FA also showed a strong effect on enzymes of glycogen metabolism [Narasimhan *et al.*, 2015a]. Using different methods such as solid-liquid extraction (SLE) or alkaline hydrolysis, various groups of extracts (HA, HE, A) from three batches of BSG were prepared, characterized, and investigated *in vitro* for their influence towards α -glucosidase, α -amylase, dipeptidyl peptidase IV and glycogen phosphorylase α (GP α). Extracts from alkaline hydrolysis (HE) had significantly higher total phenolics (TPC) and total flavonoid content (TFC) than A (SLE) and HA extracts (SLE from alkaline hydrolysis residue). Potent inhibition was mainly observed by the A extracts towards α -glucosidase and GP α . No correlation with the TPC and TFC was found. HPLC-ESI-MS/MS- experiments also demonstrated the significant differences between the extract groups, with HCA derivatives detected as the major compounds of the HE and HA extracts and hordatines as the main components of the A extracts. Hordatine as well as HCA contents were determined semiquantitatively, the second being significantly lower in HA than HE extracts. Both, dimeric ferulic acid (DiFA) derivatives and hordatines were not commercially available, hence they were isolated from BSG. Various fractions were obtained in both isolation processes (37 F-fractions from DiFA isolation, ten H-fractions from Hordatine isolation), which were characterized and analyzed in the α -glucosidase and GP α - inhibition assays. Two H-fractions inhibited α -glucosidase and indicated hordatine glycosides or the precursor *p*-coumaroylagmatine as a possible inhibitor. Numerous F-fractions inhibited GP α , with trimeric ferulic acid derivatives postulated as inhibitors. Clear conclusions about the inhibitory components of the extracts were difficult because of the low yields and thus small sample size as well as the semiquantitative determination. In addition, oxylipins became a focus of interest as constituents of almost all extracts as well as of the F-fractions. A GP α - and α -glucosidase-inhibiting potential of BSG extracts and isolated phytochemicals, respectively, could be demonstrated in the present work.

1 Einleitung

Glucose ist der wichtigste Energielieferant des Menschen. Seine Freisetzung bzw. Aufnahme aus der Nahrung, die Verteilung sowie dessen Umsetzung zur Energiegewinnung oder Speicherung in Form von Glykogen unterliegen einer ausgeprägten Regulation über bspw. Enzyme und Hormone. Diese sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase, zu welcher neben der exogen zugeführten auch die endogen aus Glykogen freigesetzte Glucose beiträgt. Anhand des Blutglucosespiegels (BZ) lassen sich die beiden pathologisch relevanten Stoffwechselsituationen hypoglykämisch ($BZ < 4 \text{ mmol/L}$) und hyperglykämisch ($BZ > 6,5\text{--}7 \text{ mmol/L}$) definieren, wobei letzterer der Hauptindikator für die weit verbreitete Stoffwechselerkrankung *Diabetes mellitus* (DM) ist [Rehner und Daniel, 2010]. Unter DM wird eine Vielzahl von Erkrankungen wie v.a. Typ I (T1DM) und Typ II DM (T2DM) zusammengefasst, welche als gemeinsamen Nenner die erhöhte BZ, ausgelöst durch Insulinresistenz oder Insulinmangel, aufweisen [Clauss und Clauss, 2018]. Mit über 90 % ist der T2DM der dominanteste Vertreter. Er entwickelt sich durch eine Insulinresistenz, wobei Übergewicht zu den wichtigsten Risikofaktoren zählt. In den letzten Jahren stiegen dessen Inzidenz sowie Prävalenz in Deutschland [RKI, 2017] und weltweit deutlich an. So sind 2021 bereits 537 Millionen Menschen global an DM erkrankt und 6,7 Millionen Todesfälle konnten mit DM assoziiert werden [Magliano und Boyko, 2021]. Die steigenden Zahlen erfordern Handlungsbedarf, welcher u.a. die Suche nach effizienten Therapieansätzen und Medikamenten umfasst. Zahlreiche Ansatzpunkte zur Senkung des BZ sind bereits viele Jahrzehnte bekannt und als „Antidiabetika“ auf dem Markt. So beruhen Medikamente mit den Wirkstoffen Miglitol oder Acarbose auf der Hemmung der digestiven Enzyme α -Amylase und α -Glucosidase, wodurch direkt im Darm die Resorption von Glucose verringert wird [Calder und Geddes, 1989]. Auch kann indirekt auf hormoneller Ebene eine blutzuckersenkende Wirkung durch Enzyminhibition erreicht werden, worunter insulinotrope Blutzuckersenkler wie Gliptine gehören. Sie zählen zur Gruppe der Dipeptidylpeptidase IV-Inhibitoren und bewirken eine Verlängerung der Halbwertszeit der beiden Inkretine *glucagon-like peptide 1* (GLP1) und *glucose-dependant insulotropic polypeptide* (GIP). Beide Peptidhormone fördern nach der Nahrungsaufnahme über Insulin die Glucoseaufnahme in die Zellen und senken dadurch den BZ [Lambeir *et al.*, 2008]. Ein weiterer vielversprechender Angriffspunkt ist die Glykogenphosphorylase, welche v.a. in Hepatozyten aber auch in Muskel- und Gehirnzellen das Schlüsselenzym für den Glykogenabbau darstellt. Seine Inhibition bewirkt demnach eine verminderte Glucosefreisetzung. Doch bislang ist aufgrund der Differenzierungsschwierigkeit zwischen den drei Isoformen noch kein entsprechendes Medikament verfügbar [Nagy *et al.*, 2013; Baker *et al.*, 2005]. Die Grundlage bei der Suche nach neuen „Antidiabetika“ können Pflanzenextrakte darstellen, deren biologische Aktivität untersucht wird. Wird eine biologische Aktivität bspw. in Form potenter Enzyminhibition beobachtet, ist das Ziel, mittels aktivitätsgeleiteter Fraktionierung die aktive Komponente zu identifizieren. So konnten Quercetin sowie verschiedene Anthocyane aus Subfraktionen von roten Fruchtsäften gewonnen und als potente *in vitro*-Inhibitoren der α -Amylase und α -Glucosidase identifiziert werden [Ostberg-Potthoff *et al.*, 2019]. Kantsadi *et al.* generierten polyphenolische Extrakte aus Weinbereitungsnebenprodukten und beobachteten eine potente Inhibition der GP *in vitro*, wobei sie Quercetin als aktivsten Inhaltsstoff klassifizierten [Kantsadi *et al.*, 2015]. Auch

das Agrar-Nebenprodukt Biertreber (engl. *brewer's spent grain*, BSG) wurde hinsichtlich eines Einflusses auf den Glucosestoffwechsel untersucht, wobei hier die in den hergestellten Extrakten enthaltenen Proteine im Vordergrund standen und Effekte auf die DPP IV sowie die α -Glucosidase untersucht wurden. Einige Proteinhydrolysate zeigten hier ebenfalls eine potente Inhibition [Connolly *et al.*, 2014]. Die Studien von Connolly *et al.* 2014 und Kantsadi *et al.* 2015 greifen den Aspekt der alternativen und nachhaltigen Nutzung landwirtschaftlicher Nebenprodukte auf. Diese fallen oftmals in sehr großen Mengen an und werden derzeit v.a. als Treibstoff, Dünger oder Tierfutter verwendet [Ben-Othman *et al.*, 2020]. Zudem enthalten die Nebenprodukte zumeist signifikante Mengen an bioaktiven Komponenten wie u.a. Polyphenole, Carotinoide, Saponine, Alkaloide und Peptide [Doria, 2017; Hernanz *et al.*, 2001; Moure *et al.*, 2001; Llorach *et al.*, 2002] oder können als Ausgangsmaterial für Fermentationsprozesse zur Herstellung wertgebender Substanzen genutzt werden [Sabater *et al.*, 2020; Akermann *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2005; Cooray und Chen, 2018]. Mit weltweit bis zu 39 Millionen Tonnen jährlich stellt BSG das Hauptnebenprodukt der Bierherstellung dar und eignet sich aufgrund des hohen Protein- und Ballaststoffgehalts als Futtermittel [Xiros *et al.*, 2008; Mussatto, 2014]. Diese Gehalte bieten jedoch weiterhin Potential für die menschliche Ernährung bspw. als Zusatz in Nahrungsmitteln zur Erhöhung des Nährwerts. So wurde BSG in verschiedenen Studien bereits in Pasta [Sahin *et al.*, 2021], proteinreichen Snacks [Pratap Singh *et al.*, 2020], Frankfurter Würstchen [Nagy *et al.*, 2017] oder gebackenen Gerstensnacks [Kirjoranta *et al.*, 2016] eingesetzt, um in Testversuchen den Einfluss des BSG-Zusatzes auf den Nährwert und physikalische/haptische Eigenschaften zu untersuchen. Neben Proteinen und Ballaststoffen sind in BSG weitere bekannte bioaktive Inhaltsstoffe enthalten. Als „Quervernetzer“ (engl. *crosslinks*) innerhalb der Hemicellulosen Arabinoxylane wurden hohe Gehalte an Hydroxyzimtsäuren (HCA) sowie geringere Mengen an Flavonoide wie Catechine oder Quercetin in BSG nachgewiesen. Neben der klassischen Fest-Flüssig-Extraktion (engl. *solid-liquid extraction*, SLE) mit organischen Lösungsmitteln haben sich für BSG der alkalische Aufschluss oder enzymatische Vorbehandlungen als geeignet zur Extraktion von Polyphenolen erwiesen. Die beiden letzteren führen zu einer besseren Freisetzung der HCAs aus der Hemicellulose-Matrix [Verni *et al.*, 2020; Hernanz *et al.*, 2001; Faulds *et al.*, 2008]. Die Kombination der Extraktionsprozesse ermöglicht die Unterscheidung zwischen freien und gebundenen Polyphenolen [Birsan *et al.*, 2019]. Zur Untersuchung der Extrakte auf Enzyme des Glucosestoffwechsels ist eine zusätzliche Aufreinigung essentiell, da besonders durch alkalische Hydrolysen Zucker aus lignocellulosischem Material freigesetzt werden [Loow *et al.*, 2016], welche durch Wechselwirkung mit den Enzymen die Ergebnisse verfälschen könnten. Zudem ermöglicht die Festphasenextraktion (engl. *solid phase extraction*, SPE) die Aufkonzentrierung phenolischer Komponenten [Michalkiewicz *et al.*, 2008]. HCAs wie Kaffee- (CA) oder Ferulasäure (FA) erwiesen sich als potente α -Glucosidase-Inhibitoren *in vitro* [Adisakwattana *et al.*, 2009]. FA zeigte in Typ 2-Diabetes-Ratten einen starken Einfluss auf Enzyme des Glykogenmetabolismus [Narasimhan *et al.*, 2015b; Narasimhan *et al.*, 2015a]. Auch Quercetin ist als starker Inhibitor der GP α [Jakobs *et al.*, 2006], der α -Amylase und der α -Glucosidase [Tadera *et al.*, 2006] beschrieben.

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Birtreber (brewer's spent grain, BSG)

BSG stellt 85 % der Nebenprodukte beim Bierherstellungsprozess dar und fällt weltweit jährlich in Mengen bis zu 39 Millionen Tonnen an. Alleine 3,4 Tonnen davon stammen aus der EU [Steiner *et al.*, 2015; Mussatto, 2014]. Er besteht hauptsächlich aus den Schalen des Getreidemalzes, Teilen des Perikarps sowie der Samenschale und verbleibt als fester Rückstand nach dem Läuterprozess. Das verwendete Getreidemalz besteht meistens aus Gerste (*Hordeum vulgare*), was im deutschen Reinheitsgebot bzw. der Bierverordnung und der Verordnung zur Durchführung des Biergesetzes für untergärige Biere vorgeschrieben ist [§ 17 Absatz 1 BierStDB]. Für obergärige Biere darf auch Malz aus anderen Rohstoffen wie Mais, Reis, Weizen, Hafer, Roggen oder Hirse verwendet werden [Mussatto, 2014]. Diese spielen jedoch eine untergeordnete Rolle, sodass 90 % aller weltweit gebrauten Biere Gerstenmalz als Ausgangsstoff verwenden [Bamforth, 2009].

2.1.1 Prozess der Bierherstellung

Grundsätzlich sind für die Zusammensetzung von BSG sowohl der Mälzungsprozess als auch der eigentliche Brauprozess entscheidend. Die Gerste wird zunächst im Malzprozess zu Malz verarbeitet und geht anschließend in den Brauprozess über, welcher sich gliedern lässt in die Würzebereitung und Gärung (s. Abb. 1).

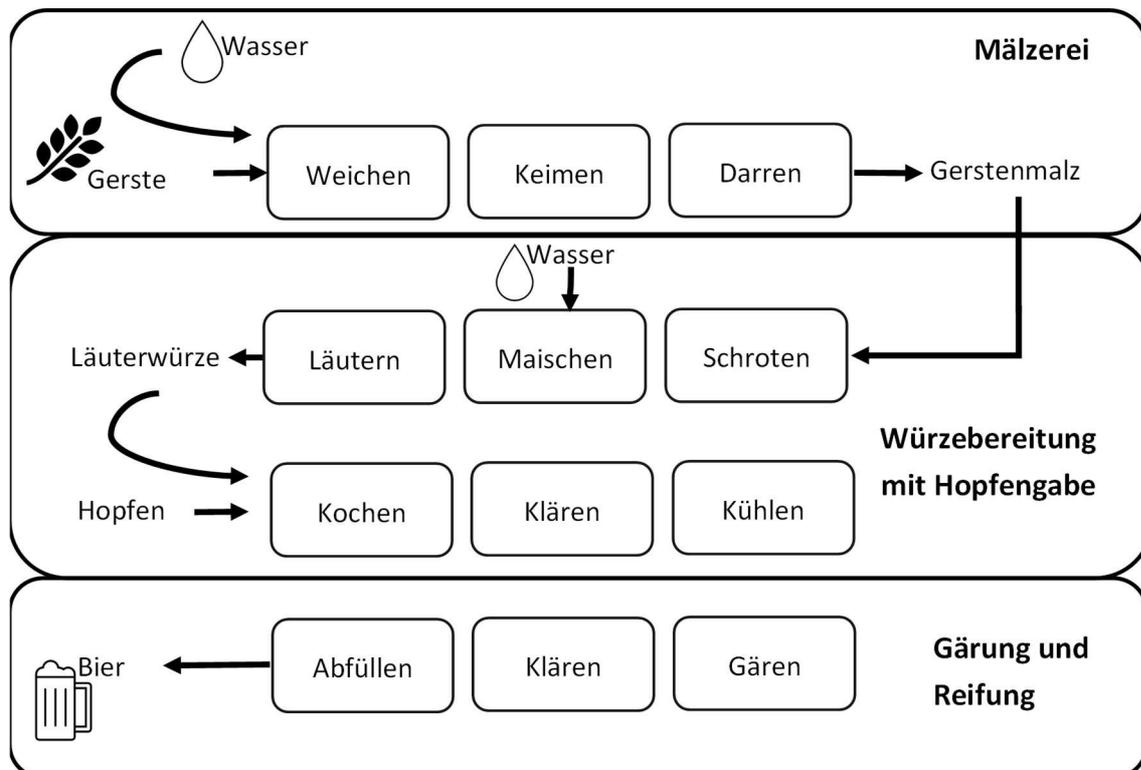


Abb. 1: Herstellungsprozess von Bier gegliedert in Mälzerei, Würzebereitung und Gärung. (Modifiziert nach Belitz *et al.* 2007).

Zur Herstellung des Malzes wird das Getreide zunächst einer Prozessabfolge, bestehend aus Weichen, Keimen und Darren, unterzogen. Beim Weichen werden durch die Wasseraufnahme

und Belüftung zelleigene Enzyme aktiviert und Stoffwechselforgänge initiiert, welche für die sich anschließende Keimung relevant sind. Während des Keimungsprozesses (5–7 Tage) kommt es zur Ausbildung von Wurzeln und Blättern sowie zur Neubildung verschiedener Enzyme wie Proteasen, Phosphatasen oder α - und β -Amylase. Aufgrund des Energiebedarfs beim Wachstumsprozess kommt es zum vermehrten Abbau polymerer Kohlenhydrate wie Stärke (Amylolyse) sowie Proteine (Proteolyse). Der Gehalt kurzkettiger Kohlenhydrate steigt an. Temperatur, Rohmaterial sowie die Intensität der Keimung und somit das Ausmaß der Enzymaktivität beeinflussen den Charakter des entstehenden sog. Grünmalzes. Dieses wird im Anschluss gedarrt mit dem Ziel der Lagerfähigkeit, Entstehung der charakteristischen Farbe und des Aromas. In dem mehrstündigen Prozess wird der Wassergehalt von ca. 40–50 % auf 3–4 % reduziert und demnach die Wasseraktivität (a_w -Wert) deutlich abgesenkt. Im unteren Temperaturbereich (40–70 °C) laufen enzymatische Reaktionen ab, während im höheren Temperaturbereich (ab 95 °C) chemische Reaktionen geprägt von der Maillard-Reaktion – v.a. bei dunklem Malz – eine Rolle spielen. Die Temperaturführung beeinflusst den Bräunungsgrad bzw. die Farbwerte des resultierenden Malzes.

Der sich anschließende Brauprozess umfasst die Prozessschritte Schrotten, Maischen, Läutern, Würzekochen, Gärung, Reifung, Lagerung und Abfüllung, wobei die Schritte nach dem Läutern für die Zusammensetzung des BSG nicht relevant sind. Zunächst wird das Malz erneut mit Wasser versetzt und bei für die Enzymsysteme des Malzes optimalen Bedingungen dem Maischeprozess unterworfen. Dabei gehen zahlreiche Inhaltsstoffe des Malzes durch enzymatische Degradation oder Solubilisierung in die sog. Würze über. Wie auch beim Keimungsprozess spielen Proteolyse, Amylolyse und Zytolyse eine tragende Rolle. Je nach Temperatur und Dauer kann die Zusammensetzung stark beeinflusst werden. Bspw. verbleiben durch schnelles Erhitzen auf Temperaturen über 72 °C Maischen mit hohem Dextringehalt, welche geeignet sind für Biere mit niedrigem Alkoholgehalt. Beim sog. Läuterprozess wird die Würze (lösliche Substanzen) vom BSG (unlösliche Bestandteile) getrennt. Die Würze wird anschließend zusammen mit Hopfen zur Inaktivierung der Malzenzyme, Sterilisation, Bildung reduzierende Stoffe, Lösung von Hopfeninhaltsstoffen sowie Bildung und Ausscheidung von Eiweiß- und Gerbstoffen gekocht. Anschließend wird die Würze mittels Hefe einer alkoholischen Gärung unterworfen und das erhaltene Bier zur Haltbarmachung zumeist filtriert und abgefüllt [Fischer und Glomb, 2015].

2.1.2 Nutzungsmöglichkeiten und Anwendungen

Sein hoher Protein- und Ballaststoffgehalt machen BSG zu einem geeigneten und günstigen Futtermittel für Vieh, doch sind seine Anwendungsmöglichkeiten deutlich vielseitiger und wurden in den letzten Jahren verstärkt erforscht. Die hohen Protein- und Ballaststoffgehalte machen BSG zu einem interessanten Rohstoff für die menschliche Ernährung. So kann BSG eingesetzt werden, um den Nährwert verschiedener Produkte zu erhöhen. Kürzlich publizierte Studien reichen von Einsatz in Pasta [Sahin *et al.*, 2021; Nocente *et al.*, 2019] oder proteinreicher Snacks [Pratap Singh *et al.*, 2020] über Zusatz in gebackenen Gerste-Snacks [Amoriello *et al.*, 2020; Kirjoranta *et al.*, 2016; Ktenioudaki *et al.*, 2012; Merten *et al.*, 2022] bis hin zur Verarbeitung in Frankfurter Würstchen, um den Fettgehalt des Endproduktes zu reduzieren [Özvural *et al.*, 2009; Nagy *et al.*, 2017], wobei die Produkte in den dargelegten Studien nicht vermarktet wurden und lediglich ein potenzieller Einsatz von BSG untersucht

wurde. So zeigten Nocente *et al.* für Nudeln, dass der Zusatz von BSG zu Weizenmehl den Ballaststoffgehalt um bis zu 135 %, den β -Glucangehalt um bis zu 85 % und die antioxidative Kapazität um bis zu 19 % erhöhen konnte im Vergleich zu reinen Weizennudeln [Nocente *et al.*, 2019]. Die Forscher um Kirjoranta beobachteten, dass eine Zugabe von BSG zu Weizenmehl im Verhältnis 1:4 den glykämischen Index von Keksen reduzieren konnte [Kirjoranta *et al.*, 2016]. Merten *et al.* untersuchten u.a. den Gesamtphenolgehalt (engl. *total phenolic content*, TPC), Gesamtflavonoidgehalt (engl. *total flavonoid content*, TFC) und Gesamtballaststoffgehalt sowie die antioxidative Kapazität im Brot nach Zusatz unterschiedlicher Menge an BSG. Sie zeigten im Brot eine Erhöhungen der Substanzen, die nach einer Verdauung *in vitro* erhalten blieben [Merten *et al.*, 2022]. Besonders β -Glucane aus Gerste sind in diesem Zusammenhang hinsichtlich ihrer positiven Effekte auf die menschliche Gesundheit wie Beschleunigung der Transitzeit, erhöhtes Stuhlgewicht und Fettausscheidung, verringertes Auftreten von Gallensteinen oder Senkung des postprandialen Serumglucose-Spiegels von Bedeutung [Brennan und Cleary, 2005; Cho, 2001].

Neben seinem Einsatz als Futtermittel oder für menschliche Ernährung kann BSG zur Treibstoffgewinnung eingesetzt werden. So gibt es Studien über den Einsatz von BSG zur Bioethanol- oder Biogasgewinnung durch Fermentation [Liguori *et al.*, 2015; Szaja *et al.*, 2020; Bedó *et al.*, 2021]. Weiterhin eignet sich BSG als Wachstumsmedium bzw. Substrat für Fermentationsprozesse. Studien zur Nutzung durch verschiedene Organismen sind bekannt. Unter anderem wurde BSG erfolgreich als Zuckerersatz bei der Milchsäuregärung bzw. zur Lactatgewinnung [Mussatto *et al.*, 2007b; Shindo und Tachibana, 2004; Akermann *et al.*, 2020; Akermann *et al.*, 2020] eingesetzt. Auch zur Xylitol-Produktion [Carvalho *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2005; Akermann *et al.*, 2020] oder Zitronensäurefreisetzung mittels *Rhizopus oligosporus* [Cooray und Chen, 2018] wurde BSG verwendet.

Weitere Anwendungsmöglichkeiten liegen in der Extraktion einzelner Wertstoffe oder Substanzklassen. Cellulose und Lignin sind wichtige Rohmaterialien in der Polymer-Technologie und können mit verschiedenen Extraktionsmethoden aus BSG gewonnen werden. Mishra *et al.* isolierten Cellulose und überführten diese mittels eines mehrstufigen Prozesses in Nanofasern [Mishra *et al.*, 2016], die oftmals als Füllstoffe verwendet werden [Chen *et al.*, 2019]. Ebenso wurde Lignin mittels alkalischen Aufschlusses aus BSG, gefolgt von Ansäuerung der erhaltenen schwarzen Aufschlussflüssigkeit (engl. *black liquor*), gewonnen. Es ist ein wichtiger Ausgangsstoff für die Herstellung vieler Produkte wie u.a. Vanillin, Chelatoren oder Polymere [Mussatto *et al.*, 2007c]. Die enthaltenen Hemicellulosen, v.a. Arabinoxylane, lassen sich ebenfalls mittels enzymatischer Extraktion aus BSG gewinnen [Coelho *et al.*, 2016; Mandalari *et al.*, 2005] und stellen Rohstoffe für biologisch abbaubare oder essbare Materialien im Bereich der Polymertechnologie dar [Péroval *et al.*, 2002; Höije *et al.*, 2005]. Neben diesen Inhaltsstoffen des BSG sind Minorkomponenten wie Phenole enthalten, mit HCAs als Hauptkomponenten. Sie wurden mittels verschiedener Prozesse wie SLE mit oder ohne alkalischer bzw. enzymatischer Vorbehandlung sowie ultraschall- oder mikrowellenunterstützt und verschiedenen Lösungsmitteln oder überkritischem CO₂ extrahiert [Faulds *et al.*, 2002; Hernanz *et al.*, 2001; Alonso-Riaño *et al.*, 2020; Andres *et al.*, 2020; Bartolom und Gmez-Cordovs, 1999; Irakli *et al.*, 2012; Spinelli *et al.*, 2016]. Auf die einzelnen Inhaltsstoffe und die zugehörige Extraktionsmethodik wird im Folgenden eingegangen.

2.1.3 Inhaltsstoffe

BSG ist der unlösliche Rückstand nach dem Läuterprozess der Bierherstellung und besteht hauptsächlich aus den Schalen des Getreidemalzes, was dessen hohen Gehalt an Cellulose, Hemicellulose und Lignin erklärt. Weiterhin finden sich recht hohe Gehalte an Proteinen und Fetten sowie, je nach Prozessführung, geringe Mengen an verbliebener Stärke (Tab. 1). Zudem ist BSG relativ reich an Phenolen, insbesondere HCAs, wobei dies genauer in Kapitel 2.1.3.3 betrachtet wird. Die teilweise deutlich variierenden Gehalte sind abhängig von unterschiedlichen Faktoren wie der Brauprozessführung (Maische-/Malzprozess), dem verwendeten Ausgangsmaterial (Getreideart, Erntezeit), ggf. eingebrachten Zusatzstoffen im Brauprozess (exogene Enzyme, ungemälztes Getreide/Rohfrucht, Zucker/-sirup), wobei letztere nicht für nach dt. Reinheitsgebot gebraute Biere von Bedeutung sind [Moreira *et al.*, 2013b; Basarová, 2020; Steiner *et al.*, 2015; Steiner *et al.*, 2015]. Zusätzlich spielt bei der Analyse der Zusammensetzung die Lagerzeit des BSG eine Rolle, da dieser sehr anfällig für mikrobiologische Prozesse ist [Bianco *et al.*, 2020]. Daher sollte er vor der Analyse mittels Gefriertrocknung möglichst schonend in einen lagerfähigen Zustand überführt werden.

Tab. 1: Zusammensetzung verschiedener BSG.

| Inhaltsstoff in [g/100 g Trockengewicht BSG] | [Jay <i>et al.</i> , 2008] | [Xiros <i>et al.</i> , 2008] | [Menes <i>et al.</i> , 2013] | [Robertson <i>et al.</i> , 2010] | [Coronado <i>et al.</i> , 2020] | [Naibaho und Korzeniowski, 2021] ³ | [Parchami <i>et al.</i> , 2021] |
|--|----------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---|---------------------------------|
| Hemicellulose (Arabinoxylan) | n.b. ¹ | 40,2 | 19,3 | n.b. | 37,2 | n.b. | 25,3 |
| Cellulose | 31–33 | 12 | 21,7 | 19,7 | 26,8 | n.b. | 17,5 |
| Stärke | 10–12 | 2,7 | n.b. | 1,6–13 ² | n.b. | n.b. | 20,9 |
| Protein | 15–17 | 14,2 | 24,7 | 14,9–22,3 ² | n.b. | 22,2–30,2 | 22,7 |
| Lignin | 20–22 | 11,5 | 19,4 | 12,6–17,2 | 17,1 | n.b. | 16,7 ⁴ |
| Lipide | 6–8 | 13 | n.b. | n.b. | n.b. | 9,5–13,1 | n.b. |
| Asche | n.b. | 3,3 | 4,2 | n.b. | 4,1 | 3,3–4,3 | n.b. |

¹ n.b.= nicht bestimmt

² Schwankungen zwischen BSG von Lager und Ale Bier

³ BSG acht verschiedener Brauereien

⁴ Gesamtfaser abzüglich Cellulose und Hemicellulose

2.1.3.1 Ballaststoffe

Ballaststoffe sind definiert als die Bestandteile pflanzlicher Nahrungsmittel, die von den Enzymen des menschlichen Körpers nicht verdaut werden können. Darunter fallen zahlreiche Polysaccharide sowie Lignin. Es wird weiterhin unterschieden zwischen löslichen Ballaststoffen, welche im Kolon fermentiert werden und wasserlöslich sind, sowie unlöslichen (bspw. in Weizenkleie), welche auch durch Mikroorganismen im Körper nahezu unverdaut bleiben und in Wasser nicht löslich sind. Der positive Effekt auf die menschliche Gesundheit durch Ballaststoffe wurde durch Studien belegt. Anderson *et al.* fasste verschiedene Wirkungen zusammen, welche u.a. die Risikoreduktion für koronare Herzerkrankungen, Schlaganfälle, Bluthochdruck, Diabetes (bspw. durch Kontrolle der postprandialen BZ),

Fettleibigkeit sowie verschiedene gastrointestinale Erkrankungen umfassen [Anderson *et al.*, 2009]. Mit der Verordnung (EG) Nr. 1924/2006, der sogenannten Health-Claims-VO, sind seit 2006 Lebensmittel als Ballaststoffquelle oder Lebensmittel mit hohem Ballaststoffgehalt und damit gesundheitsbezogenen Angaben kennzeichenbar. Explizit für verschiedene Getreideballaststoffe sind in der Artikel 13-Liste gesundheitsbezogene Angaben zur Erhöhung des Stuhlvolumens oder Unterstützung der normalen Darmfunktion bzw. Beschleunigung der Darmpassage enthalten [VO (EG) NR. 1924/2006; VO (EU) Nr. 432/2012]. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfiehlt eine hohe Ballaststoffzufuhr von etwa 30 g/Tag bzw. 14,6 g/1000 kcal, was sich insbesondere durch den Verzehr von Obst und Gemüse bzw. Vollkornprodukten erreichen lässt [DGE Bonn, 2019].

BSG enthält eine Vielzahl an Ballaststoffen, zu welchen Polysaccharide wie Arabinoxylane, β -Glucane und Cellulose sowie Lignin als polyphenolisches Makromolekül zählen [Kanauchi und Agata, 1997; Preedy; Watson; Patel, 2011]. Mit bis zu 70 % Polysacchariden zählt BSG (vgl. Tab. 1) als ballaststoffreich. Aufgrund des Brauprozesses, in welchem die löslichen Bestandteile in die Würze übergehen, verbleiben im BSG v.a. die unlöslichen, nicht mit Wasser extrahierbaren Substanzen, für deren Extraktion jedoch viele Methodiken beschrieben sind [Lynch *et al.*, 2021], wobei die einzelnen Substanzklassen im Folgenden vorgestellt werden sollen und die im BSG verbliebenen größtenteils den unlöslichen Ballaststoffen zugeordnet werden können.

Die Hemicellulosen **Arabinoxylane** (s. Abb. 2; AX) stellen in BSG neben Cellulose die Hauptpolysaccharide dar und bestehen strukturell aus β -D-(1 \rightarrow 4)-verknüpften -Xylopyranosylen mit α -L-Arabinofuranose-Seitenketten. Zusätzlich sind vereinzelte Arabinofuranosen mit monomeren oder dimeren FA-Einheiten als sog. Quervernetzer verestert. BSG enthält sowohl lösliche als auch unlösliche AX, da bspw. Proteinbarrieren in der Pflanzenmatrix die Extraktion der löslichen AX während des Brauprozesses verhindern kann [Reis *et al.*, 2015].

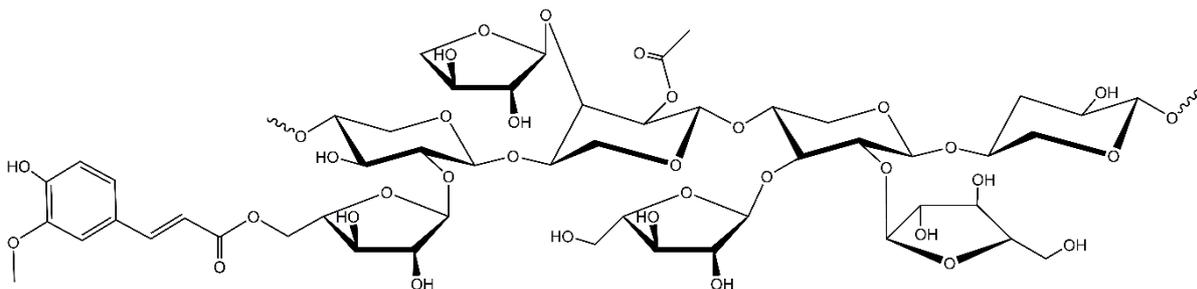


Abb. 2: Struktur der AX; β -D-(1 \rightarrow 4)-verknüpfte -Xylopyranosyle mit α 1 \rightarrow 3 verknüpften Arabinofuranosen und veresteter FA an C(4) der Arabinofuranose. (Modifiziert nach Reis *et al.*, 2015 und Lynch *et al.*, 2016). AX: Arabinoxylan, FA: Ferulasäure

Effekte durch AX aus Getreide hinsichtlich einer Modulation des glykämischen Index sind in aktuellen Studien beschrieben [Malunga *et al.*, 2017; Truchado *et al.*, 2017; EFSA, 2011b]. Ein ähnlicher Einfluss durch mit BSG angereicherte, getreidebasierte Snacks wurde von Reis *et al.* beobachtet. Durch Zusatz von BSG erhöhte sich neben dem Polyphenolgehalt (v.a. phenolische Säuren) der AX-Gehalt der Lebensmittel, was zu einem Anstieg der antioxidativen Kapazität und gleichzeitig zu einer Abnahme des glykämischen Index führte [Reis und Abu-

Ghannam, 2014]. Weiterhin wurde in einer *in vitro*-Studie von Lynch *et al.* in Stuhlfermentationsexperimenten der Einfluss von BSG-AX auf das Mikrobiom untersucht und ein präbiotisches Potential bestätigt [Lynch *et al.*, 2021]. AX aus Getreide bzw. auch BSG zeigten folglich potente biologische Wirkungen, was ihre Extraktion aus der Pflanzenmatrix für weitere Untersuchungen notwendig macht. AX sind über Wasserstoffbrücken an Cellulose gebunden und in einer komplexen Matrix aus Lignin, Cellulose und Proteinen eingeschlossen, weshalb sie mittels aufwändiger Extraktionsverfahren gewonnen werden müssen. Hierbei wurden Verfahren angewandt, die von physikalischen (z.B. ultraschallunterstützt [Reis *et al.*, 2015]), enzymatischen [Treimo *et al.*, 2009] zu chemischen Methoden mit Alkaliextraktion reichen [Martínez-Encinas *et al.*, 2021; Coelho *et al.*, 2016; Mandalari *et al.*, 2005], wobei auch Kombinationen der Methoden Anwendung finden. Coelho *et al.* erzielten eine Ausbeute AX-reicher Fraktionen von 2 % nach Extraktion mit Wasser und anschließender Dialyse, welche durch Kalilauge auf 10–13 % gesteigert wurde. Die höchsten Gehalte an AX sowie Zuckern (v.a. Arabinose, Xylose und Glucose) wurden dabei mit vier molarer Kalilauge gewonnen. Die so erhaltenen Fraktionen enthielten zwischen 66–76 % Zucker und 85–94 mol % AX, wobei das Arabinose/Xylose-Verhältnis bei ca. 0,85 lag. Weiterhin untersuchten Coelho *et al.* die Struktur der AX und machten die 1→4-Xylose-Verbrückung mit 45–71% als Hauptverbindung aus. Arabinose war im Gegensatz dazu v.a. terminal verbunden was so auch von Reis *et al.* publiziert wurde [Reis *et al.*, 2015; Coelho *et al.*, 2016]. Die Größe der extrahierten AX, d.h. das Ausmaß der Spaltungen kovalenter Bindungen innerhalb der Makromoleküle, hängt stark von der Konzentration der Lauge im Extraktionsprozess ab. AX-Anteile mit eher geringer Molmasse (1000–7000 Da) finden sich demnach v.a. bei Extraktion mit starken Basen (ca. 4 M). Verschiedene Dehydrodimere der Ferulasäure (DiFA) sowie das Monomer (s. 2.1.3.3.1) werden durch den Aufschluss ebenso freigesetzt, wobei etwa 15 % verestert an den AX verbleiben. Neben FA-Veresterungen finden sich Glucuronidierungen [Reis *et al.*, 2015] und Acetylierungen der Xyloseeinheiten, wobei ca. eine Acetatgruppe pro 12 Xyloseeinheiten von Mandalari *et al.* beschrieben wurde, was etwa fünfmal so häufig war wie die Veresterung mit FA [Mandalari *et al.*, 2005].

Als zweite Gruppe der Hemicellulosen sind **β-Glucane** ((1–3,1–4)-β-D-Glucan)) in BSG enthalten. Wie auch die AX können sie sowohl den löslichen als auch den unlöslichen Ballaststoffen angehören, was u.a. auch vom Molekulargewicht abhängt [Zielke *et al.*, 2017]. Sie spielen mengenmäßig (ca. 1 % w/w) eine untergeordnete Rolle [Bravi *et al.*, 2021]. Strukturell handelt es sich um lineare Ketten 1→3 und 1→4 verknüpfter β-D-Glucopyranosyleinheiten mit einem Molekulargewicht von 48–3000 kDa, wobei die 1→4 Verknüpfung mit etwa 75–85 % dominiert [Gómez *et al.*, 1997]. Ihre positiven Effekte hinsichtlich der Risikoreduktion für koronare Herzerkrankungen beruhen auf der Reduktion der Gallensäurerückresorption und einer dadurch erhöhten Gallensäuresynthese aus Cholesterin. Gleichzeitig wird die Ausscheidung neutraler Sterole erhöht, was die Cholesterinkonzentration im Blut senkt. Ein erhöhter LDL-Cholesterinspiegel ist assoziiert mit der Entwicklung von Arteriosklerose, welche eine der Hauptursachen koronarer Herzerkrankungen darstellt. [Steiner *et al.*, 2015; Lynch *et al.*, 2016]. Der cholesterinsenkende Effekt ist ab einer Dosis von 3 g/Tag für β-Glucan aus Gersten beschrieben.

Weiterhin reduziert die Aufnahme von ca. 4 g β -Glucan/30 g verfügbarer Kohlenhydrate die postprandiale glykämische Antwort, ohne gleichzeitig den Insulinspiegel überproportional zu erhöhen. Dies stellt eine Möglichkeit dar, postprandiale Hyperglykämie zu behandeln [EFSA, 2011a]. Ihre Extraktion beruht bspw. auf einer Inkubation mit α -Amylase, zum Abbau von Stärke und anschließender Dialyse [Zielke *et al.*, 2017] oder mikrowellenunterstützter Extraktion bei 140 °C [Coelho *et al.*, 2014].

Da BSG v.a. aus den äußeren Schalen des Gerstenkorns besteht, findet sich als weiteres Hauptpolysaccharid **Cellulose** (Homopolymer, (1,4)- β -verknüpfte Glucose Einheiten), welches die Grundlage der pflanzlichen Zellwände darstellt und zur Gruppe der unlöslichen Ballaststoffe gehört [Williams *et al.*, 2019]. Die Wirkung von Cellulose im menschlichen Darmtrakt wurde schon vor vielen Jahren untersucht. So erhöhte Cellulose in unterschiedlichen Studien das Stuhl-Gewicht, verringerte die Darm-Transit-Zeit und den pH-Wert des Stuhls [Eastwood *et al.*, 1973; Slavin und Marlett, 1980; Wrick *et al.*, 1983]. Auch modifizierte Cellulose, wie nanofibrillierte Cellulose oder Carboxymethylcellulose, ein verwendetes Verdickungs- und Überzugsmittel, kann den menschlichen Darmtrakt beeinflussen. Liu *et al.* beobachteten eine verzögerte Glucosediffusion und verringerte Amylolyse durch nanofibrillierte Cellulose, welche sie auf die Viskosität der Cellulose zurückführten [Liu *et al.*, 2018]. Carboxymethylcellulose zeigte abführende Wirkung [Schultz J., 1949] und führte zudem zu einer Reduktion der Darmflora-Diversität [Chassaing *et al.*, 2022]. Die Extraktion von Cellulose aufgrund deren möglichen biologischen Wirkungen sowie als Ausgangsmaterial zur Synthese modifizierter Produkte kann mittels alkalischem Aufschluss und sich anschließendem Bleichen [dos Santos *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2016] aus BSG erfolgen.

Mit circa 20 % (s. Tab. 1) stellt **Lignin** einen weiteren Hauptinhaltsstoff des BSGs dar. Er zählt zu den nicht-polysaccharidischen unlöslichen Ballaststoffen und ist ein Teil der pflanzlichen Zellwand. Dort stellt es die Verbindung zwischen Cellulose und Hemicellulose dar, womit es die Stabilität sowie Integrität der Zellwand unterstützt [Mussatto, 2010]. Lignin lässt sich strukturell als polyphenolisches Makromolekül aus drei Monomeren (Monolignole), *p*-Coumaryl-, Coniferyl-, und Sinapylalkohol (Abb. 3) beschreiben. Durch radikalinduzierte Kondensationsreaktionen entsteht ein komplexes Netzwerk zum Polymer, während die Zusammensetzung je nach Pflanzenart variiert. Die häufigste Verknüpfung ist der β -Arylether (β -O-4)- gefolgt von Phenylcoumaran (β -5)-, Biphenyl (5-5')-, Diarylpropan (β -1)-, α -Arylether (α -O-4)-, Diarylether (4-O-5)-, und Pinoresinol (β - β)-Verknüpfungen. Zusätzlich liegen in Lignin aus Getreide FA-Quervernetzungen zu Kohlenhydraten vor. Durch den Einbau der Monolignole in die Polymerstruktur ergeben sich drei Einheiten, die Guaiacyl (G)-, die Syringyl (S)- und die *p*-Hydroxyphenyl (H)-Einheit. Zweikeimblättrige Bedecktsamer (lat. *Angiosperme Dicotyledonen*), zu denen auch Gerste gehört, beinhalten v.a. die G- gefolgt von der S-Einheit (Abb. 3) [Niemi *et al.*, 2013; Vanholme *et al.*, 2010]. Dies wurde für BSG in einer aktuellen Studie bestätigt, wobei ein S/G-Verhältnis von 0,5–0,7 ermittelt wurde [Ohra-aho *et al.*, 2016].

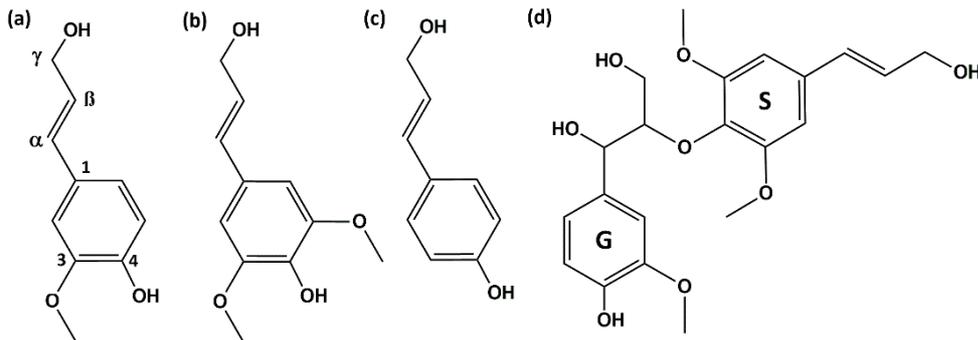


Abb. 3: Monolignole: (a) Coniferylalkohol; (b) Sinapylalkohol; (c) *p*-Coumarylalkohol; (d) G- und S-Einheit über β -O-4-Verbindung verknüpft. (Modifiziert nach Niemi et al., 2013 und Vanholme et al., 2010).

In vitro-Studien im Kolonmodell zeigten, dass Lignin aus BSG von Mikroorganismen zumindest teilweise verstoffwechselt werden kann. So führten ligninreiche Fraktionen zu einer verbesserten Vitalität einiger Bifidobakterien im Vergleich zu Glucose als alleiniges Wachstumsmedium. Nach der Fermentation durch die Mikroorganismen wurden verschiedene phenolische Moleküle mit Guaiacyl- und Syringyl- Struktur sowie verschiedene Lignane detektiert [Niemi et al., 2013]. Eine Wirkung auf den Glucosestoffwechsel durch Lignin wurde ebenfalls beschrieben. So konnten eine starke α -Glucosidaseinhibition durch Lignin (v.a. G- und S-Einheiten) aus *Canna edulis* [Xie et al., 2017] sowie eine potente α -Amylaseinhibition durch biomodifiziertes Lignin aus *Acacia nilotica* beobachtet werden. Letzteres wurde mittels Biodegradierung von Lignin durch 21-tägige Kultivierung mit zwei Pilzstämmen (F10 und APF4) erhalten [Barapatre et al., 2015].

Lignin kann mittels alkalischen Aufschlusses unter vorangegangener Säurebehandlung gewonnen werden. Dabei entsteht der sog. *black liquor*, aus welchem Lignin mit konzentrierter Schwefelsäure bis zu annähernd neutralem pH-Wert gefällt werden kann [Mussatto et al., 2007c]. Zur Isolierung einzelner Ligninfraktionen aus BSG wurden verschiedene enzymatische Vorbehandlungen mit kohlenhydrat- oder proteinabbauenden Enzymen nach einer Soxhlet-Extraktion mit Hexan und anschließender Acidolyse eingesetzt [Ohra-aho et al., 2016].

2.1.3.2 Lipide

Neben hohen Gehalten an Ballaststoffen und Proteinen stellen Lipide mit ca. 10 % (Tab. 1) eine weitere Hauptkomponente in BSG dar. Studien zur genauen Zusammensetzung sind bislang limitiert. Niemi et al. untersuchten die Fettsäurezusammensetzung einer mittels Soxhlet-Extraktion (Heptan) gewonnenen Lipidfraktion via Pyrolyse-GC/MS. Zudem nutzten sie die TLC-GC (engl. *thin layer chromatography gas chromatography*) zur Detektion und Quantifizierung der einzelnen Lipidklassen. Die Lipidfraktion entsprach 11 % des Gesamt-BSG. Die enthaltenen Fettsäuren setzten sich zum größten Teil aus Linol-(18:2), Palmitin-(16:0) und Ölsäure (18:1) gefolgt von geringeren Mengen an Stearin-(18:0) und Linolensäure (18:3) zusammen. Hinsichtlich der Lipidklassen detektierten sie Triglyceride mit 55 % als Hauptanteil, freie Fettsäuren zu 30 % und Phospholipide sowie Diglyceride mit 9,1 % und 5,7 %, wobei der hohe Gehalt an freien Fettsäuren vermutlich auf endogene Lipaseaktivität während des Mälzens und Maischens zurückgeführt werden kann. Neben dem unbehandelten BSG analysierten sie die Lipide in einer BSG-Fraktion, welche nach Behandlung mit kohlenhydrat-

und proteinabbauenden Enzymen und anschließender Fällung durch Acidolyse erhalten wurde. Diese bestand aus ca. 40 % Lipiden mit ähnlicher Fettsäurezusammensetzung, jedoch deutlich geringerem Anteil an Triglyceriden, was durch den hohen pH-Wert während der alkalischen Proteasebehandlung erklärbar ist [Niemi *et al.*, 2012].

Weiterführende Studien wurden von Del Rio *et al.* mit Acetonextrakten (Ausbeute 9,2 %) und GC-MS-Analytik durchgeführt. Sie bestimmten die Triglyceride mit 25,3 g/kg BSG (Trockengewicht, aschefrei) als Hauptkomponenten, wobei Trilinolein, Dilinoleyl-Palmitin und Dilinoleyl-Olein überwiegen. Auch bei den Diglyceriden (2,9 g/kg) waren Ester der Linolsäure die Hauptvertreter. Zudem wurden Monoglyceride (0,61 g/kg) nachgewiesen, die von 2,3-Dihydroxypropyltetradecanoat zu 2,3-Dihydroxypropyloctacosanoat reichten. Freie Fettsäuren waren mengenmäßig mit 6,7 g/kg die zweitgrößte Komponente mit Fettsäuren von Tetradecan-(C₁₄) bis Triacotansäure (C₃₀). Als weitere Inhaltsstoffe in den Lipidfraktionen fanden sie Alkylresorcinole mit einem Gehalt von 30 mg/kg, welche strukturell als Resorcin, d.h. phenolische Komponente mit Alkylketten beschrieben werden können. Verschiedene Steroidklassen wie freie Sterole, Sterolglycoside und -ester sowie Steroidhydrokarbone und -ketone wurden mit einem Gehalt von 1905 mg/kg publiziert, wobei die freien Sterole v.a. Sitosterol und Campesterol überwogen [Del Río *et al.*, 2013].

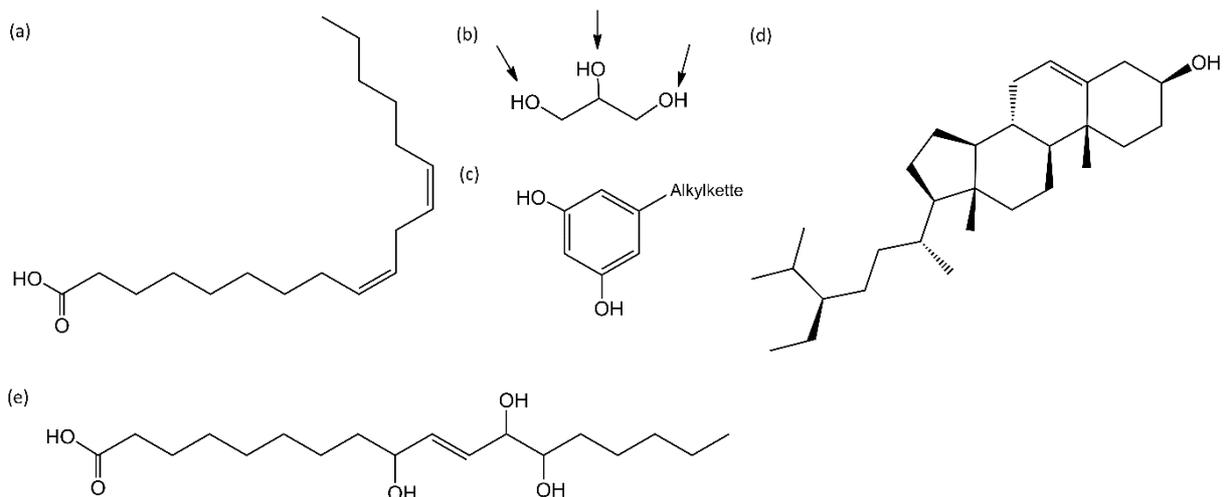


Abb. 4: Ausgewählte Strukturen und Hauptinhaltsstoffe der Lipidfraktionen aus BSG: (a) Linolsäure; (b) Glycerin, Pfeile markieren die Veresterungspositionen mit Fettsäuren; (c) Grundstruktur der 5-n-Alkylresorcinole; (d) β -Sitosterin als Hauptvertreter der freien Sterole; (e) 9,12,13-Trihydroxy-10-octadecensäure.

Der hohe Gehalt der ungesättigten Fettsäure Linolsäure, macht BSG empfindlich für Oxidationsprozesse. Arts *et al.* zeigten in ihren Studien, dass beim Maischeprozess monohydroxylierte Fettsäuren, wie 9- und 13-OH-Fettsäuren, maßgeblich durch enzymatische Reaktionen gebildet werden. Hydroperoxide können dabei als Zwischenprodukte zusätzlich Auslöser für radikalische Lipidoxidation sein [Arts *et al.*, 2007]. Im Jahr 1985 wurde publiziert, dass ca. 30 % aller Lipide beim Maischeprozess oxidiert werden [Anness und Reud, 1985] und mehrfach hydroxylierte Fettsäuren wie Trihydroxyfettsäuren entstehen. Deren Derivate von Linolsäure wurden in Bier detektiert [Hamberg, 1991; Garbe *et al.*, 2005]. Zusammengefasst werden die Oxidationsprodukte unter dem Sammelbegriff Oxylipine. Studien zum Vorkommen von Oxylipinen in BSG sind bis dato nicht bekannt. Eine der häufigsten

Trihydroxyfettsäuren in Bier, die 9,12,13-Trihydroxy-10-octadecensäure, ist in Abb. 4 (e) dargestellt.

2.1.3.3 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe sind Substanzen, die von Pflanzen zusätzlich neben dem primären Metabolismus gebildet werden und verschiedene Funktionen erfüllen, welche der Pflanze bspw. Überlebensvorteile in ihrer Umwelt bietet. So haben sie für die Pflanze oft antifungizide oder antimikrobielle Wirkung, regen die Blüte oder Fruchtbildung an oder dienen als Lockstoffe bzw. Repellent. Über 50 000 Metaboliten wurden bereits identifiziert und entsprechend vielfältig sind die zugehörigen Substanzklassen, welche Kohlenhydrate, Terpene, Phenole, Saponine, Alkaloide und Lipide umfassen [Hussein und El-Anssary, 2019; Teoh, 2016]. Dabei stellen Polyphenole die größte Gruppe dar und können anhand ihrer Struktur oder biosynthetischen Ursprungs in die folgenden Untergruppen klassifiziert werden: Phenolsäuren, Stilbene, Lignane, Flavonoide wie Anthocyane oder Flavonole [Ferrazzano *et al.*, 2011]. Zahlreiche biologische Wirkungen sind *in vitro* sowie *in vivo* bekannt und reichen von antioxidativen [Shen *et al.*, 2016], antiinflammatorischen [Eun *et al.*, 2016], sowie den Blutzucker beeinflussenden „antidiabetischen“ durch α -Amylase- und α -Glucosidaseinhibition [Ramakrishna *et al.*, 2017] über antibakterielle [Boubakri *et al.*, 2017] Effekte, wobei die hier angeführten Studien Polyphenole aus Gerste (*Hordeum vulgare*) untersuchten. Die im BSG enthaltenen Polyphenole werden in den Folgekapiteln (s. Kapitel 2.1.3.3.1 und 2.1.3.3.2) genauer erläutert, wobei der Fokus auf den phenolischen Säuren (v.a. den Hydroxymitsäuren) und den Flavonoiden liegt. Bei Getreide wird zwischen freien und gebundenen Polyphenolen unterschieden, da große Mengen in der komplexen Matrix des lignocellulosischen Materials gebunden vorliegen. So werden die freien Polyphenole eher mit SLE gewonnen, wohingegen die gebundenen erst mittels enzymatischer oder alkalischer Hydrolyse zugänglich gemacht werden können [Verni *et al.*, 2020; Mussatto *et al.*, 2007a; Birsan *et al.*, 2019]. Eine weitere Gruppe sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe, die zu den Alkaloiden gezählt werden kann, sind Phenolamide, welche als zweitgrößte Klasse der Phytochemikalien in verschiedenen Vollkorn- oder Malzproben detektiert wurde [Koistinen *et al.*, 2020]. Durch die Verknüpfung einer phenolischen Komponente mit aliphatischen oder aromatischen Aminen ergibt sich eine Vielzahl potenzieller Strukturen. Wie die Polyphenole, sind Phenolamide bekannt für ihre antioxidative [Lee *et al.*, 2015], anti-inflammatorische [Yamazaki *et al.*, 2008], antidiabetische [Liu *et al.*, 2011] oder antifungizide Wirkung [Röpenack *et al.*, 1998]. In Gerste sind spezifische Phenolamide, die Hordatine, enthalten, welche bislang in Bier [Pihlava *et al.*, 2016] nicht jedoch in BSG nachgewiesen wurden und im Folgenden (s. Kapitel 2.1.3.3.3) vorgestellt werden.

2.1.3.3.1 Hydroxymitsäuren

BSG enthält als Hauptsubstanzklasse der Polyphenole verschiedene phenolische Säuren. Dabei stellen HCAs den Hauptanteil der in BSG enthaltenen Polyphenole dar, wobei *trans*-Ferula- und *p*-Coumarsäure (*p*CA) gefolgt von deutlich geringeren Gehalten an CA und Sinapinsäure überwiegen (Abb. 5) [Moreira *et al.*, 2013b; Ikram *et al.*, 2020]. Dies ist bedingt durch den hohen Gehalt an lignifizierter Zellwand aus den Getreideschalen, in welcher phenolische Komponenten, v.a. FA, als verknüpfende Quervernetzer zwischen den

Arabinoxylanketten über Veresterung dienen [Hernanz et al., 2001; Bartolomé et al., 2002]. Als zweite Gruppe der phenolischen Säuren sind Hydroxybenzoesäuren wie 4-Hydroxybenzoesäure, Protocatechu-, Vanillin- und Syringasäure enthalten (Abb. 5). Allerdings sind ihre Gehalte deutlich geringer, weshalb der Fokus im Folgenden auf den HCAs liegt [Birsan et al., 2019; Verni et al., 2020].

| Hydroxyzimtsäure | R ₁ | R ₂ |
|-----------------------|------------------|------------------|
| <i>p</i> -Coumarsäure | H | H |
| trans-Ferulasäure | H | OCH ₃ |
| Kaffeesäure | H | OH |
| Sinapinsäure | OCH ₃ | OCH ₃ |
| Hydroxybenzoesäure | R ₃ | R ₄ |
| 4-Hydroxybenzoesäure | H | H |
| Protocatechusäure | OH | H |
| Vanillinsäure | OCH ₃ | H |
| Syringasäure | OCH ₃ | OCH ₃ |

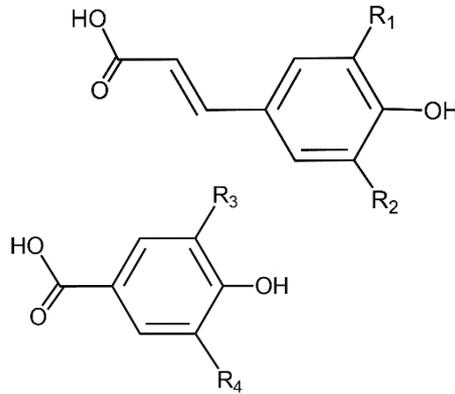


Abb. 5: Struktur der monomeren phenolischen Säuren

Neben den monomeren HCAs finden sich verschiedene DiFAs oder trimere und tetramere Strukturen, die ebenfalls Bestandteil der Zellwände in Getreide sind. Diese quervernetzenden Einheiten sind als solche kovalent in der Matrix gebunden und mit deutlich höherer Ausbeute mittels enzymatischer [Faulds et al., 2004; Verni et al., 2020] oder physikalisch-chemischer Methoden wie mikrowellen- oder thermisch unterstützter alkalischer Hydrolyse [Moreira et al., 2012; Stefanello et al., 2018; Mussatto et al., 2007a] extrahierbar. Hinsichtlich der DiFAs identifizierten Moreira et al. acht Strukturen, welche von der 8-8'-Aryltetralin-, 8-5'-Benzofuran-, 8-8' linearen-, 8-5'-, 8-8' zyklischen-, 5-5' methylierten-, 8-O-4'-DiFA bis zur decarboxylierten Form reichen. Zudem konnten sie als trimere Struktur die 5-5' / 8'-O-4'-dehydrotrimere Ferulasäure (TriFA) bestimmen (Abb. 6) [Moreira et al., 2012]. Im Rahmen der Arbeit werden die Trivialnamen für di- und trimere Strukturen aus bereits publizierten Studien verwendet. Diese beschreiben, an welchen C-Atomen der beiden Monomere die Verknüpfung vorliegt und geben so an, ob eine C-C-Verbindung oder eine C-O-Etherverbindung vorliegt. Weiterhin wird die Struktur durch Angaben wie zyklisch, linear oder Aryltetralin spezifischer beschrieben.

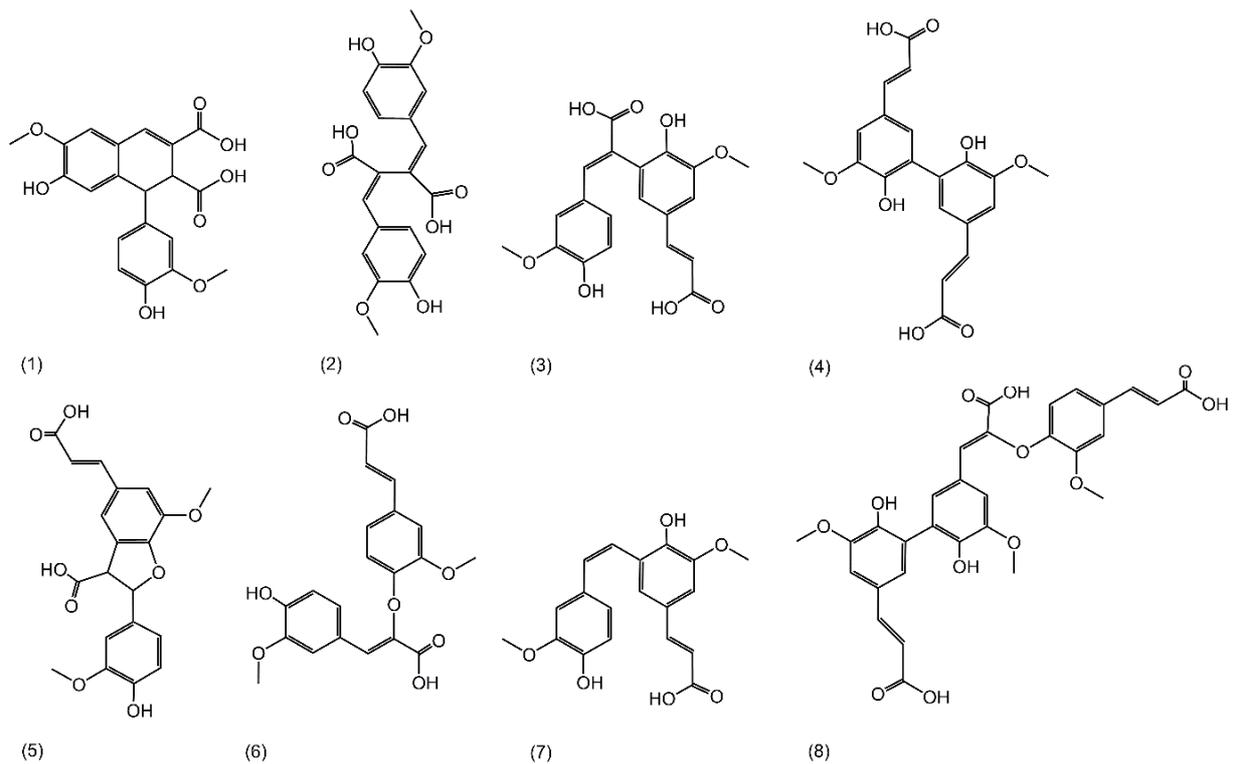


Abb. 6: Strukturen der im BSG und Getreide identifizierten DiFAs und TriFAs; (1) 8-8' Aryltetralin-DiFA, (2) 8-8' lineare DiFA, (3) 8-5'-DiFA, (4) 5-5'-DiFA, (5) 8-5'-Benzofuran-DiFA, (6) 8-O-4'-DiFA, (7) 8-5'-decarboxylierte DiFA, (8) 5-5'/8'-O-4'-TriFA. (Modifiziert nach Moreira *et al.*, 2012 und Callipo *et al.*, 2010). DiFA: Ferulasäure-Dehydrotimer, TriFA: Ferulasäure-Dehydrotimertrimer

Der Gehalt an HCA in BSG hängt dabei von verschiedenen Faktoren ab. So ist v.a. das verwendete Ausgangsmalz und dessen Darrtemperatur ausschlaggebend für den Polyphenolgehalt [Moreira *et al.*, 2013b]. Die eingesetzten Extraktionsmethodiken (enzymatisch oder ohne Vorbehandlung) [Verni *et al.*, 2020] sowie die Konzentration der verwendeten Lauge zum Aufschluss, die Temperatur und Extraktionsdauer [Mussatto *et al.*, 2007a] sind von tragender Bedeutung für die am Ende extrahierte Menge an HCA. Auch hat dies einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Derivate hinsichtlich mono- bis tetramerer Strukturen. Verni *et al.* quantifizierten gebundene Polyphenole in unbehandeltem BSG sowie nach verschiedenen Enzymvorbehandlung (Xylanase) und Fermentation (*L. plantarum*) jeweils nach alkalischem Aufschluss. Sie bestimmten höhere Di- bis Tetramer- sowie Gesamtgehalte bis zu 2070 mg/kg Trockenmasse BSG in Proben mit beiden Vorbehandlungen [Verni *et al.*, 2020]. Die Gehalte an monomeren HCA reichen unter Einbeziehung aller Extraktionsmethodiken von 22–210 mg/100 g BSG *p*-Coumarsäure, 36–507 mg/100 g BSG FA und 0,04–64 mg/100g BSG CA [Alonso-Riaño *et al.*, 2020; Stefanello *et al.*, 2018; Birsan *et al.*, 2019; Verni *et al.*, 2020; Ikram *et al.*, 2020]. In der folgenden Tabelle (Tab. 2) wurden Gehalte in Extrakten dargestellt, welche nach ähnlichen Methodiken wie die in der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden. Durch alkalischen Aufschluss wurden v.a. *trans*-FA und *p*CA mit Gehalten von 5,3–207 mg FA/100 g BSG bzw. 4,1–103 mg *p*CA/100 g BSG extrahiert. CA und Sinapinsäure waren in vergleichbaren Konzentrationen wie die drei Hydroxybenzoesäuren Protocatechu-, Vanillin- und Syringasäure enthalten, wobei die Gehalte für alle mit max. 10,6 mg/100 g BSG gering waren. Oligomere FA wurden von Verni *et al.* als FA-Äquivalente bestimmt mit 56,8 mg DiFAs/100 g BSG und 8,8 mg TriFAs/100 g BSG. Stefanello *et al.* zeigten

mit ihren Ergebnissen zudem, dass sich der alkalische Aufschluss besser zur Extraktion von FA und pCA eignet, da die Gehalte durch SLE ca. 350- bzw. 130-fach geringer ausfielen.

Tab. 2: Gehalte verschiedener phenolischer Säuren in BSG bestimmt nach unterschiedlichen Extraktionsmethodiken

| | Gehalt* | | |
|------------------|---------------------------|---|-------------------------------------|
| Substanz | [mg /100 g BSG dw] | Extraktionsmethodik | Referenz |
| <i>trans</i> -FA | 207,7 ± 11,7 | alkalischer Aufschluss (0,75 %-ige Natronlauge (NaOH)) | [Stefanello <i>et al.</i> , 2018] |
| | 0,6 ± 0,1 | SLE mit 50 %-igem Aceton | [Stefanello <i>et al.</i> , 2018] |
| | 84,9 ± 1,5 | ultraschallgestützter alkalischer Aufschluss (0,75 %-ige NaOH) + Ethylacetat-Extraktion | [Birsan <i>et al.</i> , 2019] |
| | 5,3 ± 0,2 | alkalischer Aufschluss (zwei M NaOH) + Hexan - und Ethylacetat (EtOAc)-Extraktion | [Verni <i>et al.</i> , 2020] |
| | 130,6 ± 0,1 | alkalischer Aufschluss (zwei M NaOH) | [Alonso-Riaño <i>et al.</i> , 2020] |
| | 103,2 ± 12,3 | alkalischer Aufschluss (0,75 %-ige NaOH) | [Stefanello <i>et al.</i> , 2018] |
| pCA | 0,8 ± 0,2 | SLE mit 50 %-igem Aceton | [Stefanello <i>et al.</i> , 2018] |
| | 38,7 ± 0,7 | ultraschallgestützter alkalischer Aufschluss (0,75 %-ige NaOH) + Ethylacetat-Extraktion | [Birsan <i>et al.</i> , 2019] |
| | 4,1 ± 0,2 | alkalischer Aufschluss (zwei M NaOH) + Hexan - und EtOAc-Extraktion | [Verni <i>et al.</i> , 2020] |
| | 53,8 ± 0,4 | alkalischer Aufschluss (zwei M NaOH) | [Alonso-Riaño <i>et al.</i> , 2020] |
| | 0,033 ± 0,001 | ultraschallgestützter alkalischer Aufschluss (0,75 %-ige NaOH) + Ethylacetat-Extraktion | [Birsan <i>et al.</i> , 2019] |
| CA | 3,5 ± 0,1 | alkalischer Aufschluss (zwei M NaOH) + Hexan- und EtOAc-Extraktion | [Verni <i>et al.</i> , 2020] |

| | | | |
|-----------------------------|---|---|-------------------------------------|
| Sinapinsäure | 8,7 ± 1,0 | alkalischer Aufschluss (0,75 %-ige NaOH) | [Stefanello <i>et al.</i> , 2018] |
| | 1,1 ± 0,2 | ultraschallgestützter alkalischer Aufschluss (0,75 %-ige NaOH) + Ethlyacetat-Extraktion | [Birsan <i>et al.</i> , 2019] |
| | 1,5 ± 0,1 | alkalischer Aufschluss (zwei M NaOH) + Hexan- und EtOAc-Extraktion | [Verni <i>et al.</i> , 2020] |
| | 2,7 ± 0,1 | alkalischer Aufschluss (zwei M NaOH) | [Alonso-Riaño <i>et al.</i> , 2020] |
| DiFA | 56,8 ± 2,1 mg FA- Äquivalente (FA- Äq)/100 g BSG | alkalischer Aufschluss (zwei M NaOH) + Hexan - und EtOAc-Extraktion | [Verni <i>et al.</i> , 2020] |
| TriFA | 8,8 ± 0,4 mg FA-Äq/100 g BSG | alkalischer Aufschluss (zwei M NaOH) + Hexan - und EtOAc-Extraktion | [Verni <i>et al.</i> , 2020] |
| Syringa- säure | 10,6 ± 0,6 | alkalischer Aufschluss (zwei M NaOH) | [Alonso-Riaño <i>et al.</i> , 2020] |
| Vanillinsäure | 0,67 ± 0,03 | alkalischer Aufschluss (zwei M NaOH) + Hexan - und EtOAc-Extraktion | [Verni <i>et al.</i> , 2020] |
| | 4,9 ± 0,2 | alkalischer Aufschluss (zwei M NaOH) | [Alonso-Riaño <i>et al.</i> , 2020] |
| Proto- catechu- säure | 0,02 ± 0,01 | ultraschallgestützter alkalischer Aufschluss (0,75 %-ige NaOH) + Ethlyacetat-Extraktion | [Birsan <i>et al.</i> , 2019] |

* Gehalte gerundet und umgerechnet auf eine Einheit [mg/100 g BSG] (elektronischer Anhang, Tab. 39 Seite G)

Die antioxidative Wirkung natürlich vorkommender HCA [Zduńska *et al.*, 2018; Gülçin, 2006; Shen *et al.*, 2019] sowie spezifisch für HCA aus Gerste [Shen *et al.*, 2016] sowie synthetisierte DiFAs [Garcia-Conesa *et al.*, 1997] wurde bereits beschrieben. Ebenso antiinflammatorische [Huang *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2018; Mir *et al.*, 2018; Da Cunha *et al.*, 2004] sowie den Blutzucker beeinflussende („antidiabetische“) [Singh *et al.*, 2012; Adisakwattana, 2017; Adisakwattana *et al.*, 2009; Chiou *et al.*, 2017] Eigenschaften sind bekannt, wobei letztere im Fokus dieser Arbeit stehen. So erwiesen sich CA und FA *in vitro* als potente α -Glucosidase-Inhibitoren [Adisakwattana *et al.*, 2009]. HCA-reiche Extrakte aus *Echinacea purpurea* Extrakt hemmten sowohl α -Glucosidase als auch α -Amylase. Weiterhin konnte in einer *in vivo*-Studie

mit Typ 2 Diabetes-Ratten ein starker Effekt durch FA auf den Glykogenmetabolismus beobachtet werden, wobei verschiedene Enzyme wie Glykogensynthase oder Glykogenphosphorylase (GP) beeinflusst waren. Deren Aktivitäten sind in an mit DM erkrankten Tieren beeinflusst und weisen eine niedrigere Aktivität bei der Glykogenese sowie eine höherer bei der Glykogenolyse auf. Durch eine FA-Gabe normalisierte sich diese Verteilung der Enzymaktivitäten auf das Level gesunder Tiere [Narasimhan *et al.*, 2015b; Narasimhan *et al.*, 2015a]. Zudem konnte eine potente α -Glucosidase-inhibierende Wirkung durch DiFAs (8-5', 5-5' und 8-O-4') und eine TriFA (5-5'/8-O-4'') aus Vollkornreis, auch brauner Reis genannt, nachgewiesen werden [Ye *et al.*, 2022].

2.1.3.3.2 Flavonoide

Als zweite Klasse der Polyphenole in BSG sind Flavonoide zu nennen, welche sich in weitere Unterklassen aufteilen lassen. In BSG wurden Substanzen der Untergruppen der Flavanole, Chalkone, Flavonole und Flavanone identifiziert. Sie sind zumeist Teil der freien Polyphenole und werden oftmals mittels SLE mit organisch-wässrigen Extraktionsmitteln (bspw. 60% Aceton) extrahiert, können jedoch auch in der Matrix des lignocellulosischen Materials fixiert sein und leichter nach enzymatischer Vorbehandlung oder mit alkalischer Hydrolyse freigesetzt werden [Verni *et al.*, 2020; Birsan *et al.*, 2019; Stefanello *et al.*, 2018]. Die häufigsten Vertreter unter den Flavonoiden im BSG sind Flavanole wie Diastereomere des Catechins oder Epicatechins [Verni *et al.*, 2020; Birsan *et al.*, 2019; Martín-García *et al.*, 2019] sowie monomere bis polymere Proanthocyanidine bis zu 1014 $\mu\text{g/g}$ BSG [Martín-García *et al.*, 2019] bzw. Tannine [Stefanello *et al.*, 2018]. Weiterhin konnten geringe Mengen Quercetin (ein Flavonol), Chrysoeriol (ein Flavon) sowie Xanthohumol (ein Chalkon) nachgewiesen werden (Abb. 7) [Verni *et al.*, 2020]. Xanthohumol ist ein spezifisches Flavonoid des Hopfens (*Humulus lupulus*) [Brahmachari, 2021], welcher im Brauprozess (s. Kapitel 2.1.1) mit der nach der Läuterung gewonnenen Würze gekocht wird. Da BSG zu diesem Zeitpunkt schon abgetrennt wurde, ist zu erwarten, dass Xanthohumol nicht in BSG nachweisbar ist und es sich um eine „Verunreinigung“ durch bspw. gemeinsame Lagerung mit Hopfenabfall handelt.

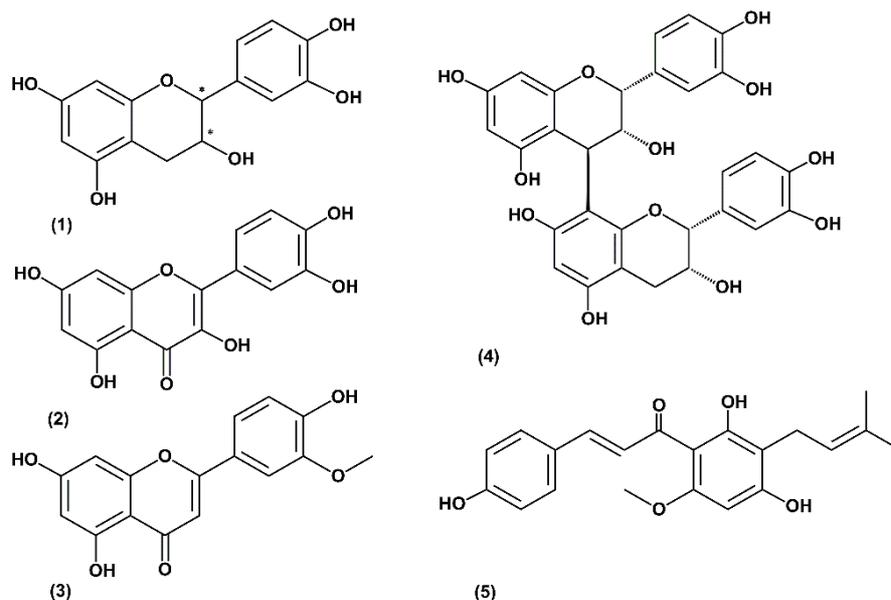


Abb. 7: Ausgewählte Strukturen der Flavonoide in BSG; (1) Grundstruktur der Catechine, (2) Quercetin, (3) Chrysoeriol, (4) Procyanidin B₂, (5) Xanthohumol

Nachfolgend sind tabellarisch Gehalte ausgewählter Flavonoide dargestellt, welche mittels ähnlicher Extraktionsmethodiken wie in der vorliegenden Arbeit angewandt, extrahiert wurden (Tab. 3). Diastereomere des Catechins sind in BSG enthalten in Konzentrationen von 0,6–6,8 mg/100 g BSG sowie in geringerer Menge von 0,2 mg/100 g BSG auch Diastereomere des Epicatechins [Verni *et al.*, 2020; Birsan *et al.*, 2019; Martín-García *et al.*, 2019; Stefanello *et al.*, 2018]. Quercetin und Chrysoeriol wurden Verni *et al.* je nur in geringer Konzentration von 0,1 mg/100 g BSG detektiert. Tendenziell zeigt sich, dass die SLE zur Extraktion von Flavonoiden gegenüber einem alkalischen Aufschluss vorzuziehen ist.

Tab. 3: Gehalte ausgewählter Flavonoide in BSG bestimmt nach unterschiedlichen Extraktionsmethodiken

| Substanz | Gehalt** [mg/100 g BSG] | Extraktionsmethodik | Referenz |
|------------------|-------------------------------|---|---|
| Catechin* | 6,8 ± 1,4 | SLE mit 50 %-igem Aceton | [Stefanello <i>et al.</i> , 2018] |
| | 1,4 ± 0,1 | SLE mit 60 %-igem Aceton | [Birsan <i>et al.</i> , 2019] |
| | 0,6 ± 0,03 | alkalischer Aufschluss (zwei M NaOH) + Hexan- und EtOAc-Extraktion | [Verni <i>et al.</i> , 2020] |
| Epicatechin* | 0,15 ± 0,01 | alkalischer Aufschluss (zwei M NaOH) + Hexan- und EtOAc-Extraktion | [Verni <i>et al.</i> , 2020] |
| Procyandindimer* | 6,6 ± 0,1 | ultraschallgestützte SLE mit 75 %-igem Aceton | [Martín-García <i>et al.</i> , 2019] |
| Quercetin | 0,056 ± 0,001 | alkalischer Aufschluss (zwei M NaOH) + Hexan- und EtOAc-Extraktion | [Verni <i>et al.</i> , 2020] |
| Chrysoeriol | 0,089 ± 0,004 | ultraschallgestützte SLE mit wässrigem Ethanol (4:1, v/v) | [Verni <i>et al.</i> , 2020] |

* keine Angabe zur Stereoisomerie

** Gehalte gerundet und zum Vergleich umgerechnet auf eine Einheit [mg/100 g BSG] (vgl. elektronischer Anhang, Tab. 39 Seite G)

Wie die phenolischen Säuren weisen Flavonoide *in vitro* und *in vivo* biologische Aktivitäten antioxidativer [Abdel-Ghaf *et al.*, 2019; Grzesik *et al.*, 2018] aber auch den Blutzucker beeinflussende Wirkungen „antidiabetischer“ [Liu *et al.*, 2014; Jakobs *et al.*, 2006; Yin *et al.*,

2014] Art auf. So erwies sich Quercetin als potenter Inhibitor der GP α [Jakobs *et al.*, 2006], der α -Amylase und der α -Glucosidase [Tadera *et al.*, 2006], Procyanidine aus Hirse und rotem Reis inhibierten ebenfalls α -Amylase [Cai *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017]. Procyanidin B₁ beeinflusste in Kombination mit *p*CA aus Gerste die Glucoseaufnahme und Glykogensynthese auf Proteinexpressionsebene und führten zu erhöhter Glucosetransporter 4 (GLUT4)-Expression sowie verringerter Glykogen-Synthase-Kinase-Bildung [Liu und Li, 2021]. Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) wird ebenfalls durch Polyphenole beeinflusst und eine potente Inhibition durch Catechin wurde beschrieben. STC-1-Zellen, welche mit einem Extrakt aus Schlafbeeren (*Whitania somnifera*) inkubiert worden waren, wiesen eine erhöhte GLP-1-Konzentration auf. Fluoreszenz-Spektren zeigten, dass der untersuchte Extrakt wie auch Catechin selbst zu einer Verringerung der intrinsischen Fluoreszenz der DPP IV führte, was durch Bindung an aromatische Aminosäuren im katalytischen Zentrum auftritt. Dies deutet auf Catechin als aktive Komponente hin. Zirkulardichroismus-Analysen bestätigten eine α -Helix-Bindung des Catechins am Enzym gefolgt von einer Veränderung der Sekundärstruktur [Kempegowda *et al.*, 2018].

Flavonoide kommen innerhalb der polyphenolischen Substanzklassen in geringeren Mengen in BSG vor. Dabei zeigten sich unabhängig von der Extraktionsmethodik Catechingehalte von max. 14 μ g/g BSG Trockenmasse als einziges Flavonoid neben phenolischen Säuren, deren Gehalte insgesamt bei bis zu 2739 μ g/g BSG Trockenmasse lagen [Birsan *et al.*, 2019].

2.1.3.3.3 Phenolamide

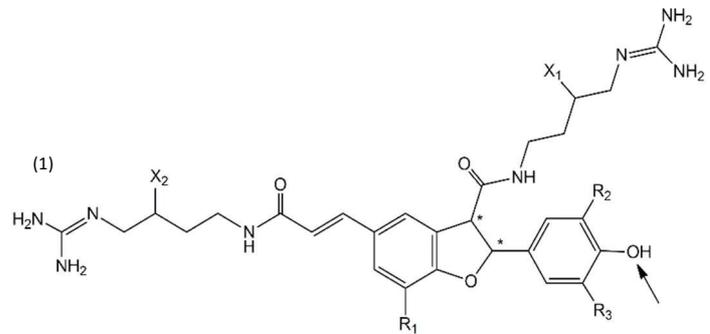
Eine weitere Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe sind Phenolamide (Hydroxyzimtsäureamide (HCAA)), welche als zweitgrößte Gruppe unter den Phytochemikalien in verschiedenen rohen und gemälzten Getreideproben nachgewiesen wurden [Koistinen *et al.*, 2020]. Ihre grundlegende Struktur setzt sich zusammen aus einem phenolischen Anteil, einer HCA sowie einem Amin. Als Amin-Komponente kommen Monopolyamine, aromatische Amine wie Tyramin, Dopamin oder Tryptamin sowie aliphatische Amine wie u.a. Putrescin, Agmatin oder Spermidin vor. Durch die große Anzahl möglicher Kombinationen der phenolischen und aminischen Monomere sowie die Möglichkeit von einer bis vier Stickstoffatomen zur Bildung der Säureamidbindung bei den aliphatischen Aminen, ergibt sich eine umfangreiche strukturelle Vielfalt [Bassard *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2018]. In hoher Konzentration sind Phenolamide in Pollen und Samen zu finden [Koistinen *et al.*, 2020; Vogt, 2018; Grienberger *et al.*, 2009], wo sie oftmals Abwehrmechanismen gegen Pathogene darstellen oder als Phytoalexine wirken [Röpenack *et al.*, 1998; Zacarés *et al.*, 2007; Ube *et al.*, 2019].

Gerste, als (Haupt-)Rohstoff der Bierherstellung, enthält spezifische Phenolamide, die Hordatine (Abb. 8, (1)), abgeleitet vom lateinischen Namen *Hordeum vulgare* [Bird and Smith, 1984]. Sie bestehen aus Dimeren von HCA-Agmatinen (Abb. 8, (2)) und verschiedene Hordatine unterscheiden sich im *p*CA- und FA-Anteil sowie durch zusätzliche Hydroxylierungen des Agmatins oder Glykosylierungsgrad. Neben den dimeren Strukturen konnten die zugehörigen monomeren Vorläufer, die HCA-Agmatine, identifiziert werden [Gorzolka *et al.*, 2014]. Zusätzlich zu ihrem Auftreten in Gerste, bestimmten Pihlava *et al.* diese in Bier, was auf die hohe Stabilität der Hordatine während des Brauprozesses hinweist. Neben Agmatin-Derivaten wies die Gruppe HCA-Derivate des Spermidins (Abb. 8, (3)) nach [Pihlava,

2014]. Diese sind jedoch nicht spezifisch für Gerste und konnten in Reis und Mais beobachtet werden [Dong *et al.*, 2015; Bento-Silva *et al.*, 2020].

(1)

| Hordatin | R ₁ | R ₂ | R ₃ | X ₁ | X ₂ |
|----------|------------------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| A | H | H | H | H | H |
| B | OCH ₃ | H | H | H | H |
| C | OCH ₃ | OCH ₃ | H | H | H |
| D | OCH ₃ | OCH ₃ | OCH ₃ | H | H |
| A1 | H | H | H | OH | H |
| B1 | OCH ₃ | H | H | OH | H |
| C1 | OCH ₃ | OCH ₃ | H | OH | H |
| A2 | H | H | H | OH | OH |
| B2 | OCH ₃ | H | H | OH | OH |
| C2 | OCH ₃ | OCH ₃ | H | OH | OH |



(2) HCA-

| Agmatin | R ₁ | (3) HCA-Spermidin | R ₁ |
|---------------------|----------------|-------------------------------------|----------------|
| <i>p</i> CA-Agmatin | H | Bis-Coumaroyl-Spermidin | H |
| FA-Agmatin | OH | Feruloyl-Coumaroyl Spermidin | OH |

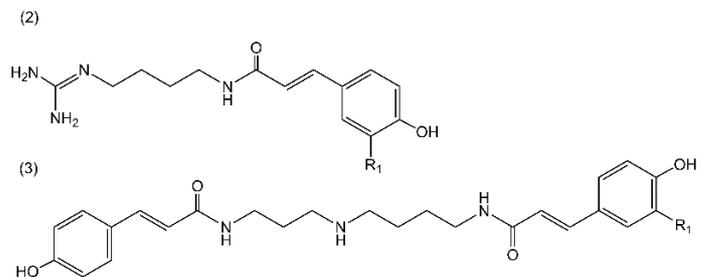


Abb. 8: Ausgewählte Phenolamide in Getreide; (1) Hordatine, Glykosylierung an Hydroxygruppe des Phenylrings (markiert mit Pfeil) mit bis zu neun Hexoseeinheiten; (2) Hordatin-Vorläufer HCA-Agmatine; (3) HCA-Spermidine modifiziert nach Pihlava *et al.*, Gorzolka *et al.*, Bento-Silva *et al.*. FA: Ferulasäure, HCA: Hydroxyzimtsäure, *p*CA: *p*-Coumarsäure

Hordatine gehören zu den Minorkomponenten und nur wenige Studien zu ihrem Gesamtgehalt in Gerste sind bisher publiziert. Kohyama und Ono bestimmten Hordatin A-β-D-Glucopyranosidgehalte von 103 bis 254 nmol/g Trockengewicht in ungekeimter Gerste [Kohyama und Ono, 2013]. Nomura *et al.* beobachteten, dass Hordatin A- und B-Gehalte 72–96 h nach der Aussaat auf einen Höchstwert von 90 nmol/g Frischgewicht in Weizen-Gerste-Chromosomadditionslinien (Mischform der Pflanze durch Zufügen einiger Chromosomen einer anderen Pflanze) anstiegen [Nomura *et al.*, 1999]. Die aktuellsten Studien zur Hordatinquantifizierung stammen von Pihlava *et al.*, welche den Gesamthordatingehalt in Bier als *p*CA-Äquivalente (*p*CA-Äq) mit 5,6–18,7 mg/L Bier bestimmten [Pihlava *et al.*, 2016]. Es handelt es sich hier jedoch um semiquantitative Daten.

Hinsichtlich der biologischen Aktivität von Hordatinen sind ebenfalls wenige Studien bekannt. Es wurden antifungizide [Röpenack *et al.*, 1998] und antioxidative [Spreng und Hofmann, 2018] Effekte beschrieben. Weiterhin wurde in einer aktuellen *in silico*-Studie ihr inhibitorisches Potential auf Protease und RNAsen des COVID-19-Virus gezeigt [Dahab *et al.*, 2020]. Hinsichtlich einer Beeinflussung des Blutzuckerspiegels sind lediglich Studien über

verschiedene andere HCAAs bekannt. So erwiesen sich Caffeoyl-putrescin und verschiedene HCA-Tyramine als potente Inhibitoren der α -Glucosidase [Assefa *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2011; Moradi-Afrapoli *et al.*, 2012], wobei hinsichtlich der HCA-Agmatine oder HCA-Spermidine noch keine Daten bekannt sind.

2.2 Zuckerstoffwechsel

Kohlenhydrate stellen im Säuger neben Lipiden die Hauptlieferanten zur Energiegewinnung dar, wobei dem Monosaccharid Glucose beim Menschen die größte Rolle zukommt [Berg *et al.*, 2018]. Glucose wird im Rahmen der Glykolyse zu Pyruvat abgebaut, welches anschließend in Form von Acetyl-Coenzym A in den Citratzyklus eingeht. Neben seiner Relevanz zur Energiegewinnung ist Glucose notwendig zur Aufrechterhaltung eines normalen osmotischen Drucks in Form eines konstanten Blutzuckers (BZ). Die im Darm enzymatisch aus den Nahrungspolysacchariden freigesetzte Glucose wird über verschiedene Glucosetransporter aufgenommen und über das Blut zu den Zielorganen transportiert. Überschüssige Glucose kann in Form eines Speicherkohlenhydrates, dem Glykogen, in der Leber gespeichert und von dort über die Glykogenolyse bei Bedarf wieder abgebaut und freigesetzt werden. Über die Gluconeogenese kann der menschliche Körper in der Leber und Niere Glucose synthetisieren, was mit einem hohen Energieaufwand verbunden ist [Harmjanz, 2021]. Der BZ sowie damit einhergehende Prozesse über Gluconeogenese, Glykolyse, Glykogensynthese und Glykogenolyse sind präzise reguliert. Dies erfolgt zum einen hormonell (Insulin, Glucagon), zum anderen über Feedback-Hemmungen einiger Hauptenzyme, allosterische Effektoren oder kovalente Modifikationen wie Phosphorylierungen [Berg *et al.*, 2018]. Die am häufigsten vorkommende Störung im Glucosestoffwechsel, *Diabetes mellitus*, beruht auf der Resistenz bzw. dem Defizit des Hormons Insulin, was zu einem deutlich erhöhten BZ führt. Therapeutika wirken bspw. über eine verringerte Glucosefreisetzung im Darm oder der Leber, eine Erhöhung des Inkretins GLP1 oder eine Erhöhung der Zuckerausscheidung über den Urin [Tan, 2020].

2.2.1 Resorption und Verteilung

Die mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydrate bestehen zu großen Teilen aus Stärke (Amylose, Amylopektin), welches ein Polysaccharid aus α -D-Glucose-Einheiten darstellt. Neben Stärke sind oftmals geringere Mengen an Glykogen, ebenfalls aufgebaut aus α -D-Glucose-Einheiten, enthalten. Zudem sind die Mono- und Disaccharide Glucose, Fructose, Lactose oder Saccharose Bestandteile von Lebensmitteln. Um dem Körper die komplexen Polysaccharide zur Verfügung zu stellen, müssen diese im Darm aufgenommen werden, was erst nach Spaltung in kleinere Einheiten möglich ist. Hierbei ist die α -Amylase im Speichelsekret sowie Zwölffingerdarm (Duodenum) zu nennen, welches α -1,4-glykosidische Bindungen in Stärke und Glykogen zu Maltose und Maltotriose spaltet. Da es die ebenso vorhandenen α -1,6-glykosidischen Bindungen nicht aufspalten kann, entstehen zusätzlich sogenannte Grenzextrine. Am Bürstensaum des Darmepithels sind die Enzyme Lactase, Maltase und Saccharase zur Spaltung der Disaccharide Lactose, Maltose und Saccharose lokalisiert. Zudem sind hier α -Dextrinase mit den Grenzextrinen als Substrat und α -Glucosidase, welche Maltotriose und höhere Oligosaccharide aus dem Vorverdau der α -Amylase spaltet, zu finden [Berg *et al.*, 2018]. Aus diesen membrangebundenen Vorgängen

gehen die Monomere Glucose, Galactose und Fructose hervor, welche über verschiedene Transporter in die intestinalen Epithel-Zellen aufgenommen werden. So sind Glucose und Galactose Substrate des SGLT1-Transporters (engl. *sodium dependant glucose co-transporter*) und werden je gekoppelt an den Influx von Natriumionen in die Zellen transportiert, was gleichzeitig eine wichtige Rolle für die osmotisch bedingte Wasserresorption ist. Fructose gelangt über den GLUT5 (engl. *glucose transporter*) mittels erleichterter Diffusion durch die Zellmembran in die Enterozyten. Von dort gelangen alle Monomere entlang des Konzentrationsgradienten über den GLUT2 in den Blutkreislauf. In Phasen eines niedrigen Glucosespiegels in den Intestinalzellen, bspw. längere Zeit nach Nahrungsaufnahme, kann Glucose aus dem Blut in die Zelle transportiert werden, wo sie u.a. für die Glykosylierung der hydrolytischen Enzyme notwendig ist (Abb. 9) [Rehner und Daniel, 2010].

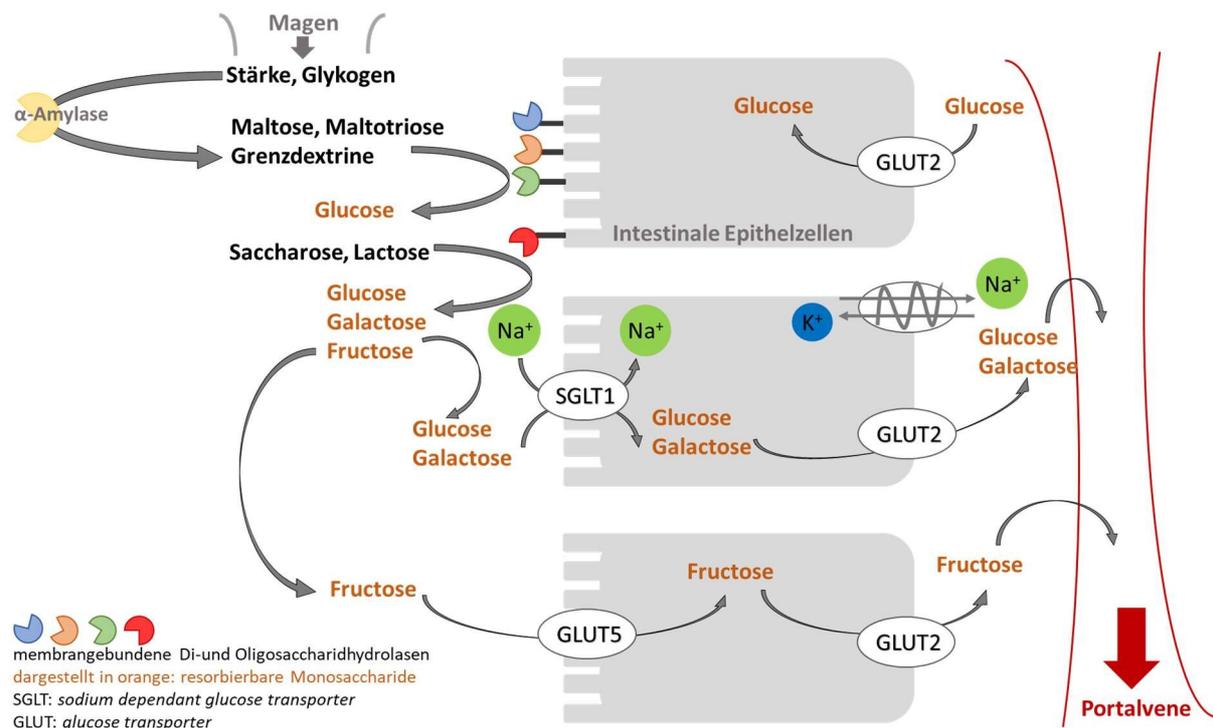


Abb. 9: Verdauungsvorgänge der Kohlenhydrate und Transportwege der Monosaccharide in intestinalen Epithelzellen über die Portalvene (nach Rehner und Daniel, 2010).

Neben den resorbierbaren Kohlenhydraten sind weiterhin nicht verwertbare Polysaccharide in der Nahrung enthalten, zu denen Cellulose oder Hemicellulosen zählen. Für ihre Hydrolyse zu Monomeren oder kleineren Oligomeren besitzt der menschliche Körper keine geeigneten Enzyme, weshalb sie lediglich im Dickdarm mikrobiell fermentiert werden können. Sie zählen zur Gruppe der Ballaststoffe [Rehner und Daniel, 2010].

Die aus dem Darm resorbierten Monosaccharide, v.a. Glucose, werden über das Blut zu den jeweiligen Zielorganen transportiert, wo sie über verschiedene Glucosetransporter aufgenommen werden. So erfolgt die Aufnahme in Leber und Pankreas über GLUT2, in Adipozyten und Muskelzellen über GLUT4 und in die Niere über SGLT2, wobei hier auch GLUT2 von Bedeutung ist. In allen Säugetiergeweben stehen GLUT1 und GLUT3 für die Glucosegrundversorgung zur Verfügung. Sie transportieren durchgehend eine konstante Glucosemenge in die Zellen. GLUT2 hingegen transportiert aufgrund seines sehr hohen K_M -Wertes (Michaelis-Menten-Konstante; Maß für Affinität des Enzyms zum Substrat) nur

Glucose in die Zellen, wenn der BZ sehr hoch ist. Der Hauptregulator des BZ ist Insulin, wobei die Regulierung im Folgenden vorgestellt wird [Berg *et al.*, 2018; Vallon, 2020].

2.2.2 Regulation und Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase

Die Verteilung der Glucose als Energieträger zwischen den Organen ist essenziell, weshalb die Regulation des BZ von großer Bedeutung ist. Zu diesem tragen sowohl die alimentäre Glucosezufuhr als auch die endogene Glucosebildung bei. Der BZ liegt bei Gesunden zwischen 5–6 mmol/L. Anhand der Konzentration lassen sich die beiden pathologischen Stoffwechselsituationen hypoglykämisch (BZ < 4 mmol/L) und hyperglykämisch (BZ > 6,5-7 mmol/L) definieren [Rehner und Daniel, 2010].

Die Hauptregulatoren der Glucosehomöostase sind die beiden Hormone Glucagon, welches in den α -Zellen des Pankreas produziert wird, und Insulin, das aus den β -Zellen des Pankreas stammt. Deren Sekretion aus dem Pankreas wird durch den BZ innerhalb der Peripherie der Langerhans'schen Inselkörper gesteuert. Zudem beeinflussen sich die beiden Hormone gegenseitig. Insulin inhibiert die Bildung und Ausschüttung von Glucagon, wohingegen letzteres die Insulinsekretion fördert [Rehner und Daniel, 2010].

Nach der Resorption der Glucose und deren Transport über das Blut wird Glucose über die insulinsensitiven GLUT2 in die β -Zellen des Pankreas aufgenommen, woraufhin Phosphorylierungsprozesse eine Depolarisation der Zellmembran, gefolgt von einem Ca^{2+} -Einstrom, auslösen. Dadurch fusionieren sekretorische Granula mit der Plasmamembran und Insulin wird ausgeschüttet. Neben der Glucosekonzentration gibt es weitere Modulatoren der Insulinsekretion wie GLP1, welches die Exocytose von Insulin über seinen $\text{G}\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptor steigert oder Somatostatin, welches die Insulinsekretion über $\text{G}\alpha_i$ -gekoppelten Rezeptoren senkt [Müller-Esterl, 2018]. Über die Pfortader gelangt Insulin primär zur Leber, wo es an dimere Insulinrezeptoren der Hepatocyten bindet. Hierüber werden verschiedene Signalkaskaden ausgelöst, welche genregulatorisch in der Expression glykolytischer Enzyme (z.B. Phosphofruktokinase, Pyruvatkinase) mündet oder akute metabolische Effekte wie die Hemmung der Glykogenolyse, Aktivierung der Glykogensynthese und Glykolyse auslöst. In den Muskelzellen stimuliert Insulin die Glucoseaufnahme, indem es den GLUT4-Einbau in die Plasmamembran erhöht und Schlüsselenzyme der Glykolyse aktiviert [Müller-Esterl, 2018].

Gegenläufige Reaktionen löst das antagonistische Hormon Glucagon aus, welches vermehrt bei niedrigem BZ ausgeschüttet wird. Seine Hauptstimulatoren sind Aminosäuren wie Arginin, wohingegen es in der Leber v.a. den Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel steuert. So induziert Glucagon über Phosphorylierungen die Glykogenolyse sowie Schlüsselenzyme der Gluconeogenese. Die Glykogensynthese und Enzyme der Glykolyse werden gehemmt. Ähnlich wie Insulin beeinflusst Glucagon die Glucosehomöostase auf Genebene, indem es die Expression gluconeogenetischer Enzyme steigert und die der Phosphofruktokinase oder Pyruvatkinase drosselt (Abb. 10) [Müller-Esterl, 2018].

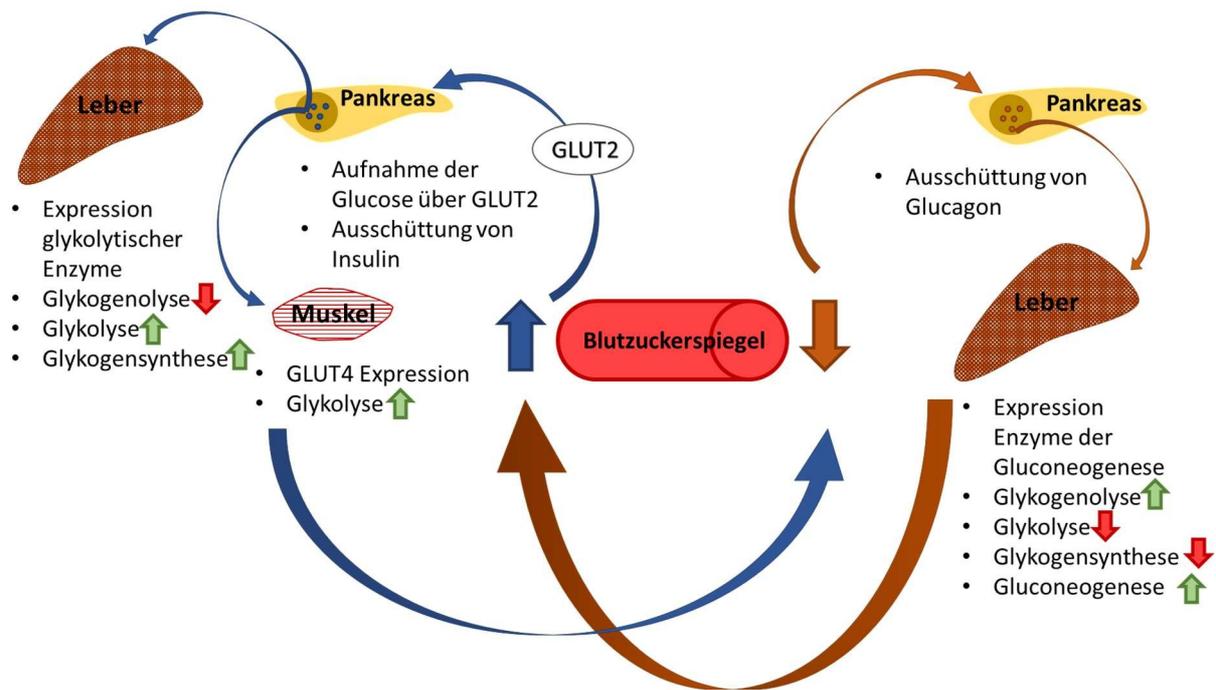


Abb. 10: Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase durch die Gegenspieler Insulin und Glucagon (nach Müller-Esterl, 2018). GLUT: Glucosetransporter

2.2.3 Glykogenstoffwechsel

Kohlenhydrate, welche nicht direkt benötigt werden, kann der menschliche Körper in Form von Glykogen im Cytoplasma von Leber- und Muskelzellen speichern. Dabei handelt es sich um ein Polysaccharid aus ca. 55 000 Glucoseeinheiten ähnlich der Struktur von Amylopektin. Das Homoglykan Glykogen besteht aus α -1,4-glykosidisch gebundenen Glucosemonomeren sowie α -1,6-glykosidischen Verknüpfungen an jedem zehnten Glucosemolekül, sodass sich eine kugelförmige, platzsparende Struktur ergibt. Dadurch entsteht eine große Anzahl endständiger Angriffspunkte für Enzyme der Synthese und des Abbaus, was eine rasche Freisetzung ermöglicht. Die Konzentration in der Leber ist etwa fünfmal so hoch wie in der Muskulatur. Zudem werden Glykogensynthese und -abbau in der Leber so reguliert, dass sie die Glucosehomöostase des gesamten Organismus aufrechterhalten. In der Muskulatur ist der Gehalt nur den Bedürfnissen des Muskels selbst angepasst. Reguliert werden die beiden Prozesse durch den BZ (s. Kapitel 2.2.2) und unterliegen der allosterischen Kontrolle durch Metaboliten des Energiestoffwechsels [Berg *et al.*, 2018].

Schlüsselenzym des Glykogenabbaus ist die GP, welche einzelne Glucosemoleküle in Form von Glucose-1-phosphat (G1P) über Phosphorolyse aus Glykogen freisetzt. G1P kann mittels Glucose-Phosphatmutase leicht in Glucose-6-phosphat (G6P) überführt werden und fließt so in den Stoffwechsel ein. Dabei wird es in den Muskelzellen direkt zur ATP-Synthese verwendet, wohingegen es in der Leber über die Glucose-6-Phosphatase in Glucose überführt wird und in die Blutbahn eintreten kann. Die im Glykogen vorhandenen α -1,6-Verzweigungen sind für die GP nicht zugänglich und müssen zunächst mittels einer Transferasereaktion und einer α -1,6-Glucosidase umgebaut werden. Durch die enzymatischen Reaktionen entsteht eine reine α -1,4-verknüpfte Glucosekette, welche als Substrat für die GP dient. Die Regulation des Abbaus beruht v.a. auf der GP, deren Auftreten in einer aktiven und inaktiven Form sowie

deren Vorliegen in einem entspannten R- und gespannten T-Zustand (s. Kapitel 2.2.4.4) eine genaue Regulation ermöglicht. Hinzu kommen die hormonelle Regulation (s. Kapitel 2.2.2) sowie allosterische Effektoren [Berg *et al.*, 2018].

Die Glykogensynthese läuft bei hoher Glucose-Konzentration ab und erfordert Uridindiphosphat (UDP)-Glucose als aktivierte Form. Sie wird gebildet aus Glucose-1-phosphat (G1P) und Uridintriphosphat (UTP), was von der UDP-Glucose-Pyrophosphorylase katalysiert wird. Dabei entsteht freies Pyrophosphat, das schnell zu Orthophosphat hydrolysiert und somit die Synthese antreibt. Die so aktivierte Glucosyleinheit der UDP-Glucose wird durch die Glykogensynthase an die Hydroxylgruppen des C(4)-Atoms endständiger Glykogenreste übertragen, wodurch eine neue α -1,4-glykosidische Bindung entsteht. Bei einer kompletten Neusynthese des Glykogens dient Glykogenin als Startmolekül. Dabei handelt es sich um eine Glykosyltransferase aus zwei Untereinheiten (UE), welche jeweils die Bildung von α -1,4-verknüpften Glucosepolymeren mit einer Länge von 10–20 Einheiten katalysiert. Die α -1,6-Verzweigungen werden durch Übertrag von etwa sieben Glucoseeinheiten durch ein *branching enzyme* ermöglicht. Die Glykogensynthase wird reguliert durch Phosphorylierungen über die Proteinkinase A oder Glykogen-Synthase-Kinase sowie durch allosterische Regulation. G6P ist ein starker Aktivator des Enzyms und stabilisiert den aktiven Zustand. Analog dem Abbau wird die Synthese auf hormoneller Ebene reguliert, wobei Glucagon hierbei als wichtigster Aktivator der auslösenden Signalkaskaden zu nennen ist. Grundsätzlich werden Glykogensynthese und -abbau reziprok reguliert [Berg *et al.*, 2018].

2.2.4 Ausgewählte Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben (s. Kapitel 2.2.1ff), ist der Kohlenhydratstoffwechsel ein fein reguliertes System und unterliegt zahlreichen Kontrollsystemen. Glucose ist der wichtigste Energieträger der Zelle und muss im Körper oft aus der Nahrung zunächst freigesetzt werden, wobei Enzyme wie α -Amylase und α -Glucosidase von großer Bedeutung sind. Nach der Freisetzung wird Glucose resorbiert und über verschiedene Transportenzyme verteilt. Außerdem spielt die hormonelle Regulation über Insulin und Glucagon eine wichtige Rolle, wobei hier Enzyme wie die DPP IV ihre Wirkung entfalten. Zur Speicherung überschüssiger Glucose überführt der Körper diese in Glykogen und kann sie, katalysiert von der GP, wieder freisetzen. Die vier genannten Enzyme sind Teil der Forschungsfrage der vorliegenden Arbeit und stellen (potenzielle) Angriffspunkte für antidiabetische Medikamente dar.

2.2.4.1 α -Amylase

Eine wichtige Gruppe kohlenhydratverdauender Glucosidasen sind α -Amylasen, welche im Speichel sowie im Pankreassekret zu finden sind. Sowohl die Struktur als auch die Sequenz der beiden Enzyme sind sehr ähnlich, worin die gemeinsame Substratspezifität und durchgeführte Katalyse begründet ist. Beide Enzyme hydrolysieren endo- α -1,4-glykosidische Bindungen in Stärke, wobei durch die im Speichel enthaltene α -Amylase v.a. kürzere Oligomere entstehen, welche im Darm weiter verdaut werden zu Maltose, Maltotriose und α -Dextrinen [Jiang, 2019].

Strukturell sind α -Amylasen ähnlich den α -Glucosidasen aus acht β -Strängen und α -Helices aufgebaut, welche eine „Fassstruktur“ bilden. Sie gehören zur

Glykosid-Hydrolase (GH)-Familie 13. Es handelt sich mit 496 Aminosäuren um ein kleines Enzym und weist drei Domänen A-C auf. Domäne A beinhaltet als größte der drei die aktive Seite sowie eine Chloridbindungsstelle. Dazwischen findet sich Domäne B mit einer Calciumbindungsstelle und Domäne C stellt das C-terminale Ende dar [Brayer *et al.*, 1995]. Sowohl Calcium als auch Chlorid sind relevant für die katalytische Aktivität. Das gebundene Calciumion interagiert mit vier Aminosäuren und drei Wassermolekülen im direkten Umfeld des aktiven Zentrums und bietet dadurch strukturelle Integrität [Qian *et al.*, 1994]. Die Chloridionen hingegen wirken als allosterische Aktivatoren [Brayer *et al.*, 1995].

Das aktive Zentrum des Enzyms ist eine tiefe, C-ähnlich geformte Tasche, welche zwischen der A und B Domäne liegt. Die Aminosäuren Asp 197, Glu 233 und Asp 300 stellen die katalytischen Aminosäuren dar (Abb. 11). In der Bindungstasche finden Oligosaccharide ab drei Glucoseeinheiten Raum. Insgesamt wurden fünf Zuckerbindungsstellen identifiziert, wobei die Spaltung der Kohlenhydratkette über Asp 197 immer an der gleichen Position stattfindet. In einer zweischrittigen Reaktion wird die glykosidische Bindung gespalten. Zunächst bildet sich ein kovalentes Enzym-Glucosyl-Intermediat unter Beteiligung der Aminosäuren Asp 197 und Glu 233 unter Stabilisierung durch Asp 300. Die Hydrolyse zur Glucose stellt den zweiten Schritt dar. Acarbose und Miglitol, Wirkstoffe antidiabetischer Medikamente, lagern sich in der Bindungstasche an und blockieren die Bindung der eigentlichen Substrate, wodurch deren Hydrolyse gehemmt wird [Jiang, 2019].

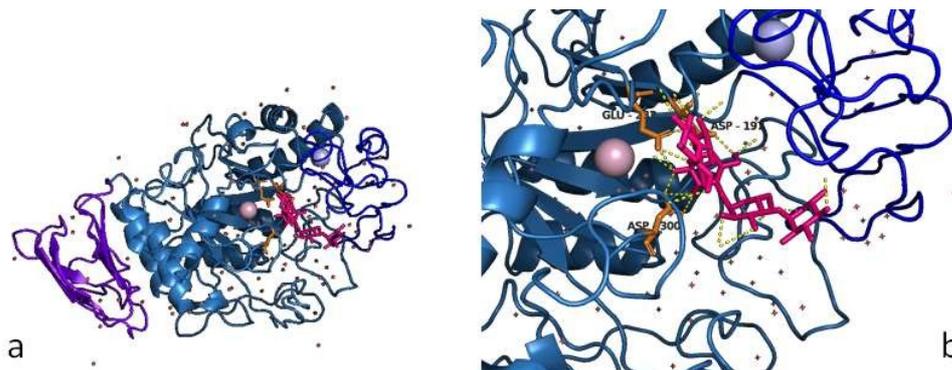


Abb. 11: Ribbon-Darstellung der humanen Pankreas- α -Amylase im Komplex mit Acarbose als Ligand (erstellt mit PyMOL nach PDB ID: 1B2Y) [Nahoum und Payan, 2000] Acarbose (pink), katalytische Aminosäuren (Asp 197, Glu 233 und Asp 300; orange). a) Darstellung der gesamten Struktur und b) Darstellung des aktiven Zentrums und Wechselwirkung des Liganden Acarbose mit katalytischen Aminosäureresten. Asp: Asparaginsäure, Glu: Glutaminsäure

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde α -Amylase aus Schweinepankreas verwendet, welche hinsichtlich der katalytischen Aminosäuren im aktiven Zentrum und der Gesamtgröße des Proteins vergleichbar mit der humanen Struktur ist (PDB ID: 1DHK) [Bompard-Gilles *et al.*, 1996].

2.2.4.2 α -Glucosidase

Neben α -Amylase gibt es weitere Glucosidasen, wobei sich die intestinalen membrangebundenen α -Glucosidasen (EC 3.2.1.20) in Maltase-Glucoamylasen (MGAM) und Sucrase-Isomaltasen (SI) unterteilen lassen. Beide Subgruppen sind notwendig zum Abbau verbliebener Produkte der Hydrolyse durch Amylasen. MGAMs hydrolysieren α -1,4-glykosidische Bindungen vom nicht-reduzierenden Ende der Oligomere, wobei

α -D-Glucose entsteht. Die gleiche Reaktion wird von SIs katalysiert. Zudem können α -1,6-glykosidische und α -1,2-glykosidische Bindungen gespalten werden. Sie gehören zur GH-Familie 31 und generieren als Endprodukt der enzymatischen Reaktionen Glucose bzw. Fructose. Strukturell sind α -Glucosidasen charakterisiert durch eine β -„Fasstruktur“ aus acht β -Strängen und α -Helices [Jiang, 2019; Ernst *et al.*, 2006].

MGAMs bestehen aus einer cytosolischen und einer Transmembrandomäne sowie einem O-glykosylierten-Verlinkungselement und einer N-terminalen und C-terminalen katalytischen UE. Beide UE katalysieren die gleiche Reaktion, variieren jedoch in der Größe der gebundenen Substrate. So können im aktiven Zentrum der N-terminalen UE lediglich Disaccharide gebunden werden, wohingegen in der C-terminalen Domäne längere Oligomere Platz finden. In beiden aktiven Zentren stellt Asparaginsäure (Asp) das katalytische Nukleophil (Asp 443 bzw. Asp 1420) sowie den Säure-Base-Katalysator (Asp 542 bzw. Asp 1526) dar. Das katalytische Nukleophil ist in beiden Fällen von den gleichen Aminosäuren umgeben, welche in einer spezifischen Signatur der WIDMNE-Sequenz festgelegt sind [Ernst *et al.*, 2006] (Abb. 12).

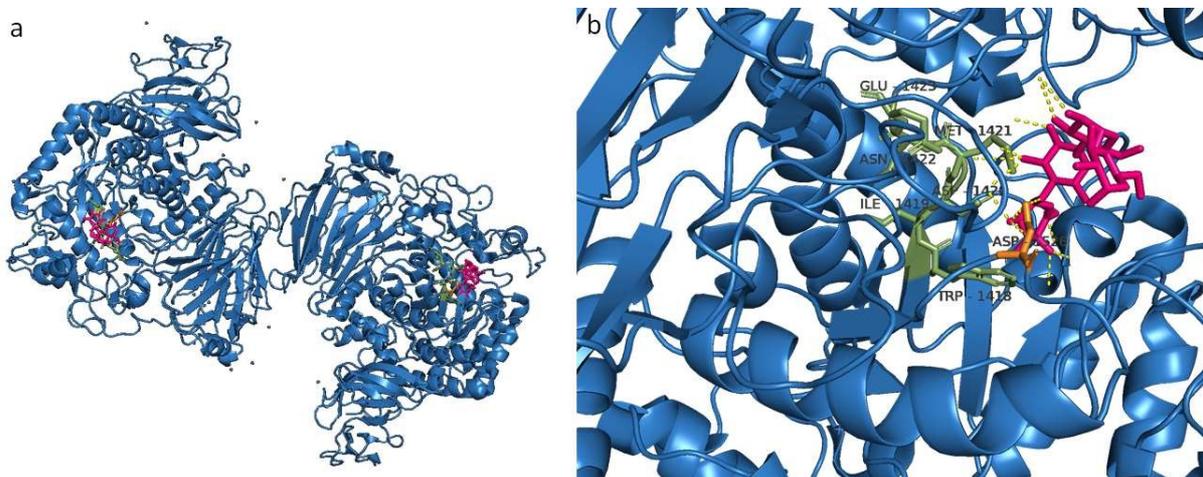


Abb. 12: Ribbon-Darstellung der C-terminalen Domäne der intestinalen humanen Maltase-Glucoamylase (MGAM) im Komplex mit Acarbose als Ligand (erstellt mit PyMOL nach PDB ID: 3TOP) [Ren *et al.*, 2011]; Acarbose (pink), WIDMNE-Sequenz (Aminosäuren 1418–1423; grün), Säure-Base-Katalysator (orange). a) Darstellung der gesamten Struktur aus Kette A und B und b) Darstellung des aktiven Zentrums und Wechselwirkung des Liganden Acarbose mit Asp 1526 und weiteren Aminosäureresten. Asp: Asparaginsäure

SIs sind strukturell ähnlich aufgebaut. Sie bestehen ebenfalls aus einer cytosolischen und einer Transmembrandomäne, einem O-glykosylierten-Verlinkungselement sowie zwei katalytischen UE, der Isomaltase-UE (N-terminal) und der Sucrase-UE (C-terminal). Die UE weisen etwa 40 % Sequenzhomologie auf und katalysieren beide die Hydrolyse α -1,4-glykosidischer Bindungen. Die N-terminale Domäne spaltet α -1,6-glykosidische Verbindungen wie im Amylopektin und die C-terminale Domäne zusätzlich α -1,2-glykosidische Bindungen wie bspw. in Sucrose. Das aktive Zentrum ist mit der WIDMNE-Sequenz sowie Asp als Nukleophil (Asp 472) und Säure-Base-Katalysator (Asp 571) ähnlich dem der MGAMs aufgebaut. Wie bei den MGAMs erfolgt die Hemmung der SIs durch Acarbose oder Miglitol über Blockade der Bindungsposition für die Glucoseeinheit im zu spaltenden Substrat [Jiang, 2019].

Die Katalyse erfolgt bei beiden α -Glucosidasen in zwei Schritten. Zunächst bildet sich ein kovalentes Glucosyl-Enzymintermediat unter Einbeziehung der beiden katalytischen

Aspartate. Im zweiten Schritt erfolgt die eigentliche Spaltung der glykosidischen Bindung [Brás *et al.*, 2018].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde α -Glucosidase aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) verwendet, wobei dieses eine Mischung aus zwei Enzymen, der α -Glucosidase MAL12 und MAL32 entsprach (Produktdatenblatt G5003 Sigma Aldrich). Beide katalysieren lediglich die Hydrolyse der α -1,4-glykosidischen Bindungen ausgehend vom nicht-reduzierenden Ende der Oligomere. Von beiden Enzymen sind noch keine Kristallstrukturen verfügbar, jedoch ist bekannt, dass die katalytischen Aminosäuren Asp 214 und Lys 276 (MAL32) bzw. Asp 214 und Glu 276 (MAL12) sind und ebenfalls eine Säure-Base-katalysierte Reaktion zur Hydrolyse stattfindet [UniProtKB; Eintrag F8LG06 und P53341].

2.2.4.3 Dipeptidylpeptidase IV

DPP IV (EC 3.4.14.5) ist ein Typ II-Glykoprotein auf der Zelloberfläche und erfüllt im Körper unterschiedlichste Funktionen, weshalb es in fast allen Geweben und Zelltypen, v.a. aber in der Leber, Darm, Prostata oder proximalem Tubulus der Niere zu finden ist [Thoma *et al.*, 2003]. Seine biologischen Prozesse umfassen u.a. die membranverankernde Funktion für die Lokalisierung der extrazellulären Adenosin-Deaminase [Franco *et al.*, 1998], die co-stimulierende Funktion während der T-Zell-Aktivierung und Zellproliferation [Bonin *et al.*, 1998] sowie den Abbau des Inkretinhormons GLP1 im Rahmen des Glucosestoffwechsels [Holst und Deacon, 1998]. Es hat eine postprolin-Dipeptidylaminopeptidase-Aktivität (d.h. Spaltung erfolgt nach der Aminosäure Prolin) und spaltet bevorzugt X-Prolin- oder X-Alanin-Dipeptide ausgehend vom N-Terminus der Polypeptidkette. Es gehört zu einer Gruppe von Serinproteasen, welche in der Lage sind, Prolylbindungen zu spalten [Cunningham und O'Connor, 1997].

Das Enzym besteht aus insgesamt drei Domänen, wobei die kleinste Domäne aus sechs Aminosäuren verbunden mit einer helicalen Transmembrandomäne aus weiteren 22 Aminosäuren im Cytoplasma vorliegt. Den größten Anteil stellt die extrazelluläre Domäne dar, welche neben einer β -„Propeller“-Struktur aus Wiederholungen von β -Faltblatt-Motiven in antiparalleler Anordnung den katalytischen Bereich enthält. Innerhalb des β -„Propellers“ findet sich eine doppelte Glutaminsäure-Sequenz (Glu 204–206), welche relevant für die Substratbindung ist. Die DPP IV gehört zu den α/β -Hydrolasen, die eine spezifische Faltung aus acht β -Strängen und sechs α -Helices in der katalytischen Domäne aufweisen. Eingebettet in die Struktur findet sich die katalytische Triade aus Ser 630, Asp 708 und His 740 (Abb. 13) [Thoma *et al.*, 2003].

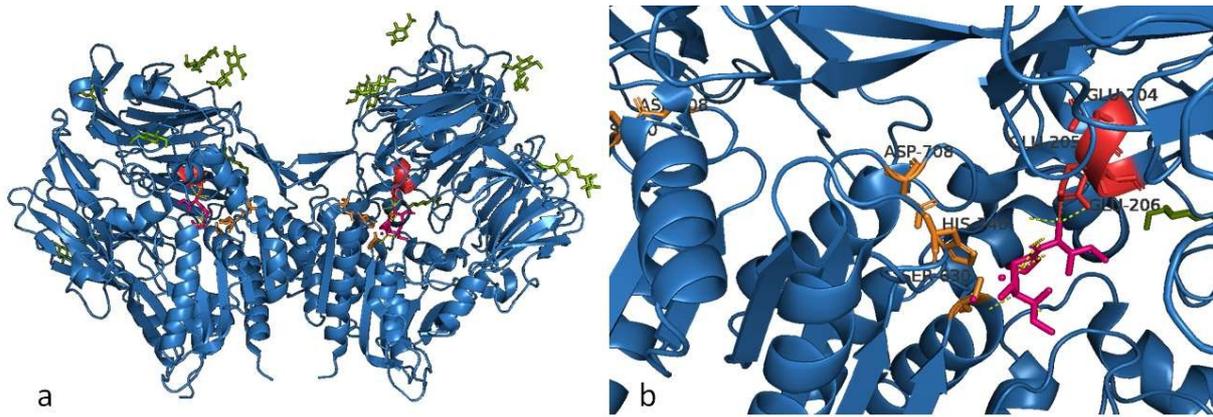


Abb. 13: Ribbon-Darstellung der humanen extrazellulären Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) im Komplex mit Diprotin A (pink) als Ligand (erstellt mit PyMOL nach PDB ID: 1WCY) [Thoma *et al.*, 2003], Glykosylierungen (grün), katalytische Triade (Ser 630, Asp 708, His 740; orange), Glu-Sequenz (Glu 204–206; rot) a) Darstellung der gesamten Struktur aus Kette A und B und b) Darstellung des aktiven Zentrums und Wechselwirkung des Liganden Diprotin A mit aktivem Zentrum. Asp: Asparaginsäure, His: Histidin, Glu: Glutaminsäure, Ser: Serin

Die Katalyse erfolgt in einem vierstufigen Prozess, wobei zunächst Serin als Nukleophil wirkt, sodass sich zwischen Enzym und Substrat ein Michaelis-Komplex bildet. Anschließend bildet sich ein tetrahedrales Intermediat unter der Säurewirkung des Histidins, welches über ein Acyl-Enzym-Intermediat in ein zweites tetrahedrales Intermediat übergeht. An diesem Punkt findet schließlich die Spaltung der Peptidbindung statt [Ekici *et al.*, 2008]. Eine Hemmung erfolgt bspw. durch Diprotin A oder Gliptine wie Sitagliptin oder Vidagliptin, welche als „Antidiabetika“ Anwendung finden und das Enzym kompetitiv inhibieren [Lambeir *et al.*, 2008].

2.2.4.4 Glykogenphosphorylase α

GP α liegt im menschlichen Körper in drei Isoformen vor und wurde in der Leber sowie im Muskelgewebe und dem Gehirn gefunden [Mathieu *et al.*, 2017]. Sie weisen eine hohe Ähnlichkeit auf doch für den BZ ist die Leber-GP α (EC 2.4.1.1.) aus 846 Aminosäuren am relevantesten, weshalb diese genauer vorgestellt wird. Sie katalysiert die phosphorolytische Freisetzung von G1P aus Glykogen und ist als allosterisches Enzym durch verschiedene Effektoren reguliert. So erfolgt bspw. eine Inhibition durch Glucose und Glucoseanaloga [Rath *et al.*, 2000a], allosterische Inhibitoren wie Koffein oder CP403,700 [Ekstrom *et al.*, 2002b] oder eine Aktivierung durch Phosphorylierung an Ser 14 bzw. Bindung von AMP, dessen Bindung wiederum durch ATP oder G6P inhibiert wird [Rath *et al.*, 2000b]. Als Cofaktor nutzt die GP α Pyridoxal-5-Phosphat, welche an Lys 680 gebunden wird [Rath *et al.*, 2000a].

Die GP α kann in verschiedenen Konformationen sowie in aktiver (α) oder inaktiver Form (β) vorliegen, wobei sich letztere lediglich in der Phosphorylierung an Ser 14 unterscheiden. Die Unterschiede der beiden weiteren Konformationen sind komplexer und begründen sich auf verschiedene Winkel im Bereich der sog. *tower helices* (Aminosäuren 267–274), welche im inaktiven T-*state* bei ungefähr 30° und bei etwa 45° im aktiven R-*state* liegen [Mathieu *et al.*, 2017]. Dadurch wird die katalytische Domäne zugänglich. Neben den beiden *tower-helices* sind die *250' loop* (Aminosäuren 250–260) sowie das *gate* (Aminosäuren 280–289) an der Konformationsänderung beteiligt. Das *gate* wird im inaktiven Zustand durch die *380' loop* (Aminosäuren 376–386) sowie die Glucoseanaloga an Asn 284 und His 377 geschlossen

gehalten. Zudem bildet sich die Bindungsstelle für Koffein (Phe 285 und Tyr 613) nur im inaktiven Zustand, der durch entsprechende Bindung des Inhibitors stabilisiert wird. Ein zweites Koffeinmolekül bindet weiter außerhalb an Trp 174, wobei hier keine biologische Relevanz angenommen wird [Ekstrom *et al.*, 2002b]. Weitere Inhibitoren sind bspw. Cp403,700, welches an einer anderen Bindungsstelle im Enzym anlagert (Arg 60, Val 64, Lys 191) und ebenfalls den inaktiven Zustand stabilisiert. AMP als Aktivator bindet an einer gesonderten Bindungsstelle (im Bereich von Aminosäuren 47–78), wodurch es den aktiven *R-state* stabilisiert [Rath *et al.*, 2000b]. Glykogen selbst wird nicht im katalytischen Zentrum, sondern außerhalb (Arg 426, Glu 433, Gly 434 und Ala 435) gebunden [Johnson, 1992]. Eine Übersicht ist in Abb.14 dargestellt.

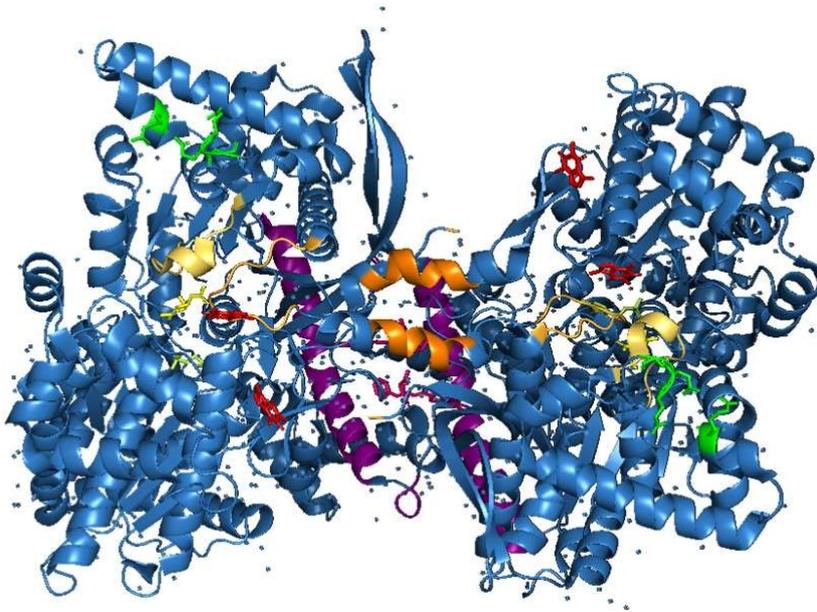


Abb. 14: Ribbon-Darstellung der humanen Leber-GP im inaktiven *T-state* im Komplex mit CP403,700 (pink) an Arg 60, Val 64, Lys 191, Koffein an Phe 285 und Tyr 613 sowie an Trp 174 (rot), N-Acetyl-Glucoylamin (gelb), Pyridoxalphosphat an Lys 680 (hellgrün); AMP-Bindungsstelle (lila), Glykogen-Bindungsstelle (grün), *tower helices* (orange), *38' loop* (beige) (erstellt mit PyMOL nach PDB ID: 1L5Q) [Ekstrom *et al.*, 2002a]. AMP: Adenosinmonophosphat, Arg: Arginin, Lys: Lysin, Phe: Phenylalanin, Trp: Tryptophan, Tyr: Tyrosin, Val: Valin

Durch die Möglichkeiten der Konformationsänderung und die große Anzahl von Bindungsstellen (katalytisch, inhibierend, Glykogen-Bindungsstelle, AMP-Bindungsstelle sowie weitere allosterische Bindungsstellen) sind vielfältige Möglichkeiten einer biologischen Wirkung zu vermuten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Enzym isoliert aus Hasenmuskel verwendet, welches mittels BLAST auf Sequenzhomologie zum Enzym im Menschen untersucht wurde und bei 80,5 % lag.

2.2.5 *Diabetes mellitus*: Störung des Glucosestoffwechsels

Diabetes mellitus (lateinisch „honigsüßer Durchfluss“; DM) ist ein Sammelbegriff für verschiedene Stoffwechselstörungen, die mit einem erhöhten BZ, einer Hyperglykämie einhergehen. Die häufigsten Formen sind der Typ I (T1DM) und Typ II (T2DM) sowie

Schwangerschafts-Diabetes, wobei jede Erkrankung entweder auf Insulinmangel oder einer Insulinunempfindlichkeit/-resistenz der Zielzellen beruht [Clauss und Clauss, 2018]. Aktuelle Daten vom Robert Koch Institut (RKI) aus 2017 zeigen, dass die Erkrankung deutlich an Bedeutung zunimmt, unter Beachtung des Anstiegs der Prävalenz von unter 1 % in den 1960er Jahren auf mittlerweile 7,2 bis 9,9 % ermittelt über verschiedene Monitoringmethoden. Die Inzidenz stieg im gleichen Zeitraum von etwa 1,2 auf 6,9 pro 1000 Personenjahre, wobei jeweils nur die beiden Hauptformen T1DM und T2DM in die Berechnung miteinbezogen wurden [Robert Koch-Institut, 2017; RKI, 2017]. Auf globaler Ebene stellt sich die Situation ähnlich dar und 2021 sind bereits 537 Millionen Menschen an DM erkrankt mit 6,7 Millionen Todesfällen, welche mit DM assoziiert werden [Magliano und Boyko, 2021].

T1DM war früher geläufig unter dem Begriff insulinabhängiger Diabetes und begründet auf einer verminderten Insulinproduktion des Körpers. Durch tägliche Insulingaben kann der Mensch dies jedoch ausgleichen. Typische Symptome sind vermehrter Harndrang, Durst, konstanter Hunger oder Gewichtsverlust. Die Entstehung des T1DM ist noch nicht gänzlich erforscht. Vermutlich handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, ausgelöst durch die Zerstörung der β -Zellen des Pankreas. Eine genetische Prädisposition für T1DM existiert, doch weitere Umweltfaktoren wie der Lebensstil und bestimmte Virusinfektionen erhöhen das Risiko [Clauss und Clauss, 2018].

Beim T2DM, früher als nicht-insulinabhängig bekannt, liegt der Hyperglykämie hingegen eine Insulinresistenz zugrunde. Der Körper ist nicht in der Lage, das vorhandene Insulin effektiv zu nutzen und ähnliche Symptome treten auf, meist jedoch weniger ausgeprägt. Er ist mit etwa 90 % die hauptsächlich auftretende Form des Diabetes, wird jedoch aufgrund der schwächeren Symptomatik oft später diagnostiziert. Zu den wichtigsten Risikofaktoren des T2DM zählen Übergewicht und Fettleibigkeit [World Health Organization, 2016]. Eine fortwährende Überernährung über einen längeren Zeitraum führt zu einer stetig ansteigenden Insulinkonzentration, wodurch die zugehörigen Insulinrezeptoren unempfindlicher werden. Je nachdem wie weit die Erkrankung fortgeschritten ist, kann ihr mit Diät, Bewegung und Gewichtsreduktion entgegengewirkt werden. T2DM ist einer der drei Faktoren des metabolischen Syndroms und tritt daher oft in Kombination mit Bluthochdruck und erhöhten Blutfettkonzentrationen auf [Clauss und Clauss, 2018].

Neben der Insulingabe bei T1DM und der entsprechenden Diät und Gewichtsreduktion bei T2DM stellen v.a. bei letzterem orale „Antidiabetika“ eine mögliche Behandlungsform dar. So können Biguanidine eingesetzt werden wie Metformin, welche als Insulinsensibilisator bekannt sind und verschiedene inhibitorische Effekte auf die hepatische Glucoseproduktion haben [Chaudhury *et al.*, 2017]. Es hemmt bspw. die Fructose-1,6-Bisphosphatase und damit die Gluconeogenese [Hunter *et al.*, 2018]. Weitere effektive Therapeutika sind Dipeptidylpeptidase (DPP) IV-Inhibitoren wie Sitagliptin oder Vidagliptin. Ihre blutzuckersenkende Wirkung beruht auf der Verlängerung der Halbwertszeit der beiden Inkretine GLP1 und GIP. Die beiden Peptidhormone bewirken eine erhöhte Insulinsekretion aus dem Pankreas nach der Nahrungsaufnahme und fördern somit die Aufnahme der Glucose in die Zellen. Ihr Abbau erfolgt durch DPP IV, welche Aminosäuren vom N-terminalen Ende der Inkretine abspaltet und sie so unwirksam macht. Eine Inhibition des abbauenden Enzyms DPP IV verlängert demnach die Wirkung der Inkretine und hält folglich das Level der Insulinsekretion erhöht. Allerdings ist ihr Effekt geknüpft an die Nahrungsaufnahme und damit

verbundene GLP1- und GIP-Ausschüttung [Lambeir *et al.*, 2008]. Eine insulinunabhängige Medikation stellen SGLT2-Inhibitoren wie Canagliflozin oder Dapagliflozin dar. Sie senken den BZ indem sie die renale Rückresorption von Glucose deutlich reduzieren [Abdul-Ghani und DeFronzo, 2008] und sind besonders für T1DM-Patienten geeignet, deren Insulin-Sekretion nicht mehr stattfindet [Chaudhury *et al.*, 2017]. Direkt nach der Nahrungsaufnahme kann über Medikamente eine blutzuckersenkende Wirkung im GIT über α -Amylase- und α -Glucosidase-Inhibitoren wie Acarbose und Miglitol erreicht werden. Dabei handelt es sich um Pseudosaccharide, die die beiden Enzyme kompetitiv hemmen und somit den Abbau der aufgenommenen Polysaccharide zu resorbierbaren Monosacchariden reduzieren. Durch die mikrobielle Fermentation der unverdauten Kohlenhydrate im Dickdarm zählen gastrointestinale Symptome wie Flatulenz zu den oftmals auftretenden Nebenwirkungen [Calder und Geddes, 1989; DiNicolantonio *et al.*, 2015]. Schließlich lässt sich in den Glykogenstoffwechsel gezielt eingreifen durch Inhibition des Schlüsselenzyms des Glykogenabbaus, der GP. Allerdings gestaltet es sich als schwierig, eine ausreichende Selektivität zwischen der Skelett- und der Leber-GP zu erreichen, wobei Daten darauf hinweisen, dass eine Senkung der Hyperglykämie erreicht werden kann, ohne die metabolische und funktionelle Kapazität der Muskeln negativ zu beeinflussen [Baker *et al.*, 2005]. Dennoch sind entsprechende Inhibitoren potenzielle Ansatzpunkte für „Antidiabetika“ [Nagy *et al.*, 2013].

3 Problemstellung

Störungen des Glucosestoffwechsels wie DM sind mit weitreichenden Folgen für die menschliche Gesundheit verbunden. Die Prävalenz von T1DM steigt weltweit seit Jahren an [World Health Organization, 2016] und zeigt die Relevanz der Suche nach neuen Therapieansätzen oder Medikamenten. Viele Ansatzpunkte beruhen auf der Senkung des postprandialen BZ und umfassen bspw. die Hemmung verschiedener Enzyme des Glucosestoffwechsels, wobei sich einige pflanzliche Inhaltsstoffe als deren potente Inhibitoren erwiesen. So publizierten Xiong *et al.* kürzlich ihre *in vitro*-Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Sorghum-Arten (Hirse) auf α -Amylase und α -Glucosidase. Sie unterschieden zwischen freien (nach Extraktion mit 80 %-igem MeOH) und gebundenen Polyphenolen (Säurehydrolyse) und beobachteten mittlere bis starke Inhibitionen in Abhängigkeit des Gesamtphenolgehaltes (TPC) [Xiong *et al.*, 2020]. Neben den Inhaltsstoffen von Getreide wie Hirse wurden auch Komponenten in „prozessiertem Getreide“ in Form von BSG hinsichtlich der Beeinflussung des Glucosestoffwechsels untersucht. Connolly *et al.* fokussierten sich jedoch auf Proteinhydrolysate aus BSG statt auf dessen Polyphenole und stellten eine potente Inhibition der DPP IV sowie mittlere Inhibition der α -Glucosidase fest [Connolly *et al.*, 2014]. Als weiteres landwirtschaftliches Nebenprodukt wurden polyphenolische Extrakte aus der Weinbereitung hinsichtlich einer Beeinflussung des Glykogenstoffwechsels untersucht. Kantsadi *et al.* beschrieben hier eine potente GP-Inhibition [Kantsadi *et al.*, 2015]. BSG enthält Polyphenole (s. Kapitel 2.1.3.3) und fällt als Nebenprodukt in großen Mengen an, weshalb es sich als Ausgangsmaterial für Extraktionen bioaktiver Komponenten eignet. Die Studien von Xiong *et al.* und Connolly *et al.* geben zudem Hinweise, dass Extrakte aus BSG Effekte auf den Glucosestoffwechsel zeigen könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss verschiedener Extrakte aus BSG auf den Glucosestoffwechsel untersucht werden und die biologisch aktiven Komponenten identifiziert werden. Es ergaben sich dadurch drei Hauptfragestellungen, welche sich in fünf Arbeitspaketen finden, wie folgt:

1. Herstellung verschiedener BSG-Extrakte sowie deren Charakterisierung anhand des TPC und TFC (Teil I) und Identifizierung derer Leitsubstanzen (Teil II) in Abhängigkeit von der Extraktionsmethodik (SLE, alkalische Hydrolyse oder Kombination)
2. Einfluss der Extrakte aus BSG (Teil I) sowie identifizierter Leitsubstanzen (Teil III–V) auf Enzyme des Glucosestoffwechsels (α -Glucosidase, α -Amylase, DPP IV und GP α) mit dem Ziel der Identifikation aktiver Komponente
3. Isolierung der Naturstoffe Hordatine (Teil III) und DiFAs (Teil IV) aus BSG als dessen charakteristische Inhaltsstoffe

Teil I: Zunächst sollten mittels **mehrstufiger Extraktionsprozesse** aus drei BSG-Chargen Extrakte generiert und hinsichtlich ihres **TPC** und **TFC** untersucht werden. Analog zu vorangegangenen Publikationen, wurde eine Kombination aus SLE und alkalischem Aufschluss gewählt, um zwischen freien und gebundenen Polyphenolen unterscheiden zu können. Eine Aufreinigung mittels SPE sollte gewährleisten, dass in den ***in vitro*-Enzyminhibitionsassays** interferierende Substanzen entfernt wurden. Es ergaben sich je nach Methodik drei

Extraktgruppen (HE, HA, A). So ergaben sich die **A-Extrakte** aus SLE mit 60 %-igem Aceton, die **HE-Extrakte** aus alkalischem Aufschluss des BSG gefolgt von EtOAc-Extraktion und die **HA-Extrakte** aus SLE mit 60 %-igem Aceton des festen Rückstands aus dem alkalischen Aufschluss. Im Anschluss wurden die erhaltenen Extrakte hinsichtlich ihres Effektes auf die Enzyme α -Glucosidase, α -Amylase, GP α und DPP IV in photometrischen, zellfreien *in vitro*-Assays untersucht.

Teil II: Im Anschluss sollte die **Charakterisierung der Extrakte** mittels HPLC-ESI-MS(/MS) (engl. *high pressure liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry*) Experimenten sowie HPLC-DAD (engl. *diodenarray detector*) erfolgen. Hierbei wurde zunächst via *full scan* (Q1) Präkursorionen detektiert, welche im Anschluss mittels Produktionenscan (MS²) identifiziert wurden. Als Kriterien wurden die entstandenen Fragmente sowie deren Verteilung, die Retentionszeit (R_t), sofern Referenzsubstanzen verfügbar waren, und der Vergleich mit Literaturdaten, wo möglich, herangezogen. Danach wurden die Leitsubstanzen der Extrakte – Hordatine in Acetonextrakten und HCAs in Extrakten aus alkalischem Aufschluss – mittels HPLC-DAD quantifiziert.

Teil III: Als Leitsubstanzen in den Acetonextrakten (A) wurden **Hordatine** identifiziert, welche nicht kommerziell erwerblich waren und daher gezielt aus BSG isoliert und fraktioniert werden sollten. Hierfür wurde eine SLE mit 60 %-igem Aceton gefolgt von säulenchromatographischer Aufreinigung und präparativer HPLC gewählt. Die erhaltenen **Fraktionen (H-Fraktionen)** wurden mittels HPLC-ESI-MS/MS charakterisiert und der Gesamthordatingehalt semiquantitativ via HPLC-DAD bestimmt. Danach wurden diese Fraktionen im α -Glucosidase-Inhibitionsassay sowie dem GP α -Inhibitionsassay untersucht.

Teil IV: In den Extrakten aus alkalischem Aufschluss (HE, HA) waren neben den bekannten und als Reinsubstanzen verfügbaren HCAs FA oder *pCA* kommerziell nicht erhältliche **DiFAs** enthalten. Diese sollten gezielt aus BSG isoliert werden, wobei eine alkalische Hydrolyse gefolgt von zweifacher Auftrennung mittels GPC (Gelpermeationschromatographie) und präparativer HPLC Anwendung fand. Die so erhaltenen **Fraktionen (F-Fraktionen)** wurden mit zuvor etablierten HPLC-ESI-MS/MS-Methoden, charakterisiert und im α -Glucosidase-Inhibitionsassay sowie im GP α -Inhibitionsassay untersucht.

Teil V: Identifizierte Substanzen in den aktiven Extrakten, welche als Reinsubstanzen erhältlich waren, sollten ebenfalls in den Enzyminhibitionsassays untersucht werden, um ihren Beitrag zum Inhibitionspotential der Extrakte beurteilen zu können.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist in fünf unterschiedliche Teile gegliedert. **Teil I bis III** umfassen jeweils einen Teilbereich der vorliegenden Dissertation, welche je in einer Publikation veröffentlicht wurden und sich hier kurz zusammengefasst auf Deutsch finden. In **Teil IV und V** sind zusätzliche Ergebnisse dargestellt, die in der Arbeit beschrieben und diskutiert werden. Im Anschluss werden die Ergebnisse der fünf Teilaspekte in einer zusammenfassenden Diskussion (Kapitel 5) hinsichtlich der übergeordneten Fragestellung – welche Komponenten in den BSG-Extrakten zur Inhibition beitragen – erläutert.

Teil I dieses Kapitels beinhaltet die Publikation Becker *et al.* 2021, in der die Herstellung der BSG-Extrakte HE1–HE6, HA1–HA3 und A1–A7 mittels verschiedener Extraktionsmethodiken aus unterschiedlichen BSG-Chargen (BSG 1–3) beschrieben wird. Desweiteren wurde die Bestimmung des TPCs und TFCs sowie die Untersuchung der Extrakte in den vier *in vitro*-Enzyminhibitionsassays (α -Glucosidase, α -Amylase, DPP IV, GP α) untersucht.

Die in **Teil II** dieses Kapitels beinhaltete Publikation Becker *et al.*, 2022 b umfasst die Charakterisierung der BSG-Extrakte HE1–HE6, HA1–HA3 und A1–A7 mittels Massenspektrometrie und HPLC-DAD mit dem Ziel der Identifikation der bioaktiven Komponenten in den Extrakten.

Im Rahmen der Analyse der Extrakte HE1–HE6, HA1–HA3 und A1–A7 wurden verschiedene Inhaltsstoffe detektiert, welche teilweise nicht kommerziell erhältlich waren.

So waren in Extrakten A1–A7 Phenolamide, v.a. Hordatine enthalten, deren Isolierung, Charakterisierung und Untersuchung ihrer biologischen Aktivität gegenüber α -Glucosidase und GP α in **Teil III** in Publikation Becker *et al.*, 2022 a beschrieben sind.

Als relevante Inhaltsstoffe in den Extrakten HE1–HE6, HA1–HA3 wurden neben monomeren HCAs DiFAs identifiziert. Ihre Isolierung aus BSG, Charakterisierung mittels Massenspektrometrie und die Untersuchung des inhibitorischen Potentials gegenüber α -Glucosidase und GP α wird in **Teil IV** beschrieben.

Einige Inhaltsstoffe konnten mittels einer Reinsubstanz anhand der R_f und charakteristischen Fragmentierung identifiziert werden. Um ihren Einfluss auf die beiden Enzyme α -Glucosidase und GP α zu untersuchen, wurden die identifizierten Reinsubstanzen in den beiden Enzyminhibitionsassays untersucht, was in **Teil V** dargestellt ist.

4.1 Publikation 1: Influence of Brewer's Spent Grain Compounds on Glucose Metabolism Enzymes

Einleitung

Alternative Nutzungsmöglichkeiten landwirtschaftlicher Abfälle und Nebenprodukte rückten in den letzten Jahren besonders angesichts der Fragestellung nachhaltiger Lebensmittelproduktion in den Fokus der Forschung [Ben-Othman *et al.*, 2020]. BSG stellt mit 39 Millionen Tonnen weltweiter Produktion jährlich das Hauptabfallprodukt der Bierherstellung dar und wurde bislang aufgrund seines ernährungsphysiologisch wertvollen hohen Protein- und Ballaststoffgehaltes vorwiegend als Viehfutter genutzt. Doch auch Anwendungsmöglichkeiten für die menschliche Ernährung wie die Erhöhung des Ballast- und Nährstoffgehaltes in Pasta, proteinreicher Snacks oder gebackener Waren sind Gegenstand aktueller Studien [Mussatto, 2014; Pratap Singh *et al.*, 2020; Sahin *et al.*, 2021; Amoriello *et al.*, 2020]. Als Minorcomponenten finden sich weiterhin Polyphenole wie HCAs in BSG, deren biologische Aktivität bereits mehrfach untersucht wurde. Sie erwiesen sich als potente Inhibitoren der α -Amylase und α -Glucosidase [Adisakwattana *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2012] und eine Beeinflussung des Glykogenstoffwechsels konnte *in vivo* in Ratten beobachtet werden [Narasimhan *et al.*, 2015b]. Proteinhydrolysate aus BSG inhibierten DPP IV als auch α -Glucosidase [Connolly *et al.*, 2014]. Weiterführende Studien zu polyphenolreichen Extrakten aus verschiedenen Extraktionsprozessen hinsichtlich einer Beeinflussung der genannten Enzyme des Glucosestoffwechsels sind derzeit noch nicht publiziert, wobei die vorhandenen Daten weitere Forschungsvorhaben unterstützen.

Zielsetzung

Ziel der Studie war die Herstellung von BSG-Extrakten aus verschiedenen Chargen mittels mehrstufiger Extraktionsprozesse. Neben den unbehandelten BSG-Proben sollten vor Extraktion entfettete BSG-Proben untersucht werden. Durch den Einsatz einer SLE mit 60 %-igem Aceton sowie einer alkalischen Hydrolyse und deren Kombinationen sollte unterschieden werden zwischen freien und gebundenen Polyphenolen. Eine Aufreinigung mittels SPE sowie eine zusätzliche Ethylacetat-Extraktion bei Extrakten aus alkalischer Hydrolyse gewährleistete die Entfernung interferierender Substanzen für die biologischen Enzymassays. Die erhaltenen Extrakte (**HA**=SLE mit 60 %-igem **Aceton** des Rückstands aus alkalischer **Hydrolyse**, **HE**=alkalische **Hydrolyse** gefolgt von **EtOAc**-Extraktion und **A**= SLE mit 60 %-igem **Aceton**; vgl. Schema S1 im Zusatzmaterial der Publikation 1 *supplement material*) sollten im Anschluss auf ihren TPC und TFC sowie hinsichtlich einer inhibierenden Wirkung auf α -Glucosidase, α -Amylase, DPP IV und GP α untersucht werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Aus drei verschiedenen BSG-Chargen (BSG 1 (BioVT TUK): ca. 50 % Weizenmalz/50 % Pilsner Malz, BSG 2 (BioVT TUK): 100 % Weyermann® Vienna Malz und BSG 3 (Orval Brauerei, Florenville): 90 % Pilsner Malz, 9 % Karamell-Malz und 1 % gerösteter und geschälter Gersten), welche aus unterschiedlichen Brauprozessen und Rohstoffen stammten (vgl. Tabelle 1 in Publikation 1) konnten insgesamt 16 Extrakte (A1–A7, HA1–HA3, HE1–HE6) hergestellt werden. Aus der klassischen SLE mit 60 % -igem Aceton ergaben sich die A-Extrakte, aus dem alkalischen Aufschluss die HE-Extrakte und aus der Extraktion mit 60 %-igem Aceton eines

Rückstands des alkalischen Aufschlusses die HA-Extrakte. Durchschnittlich war die Ausbeute bei allen drei Extraktgruppen mit 0,8–3,5 g/100 g BSG gering was auch auf die durchgeführte SPE zurückgeführt wurde. Alle Extrakte enthielten detektierbare Mengen an Phenolen (TPC), wohingegen nur einige Extrakte (A4–A5, A7, HE1–HE6, HA3) Flavonoiden (TFC) enthielten. Allerdings waren deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Extraktgruppen ersichtlich. So enthielten die HE-Extrakte signifikant höhere TPC und größtenteils TFC als die vergleichbaren HA- und A-Extrakte. Hierbei waren die TFC-Gehalte durchschnittlich dreimal geringer als die TPC-Werte. Dies lässt sich u.a. auf die spezifischere Methodik des TFC-Assays im Vergleich zum TPC-Assay zurückführen und der Trend wurde in vergleichbaren Studien beobachtet [Stefanello *et al.*, 2018]. Ein ähnliches Bild zeichnete sich bzgl. beider Gehalte in Relation der Werte zur Trockenmasse BSG. Weiterhin zeigte sich, dass Extrakte aus entfetteten BSG-Proben (A5, A7, HE6) höhere TPC und TFC (außer für A7) als die vergleichbaren Extrakte aus nicht entfetteten BSG-Proben (A4, A6, HE5) aufwiesen, was von Stefanello *et al.* zuvor beschrieben wurde [Stefanello *et al.*, 2018]. Hinsichtlich der verschiedenen Chargen waren die Unterschiede geringer ausgeprägt. Tendenziell zeigten Extrakte aus BSG 3 (171215, Brauerei Orval) die niedrigeren Gehalte im Vergleich zu den beiden anderen Chargen. Da der Gesamtphenolgehalt stark vom Brauprozess und den verwendeten Ausgangsmaterialien abhängt könnten die beobachteten Unterschiede auf die unterschiedlichen Prozesse zurückgeführt werden. Beispielsweise führen höhere Temperaturen während des Darrens u.U. zur Bildung von Melanoidinen, welche zu höheren TPC-Gehalten führen können [Birsan *et al.*, 2019]. Neben den verschiedenen Brauprozessen könnten unterschiedliche Lagerung vor Lyophilisierung der drei Chargen zu Veränderungen der Gehalte führen, da BSG mikrobiell anfällig ist [Bianco *et al.*, 2020].

Hinsichtlich der biologischen Aktivität zeigte sich im α -Glucosidase- und GP α -Assay ein inhibitorisches Potential, wohingegen im α -Amylase- und DPP IV-Inhibitionsassays keine Inhibition oder lediglich ohne biologische Relevanz beobachtet wurde.

Alle Extrakte führten zu keiner ausgeprägten Inhibition der **α -Amylase**, sodass keine IC₅₀-Werte bestimmt werden konnten. So konnte kein Effekt durch HE- und HA-Extrakte sowie geringe Inhibition (< 50 % in höchster Extraktkonzentration von 1050 μ g/mL) durch A-Extrakte beobachtet werden. In Bezug auf die **DPP IV** zeigte sich, dass alle HE-Extrakte sowie A7 und HA3 zu einer Inhibition des Enzyms mit IC₅₀-Werten zwischen 291–778 μ g/mL führte. Allerdings lagen diese um einen Faktor von etwa 10⁶ höher als die der PK mit 5,5 ng/mL, was die Relevanz der Ergebnisse für einen Effekt im menschlichen Körper deutlich abschwächt.

Im **α -Glucosidase**-Inhibitionsassay zeigten verschiedene Extrakte, v.a. A-Extrakte (A2–A7) sowie HE4 und HE5 mit IC₅₀-Werten zwischen 67–268 μ g/mL eine vergleichbare Inhibitionsstärke wie die PK Acarbose. Zudem konnte eine signifikant potentere Inhibition durch die A-Extrakte aus entfetteten BSG-Proben (A5, A7) als die vergleichbaren nicht zuvor entfetteten Proben (A4, A6) beobachtet werden. Vergleichbare Studien wurden von Donkor *et al.* und Ramakrishna *et al.* mit Extrakten (SLE mit organischen Lösungsmitteln) aus gekeimter und ungekeimter Gerste durchgeführt [Ramakrishna *et al.*, 2017; Donkor *et al.*, 2012]. In beiden Studien war die α -Glucosidase-Inhibition weniger potent und die TPC-Werte geringer als in unserer vorliegenden Studie. Allerdings unterliegt BSG im Vergleich zu (un)gekeimter Gerste weiteren Prozessschritten, was zu Unterschieden in der Zusammensetzung der finalen Extrakte führen kann. Eine eindeutige Korrelation der

Inhibitionsstärke mit dem TPC und TFC konnte nicht beobachtet werden. Die A-Extrakte als potenteste Inhibitoren wiesen signifikant geringere TPCs ($24,6 \pm 3,3$ bis $107,2 \pm 15,8$ $\mu\text{g GÄq/mg Extrakt}$) als die weniger inhibierenden HE-Extrakte ($157,5 \pm 13,0$ bis $351,5 \pm 20,7$ $\mu\text{g GÄq/mg Extrakt}$) auf. Hinsichtlich der GP α führten alle untersuchten Extrakte (A3–A7, HE1–HE5, HA1–HA2) zu einer Inhibition des Enzyms, wobei manche Extrakte (A1, HE6, HA3) aufgrund ihrer Löslichkeit nicht untersucht werden konnten. Die Inhibitionsstärke variierte deutlich (IC₅₀-Werte zwischen 12,6–261 $\mu\text{g/mL}$) war jedoch tendenziell stärker für HA- und A-Extrakte als für HE-Extrakte. Hier zeigte sich erneut, dass die zuvor entfetteten BSG-Proben zu hemmenderen Extrakten führte (A5, A7). Die beiden A-Extrakte fallen aufgrund ihres zehnfach höheren Effektes als die PK Koffein auf. Wie bei der α -Glucosidase-Inhibition konnte für die GP α -Inhibition keine Korrelation mit den TPC- und TFC-Werten festgestellt werden. Eine Beeinflussung der GP α ist aufgrund ihrer verschiedensten Bindungsstellen durch eine Vielzahl an chemischen Strukturen möglich [Nagy *et al.*, 2020]. Extrakte als komplexe Stoffgemische können daher viele mögliche Inhibitoren enthalten. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die SLE in Kombination mit im Vorfeld durchgeführter Entfettung des Rohmaterials die potentesten GP α -Inhibitoren extrahiert.

Fazit

Die Ergebnisse zeigen, dass BSG eine Quelle für Inhibitoren einiger Enzyme des Glucosestoffwechsels, v.a. α -Glucosidase und GP α darstellen kann. Hinsichtlich der α -Amylase konnten keine potenten BSG-Extrakte identifiziert werden und die Inhibition der DPP IV erwies sich hinsichtlich der Inhibitionsstärke im Vergleich zur PK Sitagliptin nicht als biologisch relevant. Jedoch waren hinsichtlich der α -Glucosidase besonders die A-Extrakte (vergleichbare Inhibition wie die PK Acarbose) sowie die HA- und A-Extrakte gegenüber der GP α potente Inhibitoren (bis zu zehnmal potenter als die PK Koffein). Die detektierten TPC und TFC-Gehalte waren im Vergleich zur Literatur gering (TPC: $24,6 \pm 3,3$ bis $351,5 \pm 20,7$ $\mu\text{g GÄq/mg Extrakt}$; TFC: nicht nachweisbar bis $93,6 \pm 2,9$ $\mu\text{g CÄq/mg Extrakt}$), allerdings wurden bislang keine vergleichbaren Extraktionen mit ausgeprägter Aufreinigung mittels SPE durchgeführt. Diese könnte die geringen Ausbeuten und TPC-Gehalte erklären. Die deutlich höheren TPC-Gehalte der HE-Extrakte bestätigen jedoch, dass besonders die gebundenen Polyphenole im BSG zu dem Gehalt beitragen und weniger die freien Polyphenole.

Da sich keine klare Korrelation der Ergebnisse in den Enzyminhibitionsassays mit den TPCs und TFCs in den Extrakten ergab, waren weitere Untersuchungen wie HPLC-DAD- oder HPLC-MS/MS-Experimente zur Identifikation der aktiven Inhaltsstoffe notwendig. Es zeigte sich, dass die durchgeführte Extraktionsmethodik für die Inhibitionsstärke sowie den TPC- und TFC-Gehalt von deutlich größerer Bedeutung als die verwendete BSG-Charge, der angewandte Brauprozess oder das eingesetzte Malz ist. Leichte Unterschiede zwischen den Chargen wurden festgestellt, waren jedoch nicht derart ausgeprägt wie die Unterschiede, welche durch die Extraktionsmethodik erhalten wurden.

Veröffentlichtes Manuskript

Article

Influence of Brewer's Spent Grain Compounds on Glucose Metabolism Enzymes

Daniela Becker ^{*}, Tamara Bakuradze, Marcel Hensel, Simone Beller, Carolina Corral Yélamos and Elke Richling ^{*} 

Department of Chemistry, Division of Food Chemistry and Toxicology, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Straße 52, 67663 Kaiserslautern, Germany; bakuradze@chemie.uni-kl.de (T.B.); mhensel@rhrk.uni-kl.de (M.H.); sbeller@rhrk.uni-kl.de (S.B.); carolinacorralyelamos@gmail.com (C.C.Y.)

^{*} Correspondence: beckerda@rhrk.uni-kl.de (D.B.); richling@chemie.uni-kl.de (E.R.)

Abstract: With a yearly production of about 39 million tons, brewer's spent grain (BSG) is the most abundant brewing industry byproduct. Because it is rich in fiber and protein, it is commonly used as cattle feed but could also be used within the human diet. Additionally, it contains many bioactive substances such as hydroxycinnamic acids that are known to be antioxidants and potent inhibitors of enzymes of glucose metabolism. Therefore, our study aim was to prepare different extracts—A1-A7 (solid-liquid extraction with 60% acetone); HE1-HE6 (alkaline hydrolysis followed by ethyl acetate extraction) and HA1-HA3 (60% acetone extraction of alkaline residue)—from various BSGs which were characterized for their total phenolic (TPC) and total flavonoid (TFC) contents, before conducting in vitro studies on their effects on the glucose metabolism enzymes α -amylase, α -glucosidase, dipeptidyl peptidase IV (DPP IV), and glycogen phosphorylase α (GP α). Depending on the extraction procedures, TPCs ranged from 20–350 μ g gallic acid equivalents/mg extract and TFCs were as high as 94 μ g catechin equivalents/mg extract. Strong inhibition of glucose metabolism enzymes was also observed: the IC₅₀ values for α -glucosidase inhibition ranged from 67.4 \pm 8.1 μ g/mL to 268.1 \pm 29.4 μ g/mL, for DPP IV inhibition they ranged from 290.6 \pm 97.4 to 778.4 \pm 95.5 μ g/mL and for GP α enzyme inhibition from 12.6 \pm 1.1 to 261 \pm 6 μ g/mL. However, the extracts did not strongly inhibit α -amylase. In general, the A extracts from solid-liquid extraction with 60% acetone showed stronger inhibitory potential towards α -glucosidase and GP α than other extracts whereby no correlation with TPC or TFC were observed. Additionally, DPP IV was mainly inhibited by HE extracts but the effect was not of biological relevance. Our results show that BSG is a potent source of α -glucosidase and GP α inhibitors, but further research is needed to identify these bioactive compounds within BSG extracts focusing on extracts from solid-liquid extraction with 60% acetone.

Keywords: brewer's spent grain; glucose metabolism; bioactives; polyphenols



Citation: Becker, D.; Bakuradze, T.; Hensel, M.; Beller, S.; Yélamos, C.C.; Richling, E. Influence of Brewer's Spent Grain Compounds on Glucose Metabolism Enzymes. *Nutrients* **2021**, *13*, 2696. <https://doi.org/10.3390/nu13082696>

Academic Editors: Alessandra Napolitano and Begoña Bartolomé

Received: 12 July 2021

Accepted: 2 August 2021

Published: 4 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In recent decades, there has been growing interest in the valorization of agri-food waste and agricultural by-products as a way of achieving sustainable food production. At present, such by-products are mainly used as fuels, organic fertilizers, or animal feed. However, they could also be valuable sources of bioactive compounds. Consequently, there is ongoing research on their potential uses in the pharmaceutical industry and in functional foods [1]. One byproduct available in very large quantities is brewer's spent grain (BSG), the solid fraction of barley malt remaining after wort production; up to 39 million tons of BSG are produced annually, with 3.4 million tons being generated within the European Union (EU) [2,3]. It is reported to be rich in protein (19–30% *w/w*) and fiber (30–50% *w/w*) and is therefore currently used as a low-cost cattle feed, but it could also be used to improve the nutritional value of human food products. Recently, Pratap Singh et al. tested different drying methods of BSG to find a sustainable and sensory appealing method

with the aim of using BSG as protein rich snack [4]. Sahin et al. investigated two protein or fiber rich products prepared from BSG in enhancing the nutritional value of pasta or even improving the pasta quality [5]. Further studies also have investigated its use as an additive to increase the mineral, protein, and fiber content of baked foods [6,7]. BSG also contains relatively large quantities of lipids and polyphenols, mainly hydroxycinnamic acids, but also lignans, hydroxybenzoic acids, and flavonoids such as catechins [8–11]. It is particularly rich in hydroxycinnamic acids, which form part of the cell wall structure and can be released in concentrations of about 220 mg/100 g BSG by alkaline treatment [8]. The antioxidant activity of such polyphenols has been studied extensively in vitro and in vivo, and their effects have been attributed to factors including their radical scavenging ability, modulation of enzymatic activity, and ability to affect signal transduction pathways [12–14]. In addition, hydroxycinnamic acids have been found to inhibit glucose metabolism enzymes such as α -amylase and α -glucosidase [15–17], making them an attractive research topic due to increasing incidence and prevalence of diabetes type 2 [18]. For instance, some cinnamic acid derivatives were shown to be potent inhibitors of α -glucosidase from yeast and rat in vitro [15,16,19], and of pancreatic porcine α -amylase [17]. These enzymes play important roles in digestion of nutritional polysaccharides; their inhibition reduces glucose liberation and thus lowers blood glucose levels. α -Amylase is found in the saliva and the duodenum, and catalyzes the hydrolysis of α -1,4-glucan bonds in starch, maltodextrins, and malto-oligosaccharides. This is followed by a hydrolytic reaction that liberates α -glucose from the non-reducing end of α -glucose residues, which is catalyzed by α -glucosidase in the small intestine. Both enzymes are already pharmaceutical targets in the treatment of diabetes type 2, as exemplified by the anti-diabetic agent Acarbose [19]. Additionally, a strong in vivo antidiabetic effect was observed in a 30-day feeding study in which type 2 diabetic rats were given 50 mg ferulic acid/kg body weight. Various mechanisms were hypothesized to explain this outcome, including enhancement of insulin signaling and inhibition of gluconeogenesis [20]. Strong antidiabetic effects were also observed in another 30-day feeding study with 50 mg ferulic acid/kg body weight in type 2 diabetic rats, and it was shown that the treatment affected the activity of various glycogen metabolism enzymes including glycogen synthase (GS), glucokinase (GK), and glycogen phosphorylase (GP). Diabetic animals exhibit reduced activity of glycogenesis enzymes (GS and GK) and elevated activity of those involved in glycogenolysis (GP); these activity levels were normalized by ferulic acid to a degree similar to that induced by treatment with the antidiabetic drug metformin. Inhibition of GP in the liver is a potent target for the management of type 2 diabetes [21]. Whole grain was also found to influence glucose metabolism in humans: a wholegrain cereal-based diet reduced postprandial insulin and triglyceride levels in men and women with metabolic syndrome [22]. Furthermore, protein hydrolysates made from BSG using different enzyme preparations, were proven to be potent inhibitors of α -glucosidase and dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) in vitro. DPP IV plays an important role in insulin secretion because it catalyzes the degradation of the incretin hormone glucagon-like peptide-1 (GLP-1), which stimulates post nutrient insulin secretion and thus facilitates glucose uptake into cells. DPP IV inhibitors such as Sitagliptin, which is an active ingredient in diabetes drugs, thus reduce GLP-1 degradation and thereby indirectly enhance cellular glucose uptake [23]. We therefore investigated the effect of BSG extracts on human glucose metabolism. Extracts prepared by conventional solid-liquid extraction with 60% acetone were compared to extracts prepared by alkaline hydrolysis, which reportedly releases bound phenolic acids [8]. The total phenolic (TPC) and total flavonoid (TFC) content of each extract was determined by photometric methods and their ability to inhibit the digestive enzymes α -amylase and α -glucosidase, DPP IV (an indirect modulator of insulin secretion), and the glycogen metabolism enzyme GP α was investigated in vitro, representing some parts of the human glucose metabolism.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Enzymes

Chemicals were of analytical grade and obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) unless otherwise stated. Sodium dihydrogen phosphate dihydrate was purchased from Riedel de Haen (Berlin, Germany). Magnesium sulfate heptahydrate, disodium hydrogen phosphate monohydrate, and potassium hydrogen phosphate were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). NADP disodium salt as well as glycogen from oysters and TRIS HCl were from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). DMSO was obtained from J&K Scientific (Marbach/Neckar, Germany). Hydrochloric acid (HCl) and ethanol were purchased from CHEMSOLUTE[®], Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Germany). Methanol, acetonitrile, and acetone (HiPerSolv CHROMANORM per HPLC) were obtained from VWR (Darmstadt, Germany). Gallic acid and glucose-6-phosphate-dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* (G6PDH, EC 1.1.1.49) were purchased from Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA) and formic acid from J.T. Baker (Radnor, Pennsylvania). Ethyl acetate was obtained from Honeywell (Morristown, NJ, USA) and strata C18-E SPE (solid phase extraction) cartridges (55 μ m, 70 Å; 20 g/60 mL) were purchased from Phenomenex (Torrance, CA, USA). 2-Chloro-4-nitrophenyl- α -D-malto-trioside (CNPG3) and Gly-Pro-7-amido-4-methylcoumarin hydrobromide (H-Gly-Pro-AMC) were obtained from Carbosynth (Berkshire, United Kingdom). 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) was purchased from Acros Organics (Fair Lawn, New Jersey). Human dipeptidyl peptidase IV, native enzyme (DPP IV, EC 3.4.14.5) was purchased from Active Bioscience (Hamburg, Germany). The drugs used as positive controls were Januvia 100 mg in which the active compound is Sitagliptin from MSD (Haar, Germany) and Glucobay[®]100 in which Acarbose is the active compound from Bayer Pharmaceuticals (Leverkusen, Germany). α -Amylase from hog pancreas (EC 3.2.1.1), glycogen phosphorylase α from rabbit muscle (GP α , EC 2.4.1.1.1), α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.20), and phosphoglucomutase from rabbit muscle (PGM, EC 5.4.2.2) were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany).

2.2. Plant Material

Three different batches of Brewer's spent grain (BSG) were provided by the conventional Orval brewery in Belgium (Florenville, Belgium, BSG 3) and the brewing group of the chair of bioprocess engineering at the Technische Universität Kaiserslautern (Kaiserslautern, Germany; BSG 1,2). The malt used for each brewing process is specified in Table 1. The BSG samples were lyophilized, finely ground with a grain mill, and stored at -20 °C before extraction.

Table 1. Brewer's spent grain (BSG) samples and malt used for brewing.

| BSG | Malt Used for Brewing |
|-----|---|
| 1 | Wheat malt (54.3%), Pilsen malt (45.7%) |
| 2 | Weyermann [®] Vienna Malt (100%) |
| 3 | Pilsen malt (90%), caramel malt (9%), peeled, roasted barley (1%) |

2.3. Preparation of Extracts

Three different extraction processes were used including solid-liquid extraction with 60% acetone [24] or ultrasound-assisted alkaline hydrolysis with sodium hydroxide (4 M) [25]. Purification was done by ethyl acetate extraction [26] and solid phase extraction (SPE) with C18e material [27]. In total, seven A (acetone) extracts were prepared by solid-liquid extraction with 60% acetone (acetone/water: 60/40; *v/v*), six HE (hydrolysis and ethyl acetate) extracts were prepared by alkaline hydrolysis followed by ethyl acetate extraction, and three HA (hydrolysis and acetone) extracts were prepared by alkaline hydrolysis followed by 60% acetone (acetone/water: 60/40; *v/v*) extraction (Table 2). Each extraction process was performed independently and numbering of extracts refers to the extraction

process carried out. An overview of the extraction processes is presented in the supplements (Scheme S1). Additionally, some BSG samples were defatted before extraction. This was done by reflux extraction with isopropanol overnight in a ratio of 1 g solid per 11 mL of extraction solvent.

Table 2. Overview of the extract groups.

| Extracts | | |
|--|---|--|
| 60% acetone extraction | hydrolysis and ethyl acetate extraction | 60% acetone extraction of hydrolysis residue |
| purification by solid phase extraction | | |
| A1-A7 | HE1-HE6 | HA1-HA3 |

2.3.1. First Extraction Process

The three different BSG samples (BSG 1-3) were extracted twice with 60% acetone (acetone/water: 60/40; *v/v*) at 60 °C for 30 min while stirring in a ratio of 1 g solid per 20 mL extraction solvent. The solid residues were separated from the liquid supernatants by filtration, and the residues and filtrates were processed independently thereafter.

After filtration, acetone was removed from the filtrates by rotary evaporation under reduced pressure at 40 °C. The viscous residues were transferred to water (around 50 mL) and methanol was added (around 5 mL) to produce the ‘liquid’ raw extracts A1-A3. These were stored in the dark at −20 °C until purification (see Section 2.3.4).

The solid residues of the initial filtration process were subjected to alkaline hydrolysis. For this purpose, 4 M NaOH was mixed with the samples in a ratio of 1 g solid per 27 mL NaOH and extraction was performed for 90 min in an ultrasonic bath (continuous operation, filled with water until samples were completely covered, 240 watts/period; Bandelin Sonorex RK 106, Bandelin, Berlin, Germany). Afterwards the samples were centrifuged (10 min, 2000× *g*) and the supernatants were adjusted to a pH ≤ 2 with concentrated hydrochloric acid (HCl). The samples were then centrifuged again (10 min, 2000× *g*) and the supernatants were extracted three times with 200 mL of ethyl acetate, which was then removed by rotary evaporation under reduced pressure at 40 °C. The viscous residues were transferred to water (around 50 mL), methanol was added (around 5 mL) to obtain ‘liquid’ raw extracts HE1-HE3, and they were stored in the dark at −20 °C before purification by SPE (see Section 2.3.4).

2.3.2. Second Extraction Process

Two different BSG samples (BSG 2 + 3) and one BSG sample previously defatted with isopropanol (BSG 3) were subjected to alkaline hydrolysis with 4M NaOH at a ratio of 1 g solid per 10 mL solvent over 90 min in an ultrasonic bath (continuous operation, filled with water until samples were completely covered, 240 watts/period; Bandelin Sonorex RK 106, Bandelin, Berlin, Germany). The solid residues were separated from the liquid supernatants by filtration, and the filtrates and residues were processed independently thereafter.

The filtrates were adjusted to a pH ≤ 2 with concentrated HCl and then filtered, after which the resulting filtrates were extracted three times with 325 mL of ethyl acetate. The extraction solvent was then removed by rotary evaporation under reduced pressure at 40 °C. The viscous residues were transferred to water (around 50 mL) and methanol was added (5 mL) to obtain the ‘liquid’ raw extracts HE4-HE6. These were stored in the dark at −20 °C until purification by SPE (see Section 2.3.4).

The solid residues of the alkaline hydrolysis were twice subjected to solid-liquid extraction with 60% acetone (acetone/water: 60/40; *v/v*) at a ratio of 1 g solid per 10 mL of extraction solvent at 60 °C (first for 30 min, then overnight) by stirring. Afterwards, the combined acetone phases were adjusted to a pH ≤ 2 with concentrated HCl, the samples were filtered, and the extraction solvent was removed by rotary evaporation under reduced pressure at 40 °C. Again, the viscous residues were transferred to water (around 50 mL)

and methanol was added (around 5 mL) resulting in ‘liquid’ raw extracts HA1-HA3 that were stored in the dark at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until purification by SPE (see Section 2.3.4).

2.3.3. Third Extraction Process

A third extraction process similar to extraction process 1 was also used. Few modifications were included regarding the grinding grade of the BSG samples as well as the extraction volume used. Two BSG samples (BSG 2 + 3) and two defatted BSG samples (BSG 2 + 3) were milled into a powder and then subjected to solid-liquid extraction with 60% acetone (acetone/water: 60/40; *v/v*). A ratio of 1 g solid per 10 mL extraction solvent was used and extraction was performed twice for 30 min each at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ under stirring. The samples were then filtered and the extraction solvent of the filtrates was removed by rotary evaporation under reduced pressure at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. The viscous residues were transferred to water (around 50 mL) and methanol was added (around 5 mL), giving the ‘liquid’ raw extracts A4-A7. These extracts were stored in the dark at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until purification by SPE (see Section 2.3.4).

2.3.4. Purification by Solid Phase Extraction (SPE)

The ‘liquid’ raw extracts obtained after extraction processes 1–3 (A1-A7, HE1-HE6, HA1-HA3) were purified by applying a modified variant of a previously reported solid phase extraction (SPE) method [27] using Strata C18-E g/60 mL cartridges from Phenomenex (Torrance, California) preconditioned with 120 mL of 1% acetic acid in methanol and equilibrated with 120 mL of aqueous 1% acetic acid. The liquid raw extracts were transferred onto the preconditioned cartridges and washed with 180 mL of 1% aqueous acetic acid. Unless the washing solution was clear, the cartridges were then washed with a further 180 mL of 1% aqueous acetic acid. Elution was performed with 60–90 mL of 1% acetic acid in methanol. The amount of elution solvent depended on the extent to which the sample had adsorbed onto the C18e material. Finally, the sample volume was reduced by vacuum centrifugation and the samples were transferred into double distilled water before lyophilization. The extracts obtained after lyophilization (Table 3) were homogenized and stored in the dark at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Yields are given in Section 3.1.

Table 3. Overview and nomenclature of produced extracts (purified by SPE (solid phase extraction) and lyophilized).

| Raw | Process 1 | | Process 2 | | Process 3 |
|----------------|--|--|--|--|------------------------|
| Material Used | First Step: | Second Step: | First Step: | Second Step: | |
| 2-6 | 60% Acetone Extraction | Alkaline Hydrolysis + Ethyl Acetate Extraction | Alkaline Hydrolysis + Ethyl Acetate Extraction | 60% Acetone Extraction of Alkaline Residue | 60% Acetone Extraction |
| 2-6 | Purification by Solid Phase Extraction | | | | |
| BSG 1 | A1 | HE1 | - | - | - |
| BSG 2 | A2 | HE2 | HE4 | HA1 | A4 |
| BSG 2 defatted | - | - | - | - | A5 |
| BSG 3 | A3 | HE3 | HE5 | HA2 | A6 |
| BSG 3 defatted | - | - | HE6 | HA3 | A7 |

2.4. Total Phenolic Content (TPC)

The total phenolic content (TPC) of the extracts was determined by the spectrophotometric method of Folin-Ciocalteu [28,29] with slight modifications. A calibration curve was generated using reference solutions of gallic acid in dimethyl sulfoxide (DMSO) with concentrations ranging from 20–200 $\mu\text{g/mL}$ gallic acid. In brief, 10 μL of diluted extract (500 $\mu\text{g/mL}$), gallic acid solution, or DMSO (negative control) and 100 μL of 10% Folin-Ciocalteu reagent were mixed in a 96-well microplate. The samples were incubated for

5 min at room temperature after which 80 μ L of sodium carbonate solution (100 g/L) or 80 μ L of double distilled water (blank) was added. After 2 h incubation in the dark at room temperature, the absorbance at $\lambda = 750$ nm was measured with a microplate reader (Biotek, Bad Friedrichshall, Germany). The TPC was expressed in units of micrograms of gallic acid equivalents per milligram of dry extract (μ g GEq/mg extract).

2.5. Total Flavonoid Content (TFC)

The total flavonoid content (TFC) of the extracts was determined by a modified aluminum chloride assay [30]. A calibration curve was generated using reference solutions of catechin in DMSO with concentrations ranging from 20–200 μ g/mL catechin. In brief, 50 μ L of diluted extract (1–5 mg/mL), reference catechin solution, or DMSO (negative control) was added to a well in a 96-well microplate. Aqueous sodium nitrite solution (3%, 20 μ L) was then added and the samples were incubated in darkness for 5 min at room temperature. Subsequently, 20 μ L of an aqueous aluminum chloride solution (2%) or double distilled water (blank) was added together with 120 μ L of double distilled water, and the sample was again incubated for 6 min in darkness. Its absorption at $\lambda = 510$ nm was then measured with a microplate reader (Biotek, Bad Friedrichshall, Germany) and the resulting absorptions were used as blank values. Finally, 20 μ L of sodium hydroxide solution (1 M) was added and the microplate was incubated on a well plate shaker for 20 min. The absorption at $\lambda = 510$ nm was then measured once again and the blank values were subtracted. The TFC was expressed in units of micrograms of catechin equivalent per milligram of dry extract (μ g CEq/mg extract).

2.6. Inhibition of α -amylase

The α -amylase inhibition assay was based on previously described spectrophotometric methods [31,32]. Samples were measured in triplicate. Acarbose (five concentrations ranging from 0.15–0.55 mg/mL in double distilled water) was used as a positive control, while double distilled water and DMSO were used as negative controls. Extracts were dissolved in DMSO; the highest tested concentration was 10 mg/mL. Briefly, 20 μ L of the sample, the positive control, and the negative control were transferred to a 96-well microplate and were each mixed with 70 μ L of porcine pancreatic α -amylase (30 U/mL) dissolved in 40 mM phosphate buffered saline (PBS, pH 6.9). Each sample was analyzed alongside a blank (which was mixed with PBS instead of the enzyme solution), allowing each sample's intrinsic colors to be accounted for during the inhibition calculation. The samples were pre-incubated for 10 min at 37 °C followed by the addition of 100 μ L substrate solution consisting of 4 mM 2-chloro-4-nitrophenyl- α -D-malto-trioside (CNPG3) in 40 mM PBS (pH 6.9). The mixtures were then incubated for 8 min at 37 °C and their absorbance was measured at $\lambda = 405$ nm using a microplate reader (Biotek, Bad Friedrichshall, Germany). Concentrations and IC₅₀-values (half-inhibitory concentrations) were calculated relative to the final concentrations in each well.

2.7. Inhibition of α -glucosidase

The α -glucosidase inhibition assay was conducted according to Berger et al. (2020) and You et al. (2011) [31,33]. Samples were assayed in triplicate. Acarbose (five concentrations in double distilled water ranging from 0.4–2 mg/mL) was used as a positive control; double distilled water and DMSO were used as negative controls. Extracts were dissolved in DMSO at a concentration of 10 mg/mL and five different dilutions of these initial solutions (depending on the inhibition strength) were prepared to calculate each extract's IC₅₀ value. Then, 20 μ L of each sample, positive and negative controls, were placed in a well of a 96-well microplate and mixed with 70 μ L of α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* (1 U/mL) dissolved in 0.1 M PBS (pH 6.8). A blank (in which the enzyme solution was replaced by PBS) was analyzed alongside each sample, allowing the samples' intrinsic color to be accounted for in the inhibition calculation. After incubation at 25 °C for 10 min, the substrate solution, 4 mM 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG) in

0.1 M PBS at pH 6.8, was added and the samples were incubated again for 5 min at 25 °C. Finally, the absorbance was measured at $\lambda = 405$ nm using a microplate reader (Biotek, Bad Friedrichshall, Germany). Concentrations and IC_{50} values were calculated relative to the final concentrations in each well.

2.8. Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV)

Inhibition of DPP IV was measured using a modification of the fluorometric method reported by Connolly et al. 2014 [23]. Samples were measured in triplicate. Sitagliptin was used as positive control at five concentrations ranging from 20–60 ng/mL in 20 mM TRIS HCl buffer, pH 8 (TRIS). DMSO and TRIS were used as negative controls. Extracts were dissolved in DMSO at a concentration of 10 mg/mL. Then, 20 μ L of the sample, the positive control, and negative control were transferred to a black 96-well microplate for fluorescence measurement with 60 μ L TRIS and 100 μ L of substrate solution (0.2 mM H-Gly-Pro-AMC in TRIS). DPP IV (20 μ L of a 6 mU/mL solution in TRIS) was then mixed into each sample. A blank (in which the enzyme solution was replaced by TRIS) was analyzed alongside each sample, allowing the samples' intrinsic color to be accounted for in the inhibition calculations. The samples were incubated for 30 min at 37 °C and their fluorescence was read at $\lambda = 360/40$ nm (extinction) and $\lambda 460/40$ nm (emission) using a microplate reader (Biotek, Bad Friedrichshall, Germany). Concentrations and IC_{50} -values were calculated relative to the final concentrations in each well.

2.9. Inhibition of Glycogen Phosphorylase α (GP α)

The extracts' inhibitory potential against GP α was determined by a spectrophotometric method that was adapted for use with 96-well microplates [34]. Each sample was assayed in triplicate. Caffeine solutions (five concentrations in double distilled water ranging from 0.5–2 mg/mL) were used as a positive control; DMSO or double distilled water were used as negative controls. Extracts were dissolved in DMSO at a concentration of 10 mg/mL.

Two buffers were used. Buffer A (3 mM adenosine monophosphate, 40 mM β -glycerophosphate, 8 mM l-cysteine free base at pH 6.8) was used to prepare GP α stock solutions, while Buffer B (20 mM sodium dihydrogen phosphate dihydrate, 2 mM magnesium sulfate heptahydrate; pH 7.2) was diluted with double distilled water and used as the assay buffer.

Stock solutions of the enzymes were prepared as follows: GP α was dissolved in buffer A to a concentration of 5 U/mL. PGM and G6PDH were dissolved in double distilled water to a concentration of 500 U/mL. All three enzyme stock solutions were stored at -80 °C until use.

The assay medium was prepared by mixing 5 U/mL G6PDH, 12 U/mL PGM, and 3.148 mg/mL NADP in assay buffer. The enzyme mix consisted of 93.75 mU/mL GP α and 100 mM glucose in assay buffer. Glycogen was dissolved in assay buffer at a concentration of 2 mg/mL.

For the assay, 20 μ L of the sample (five concentrations depending on inhibition strength), positive control, and negative control were transferred to a 96-well microplate and each mixed with 50 μ L of the assay medium. Each sample was then mixed with 80 μ L of enzyme mix. Each sample was analyzed alongside a blank (100 mM glucose dissolved in buffer B instead of enzyme mix) to allow the samples' intrinsic color to be accounted for when calculating the degree of inhibition. The reaction was started by adding 50 μ L glycogen (2 mg/mL) and the samples were incubated for 30 min at 37 °C. Finally, their absorbance at $\lambda = 340$ nm was measured. Concentrations and IC_{50} values were calculated relative to the final concentrations in each well.

2.10. Statistical Analysis

Results are presented as means and SD of three to 83 independent experiments. Statistical analyses were performed with Origin 2019G (OriginLab, Northampton, MA,

USA) and Excel Office Professional Plus 2016 (Microsoft, Redmond, DC, USA). Data were checked for normality (Anderson Darling test) and homogeneity of variance (Fisher test). The significance of differences from positive controls (DPP IV and GP α inhibition assays), between extraction groups (TPC assay and GP α inhibition assay), and within extraction groups (TPC and TFC assay, GP α and α -glucosidase inhibition assay) was evaluated using the one-sample *t* test (one-sided). Differences were considered significant at the $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$ levels.

3. Results

3.1. Characterization of Extracts

The 16 different extracts (A1-A7, HE1-HE6, HA1-HA3) were prepared from three different BSG batches (numbered 1 to 3) from two different breweries. Two of the samples were defatted with isopropanol before extraction. The extraction processes involving SPE purification provided relatively low yields in the range of 0.8–3.5 g/100 g dried BSG (see Table 4). The yields for the different extraction processes were relatively similar ranging from 0.8 to 2.0 g/100 g dw for HE extracts, 0.8 to 2.3 g/100 g dw for A extracts, and 2.5 to 3.5 g/100 g dw for HA extracts. This might be due to the relatively large number of purification steps (particularly the SPE step), which were needed to concentrate phenolic compounds and to eliminate interfering compounds such as sugars that might be released from the lignocellulosic material.

Table 4. Extraction yields of BSG extracts prepared by SPE purification and lyophilization.

| Extracts from Solid-Liquid Extraction with 60% Acetone | Yield (g/100 g) | Extract from Alkaline Hydrolysis and Ethyl Acetate Extraction | Yield (g/100 g) | Extracts from Extraction with 60% Acetone of Hydrolysis Residue | Yield (g/100 g) |
|--|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|
| A1 | 1.7 | HE1 | 0.8 | HA1 | 2.5 |
| A2 | 1.2 | HE2 | 1.0 | HA2 | 3.0 |
| A3 | 2.3 | HE3 | 2.0 | HA3 | 3.5 |
| A4 | 0.8 | HE4 | 0.9 | - | - |
| A5 | 0.8 | HE5 | 1.6 | - | - |
| A6 | 0.9 | HE6 | 1.0 | - | - |
| A7 | 0.9 | - | - | - | - |

The TPC values of each extract are shown in Figure 1. All extracts contained detectable amounts of phenolic compounds, ranging from 24.6 ± 3.3 to 351.5 ± 20.7 $\mu\text{g GEq/mg}$ extract. The highest TPCs were detected in extracts prepared by alkaline hydrolysis (HE1-HE6), which contained significantly ($p < 0.01$ and $p < 0.001$) more phenolics (157.5 ± 13 to 351.5 ± 20.7 $\mu\text{g GEq/mg}$ extract) than those prepared by solid-liquid extraction with 60% acetone (A1-A7) (24.6 ± 3.3 to 107.2 ± 15.8 $\mu\text{g GEq/mg}$ extract) and those obtained after hydrolysis followed by solid-liquid extraction with 60% acetone (HA1-HA3) (60.5 ± 2.6 to 69.3 ± 6.7 $\mu\text{g GEq/mg}$ extract). Additionally, extracts prepared from previously defatted BSG (A5, A7, HE6) had slightly higher TPCs than those from the corresponding non-defatted BSG samples (A4, A6, HE5); this difference was even significant ($p < 0.001$) for the HE extracts. Extracts prepared from the same BSG batches using different extraction processes also had significantly different TPCs: A2 and A3 had significantly ($p < 0.01$) lower TPCs than A4 and A6. Additionally, HE extracts of the non-defatted BSG 3 sample (HE3, HE5) had significantly lower TPCs ($p < 0.01$ and $p < 0.001$) than all other HE extracts (HE1-HE2, HE4, HE6). In general, extracts of BSG 3 (A3, A6, HE3, HE5, HA2) had lower TPCs than those prepared from other BSG batches independently of the choice of extraction process, while alkaline extracts of BSG 1 (HE1) and BSG 2 (HE2, HE4) had similar TPCs. However, the TPCs of solid-liquid extracts of BSG2 (A2) were almost twice those of BSG1 (A1) leading to the assumption that, besides the extraction process, the BSG batch is also an important factor in terms of TPC.

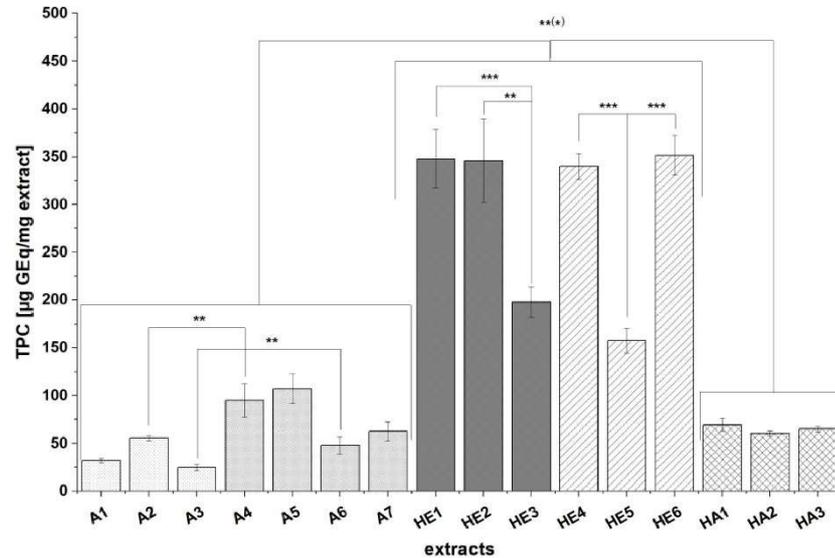


Figure 1. TPC (total phenolic content) of extracts expressed in units of $\mu\text{g GEq/mg extract}$. Values are expressed as means \pm SD of three to five independent experiments each performed in triplicate; significant differences between and within different extract groups were analyzed: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

To compare and discuss our results with literature, the obtained TPC values are related to the yields of the extracts. As our SPE method was only used as a purification step and no single substances were yet identified, no recovery rates were determined. Therefore, the relation to the yields is considered as an estimation giving adjusted TPCs ranging from 0.43 ± 0.08 to 0.86 ± 0.13 mg GEq/g BSG dw for solid-liquid extracts A1-A7, 1.7 ± 0.17 to 2.3 ± 0.11 mg GEq/g BSG for acetone extracts of hydrolysis residues (HA1-HA3), and 2.52 ± 0.21 to 3.96 ± 0.32 mg GEq/g BSG dw for extracts prepared by alkaline hydrolysis (HE1-HE6). The yield-related TPC values maintain nearly the same trend as the extract-related TPCs whereby HA extracts show slightly higher TPC values when related to the yield.

The TFC measurements showed that many extracts (A1-A3, A6, HA1-HA2) had no detectable flavonoid content. The other extracts under study (A4-A6, HE1-HE6, HA3) showed TFCs ranging from 7.6 ± 0.7 to 93.6 ± 2.9 $\mu\text{g CE/mg extract}$ (Figure 2). The trends seen for TPCs were also seen for TFCs: extracts prepared by alkaline hydrolysis (HE1-HE6) had higher TFCs (39.9 ± 4 to 93.6 ± 2.9 $\mu\text{g CE/mg extract}$) than those prepared by solid-liquid extraction (A4-A5, A7; n.d. to 29.6 ± 0.9 $\mu\text{g CE/mg extract}$) or extraction of hydrolysis residues with acetone (HA3; 7.6 ± 0.7 $\mu\text{g CE/mg extract}$). In general, the TFCs were around three times lower than the corresponding TPC which could be due to the greater specificity of the flavonoid assay. Additionally, the TFCs of previously defatted samples (A4, HE5) were higher than those of the corresponding non-defatted samples (A5 and HE6; $p < 0.05$ and $p < 0.001$). and as previously observed for the TPC of acetone extracts of defatted BSG, extracts of the defatted BSG batch 2 (A5) tended to have the highest TFC while those from the defatted BSG batch 3 (A7) had the lowest TFC. As was also the case for TPCs, HE extracts from the non-defatted BSG 3 (HE3 and HE5) had significantly lower TFCs ($p < 0.001$) than all other HE extracts (HE1-HE2, HE4, HE6).

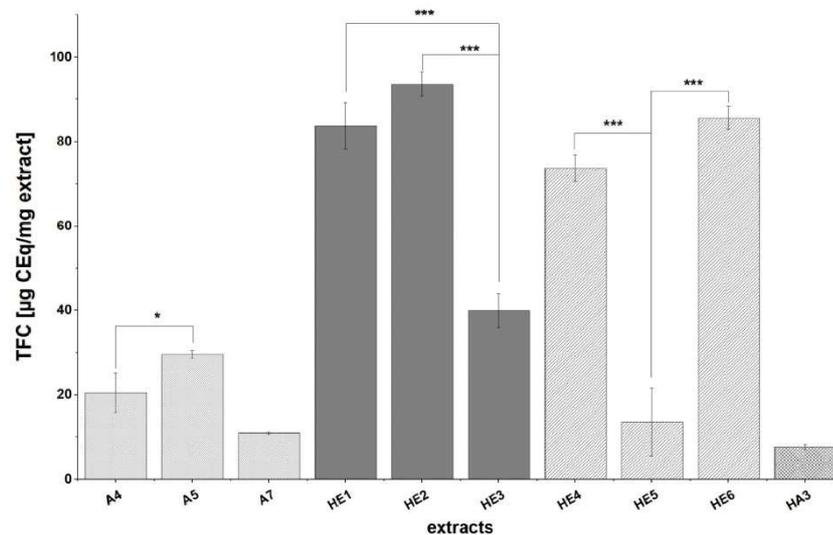


Figure 2. TFC (total flavonoid content) of extracts expressed as $\mu\text{g CEq/mg extract}$. Values are expressed as means \pm SD of three to five independent experiments each performed in triplicate; significant differences within extraction groups are indicated as follows: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

As already performed for the TPC values, TFC values were calculated in relation to extracts 'yield to facilitate comparison with previously reported values. The TFCs obtained in this way ranged from 0.16 ± 0.04 to 0.27 ± 0.02 mg CE/g BSG for acetone extracts (A4, A5, A7), 0.27 ± 0.02 mg CE/g BSG for acetone extracts of alkaline hydrolysis residues (HA3), and 0.22 ± 0.13 to 0.94 ± 0.03 mg CEq/g BSG for ethyl acetate extracts of alkaline hydrolysis solutions (HE1-HE5). The same trend as for TPC values was observed; HE extracts had the highest yield-related TFC whereby HA3 extract showed a slightly higher yield-related than extract-related value.

3.2. Effects on Enzymes of the Glucose Metabolism

The influence of the different BSG extracts on four glucose metabolism enzymes (α -amylase, α -glucosidase, GP α and DPP IV) was investigated in vitro. The extracts' inhibitory potential was compared to that of positive controls and expressed as IC₅₀ values, i.e., the concentration at which the enzyme's activity was reduced by 50% if the inhibition was strong enough to calculate this value. Otherwise, the extract's inhibitory activity was considered slight to moderate.

3.2.1. Inhibition of α -amylase

The effects of the BSG extracts on α -amylase activity were investigated using a spectrophotometric in vitro assay in which the pseudo-tetra-saccharide Acarbose (the active ingredient in the diabetes drug Glucobay®100) was used as positive control; its IC₅₀ value was determined to be 35.5 ± 4.4 $\mu\text{g/mL}$. Most extracts did not detectably inhibit this enzyme even at the highest tested concentration of 1.05 mg/mL (this value represents the final concentration of the extract in the incubation solution). However, extracts prepared by solid-liquid extraction with 60% acetone from BSG 1 and BSG 2 (A1-A2, A4-A5) showed slight to moderate inhibition at 1.05 mg/mL, reducing the enzyme's activity by 23.1 ± 4.2 to $49.7 \pm 12.3\%$ (data not shown); this level of inhibition is too low to permit the calculation of an IC₅₀ value. Generally, there were some notable discrepancies between the extracts of different BSG batches as well as between the extraction processes. In particular, BSG 3 seems to contain no α -amylase inhibitors, which might be related to the malt used in the brewing process. The active compounds that are present may not be liberated by bases;

they appear to be free and easily extractable with 60% acetone since all other extracts (HE and HA) did not show any inhibiting effect.

3.2.2. Inhibition of α -glucosidase

The α -glucosidase-inhibiting potential of the 16 BSG extracts was investigated using the potent inhibitor Acarbose (whose measured IC_{50} value was $156.7 \pm 37.3 \mu\text{g/mL}$) as a positive control. Extracts A2-A7 and HE4-HE5 exhibited strong inhibition of the enzyme, with IC_{50} values ranging from $67.4 \pm 8.1 \mu\text{g/mL}$ to $268.1 \pm 29.4 \mu\text{g/mL}$ (Figure 3). The other extracts (A1, HE1-HE3, HE6, HA1-HA3) caused only slight (data not shown) or no inhibition and their IC_{50} values could not be calculated. In general, most extracts prepared by solid-liquid extraction with 60% acetone (A) showed inhibitory activity, whereas only two HE extracts (prepared by alkaline treatment followed by ethyl acetate extraction) and no HA extracts (prepared by alkaline treatment followed by extraction with 60% acetone) were strong inhibitors. Additionally, extracts prepared from BSG 2 by solid-liquid extraction with 60% acetone (A4, A5) were significantly stronger inhibitors of α -glucosidase than comparable A extracts from BSG 3 (A6, A7) ($p < 0.01$ and $p < 0.001$). A extracts prepared from defatted material (A5, A7) showed stronger inhibition than those prepared from untreated (non-defatted) BSG samples (A4, A6); this difference was statistically significant when comparing A6 and A7 ($p < 0.001$).

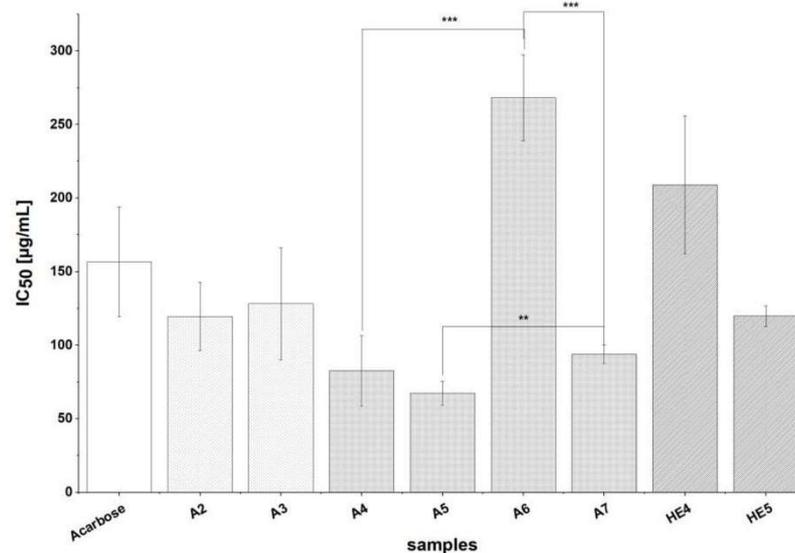


Figure 3. IC_{50} values for the inhibition of α -glucosidase by extracts (A2-A7, HE4-HE5) and the positive control (PC) agent Acarbose. Values are expressed as means \pm SD of three to five independent experiments and 83 for PC each performed in triplicate; significant differences within extraction groups are indicated as follows: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2.3. Inhibition of Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV)

A fluorometric method using Sitagliptin (in the form of 100 mg Januvia) as a positive control was used to investigate the effects of the BSG extracts (except A2) on DPP IV. The positive control agents resulted in a very low measured IC_{50} value of $5.5 \pm 1 \text{ ng/mL}$. All tested extracts inhibited DPP IV at the highest tested concentration of 1 mg/mL. Extracts HE1-HE6 prepared by alkaline hydrolysis and A7 and HA3 (prepared from defatted raw material) strongly inhibited the enzyme, with IC_{50} values ranging from 290.6 ± 97.4 to $778.4 \pm 95.5 \mu\text{g/mL}$, as shown in Figure 4. All extracts had significantly ($p < 0.001$) higher IC_{50} values than the positive control. Extracts A1 and A3-A6 (prepared by solid-liquid

extraction with 60% acetone) and HA1 and HA2 (prepared by acetone extraction of alkaline hydrolysis residues) exhibited slight to moderate inhibition, reducing DPP IV activity by 15.2 ± 4.1 to $49.5 \pm 4.4\%$ at a concentration of 1 mg/mL (data not shown). In general, it was mainly HE extracts which showed potent inhibition, whereby the biological relevance has to be evaluated critically due to the potent inhibition of the diabetes drug Sitagliptin.

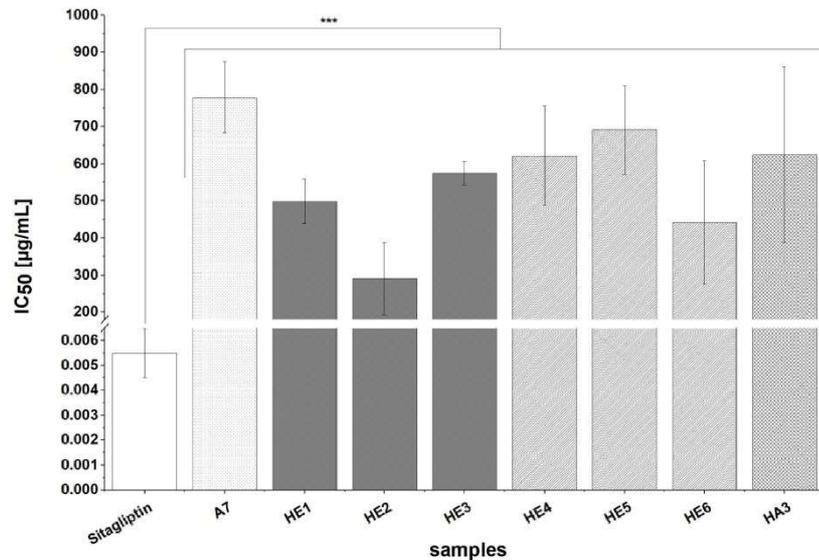


Figure 4. IC₅₀ values for the inhibition of DPP IV by extracts (A7, HE1-HE6, HA3) and the positive control (PC) agent Sitagliptin. Values are expressed as means \pm SD of three to five independent experiments and 35 independent experiments for the PC, each performed in triplicate; significant differences from the PC are indicated by *** $p < 0.001$.

3.2.4. Inhibition of Glycogen Phosphorylase α (GP α)

The inhibitory effects of the BSG extracts (except A2) on GP α were investigated using a spectrophotometric *in vitro* assay in which the potent inhibitor caffeine (IC₅₀ = 128 ± 10 µg/mL) served as a positive control. All of the tested extracts (A3-A7, HE1-HE5, HA1-HA2) strongly inhibited the enzyme, with IC₅₀ values ranging from 12.6 ± 1.1 to 261 ± 6 µg/mL (Figure 5). Extracts A1, HE6 and HA3 were not soluble in the assay medium in the required highest tested concentration of 1 mg/mL, but showed no inhibitory activity at concentrations up to 250 µg/mL. The inhibitory activity of extracts A3-A7, HA1-HA2, and HE1 was significantly stronger than that of the positive control ($p < 0.001$). Furthermore, HE extracts from alkaline hydrolysis (HE2-HE4) were significantly ($p < 0.001$) less inhibiting than all other tested extracts (A3-A7, HA1-HA2, HE1). Additionally, as also seen for the inhibition of α -glucosidase, A extracts made from defatted BSG (A5, A7) were significantly ($p < 0.001$) more potent inhibitors than the corresponding extracts prepared from non-defatted BSG (A4, A6), whereby the difference between the inhibition potential was even higher than as observed for α -glucosidase. In general, extracts prepared by solid-liquid extraction with 60% acetone were more potent regarding the inhibition of GP α than extracts achieved by alkaline hydrolysis (HE extracts). Especially A5 and A7 are of interest, as their effect was about ten times that of the positive control caffeine.

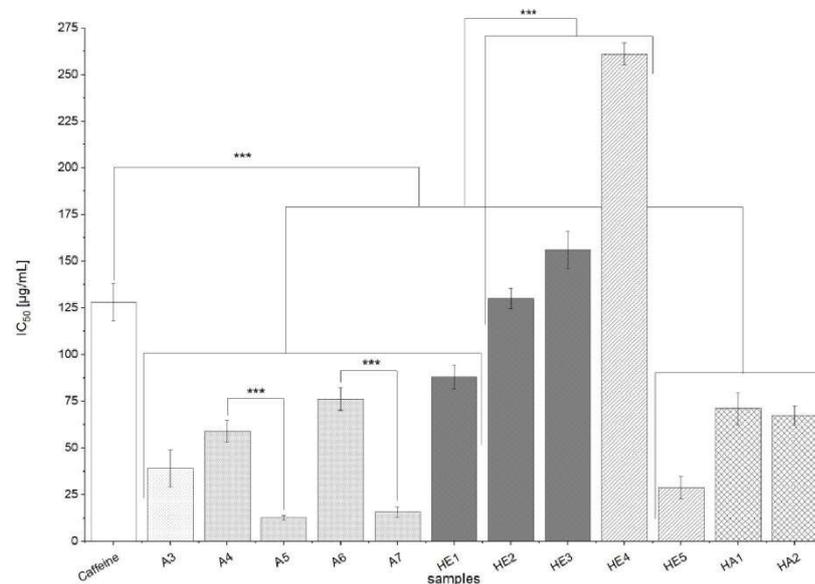


Figure 5. IC₅₀ values for the inhibition of GPα by extracts (A3–A7, HE1–HE5, HA1–HA2) and the positive control (PC) agent caffeine. Values are expressed as means ± SD of three independent experiments and 20 for the PC, each performed in triplicate; significant differences between extracts and PC and within and between extraction groups are denoted as follows: *** $p < 0.001$.

4. Discussion

Sustainable and responsible food production has become increasingly important in recent years, leading to an increased emphasis on the productive use of agri-food by-products. Because BSG is rich in fiber and proteins as well as polyphenols such as hydroxycinnamic acids, BSG is both an attractive ingredient for increasing the nutritional value of food [2] and a potential source of bioactive compounds. Hydroxycinnamic acids such as p-coumaric and ferulic acid are already known to inhibit some glucose metabolism enzymes in vitro [14], and the glucose metabolism enzyme DPP IV was inhibited by protein-rich BSG extracts in vitro [23]. Here we studied the in vitro inhibition of four glucose metabolism enzymes (α -glucosidase, α -amylase, DPP IV and GP α) by various BSG extracts. BSG is the main by-product of the brewing process, whose ingredients are water, yeast, malt, and hops. Malt, i.e., barley (*Hordeum vulgare*), is mixed with water at temperatures of around 65 °C in the mashing process, which is followed by the lautering process in which the liquid wort is separated from the solid BSG at a higher temperature (around 75 °C). BSG thus consists mainly of the insoluble components of the barley grains, i.e., the husks, which contain most of the grains' phenolic compounds [10,35]. During the malting and brewing process, the composition of the barley changes significantly. Although malting facilitates the release and extraction of phenolic compounds and the TPC of BSG is higher than that of the corresponding barley grains, the overall TPC is strongly reduced during the first brewing step [36]. In general, the TPC of malt is highly sensitive to the kilning temperature and the presence or absence of hulls [37,38]. Since BSG consists mainly of the barley grains of the malt, the TPC of BSG results to a great extent from the phenolic content in malt used for the brewing.

The extracts used in this study were produced from various BSG batches by three extraction processes including different sequences or combinations of process steps such as solid-liquid extraction with 60% acetone and alkaline hydrolysis with 4 M NaOH. All methods applied have previously been used to extract polyphenols from BSG [24,39]. Alkaline hydrolysis enables the isolation of bound polyphenols, especially hydroxycinnamic acids,

because most of the phenolic acids in cereals are ester-linked in cell wall polymers [25]. All three extraction processes were followed by purification steps including liquid-liquid extraction with ethyl acetate for all HE extracts (HE1-HE6). All extracts (A1-A7, HE1-HE6, and HA1-HA3) were subjected to SPE using C18e columns to eliminate interfering compounds and preconcentrate the phenolic compounds [25,27]. The processes we used in our study provided relatively low yields, ranging from 0.8 to 3.5 g/100 g extract, whereby yields were very similar for each extract group. Excessive purification steps to eliminate mainly sugars released by alkaline hydrolysis from the lignocellulosic material [40] might explain these results.

The TPCs of the extracts ranged from 24.6 ± 3.3 to 351.5 ± 20.7 $\mu\text{g GEq/mg}$ extract and strongly depended on the extraction method. To facilitate comparison of our results with already reported values in the literature we calculated yield-related values ranging from 0.43 ± 0.08 to 0.86 ± 0.13 mg GEq/g BSG dw for solid-liquid extracts A1-A7, 1.7 ± 0.17 to 2.3 ± 0.11 mg GEq/g BSG for acetone extracts of hydrolysis residues (HA1-HA3) and 2.52 ± 0.21 to 3.96 ± 0.32 mg GEq/g BSG dw for extracts prepared by alkaline hydrolysis (HE1-HE6). The same trend as for extract-related TPC values was observed with HE extracts containing the highest number of polyphenols. This was expected since most of the polyphenols in BSG are esterified and bound to the cell wall, and can thus be released by alkaline hydrolysis or enzymatic pretreatment [8,41,42]. Similar trends, albeit much higher TPC values, have been reported previously—for example, Stefanello et al. found that the TPCs of extracts prepared by alkaline hydrolysis ranged from 12.04 to 17.6 mg GEq/g sample whereas those of solid-liquid extracts obtained using organic solvents were between 1.00 and 3.43 mg GEq/g sample [8]. Similarly, Birsan et al. obtained TPCs of 15.42 to 19.20 mg GEq/g BSG dw for extracts prepared by alkaline hydrolysis and 2.81 to 3.85 mg GEq/g BSG dw sample for solid-liquid extracts prepared with organic solvents. The latter authors also tested liquid-liquid extraction of the hydrolyzed BSG with ethyl acetate; TPCs were much lower (3.08 to 4.71 mg GEq/g BSG dw) than that of hydrolysis-extracts without ethyl acetate extraction but were in the same range than our HE extracts [8,11]. This indicates that reducing ingredients such as sugars are removed by ethyl acetate extraction and that the TPC values are not overestimated in contrast to extracts from alkaline hydrolysis without purification [11,43]. In other studies, TPCs ranging from 0.66 to 9.9 mg GE/g BSG were obtained for extracts prepared by solid-liquid extraction [24,44,45], while analyses of BSG extracts prepared by alkaline hydrolysis yielded TPCs of 10–13 mg GEq/g BSG [46] and 0.014 to 0.732 mg GEq/mL extract [47]. No clean-up by column chromatography or SPE was performed in any of these studies making comparison of TPC values with our results difficult, though at the same time might explain the lower values than those reported in the literature. Regarding the influence of the raw material on the total phenol content, two major points were observed: extracts prepared from defatted BSG (A5, A7, HE6 and HA3) had higher TPCs than the corresponding extracts prepared from non-defatted material (A4, A6, HE5 and HA2), which was already reported for extracts prepared by solid-liquid extraction by Stefanello et al. [8]. Furthermore, differences between the BSG batches were seen; thus BSG 3 extracts generally had lower TPCs than those prepared from other BSG batches independently of the choice of extraction process. As mentioned previously, the TPC of BSG depends strongly on the phenolic content of the malt used in the brewing process which varied for each BSG in our study (see Table 1). Furthermore, the brewing processes differ, which could give rise to differences in the composition of the BSG. For instance, higher temperatures during brewing and the kilning of the malt can lead to the formation of melanoidins via the Maillard reaction [11], resulting in higher TPCs. The differences between the batches could also be partly related to the storage time before lyophilization: BSG is an unstable microbiological material, and due to the structural changes during brewing, it is highly susceptible to microbial attack [48]. The three batches may have been stored for different periods of time before freeze-drying, which would be expected to affect their composition.

The trends observed in the total flavonoid contents (TFC) of the extracts were similar to those observed for the TPC. The measured TFCs were relatively low and depended on the choice of extraction process. Specifically, the TFC values ranged from not detectable (i.e., below the concentration of the most dilute calibration standard, 20 µg/mL) to 93.6 ± 2.9 µg CEq/mg extract. Yield related values ranged from 0.16 ± 0.04 to 0.27 ± 0.02 mg CE/g BSG for acetone extracts (A4, A5, A7), 0.27 ± 0.02 mg CE/g BSG for acetone extracts of alkaline hydrolysis residues (HA3), and 0.22 ± 0.13 to 0.94 ± 0.03 mg CE/g BSG for ethyl acetate extracts of alkaline hydrolysis solutions (HE1-HE5), whereby, as already for the TPC, the same trend as for extract-related TFC was seen. In general, HE extracts (except HE5) had much higher TFCs than A and HA extracts, as was also observed for the TPC. The influence of the raw material was also similar to that in terms of TPC: defatting process (A5, A7, HE6 and HA3) resulted in higher TFCs. In general, the TFCs were around three times lower than the corresponding TPC, which could be due to the greater specificity of the flavonoid assay. Similar trends were observed by Stefanello et al., who used a slightly different method for TFC determination and obtained TFCs of 1.24 ± 0.08 and 1.34 ± 0.03 mg quercetin equivalents (QEeq)/g BSG for extracts prepared by solid-liquid extraction with acetone of defatted and non-defatted BSG, respectively, and 2.93 ± 0.22 and 4.54 ± 0.23 mg QEeq/g BSG for extracts prepared by alkaline hydrolysis of defatted and non-defatted BSG samples, respectively [8]. In addition, TFCs of 1493.75 ± 91.65 mg QEeq/kg BSG have been reported for BSG extracts prepared by solid-liquid extraction with organic solvents [49] and TFCs of up to 44.72 mg QEeq/100g fresh weight (fw) were obtained with aqueous solvents [50]. In general, our TFC values are comparable to those reported in the literature for acetone extracts but about 3–4-fold lower than the reported values for those prepared by alkaline hydrolysis. In all of these cases, no clean-up procedures were applied and the method of TFC determination differed from that used in our study which might explain the differences.

After preparing and characterizing the extracts, their biological activity was investigated. Four enzymes catalyzing different stages involved in the glucose metabolism process were studied: the digestive enzymes α -amylase and α -glucosidase, DPP IV, which is an indirect modulator of insulin secretion, and GP α , which is involved in glycogenolysis. All four enzymes are potent targets for the treatment of type two diabetes mellitus [19,51]. The effects of BSG extracts on glucose metabolism have not previously been studied in detail; the inhibitory activity of BSG protein hydrolysates towards DPP IV, α -glucosidase and α -amylase was investigated [23,52], but there are no published studies using extracts such as those examined in this work. However, studies on the inhibition of α -glucosidase and α -amylase by aqueous and organic solvent extracts of barley grains and germinated barley revealed that the extracts inhibited α -amylase more strongly than α -glucosidase and that germinated barley extracts were more potent than those of ungerminated barley [53,54]. Some in vivo studies on the effect of malted barley and barley seed on blood glucose levels have also been reported: Hong and Meang investigated the effect of malted barley in genetically diabetic mice over 12 weeks and observed an insulin-independent 25% reduction in blood glucose levels, together with a reduction in HbA1c levels compared to the control group [55]. Minaiyan et al. reported a sub-acute effect of 75% ethanolic (ethanol/water; 75/25; v/v) extracts of barley seeds in diabetic rats, leading to a reduction in blood glucose levels after 11 days of consumption [56]. However, it should be noted that the transformation of barley grains into BSG involves several processing steps, which will inevitably lead to significant changes in composition, making these results only minimally comparable to ours. Aside from studies on protein hydrolysates, there is no published data on the effects of BSG extracts on glucose metabolism. We investigated the effects of 16 different BSG extracts on four glucose metabolism enzymes because inhibitory effects have only previously been reported for barley, which is the main ingredient of BSG [57].

None of the studied extracts were found to strongly inhibit α -amylase. Only some extracts prepared by solid-liquid extraction (A1, A2, A4, A5), exhibited slight to moderate inhibition of this enzyme percentage. Thus, neither alkaline hydrolysis nor solid-liquid ex-

traction of alkaline hydrolysis residues enable the extraction of potent α -amylase inhibitors from BSG. However, there were some notable differences between the extracts of different BSG batches. Donkor et al. investigated methanolic extracts of germinated barley with a TPC of around 100 μg ferulic acid equivalents/mL and found that they induced 35% inhibition of porcine pancreatic α -amylase. However, their methodology differed from ours and the concentration of the extract was not reported [53]. In another study using aqueous and ethanolic phenolic barley extracts with TPCs ranging from 0.41 to 0.63 mg GEq/g dw, moderate and strong effects on α -amylase were observed [54]. Although the TPCs of our extracts were higher, we observed no inhibitory effect and inhibitory activity towards α -amylase was uncorrelated with TPC or TFC. This indicates that the phenolic content alone is not predictive of inhibitory activity. However, it may be worthwhile to investigate the inhibitory activity of individual compounds within the extracts. It is possible that the observed inhibition is due to other compounds such as lipids; polar lipids from BSG, beer, and brewing products have been reported to exhibit antithrombotic effects [10], and the oleic and linoleic acid content of mushroom extracts was found to correlate with inhibition of α -glucosidase, and slightly with that of α -amylase [58]. BSG is rich in lipids [9]; accordingly, the lipid content of one of our BSG samples (BSG 3) was around 13.4% (determined by solid-liquid Soxhlet extraction with isopropanol; data not shown). Most lipids in BSG are reported to be triglycerides but there are also around 30% free fatty acids and 9% phospholipids [9]. Acetone is a frequently used solvent for lipid extraction of plant material and BSG [59]. Although pure acetone was used in the work of del Rio et al., aqueous acetone, as used in our extraction processes, may also cause the extraction of some lipids.

Inhibition of α -glucosidase was mainly observed for extracts prepared by solid-liquid extraction with 60% acetone (A2-A7), but two extracts prepared by alkaline hydrolysis (HE4-HE5) also had strong effects on α -glucosidase, with IC_{50} values comparable to that of the positive control agent Acarbose, a well-known inhibitor of α -glucosidase and α -amylase. The other extracts (A1, HE1-HE3, HE6, HA1-HA3) showed moderate inhibitory activity. In general, all of the studied extracts inhibited α -glucosidase in vitro to at least some degree, indicating that BSG is a potent source of inhibitors of this enzyme, whereby mainly A extracts were biological active. Such strong inhibition of α -glucosidase by BSG extracts has not previously been reported; Donkor et al. observed only slight inhibition by methanolic extracts of germinated and ungerminated barley [53], while Ramakrishna et al. reported maximum inhibition values of around 40% for aqueous and ethanolic extracts of barley [54]. The total phenolic contents of our extracts were higher than those used in the two earlier studies, which may explain their stronger effects, but there was no clear correlation between TPC or TFC and strength of inhibition in our studies. It would therefore be useful to investigate the individual components of the extracts to determine their phenolic and flavonoid profiles and identify the compounds active against α -glucosidase.

All of the studied extracts exhibited inhibitory activity towards DPP IV. In particular, all of the alkaline hydrolysis extracts (HE1-HE6) and most of those prepared from defatted samples (A7 and HA3) achieved strong inhibition. Other extracts (A1, A3-A6, HA1-HA3) had only moderate effects. However, when evaluating the relevance of these results, it should be noted that the positive control Sitagliptin (an established anti-diabetic drug) is a 50 to 150 fold stronger DPP IV inhibitor. Most of the extracts studied here were more potent inhibitors than the BSG protein hydrolysates studied by Connolly et al.; while no IC_{50} values were determined by those authors, the highest inhibition observed (using an extract concentration of 1.5 mg/mL) was around 40% [23]. While the effects of our extracts were modest compared to that of the positive control, BSG could be an interesting source of DPP IV inhibitors given that the extracts are complex mixtures and their effects could be due to single compounds present in very small quantities. As also observed in the α -amylase- and α -glucosidase-enzyme assays, there was no clear correlation between TPC and TFC and the strength of inhibition. However, the alkaline hydrolysis extracts (HE

extracts) generally had stronger effects on DPP IV than extracts from solid-liquid extraction (A extracts). Given the results of Connolly et al. and the substrate specificity of DPP IV for proteins and peptides, it is possible that amino acids or peptides could be responsible for the inhibitory activity of the BSG extracts. However, the protein content of the alkaline hydrolysis extracts (HA1-HA3 and HE1-HE6) should be relatively low given the nature of the extraction process. Alkaline extraction is a proven method for extracting proteins, which remain in soluble form and can be precipitated and isolated by reducing the pH [60]. In our extraction processes (1 and 2) the pH was adjusted to around 2 but the insolubilized proteins were separated from our supernatant by filtration. Therefore, appreciable levels of proteins and amino acids should only be present in extracts A1-A7, meaning that the DPP IV inhibition caused by the HA and HE extracts is probably due to other compounds.

All of the studied extracts were potent inhibitors of GP α with those prepared with 60% acetone generally revealing stronger effects than those prepared by alkaline hydrolysis (with the exception of HE5). All of these extracts other than HE2-HE4 inhibited the enzyme more strongly than the positive control caffeine. As already seen for α -glucosidase inhibition, extracts prepared from defatted material (A5, A7) were stronger inhibitors than the corresponding non-defatted extracts (A4, A6). GP α inhibition appeared to be uncorrelated with TFC and TPC. However, given the potent inhibitory activity of the extracts (especially A5 and A7, which was around 10 times that of caffeine) BSG seems to be a potent source of GP α inhibitors [61]. As the enzyme has seven binding sites, it has many potential targets for allosteric modulation that can accommodate a wide range of chemical structures. For example, one of the binding sites favors the binding of glucose analogs while another favors heteroaromatic compounds binding [51]. Therefore, many compounds within our extracts could be responsible for the inhibition of GP α .

In general, HE (alkaline hydrolysis followed by ethyl acetate extraction) extracts had significantly higher TPCs and, in most cases, TFCs than A (solid-liquid extraction with acetone) and HA (alkaline hydrolysis followed by acetone extraction) extracts. Nevertheless, HE extracts were only more active than A or HA extracts towards DPP IV. Additionally, the BSG batch had no major effect on the inhibition potential. The acetone extracts were generally more potent inhibitors of α -glucosidase and GP α than the HE or HA extracts, or at least equally strong. For both enzymes, acetone extracts of defatted BSG (A5, A7) were stronger inhibitors than non-defatted acetone extracts (A4, A6). However, the differences between the three BSG batches were minor. It thus seems that the choice of extraction process affects the inhibitory activity of the extracts more than the choice of raw material.

5. Conclusions

Multiple batches of BSG were extracted using three different complex extraction processes and their total phenolic as well as total flavonoid contents were determined. The extracts' effects on the activity of four glucose metabolism enzymes were then investigated. The observed TPCs and TFCs were lower than those reported previously, although it should be noted that SPE cleanup was not applied in previously reported studies on BSG extracts and that both the malt used in the brewing process and the storage conditions of the BSG may affect the extracts' composition. Several extracts were observed to have strong inhibitory activity, particularly towards GP α and α -glucosidase, but also towards DPP IV. However, the inhibition of DPP IV was considerably weaker than that caused by the positive control, so the biological relevance of the results for this enzyme should be evaluated critically. No appreciable inhibition of α -amylase was observed. In general, the results are not readily compared to literature data because the only relevant previous studies examined BSG protein hydrolysates or barley extracts, and the steps involved in transforming barley grains into BSG (which include malting and the early steps of brewing) will inevitably cause significant changes in the composition of the material [62].

Nevertheless, our results clearly show that BSG is a source of potent inhibitors of various glucose metabolism enzymes, especially GP α and α -glucosidase, and that further research is warranted to identify the active compounds within these extracts. Additionally,

our findings show, that solid-liquid extraction with 60% acetone resulted in more potent extracts regarding GP α and α -glucosidase inhibition than alkaline hydrolysis. Differences between the BSG batches were of minor importance; the extraction process is crucial for the biological activity determined here. Furthermore, our TPC results confirmed, that bound polyphenols account for the majority of the total phenolics in BSG. However, a high TPC and TFC was no indicator of a more pronounced inhibitory potential. HPLC-DAD and HPLC-MS/MS analysis should be performed to characterize the (phenolic) compounds in the extracts in more detail, and the activity of these compounds should be investigated in enzyme-inhibition assays.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu13082696/s1>, Scheme S1: Overview flow chart for extract preparation (A1-A7, HE1-HE6, HA1-HA3).

Author Contributions: D.B.: Conceptualization, Investigation, Methodology, Formal analysis, Data Curation, Writing—original draft, Visualization. T.B.: Supervision, Writing—review & editing. M.H.: Investigation, Methodology, Formal analysis. S.B.: Investigation. C.C.Y.: Investigation. E.R.: Funding acquisition, Project administration, Conceptualization, Supervision, Resources, Validation, Writing—review & editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the EU-INTERREG project BIOVAL supported by the European Funds for Regional Development, project no. 018-4-09-021.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge the financial support by the EU-INTERREG project BIOVAL (no. 018-4-09-021). The authors gratefully acknowledge all the project partners within the BIOVAL project, especially the Brewery Orval (Florenville, Belgium) and the Brewing Group of the TUK (Roland Ulber) for providing the BSG samples as well as the working group inorganic chemistry of Werner Thiel (TUK) for their support performing extractions. We thank all collaborators of the BIOVAL consortium for their constructive collaboration.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1. Ben-Othman, S.; Joudou, I.; Bhat, R. Bioactives From Agri-Food Wastes: Present Insights and Future Challenges. *Molecules* **2020**, *25*, 510. [CrossRef]
2. Mussatto, S.I. Brewer's spent grain: A valuable feedstock for industrial applications. *J. Sci. Food Agric.* **2014**, *94*, 1264–1275. [CrossRef] [PubMed]
3. Steiner, J.; Procopio, S.; Becker, T. Brewer's spent grain: Source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *Eur. Food Res. Technol.* **2015**, *241*, 303–315. [CrossRef]
4. Pratap Singh, A.; Mandal, R.; Shojaei, M.; Singh, A.; Kowalczewski, P.L.; Ligaj, M.; Pawlicz, J.; Jarzębski, M. Novel Drying Methods for Sustainable Upcycling of Brewers' Spent Grains as a Plant Protein Source. *Sustainability* **2020**, *12*, 3660. [CrossRef]
5. Sahin, A.W.; Hardiman, K.; Atzler, J.J.; Vogelsang-O'Dwyer, M.; Valdeperez, D.; Münch, S.; Cattaneo, G.; O'Riordan, P.; Arendt, E.K. Rejuvenated Brewer's Spent Grain: The impact of two BSG-derived ingredients on techno-functional and nutritional characteristics of fibre-enriched pasta. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2021**, *68*, 102633. [CrossRef]
6. Waters, D.M.; Jacob, F.; Titze, J.; Arendt, E.K.; Zannini, E. Fibre, protein and mineral fortification of wheat bread through milled and fermented brewer's spent grain enrichment. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, *235*, 767–778. [CrossRef]
7. Amoriello, T.; Mellara, F.; Galli, V.; Amoriello, M.; Ciccioritti, R. Technological Properties and Consumer Acceptability of Bakery Products Enriched with Brewers' Spent Grains. *Foods* **2020**, *9*, 1492. [CrossRef]
8. Stefanello, F.S.; Dos Santos, C.O.; Bochi, V.C.; Fruet, A.P.B.; Soquetta, M.B.; Dörr, A.C.; Nörnberg, J.L. Analysis of polyphenols in brewer's spent grain and its comparison with corn silage and cereal brans commonly used for animal nutrition. *Food Chem.* **2018**, *239*, 385–401. [CrossRef] [PubMed]

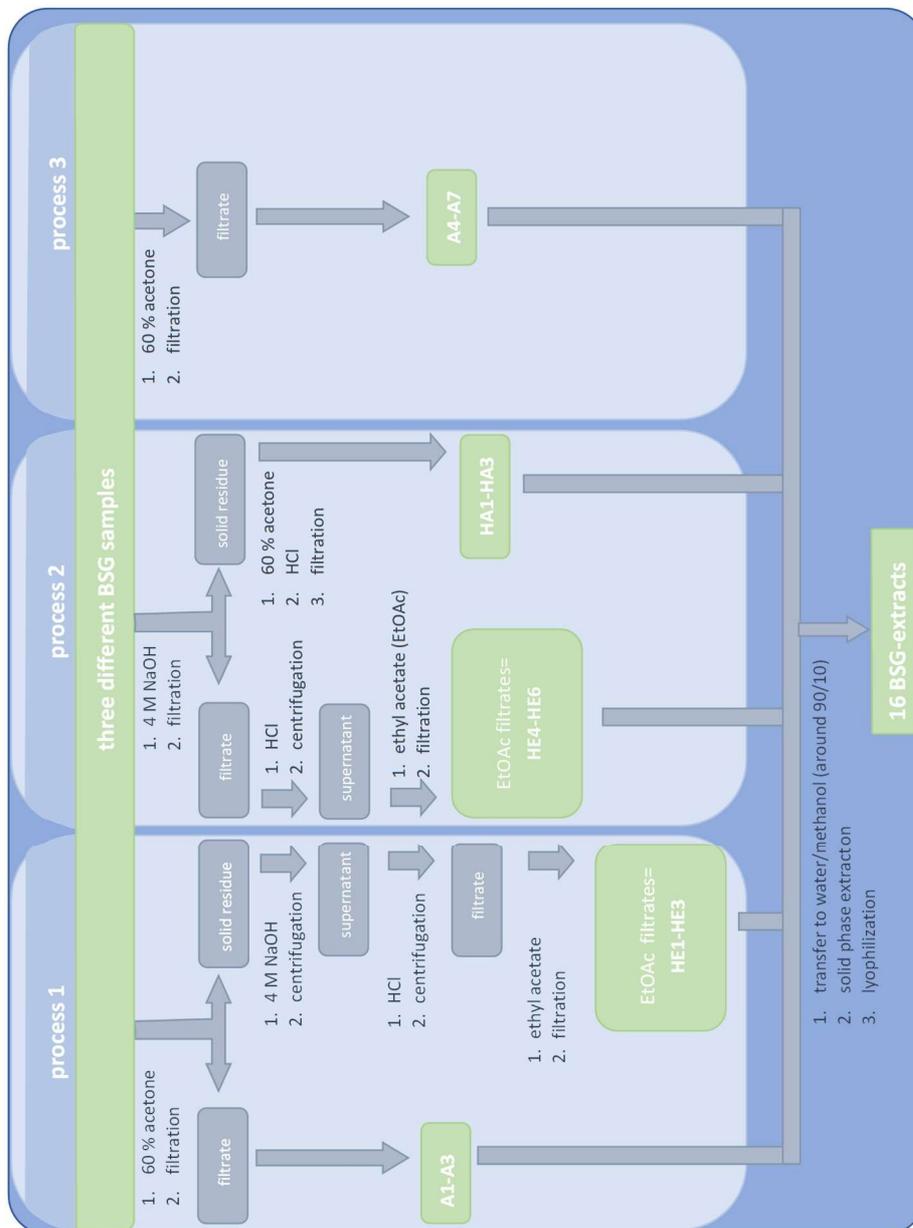
9. Niemi, P.; Tamminen, T.; Smeds, A.; Viljanen, K.; Ohra-aho, T.; Holopainen-Mantila, U.; Faulds, C.B.; Poutanen, K.; Buchert, J. Characterization of lipids and lignans in brewer's spent grain and its enzymatically extracted fraction. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 9910–9917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Lordan, R.; O'Keeffe, E.; Tsoupras, A.; Zabetakis, I. Total, Neutral, and Polar Lipids of Brewing Ingredients, By-Products and Beer: Evaluation of Antithrombotic Activities. *Foods* **2019**, *8*, 171. [[CrossRef](#)]
11. Birsan, R.I.; Wilde, P.; Waldron, K.W.; Rai, D.K. Recovery of Polyphenols from Brewer's Spent Grains. *Antioxidants* **2019**, *8*, 380. [[CrossRef](#)]
12. Shahidi, F.; Chandrasekara, A. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochem. Rev.* **2010**, *9*, 147–170. [[CrossRef](#)]
13. Gallardo, C.; Jiménez, L.; García-Conesa, M.-T. Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chem.* **2006**, *99*, 455–463. [[CrossRef](#)]
14. Semiz, A.; Celik-Turgut, G.; Karakurt, S.; Akca, H.; Arslan, S.; Adali, O.; Sen, A. In vivo examination of the effects of hydroxycinnamic acid on xenobiotic metabolizing and antioxidant enzymes. *Arch. Biol. Sci.* **2017**, *69*, 103–110. [[CrossRef](#)]
15. Adisakwattana, S.; Sookkongwaree, K.; Roengsumran, S.; Petsom, A.; Ngamrojnavanich, N.; Chavasiri, W.; Deesamer, S.; Yibchok-Anun, S. Structure-activity relationships of trans-cinnamic acid derivatives on alpha-glucosidase inhibition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2893–2896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Adisakwattana, S.; Chantarasinlapin, P.; Thammarat, H.; Yibchok-Anun, S. A series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal alpha-glucosidase. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2009**, *24*, 1194–1200. [[CrossRef](#)]
17. Jeong, E.-Y.; Cho, K.-S.; Lee, H.-S. α -amylase and α -glucosidase inhibitors isolated from *Triticum aestivum* L. sprouts. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **2012**, *55*, 47–51. [[CrossRef](#)]
18. Lago, R.M.; Singh, P.P.; Nesto, R.W. Diabetes and hypertension. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **2007**, *3*, 667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Adisakwattana, S. Cinnamic Acid and Its Derivatives: Mechanisms for Prevention and Management of Diabetes and Its Complications. *Nutrients* **2017**, *9*, 163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Narasimhan, A.; Chinnaiyan, M.; Karundevi, B. Ferulic acid regulates hepatic GLUT2 gene expression in high fat and fructose-induced type-2 diabetic adult male rat. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *761*, 391–397. [[CrossRef](#)]
21. Narasimhan, A.; Chinnaiyan, M.; Karundevi, B. Ferulic acid exerts its antidiabetic effect by modulating insulin-signalling molecules in the liver of high-fat diet and fructose-induced type-2 diabetic adult male rat. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2015**, *40*, 769–781. [[CrossRef](#)]
22. Giacco, R.; Costabile, G.; Della Pepa, G.; Anniballi, G.; Griffo, E.; Mangione, A.; Cipriano, P.; Viscovo, D.; Clemente, G.; Landberg, R.; et al. A whole-grain cereal-based diet lowers postprandial plasma insulin and triglyceride levels in individuals with metabolic syndrome. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2014**, *24*, 837–844. [[CrossRef](#)]
23. Connolly, A.; Piggott, C.O.; FitzGerald, R.J. In vitro α -glucosidase, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory properties of brewers' spent grain protein hydrolysates. *Food Res. Int.* **2014**, *56*, 100–107. [[CrossRef](#)]
24. Meneses, N.G.; Martins, S.; Teixeira, J.A.; Mussatto, S.I. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Sep. Purif. Technol.* **2013**, *108*, 152–158. [[CrossRef](#)]
25. Irakli, M.N.; Samanidou, V.F.; Biliaderis, C.G.; Papadoyannis, I.N. Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction. *Food Chem.* **2012**, *134*, 1624–1632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Aarabi, A.; Honarvar, M.; Mizani, M.; Faghilian, H.; Gerami, A. Extraction and purification of ferulic acid as an antioxidant from sugar beet pulp by alkaline hydrolysis. *Ital. J. Food Sci.* **2016**, *28*, 362–375. [[CrossRef](#)]
27. Michalkiewicz, A.; Biesaga, M.; Pyrzynska, K. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1187*, 18–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Fuchs, C.; Bakuradze, T.; Steinke, R.; Grewal, R.; Eckert, G.P.; Richling, E. Polyphenolic composition of extracts from winery by-products and effects on cellular cytotoxicity and mitochondrial functions in HepG2 cells. *J. Funct. Foods* **2020**, *70*, 103988. [[CrossRef](#)]
29. Bobo García, G.; Davidov Pardo, G.; Arroqui, C.; Viracida, P.; Marín Arroyo, M.R.; Navarro, M. Intra laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 204–209. [[CrossRef](#)]
30. Pekal, A.; Pyrzynska, K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods* **2014**, *7*, 1776–1782. [[CrossRef](#)]
31. Berger, K.; Ostberg-Potthoff, J.J.; Bakuradze, T.; Winterhalter, P.; Richling, E. Carbohydrate Hydrolase-Inhibitory Activity of Juice-Based Phenolic Extracts in Correlation to Their Anthocyanin/Copigment Profile. *Molecules* **2020**, *25*, 5224. [[CrossRef](#)]
32. Ashok Kumar, B.S.; Lakshman, K.; Nandeesh, R.; Arun Kumar, P.A.; Manoj, B.; Kumar, V.; Sheshadri Shekar, D. In vitro alpha-amylase inhibition and in vivo antioxidant potential of *Amaranthus spinosus* in alloxan-induced oxidative stress in diabetic rats. *Saudi J. Biol. Sci.* **2011**, *18*, 1–5. [[CrossRef](#)]
33. You, Q.; Chen, F.; Wang, X.; Luo, P.G.; Jiang, Y. Inhibitory effects of muscadine anthocyanins on α -glucosidase and pancreatic lipase activities. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 9506–9511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Jakobs, S.; Fridrich, D.; Hofem, S.; Pahlke, G.; Eisenbrand, G. Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 52–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lynch, K.M.; Steffen, E.J.; Arendt, E.K. Brewers' spent grain: A review with an emphasis on food and health. *J. Inst. Brew.* **2016**, *122*, 553–568. [[CrossRef](#)]
36. Leitao, C.; Marchioni, E.; Bergaentzle, M.; Zhao, M.; Didierjean, L.; Miesch, L.; Holder, E.; Miesch, M.; Ennahar, S. Fate of polyphenols and antioxidant activity of barley throughout malting and brewing. *J. Cereal Sci.* **2012**, *55*, 318–322. [[CrossRef](#)]
37. Moreira, M.M.; Morais, S.; Carvalho, D.O.; Barros, A.A.; Delerue-Matos, C.; Guido, L.F. Brewer's spent grain from different types of malt: Evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds. *Food Res. Int.* **2013**, *54*, 382–388. [[CrossRef](#)]
38. Dvořáková, M.; Guido, L.F.; Dostálek, P.; Skulilová, Z.; Moreira, M.M.; Barros, A.A. Antioxidant Properties of Free, Soluble Ester and Insoluble-Bound Phenolic Compounds in Different Barley Varieties and Corresponding Malts. *J. Inst. Brew.* **2008**, *114*, 27–33. [[CrossRef](#)]
39. McCarthy, A.L.; O'Callaghan, Y.C.; Neugart, S.; Piggott, C.O.; Connolly, A.; Jansen, M.A.K.; Krumbein, A.; Schreiner, M.; FitzGerald, R.J.; O'Brien, N.M. The hydroxycinnamic acid content of barley and brewers' spent grain (BSG) and the potential to incorporate phenolic extracts of BSG as antioxidants into fruit beverages. *Food Chem.* **2013**, *141*, 2567–2574. [[CrossRef](#)]
40. Loow, Y.-L.; Wu, T.Y.; Jahim, J.M.; Mohammad, A.W.; Teoh, W.H. Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. *Cellulose* **2016**, *23*, 1491–1520. [[CrossRef](#)]
41. Faulds, C.; Sancho, A.; Bartolomé, B. Mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *60*, 489–494. [[CrossRef](#)]
42. Mussatto, S.I.; Dragone, G.; Roberto, I.C. Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Ind. Crop. Prod.* **2007**, *25*, 231–237. [[CrossRef](#)]
43. Sánchez-Rangel, J.C.; Benavides, J.; Heredia, J.B.; Cisneros-Zevallos, L.; Jacobo-Velázquez, D.A. The Folin–Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Anal. Methods* **2013**, *5*, 5990. [[CrossRef](#)]
44. Bonifácio-Lopes, T.; Vilas Boas, A.A.; Coscueta, E.R.; Costa, E.M.; Silva, S.; Campos, D.; Teixeira, J.A.; Pintado, M. Bioactive extracts from brewer's spent grain. *Food Funct.* **2020**, *11*, 8963–8977. [[CrossRef](#)]
45. Andres, A.I.; Petron, M.J.; Lopez, A.M.; Timon, M.L. Optimization of Extraction Conditions to Improve Phenolic Content and In Vitro Antioxidant Activity in Craft Brewers' Spent Grain Using Response Surface Methodology (RSM). *Foods* **2020**, *9*, 1398. [[CrossRef](#)]
46. Ideia, P.; Sousa-Ferreira, I.; Castilho, P.C. A Novel and Simpler Alkaline Hydrolysis Methodology for Extraction of Ferulic Acid from Brewer's Spent Grain and its (Partial) Purification through Adsorption in a Synthetic Resin. *Foods* **2020**, *9*, 600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. McCarthy, A.L.; O'Callaghan, Y.C.; Connolly, A.; Piggott, C.O.; FitzGerald, R.J.; O'Brien, N.M. Phenolic extracts of brewers' spent grain (BSG) as functional ingredients—Assessment of their DNA protective effect against oxidant-induced DNA single strand breaks in U937 cells. *Food Chem.* **2012**, *134*, 641–646. [[CrossRef](#)]
48. Bianco, A.; Budroni, M.; Zara, S.; Mannazzu, I.; Fancello, F.; Zara, G. The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *104*, 8661–8678. [[CrossRef](#)]
49. Almeida, A.D.R.; Geraldo, M.R.F.; Ribeiro, L.F.; Silva, M.V.; Maciel, M.V.d.O.B.; Haminiuk, C.W.I. Bioactive compounds from brewer's spent grain: Phenolic compounds, fatty acids and in vitro antioxidant capacity. *Acta Sci. Technol.* **2017**, *39*, 269–277. [[CrossRef](#)]
50. Farcas, A.; Socaci, S.; Tofana, M.; Mudura, E.; Salanta, L. The Content in Bioactive Compounds of Different Brewers' Spent Grain Aqueous Extracts. *Bull. UASVM Food Sci. Technol.* **2016**, *73*, 143. [[CrossRef](#)]
51. Nagy, L.; Béke, F.; Juhász, L.; Kovács, T.; Juhász-Tóth, É.; Dócsa, T.; Tóth, A.; Gergely, P.; Somsák, L.; Bai, P. Glycogen phosphorylase inhibitor, 2,3-bis(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enamido butanedioic acid (BF142), improves baseline insulin secretion of MIN6 insulinoma cells. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0236081. [[CrossRef](#)]
52. Lin, H.J.; Li, L.; Tian, Y.J.; Zhang, X.; Li, B. Protein Hydrolysate from Brewer's Spent Grain and its Inhibitory Ability of α -Glucosidase. *Adv. Mater. Res.* **2012**, *581–582*, 138–141. [[CrossRef](#)]
53. Donkor, O.N.; Stojanovska, L.; Ginn, P.; Ashton, J.; Vasiljevic, T. Germinated grains—sources of bioactive compounds. *Food Chem.* **2012**, *135*, 950–959. [[CrossRef](#)]
54. Ramakrishna, R.; Sarkar, D.; Schwarz, P.; Shetty, K. Phenolic linked anti-hyperglycemic bioactives of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars as nutraceuticals targeting type 2 diabetes. *Ind. Crop. Prod.* **2017**, *107*, 509–517. [[CrossRef](#)]
55. Hong, H.; Jai Maeng, W. Effects of malted barley extract and banaba extract on blood glucose levels in genetically diabetic mice. *J. Med. Food* **2004**, *7*, 487–490. [[CrossRef](#)]
56. Minaiyan, M.; Ghannadi, A.; Movahedian, A.; Hakim-Elahi, I. Effect of *Hordeum vulgare* L. (Barley) on blood glucose levels of normal and STZ-induced diabetic rats. *Res. Pharm. Sci.* **2014**, *9*, 173–178. [[PubMed](#)]
57. Idehen, E.; Tang, Y.; Sang, S. Bioactive phytochemicals in barley. *J. Food Drug Anal.* **2017**, *25*, 148–161. [[CrossRef](#)]
58. Su, C.-H.; Lai, M.-N.; Ng, L.-T. Inhibitory effects of medicinal mushrooms on α -amylase and α -glucosidase—enzymes related to hyperglycemia. *Food Funct.* **2013**, *4*, 644–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. del Rio, J.C.; Prinsen, P.; Gutiérrez, A. Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals. *J. Cereal Sci.* **2013**, *58*, 248–254. [[CrossRef](#)]

60. Jaeger, A.; Zannini, E.; Sahin, A.W.; Arendt, E.K. Barley Protein Properties, Extraction and Applications, with a Focus on Brewers' Spent Grain Protein. *Foods* **2021**, *10*, 1389. [[CrossRef](#)]
61. Pałasz, A.; Cież, D.; Trzewik, B.; Miszczak, K.; Tynor, G.; Bazan, B. In the Search of Glycoside-Based Molecules as Antidiabetic Agents. *Top. Curr. Chem.* **2019**, *377*, 19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Gupta, M.; Abu-Ghannam, N.; Gallagher, E. Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2010**, *9*, 318–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Supplement Material

Scheme S1: Scheme S1: Overview flow chart for extract preparation (A1–A7, HE1–HE6, HA1–HA3)



4.2 Publikation 2: Characterization of BSG extracts by tandem mass spectrometry and HPLC-DAD: ferulic acid dehydrodimers, phenolamides and oxylipins

Einleitung

BSG ist ein lignocellulosehaltiges Material, welches neben bis zu 25 % Cellulose [Carvalho *et al.*, 2005], 40 % Hemicellulosen [Mandalari *et al.*, 2005] und 28 % Lignin [Mussatto und Roberto, 2006] 19–30 % Proteine [Mussatto, 2014] und etwa 13 % Lipide [Xiros *et al.*, 2008] enthält. Letztere setzen sich größtenteils aus Triglyceriden zusammen aber auch freie Fettsäuren und Phospholipide wurden beschrieben [Niemi *et al.*, 2013]. Aufgrund des Brauprozesses wird davon ausgegangen, dass große Teile der enthaltenen Lipide einer Oxidation unterliegen und weitere modifizierte Lipidklassen enthalten sein könnten. So wurden nach dem Maischeprozess hydroxylierte Fettsäuren identifiziert [Arts *et al.*, 2007]. Zudem stellt BSG eine gute Quelle für gebundene Polyphenole dar, welche als Quervernetzer innerhalb der Hemicellulosestruktur dienen [Stefanello *et al.*, 2018]. Sie werden mittels Aufschlussverfahren chemischer oder enzymatischer Natur freigesetzt und bestehen hauptsächlich aus HCAs. Mit bis zu 2,1 mg/g BSG Trockengewicht ist FA das Hauptpolyphenol unter den gebundenen gefolgt von bis zu 1 mg/g *pCA* [Alonso-Riaño *et al.*, 2020; Birsan *et al.*, 2019]. Ebenso wurden oligomere Strukturen der FA zuvor nachgewiesen [Verni *et al.*, 2020] und besonders die dimeren Strukturen wurden in verschiedenen Studien mittels massenspektrometrischer Methoden aufgeklärt [Callipo *et al.*, 2010; Bunzel *et al.*, 2005]. Die freien Polyphenole, wie einige Flavonoide oder Dihydrohydroxyzimtsäuren, sind ohne Aufschluss mittels organischer SLE aus dem BSG isolierbar und ihr Gehalt liegt etwa 50–100 mal niedriger als der der gebundenen Polyphenole [Birsan *et al.*, 2019; Verni *et al.*, 2020]. Neben Polyphenolen stellen Phenolamide eine große Klasse sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe dar und wurden in Bier wie Getreide nachgewiesen [Wannenmacher *et al.*, 2018; Pihlava, 2014]. Sie sind als HCAA bekannt und setzen sich aus einem Aminanteil, einer Aminosäure und einem Hydroxyzimtsäureanteil zusammen. So wurden in Bier und Gerste verschiedene Hordatine, Dimere zweier HCA-Agmatine identifiziert, die sich durch ihre Stabilität auszeichnen [Pihlava, 2014; Röpenack *et al.*, 1998]. Bereits 1999 zeigten Studien [Nomura *et al.*, 1999], dass der Gehalt während der Keimung zunimmt, weshalb sie in relevanter Konzentration in BSG enthalten sein können. Aufgrund nicht kommerziell erhältlicher Reinsubstanzen gestaltete sich die Quantifizierung der Hordatine als schwierig und erfolgte in Form von *pCA*-Äq semiquantitativ [Pihlava *et al.*, 2016].

Zielsetzung

Ziel der Studie war die Untersuchung verschiedener biologisch aktiver BSG-Extrakte, aus welchen mittels mehrstufiger Extraktionsprozesse drei Extraktgruppen (HA, HE, A) gewonnen worden waren (vgl. Publikation 1 [Becker *et al.*, 2021]). Im Fokus stand dabei die massenspektrometrische Identifikation von Einzelsubstanzen, gefolgt von der Quantifizierung der Leitsubstanzen mittels HPLC-DAD. Zur Identifikation dienten Referenzsubstanzen sowie Vergleiche mit Literaturdaten, sofern keine Reinsubstanzen verfügbar waren. Weiterhin sollten die Unterschiede bzgl. der Inhaltsstoffe in Abhängigkeit von der BSG-Charge (BSG 1

(BioVT TUK): ca. 50 % Weizenmalz/50 % Pilsner Malz, BSG 2 (BioVT TUK): 100 % Weyermann® Vienna Malz und BSG 3 (Orval Brauerei, Florenville): 90 % Pilsner Malz, 9 % Karamell-Malz und 1 % gerösteter und geschälter Gersten) sowie dem verwendeten Malz und der Extraktionsmethode aufgezeigt werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Die ersten massenspektrometrischen HPLC-UV-ESI-MS/MS-Experimente zeigten, dass sich die drei Extraktgruppen hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe deutlich unterscheiden. So fanden sich in A-Extrakten abhängig von der BSG-Charge einige Catechinderivate wie (+)-Catechin (A2, A4-A7) und Procyanidin B in A2 und A4. Tryptophan wurde nur in Extrakten aus BSG 1 und BSG 2 identifiziert. Zudem konnten zwei verschiedene Lyso-Phosphatidylethanolamine in den A-Extrakten nachgewiesen werden. Weiterhin konnten Vorläufer der Hordatine wie das Coumaroyl-Hydroxyagmatin sowie einige Hordatine selbst nachgewiesen werden. Deren Analyse erfolgte mittels einer optimierten Methode, die eine deutlich bessere Trennung der strukturell sehr ähnlichen Hordatine ermöglichte. Als Leitsubstanzen innerhalb der HE- und HA- Extrakte konnten v.a. Hydroxyzimtsäurederivate, wie FA, *p*CA und CA, nachgewiesen werden, doch auch DiFAs waren in den durchgeführten *full scans* ersichtlich. Die Signalintensitäten der HCAs war in den HA-Extrakten geringer als in den HE-Extrakten, was darauf hindeutet, dass sich die Gehalte unterscheiden. Aufgrund der Extraktionsmethodik war dies zu erwarten, da die HA-Extrakte aus dem Rückstand der alkalischen Hydrolyse gewonnen worden waren (vgl. Abb. 55) und somit der Großteil der Polyphenole im flüssigen Überstand der HE-Rohextrakte enthalten waren. Weiterhin waren Azelain- und Suberinsäure (zwei Dicarbonsäuren) sowie im *full scan* angedeutet Trihydroxyoctadecansäure in den HE- und HA-Extrakten zu finden. Wie zuvor für die Hordatine, wurden die Trihydroxyfettsäuren sowie die Hydroxyzimtsäurederivate im Folgenden mit einer optimierten Methode analysiert.

Zur Analytik der Phenolamide in den A-Extrakten wurde eine auf die Trennung angepasste HPLC-MS/MS-Methode verwendet. Mittels *enhanced product ion scans* (EPI) wurde eine bessere Sensitivität erreicht. Eine Identifikation der Hordatine erfolgte größtenteils anhand ihrer charakteristischen Fragmente, welche dem zweifach geladenen Präkursorion entsprachen oder von der Agmatin- (für Hordatine A, B, C, A1, B1, C1) bzw. Hydroxyagmatineinheit (für Hordatine A1, B1, C1, A2, B2, C2) stammen. Zusätzlich wurde der Verlust von Kohlenmonoxid, Methylgruppen, Methoxygruppen oder Ammoniak beobachtet und Glykoside anhand des spezifischen Verlustes einer Hexose identifiziert. Für die meisten Hordatine wurden verschiedene isomere Formen detektiert, die sich einerseits aus *cis/trans*-Isomerie (Stereoisomerie an den beiden C-Atom des Heterozyklus im Ringsystem) ergaben und bei Hordatin B, B1, B2 zusätzlich ein Regioisomer darstellen. Insgesamt wurden so fast 70 Isomere identifiziert. Neben den Hordatinen waren in den meisten Extrakten zusätzlich zwei Spermidinderivate und die monomeren Vorläufer der Hordatine enthalten. Die semi-quantitativen Ergebnisse bestätigten, was sich in den massenspektrometrischen Experimenten anhand der Signalintensität angedeutet hatte. A1, als Extrakt aus BSG mit 50 % Weizenanteil (BSG 1), wies signifikant den geringsten Gehalt auf. Weiterhin zeigte sich, dass Extrakte aus entfettetem BSG (A5, A7) größere Mengen an Hordatinen enthielten als die vergleichbaren Extrakte aus nicht entfettetem Material. Extraktionsprozess 3 erwies sich als effektiver für die Hordatinextraktion als Prozess 1. Die Gehalte in den A-Extrakten schwankten

zwischen $14,2 \pm 0,5$ und $172,2 \pm 2,1$ $\mu\text{g } p\text{CA-}\ddot{\text{A}}\text{q}/\text{mg}$ Extrakt. Vergleiche mit den wenigen vorhandenen Literaturdaten [Pihlava *et al.*, 2016; Kohyama und Ono, 2013] zeigten, dass die Gehalte in BSG höher sein könnten als in ungekeimter Gerste und bewiesen, dass Hordatine beim Brauprozess im BSG verbleiben und nicht vollständig in die wässrige Würze und damit in das Bier übergehen.

Die beiden anderen Extraktgruppen, HA und HE, enthielten v.a. Hydroxyzimtsäurederivate, welche mit einer optimierten HPLC-ESI-MS/MS-Methode charakterisiert wurden. Insgesamt konnten zehn verschiedene DiFAs identifiziert werden, wobei sich die anhand der *full scans* vermuteten TriFAs nicht bestätigten. Strukturell wurden die DiFA-Isomere anhand charakteristischer Fragmente sowie deren Verteilung identifiziert. Dabei wurde unterschieden zwischen unspezifischen Signalen, wie bspw. der Kohlenstoffdioxidabspaltung, welche für alle DiFAs auftrat und diagnostischen Signalen, welche strukturspezifisch waren. So zeichnete sich die 8'-O-4-Form durch das Auftreten des Masse-zu-Ladungsverhältnisses m/z 193 aus, welches vom monomeren FA-Fragment stammt. Je nach Verknüpfung der beiden FAs ergeben sich die folgenden Strukturen: 8-8-Aryltetralin, 8-8', 8-5', 5-5', 8-5'-zyklisch und 8-O-4-Form. Alle DiFAs können noch als *cis/cis*, *cis/trans* oder *trans/trans*-Isomer sowie für die zyklischen Isomere in *anti*- oder *syn*-Form auftreten. Die Extrakte HE4–HE6 enthielten die meisten Isomere, gefolgt von HE1–HE3 und HA1–HA3. Die sich anschließende HPLC-DAD-Quantifizierung aller Hydroxyzimtsäurederivate ergab für alle neun Extrakte die gleiche Abfolge der Derivate mit FA ($18,1 \pm 3,1$ bis $378,6 \pm 41,0$ $\mu\text{g FA}/\text{mg}$ Extrakt) als mengenmäßig häufigstes Derivat gefolgt von *pCA* ($6,8 \pm 0,8$ bis $94,9 \pm 15,1$ $\mu\text{g } p\text{CA}/\text{mg}$ Extrakt), DiFA ($2,2 \pm 0,1$ bis $50,8 \pm 2,5$ $\mu\text{g FA-}\ddot{\text{A}}\text{q}/\text{mg}$ Extrakt) und CA ($14,3 \pm 6,1$ bis $19,6 \pm 0,4$ $\mu\text{g CA}/\text{mg}$ Extrakt). Die HA-Extrakte enthielten keine CA. Der Vergleich mit Literaturdaten ergab ein ähnliches Bild hinsichtlich der mengenmäßigen Verteilung der Derivate. Doch sowohl die HE- als auch die HA-Extrakte wiesen höhere Gehalte der monomeren Hydroxyzimtsäurederivate als die Vergleichsdaten auf [Stefanello *et al.*, 2018; Birsan *et al.*, 2019; Alonso-Riaño *et al.*, 2020]. Dies könnte auf die Aufreinigung mittels SPE zurückgeführt werden. Die semiquantitativen Daten für die DiFAs waren teilweise vergleichbar mit Literaturdaten [Verni *et al.*, 2020], doch zeigte sich hier, dass zwar teils höhere DiFA-Mengen jedoch keinerlei höhere Oligomere enthalten waren. Dies lässt sich auf unterschiedliche Laugenkonzentration während der alkalischen Hydrolyse zurückführen, da davon auszugehen ist, dass höhere Konzentrationen zu höheren Hydrolyseraten führen können. Auch zwischen den BSG-Chargen waren Unterschiede vorhanden. BSG 3 (HE3, HE5) wies sowohl in HE- als auch HA-Extrakten im Vergleich eher geringe FA-Gehalte auf, wobei der Entfettungsprozess bei HE6 zu einer deutlichen Erhöhung selbigen Gehaltes geführt hatte. Weiterhin erwies sich Extraktionsprozess 1 (HE1–HE3) als effektiver im Vergleich zu Prozess 2 (HE4–HE6), was am unterschiedlichen Extraktionsvolumen der Natronlauge liegen könnte.

Als dritte große Substanzklasse wurde in allen drei Extraktgruppen Oxylipine, im Speziellen hydroxylierte Derivate der Linolsäure bestimmt. Mittels HPLC-MS/MS-Experimenten wurden verschiedene Isomere der TriHOME und TriHODA analysiert und anhand ihrer Fragmente identifiziert, wobei die genaue Position der Hydroxylgruppen nicht spezifiziert werden konnte. Die HE-Extrakte enthielten durchschnittlich die meisten Isomere beider Säuren gefolgt von den HA- und A-Extrakten. Die gesättigte TriHODA war in A-Extrakten, mit Ausnahme von A1 und A6, hingegen nicht enthalten. Aufgrund der regio- und stereoselektiven Lipoxygenase-

Reaktion während des Maischeprozesses [Garbe *et al.*, 2005] wurde die (9S, 12S, 13S)-TriHOME als Hauptisomer in den A-Extrakten angenommen. In den HA- und HE-Extrakten hingegen waren zahlreiche Isomere vorhanden, welche coeluierten. Vermutlich führte die alkalische Behandlung zu den Modifikationen der Fettsäuren oder das Zwischenprodukt der enzymatischen Reaktion im Maischeprozess weiter oxidiert.

Fazit

Die mittels verschiedener Methodiken hergestellten BSG-Extrakte wurden in die drei Gruppen HA-, HE- und A-Extrakte unterteilt und wiesen analytisch große Unterschiede im Bereich der Inhaltsstoffe auf. So konnten in den A-Extrakten aus SLE mit 60 %-igem Aceton einige Flavonoide sowie Phospholipide identifiziert werden, wobei die größte Substanzklasse die Phenolamide, v.a. Hordatine waren. Diese stellen Dimere zweier HCA-Agmatine dar, wodurch sich in Kombination mit Glykosidierungen und Hydroxylierungen eine große strukturelle Vielfalt ergibt. Hier wurden Hordatine erstmals als Bestandteile von BSG identifiziert. Ihre Quantifizierung erwies sich aufgrund nicht erhältlicher Reinsubstanzen als schwierig und die semiquantitative Betrachtung als *p*CA-Äq ermöglicht lediglich einen Vergleich zwischen den Extrakten. Trotzdem zeigten die Ergebnisse, dass BSG eine gute Quelle für Hordatine darstellt. Insbesondere die Chargen 2 und 3 enthielten viele Hordatine, was darauf zurückgeführt wurde, dass Charge 1 aus 50 % Weizenanteil bestand und Hordatine gerstenspezifisch sind. Der Entfettungsprozess erwies sich als effektiv, da die entsprechenden Extrakte (A5, A7) höhere Mengen als die vergleichbaren Extrakte aus nicht entfettetem Material (A4, A6) aufwiesen.

In HA- und HE-Extrakten lagen tendenziell die gleichen Substanzklassen, v.a. Hydroxymyristinsäurederivate vor. Lediglich einige Dicarbonsäuren wurden in den HA- nicht aber in den HE-Extrakten nachgewiesen. Große Unterschiede ergaben sich hinsichtlich der Menge und der Vielfalt der enthaltenen DiFA-Isomere. So enthielten HE-Extrakte, besonders jene aus Extraktionsprozess 1 (HE1–HE3), deutlich höhere Hydroxymyristinsäuregehalte und eine höhere Anzahl verschiedener DiFA-Isomere als die HA-Extrakte. Auffällig war, dass Charge 3, sofern sie zuvor nicht entfettet worden war, signifikant geringere FA-Gehalte als die Extrakte der beiden anderen Chargen aufwies. Weiterhin zeigte sich im Vergleich mit Literaturdaten, dass das Extraktionsvolumen sowie NaOH-Konzentration einen großen Einfluss auf die extrahierte Gesamtmenge an HCAs und molekulare Größe der FA-Oligomere hat. So konnten keine Tri- oder Tetramere mit den hier eingesetzten Extraktionsmethodiken isoliert werden, wohingegen die monomeren Gehalte deutlich höher als in Vergleichsstudien lagen.

Neben den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen enthielten alle Extrakte verschiedene Isomere einiger Trihydroxyfettsäuren, wobei TriHOMEs in allen drei Extraktgruppen bestimmt wurden, die TriHODA jedoch nur in HA- und HE-Extrakten. Es zeigte sich weiterhin eine deutlich größere Isomerenvielfalt in Extrakten aus alkalischen Vorbehandlungen (HE, HA) als in Extrakten aus SLE (A). Eine genaue Analyse der Isomeren war aufgrund von Coelutionen nicht möglich, weshalb hier eine Optimierung der Trennung in weiteren Studien zielführend wäre.

Insgesamt erwiesen sich alle Extrakte als reich an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, wobei Phenolamide (bis zu 17 % Anteil am Gesamtextrakt durch Hordatine in A-Extrakten) und HCAs (bis zu 48 % Anteil am Gesamtextrakt durch HCAs in HE-Extrakten) als Leitsubstanzklassen zu nennen sind. In den HA-Extrakten entsprachen der HCA-Anteil nur 3 % am Gesamtextrakt,

weshalb hier die Leitsubstanzen nicht eindeutig den HCAs zugeordnet werden können. Die Quantifizierungen der Hordatine und HCAs erwies sich jedoch ohne Referenzsubstanzen als schwierig und die semiquantitativen Daten stellen lediglich eine Möglichkeit dar, Extrakte aus gleichen Prozessen direkt miteinander zu vergleichen. Die Synthese oder Isolierung der einzelnen Substanzen wäre daher eine geeignete Möglichkeit Referenzsubstanzen zu generieren, um eine präzise Quantifizierung der bioaktiven Substanzen zu ermöglichen.

Veröffentlichtes Manuskript

Received: 13 September 2022 | Revised: 25 November 2022 | Accepted: 29 November 2022

DOI: 10.1002/fsn3.3178

ORIGINAL RESEARCH

Food Science & Nutrition
WILEY

Characterization of brewer's spent grain extracts by tandem mass spectrometry and HPLC-DAD: Ferulic acid dehydrodimers, phenolamides, and oxylipins

Daniela Becker  | Simone Stegmüller | Elke Richling

Department of Chemistry, Division of Food Chemistry and Toxicology, Rheinland-Pfälzische Technische Universität Kaiserslautern-Landau, Kaiserslautern, Germany

Correspondence

Elke Richling, Department of Chemistry, Division of Food Chemistry and Toxicology, Rheinland-Pfälzische Technische Universität Kaiserslautern-Landau, Erwin-Schrödinger-Straße 52, 67663 Kaiserslautern, Germany.
Email: richling@chemie.uni-kl.de

Funding information

EU-INTERREG project BIOVAL supported by the European Funds for Regional Development, Grant/Award Number: project no. 018-4-09-021

Abstract

Brewer's spent grain (BSG) is a major by-product of the brewing industry which is generated in high amounts. In recent years, sustainable food production has become more and more important. BSG mainly used as cattle feed has gained high interest due to not only its valuable ingredients such as fiber and proteins but also secondary metabolites remaining in BSG after the brewing process and known for many biological effects. In the present study, various methods were applied, such as acetone extraction (A), alkaline hydrolysis followed by ethyl acetate extraction (HE), and acetone extraction of alkaline hydrolysis residue (HA). Compounds present in the respective bioactive extracts were characterized by mass spectrometry to identify the active compounds. Various hydroxycinnamic acid derivatives as well as oxylipins and some dicarboxylic acids, such as azelaic acid, were present in HE and HA extracts. In contrast, some catechins and phenolamides, such as numerous hordatines, as well as oxylipins and phospholipids were detected in A extracts. Quantification using HPLC-DAD revealed hordatine contents up to 172.2 ± 2.1 μg *p*-coumaric acid equivalents/mg extract. Hydroxycinnamic acid derivatives content accounted for up to 48% of the total extract (HE extracts) but only around 3% of the total HA extracts. In summary, all extracts contained secondary plant metabolites belonging to different classes, ranging from hydroxycinnamic acids to phenolamides, such as not only hordatines but also oxylipins, which were identified for the first time in BSG.

KEYWORDS

bioactives, Brewer's spent grain, ferulic acid derivatives, hordatines, oxylipins, polyphenols

1 | INTRODUCTION

Beer is the most popular alcoholic beverage worldwide and its annual global production in 2020 accounted for around 1.8 billion hectoliters (Barth, 2021). Its major by-product is the brewer's spent grain (BSG) with around 14–20 kg/100 L beer (Kunze, 2010; Olajire, 2020)

leading to high amounts (up to 39 million tons) of BSG worldwide. As a sustainable and responsible food production has become increasingly important, alternative usages of agri-food by-products such as BSG became crucial in recent years. BSG mainly consists of the insoluble part of the malt, which remains after the brewing process. Mainly barley grains and to a lesser extent other cereals, such

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2022 The Authors. *Food Science & Nutrition* published by Wiley Periodicals LLC.

as wheat or maize, are used (Lynch et al., 2016; Mussatto, 2014). Despite its high nutritional value due to its high protein (19–30% w/w) and fiber (30–50% w/w) content, BSG is often used as cattle feed. In recent years, other applications have been investigated, e.g., as an ingredient for human food to enhance its nutritional value (Merten et al., 2022; Sahin et al., 2021), used in biogas production (Szaja et al., 2020), or as an adsorbent to remove metals from waste water (Lu & Gibb, 2008). It is well-known that beer is rich in polyphenols such as hydroxycinnamic acids, flavonoids, and also phenolamides, as reviewed by Wannemacher et al. (2018), but many of these bioactive compounds have been reported to be present in BSG as well (Bonifácio-Lopes et al., 2020; Verni et al., 2020).

BSG is a lignocellulosic material with cellulose, hemicellulose, and lignin being the most abundant components. Hemicelluloses may be present at up to 40% of the total dry weight (dw) of BSG (Mandalari et al., 2005), and due to cross-linkers built from ferulic acid dehydridimers (DiFA), BSG is an interesting source of bound polyphenols (Stefanello et al., 2018). Lignin, a polyphenolic macromolecule, is found at up to 28% BSG dw and consists of not only monomers sinapyl/coniferyl and *p*-coumaroyl alcohol but also high amounts of polyphenols, such as ferulic acid (FA) or vanillic acid, as part of the lignin structure (Aura et al., 2013; Mussatto et al., 2010). Besides the lignocellulosic compounds in BSG, high amounts of proteins (14%–31%) (Santos et al., 2003; Xiros et al., 2008) have been reported with essential amino acids, such as methionine, tryptophane, or lysine, representing around 30% of the total protein content (Lynch et al., 2016). Moreover, up to 13% of lipids have been found in BSG (Xiros et al., 2008). Niemi et al. reported that the lipids comprised mostly triglycerides (55%), and also free fatty acids (30%), phospholipids (9.1%), and diglycerides (5.7%) (Niemi et al., 2012). Del Rio et al. reported similar distributions within lipid extracts of BSG, with palmitic, oleic, and linoleic acids being the predominant free fatty acids (Del Rio et al., 2013). Previously, Anness and Reud reported that most lipids from malt remained in BSG but around 30% of lipids were oxidized during mashing (Anness & Reud, 1985), which might lead to modified lipid classes in BSG. Arts et al. reported the presence of hydroxylated fatty acids resulting from enzymatic oxidation during the mashing process (Arts et al., 2007). In line with these findings, trihydroxylated fatty acids have been detected in beer (Esterbauer & Schauenstein, 1977). They belonged to the class of oxylipins, comprising oxidation products of polyunsaturated fatty acids with oxygen as well as their primary oxidation products (Arts et al., 2007).

Regarding the polyphenols in BSG, a distinction between bound and free compounds can be made and has been investigated in different studies (Birsan et al., 2019; Verni et al., 2020). The first step in the extraction process is usually SLE with organic solvents (free polyphenols), followed by alkaline hydrolysis (bound polyphenols), which disrupts ester bonds in the cell walls, leading to the liberation of hydroxycinnamic acids. Free polyphenols mainly consisted of flavonoids like catechin, whereby bound polyphenols such as hydroxycinnamic acid derivatives, particularly FA and *p*-coumaric acid (pCA) were present in 50- to 100-fold higher amounts (Birsan et al., 2019;

Verni et al., 2020). Ferulic acid oligomers are also part of the bound polyphenols and were reported to be contained in BSG (Birsan et al., 2019; Moreira et al., 2013; Verni et al., 2020).

We recently investigated the influence on glucose-metabolizing enzymes with BSG extracts prepared by solid-liquid extraction (SLE) with 60% acetone or alkaline hydrolysis followed by ethyl acetate as well as acetone extraction of alkaline hydrolysis residue (Becker et al., 2021). All of the extraction methods are well-known procedures and were already used for the extraction of polyphenols (Hernanz et al., 2001; Jay et al., 2008; Meneses et al., 2013). Our approach was to generate different extract groups with varying compounds including solid-liquid extracts containing flavonoids and other polyphenols and extracts from alkaline hydrolysis mainly containing hydroxycinnamic acids. Extensive purification by ethyl acetate extraction and SPE was performed to ensure the elimination of interfering carbohydrates (Aarabi et al., 2016; Michalkiewicz et al., 2008). The respective extracts were characterized by the total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC), but individual compounds were not identified yet. In the present study, the same BSG extracts were analyzed by tandem mass spectrometry, and specific compounds were quantified by HPLC-DAD in a semi-quantitative approach in order to identify active compounds.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Chemicals

Chemicals were of analytical grade and obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) unless otherwise stated. HPLC LC-MS grade and supergradient HPLC grade acetonitrile and HPLC LC-MS grade methanol were obtained from VWR Chemicals (Darmstadt, Germany). Formic acid was purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), and formic acid Optima LC-MS grade from Fisher Chemicals (Waltham, USA). *Trans*-ferulic acid (purity 99%), caffeic acid (purity ≥98%), *p*-coumaric acid (purity ≥98%), *trans*-cinnamic acid (purity 99%), L-tryptophan (purity ≥98%), and 3,4-dimethoxycinnamic acid (purity 99%) were obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Nonanedioic acid (azelaic acid) (purity ≥98%), octanedioic acid (suberic acid) (purity ≥98%), (9, 10, 13)-trihydroxy octadecenoic acid (purity >99%), and (9,12,13)-trihydroxy octadecenoic acid (purity >99%) were purchased from Larodan (Solna, Sweden).

2.2 | BSG samples and extracts

Three different batches of BSG were used: one from the conventional Orval Brewery in Belgium (Florenville, Belgium, BSG 3) and two supplied by the brewing group of the Chair of Bioprocess Engineering at the Technische Universität Kaiserslautern (Kaiserslautern, Germany; BSG 1–2). The malts used for these batches are listed in Table 1.

Extracts were prepared using three different extraction processes: combinations of (a) ultrasound-assisted alkaline hydrolysis

TABLE 1 Raw material for extraction and malt composition of BSG as well as nomenclature of BSG extracts (purified by SPE and lyophilized)

| Raw material used | Malt used for brewing | Process 1 | | Process 2 | | Process 3 |
|-------------------|---|--------------------|--|--|--|--|
| | | Acetone extraction | Purification by solid-phase extraction | Alkaline hydrolysis + ethyl acetate extraction | Alkaline hydrolysis + ethyl acetate extraction | Acetone extraction of hydrolysis residue |
| BSG 1 | Wheat malt (54.3%) and Pilsen malt (45.7%) | A1 | HE1 | | | |
| BSG 2 | Weyermann® Vienna malt (100%) | A2 | HE2 | | HE4 | A4 |
| BSG 2 defatted | | | | | HE6 | A5 |
| BSG 3 | Pilsen malt (90%), caramel malt (9%), peeled, and roasted barley (1%) | A3 | HE3 | | HE5 | A6 |
| BSG 3 defatted | | | | | HE6 | A7 |

with 4 M sodium hydroxide (NaOH) followed by ethyl acetate extraction (HE extracts), (b) SLE with 60% acetone (acetone/water: 60/40; v/v; A extracts), and (c) acetone extraction of alkaline hydrolysis residue (HA extracts). All extractions were followed by a purification step using solid-phase extraction with C18ec material and a lyophilization process as previously described in more detail (Becker et al., 2021). As a result, three different extract groups, labeled A1–A7 (solid-liquid extraction with 60% acetone), HE1–HE6 (alkaline hydrolysis followed by ethyl acetate extraction), and HA1–HA3 (acetone extraction of hydrolysis residue), were obtained (Table 1).

2.3 | HPLC-MS/MS characterization of BSG extracts

Analysis of the extracts listed in Section 2.2 was performed with HPLC-MS (Appendix S1: Supplement Material A). HPLC conditions were as follows: Synergi 4 μm polar RP 80 Å column (250 mm \times 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, California, USA); solvent system: A 0.1% formic acid and B acetonitrile; gradient profile: isocratic 10% B for 9 min, from 10 to 25% B over 1 min, isocratic 25% B for 9 min, from 25 to 50% B over 15 min, from 50 to 98% B over 6 min, isocratic 98% B for 10 min, from 98 to 10% B over 0.1 min, and isocratic 10% B for 10 min; flow rate 800 $\mu\text{l}/\text{min}$; injection volume 20–50 μl (depending on HPLC-MS system used); column oven temperature 30 $^{\circ}\text{C}$; samples measured at concentrations of 100–1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for extracts and 1–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for reference (depending on HPLC-MS system used); substances in methanol/formic acid (99.9/0.1; v/v), membrane filtered (0.45 μm) prior injection; and UV detection: 280, 300, and 320 nm. ESI_{pos}-MS(/MS) and ESI_{neg}-MS(/MS) conditions can be found in the supplement materials (Appendix S1: Supplement Material A). Initially, precursor ions were identified from a full scan followed by a product ion scan.

2.4 | Identification of phenolamides

Identification of phenolamides was achieved by HPLC-MS as previously described (Becker et al., 2022). Different extract concentrations were measured due to varying phenolamide content, and therefore huge differences in signal intensity to ensure clear identification are as follows: A1: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, A2: 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$, A3: 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, A5 and A6: 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and A7: 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in methanol/formic acid (99.9/0.1; v/v), membrane filtered (0.45 μm) prior injection; and injection volume was set to 20 μl .

2.5 | Structural elucidation of ferulic acid dehydromers and identification of oxylipins

Structural elucidation of DiFAs as well as identification of trihydroxy oxylipins were performed by HPLC-MS (Appendix S1: Supplement Material A) and product ions scans. HPLC conditions were as follows:

Synergi 4 μm polar RP 80 Å column (250 mm \times 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, California, USA); solvent system: A 0.1% formic acid and B acetonitrile; gradient profile: isocratic 25.1% B for 11 min, from 25.1 to 34.5% B over 30 min, from 34.5 to 98% B over 0.1 min, isocratic 98% B for 7 min, from 98 to 25.1% B over 0.1 min, and isocratic 25.1% B for 12 min; flow rate: 800 $\mu\text{l}/\text{min}$; injection volume: 5–20 μl (depending on the extract solution concentration and expected concentration of the compound) membrane filtered (0.45 μm) prior injection; column oven temperature: 35 $^{\circ}\text{C}$; and sample concentration in 0.1% formic acid in methanol: 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. ESI_{neg}-MS(MS) conditions can be found in the supplement material (Appendix S1: Supplement Material A).

2.6 | Quantification of total hordatine content by HPLC-DAD

Total hordatine content was determined as *p*-coumaric acid equivalents (*p*CA-Eq) based as previously described (Becker et al., 2022) using a correction factor (CF) due to the different UV absorption of hordatines and *p*CA which was adapted from published data (Pihlava et al., 2016).

Two independent extract solutions were prepared and each was injected three times (except A2, six injections of the same extract solution). LOD was determined as 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and LOQ as 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The precision of the method was determined by inter- and intra-day repetition experiments; and the coefficient of variation was 0.5% for intra-day and 0.8% for inter-day experiments. Matrix effects were evaluated by comparison of internal standards response in extract matrix compared to solvent and were determined with a deviation of 5.8%, which was significant ($p < .05$) indicating only slight matrix effects. Detailed information on the method validation can be found in Section 2.9.

2.7 | Quantification of hydroxycinnamic acids by HPLC-DAD

Three hydroxycinnamic acids, namely *p*CA, *trans*-FA, and caffeic acid (CA), were quantified by HPLC-DAD. Based on the peak area of compounds in relation to the peak area of an IS, an external calibration curve ranging from 2.5–75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for *p*CA, 2.5–150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for FA, 2.5–25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for CA, and 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ *trans*-cinnamic acid as IS was used. Additionally, DiFAs were quantified as FA-Eq since no pure substances were available. All sample dilutions were prepared in methanol/formic acid (99.9/0.1; v/v). Quantification was performed using HPLC-DAD (Appendix S1: Supplement Material A).

HPLC conditions were as follows: Synergi 4 μm polar RP 80 Å column (250 mm \times 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, California, USA); solvent system: A 0.1% formic acid and B acetonitrile; gradient profile: from 15 to 25.1% B over 7 min, isocratic 25.1% B for 4 min, from 25.1 to 34.5% B over 30 min, from 34.5 to 98% B within 0.1 min, isocratic 98% B for 8 min, from 98 to 15% B within 0.1 min, and

re-equilibration for 12 min; flow rate: 800 $\mu\text{l}/\text{min}$; injection volume: 20 μl , membrane filtered (0.45 μm) prior injection; column oven: 35 $^{\circ}\text{C}$; detection wavelength: 300 nm (reference wavelength 440 nm); and extracts were measured at concentrations of 250–1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ prepared in methanol/formic acid (99.9/0.1; v/v).

Two independent extract solutions were prepared and each was injected two or three times. LOD was determined for each as 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and LOQ as 2.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for *p*CA and CA, and 2.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for FA. The precision of the method was determined by inter- and intra-day repetition experiments; the coefficients of variation were 1.4% (*p*CA), 1.2% (FA), and 2.2% (CA) for intra-day, and 3.2% (*p*CA), 2.5% (FA), and 2.4% (CA) for inter-day experiments. Matrix effects were evaluated by indirect regression using spiking method. Within both extract groups (HA and HE) no significant matrix effect was observed for the three investigated hydroxycinnamic acids. Detailed information on the method validation can be found in Section 2.9. Results were multiplied with a substance-specific CF, which was obtained from the slope of a regression line obtained by plotting concentration (*p*CA, FA, and CA) \times area (IS) on the y-axis vs. concentration (IS) \times area (*p*CA; FA; CA) on the x-axis. Experiments were performed twice, each comprising three injections. Specific CFs were calculated as follows: *p*CA 0.873; FA 1.301; and CA 1.211. Due to the lack of availability of pure substances, no CFs for DiFAs could be calculated.

2.8 | Statistical analysis

Results for quantification were presented as means and SD of two independent experiments, each analyzed in duplicate/triplicate. Statistical analyses were performed with Origin 2019G (OriginLab, Northampton, USA) and Excel Office Professional Plus 2016 (Microsoft, Redmond, USA). Data were checked for normality (Anderson Darling test) and homogeneity of variance (Fisher test). Significant differences between and within extraction groups were evaluated using a one-sample *t*-test (one sided) (Couallier, 2013; Fahrmeir et al., 2016). Differences were considered significant at $p < .05$; $p < .01$; and $p < .001$ levels.

Matrix effects within quantification methods were evaluated using a two-sided *t*-test and checked for (a) differences between internal standard response in extract matrix solution compared to solvent solution (for hordatine quantification) or (b) significant differences between experimental determined *b*-value, an indicator for multiplicative systemic errors achieved by indirect regression (see Section 2.9 for hydroxycinnamic acids quantification) and theoretical *b*-value of 0.

2.9 | Method validation

Calibration curves were checked for normality (David test) and outliers (Nalimov test). The working range of standard substances as well as the IS was examined for linearity. The method sensitivity was

assessed by determination of LOD and LOQ of each compound by a calibration approach. Five concentrations (hydroxycinnamic acid quantification: 0.25–5.0 µg/ml for pCA; 0.25–2.5 µg/ml for CA and FA; and hordatine quantification: 0.25–2.5 µg/ml for pCA) including a blank were prepared in duplicate and analyzed. LOD was calculated as follows:

$$x_{LOD} = 3.8 * \frac{S_{y,x}}{b} * \sqrt{1.1 + \frac{(\bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

where x_{LOD} is the LOD, $S_{y,x}$ is the SD of residuals, b is the slope of the calibration curve, \bar{x} is the mean calibration level, and x_i is the content value of the analyte at calibration level i . LOQ was calculated as 3.3 times LOD (European Commission; Joint Research Centre, 2016). Precision was evaluated by an inter- and intra-day repetition method. Intra-day repeatability was assessed by five replicate analyses of one standard concentration; and inter-day reproducibility was obtained by analysis of one concentration level of the analyte for 5 days in a row. Mean and SD of each experiment were determined, and the coefficient of variance was calculated.

Matrix effects were evaluated by two methods. For hordatine quantification, a comparison of internal standard (20 µg/ml 3,4-dimethoxycinnamic acid) response in extract matrix and solvent matrix (0.1% formic acid in methanol) was performed. Mean values of all measurements ($n = 2$; triplicates; each replicate: AUC mean value of seven extracts and six pCA calibration solutions) were analyzed with regard to their deviation (%). Matrix effects within hydroxycinnamic acids' quantification was evaluated by indirect regression method using spiking (Wellmitz & Gluschke, 2004). Three different concentrations of FA, pCA, and CA (for HE extract) were each added to one HA extract (1000 µg/ml) and one HE extract (250 µg/ml) as follows: for HA extract pCA: 5, 7.5, and 20 µg/ml; FA: 10, 17.5, and 40 µg/ml; for HE extract: pCA: 20, 25, and 35 µg/ml; FA: 50, 75, and 100 µg/ml; and CA: 2.5, 5, and 7.5 µg/ml. Each extract was analyzed spiked as well as unspiked and each reference spiking solution was also analyzed in pure solvent. Criteria for matrix effects is the b -value which was calculated as follows:

$$b = \frac{x_3 - x_1}{x_4}$$

where x_3 = AUC of spiked extract, x_1 = AUC of unspiked extract, and x_4 = AUC of reference spiking solution. Mean b -values were calculated ($n = 2$; duplicates; each replicate includes three spiking levels of each reference substance) and analyzed for significant differences to theoretical b -value of 0.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

BSG extracts were prepared by three different extraction processes as previously described (see Section 2.2, Becker et al., 2021),

resulting in three extract groups (HA, HE, and A; Table 1). All methods applied have previously been used to extract polyphenols from BSG. Meneses et al. found 60% acetone to be the most effective solvent among various aqueous, organic, solvent mixtures regarding the total phenolic content of the generated BSG extracts (Meneses et al., 2013). Thus, it was used to generate A1–A7 extracts. Besides enzymatic treatment, alkaline hydrolysis represents the method of choice for the extraction of hydroxycinnamic acids from plant material, whereby concentrations ranging from 1 to 4 M NaOH are normally used (Hernanz et al., 2001; Jay et al., 2008). Ester-linked hydroxycinnamic acids and also sugars can be released by NaOH and are therefore found in the aqueous extracts from alkaline hydrolysis. Hence, ethyl acetate extraction was used to eliminate liberated carbohydrates from the raw extracts leading to HE1–HE6 extracts. Furthermore, a second extraction step with 60% acetone was performed using the solid residue of the hydrolysis to ensure that all hydroxycinnamic acids were extracted and HA1–HA3 extracts were generated. Additionally, all three extract groups were purified and secondary metabolites were concentrated using SPE with C18ec material (Michalkiewicz et al., 2008). HPLC-MS/MS analysis showed that the extracts strongly differed regarding their main compounds: A1–A7 extracts contained some polyphenols but were mainly rich in hordatines. HE1–HE6 extracts were rich in not only hydroxycinnamic acids, which were released from cell wall arabinoxylans by alkaline treatment, as described in the literature (Stefanello et al., 2018), but also trihydroxy oxylipins were detected. HA1–HA3 extracts were generated to ensure almost complete extraction of hydroxycinnamic acids. In general, similar compounds as in HE extracts were identified in HA extracts, namely hydroxycinnamic acids and trihydroxy oxylipins, although the amounts were much lower.

3.1 | Compound identification in extracts by HPLC-MS/MS

Extracts were analyzed by HPLC-UV-ESI-MS/MS using two different systems but the same HPLC method; specific MS parameters are shown in the results (Figure 1). For each extract group (A, HE and HA), a HPLC-DAD chromatogram recorded at 300 nm is presented in Table 2–4. In general, chromatograms within one extract group were very similar to each other and independent of the BSG batch recorded.

Tables 2–4 present the mass spectral data of compounds identified in the respective extracts by HPLC-ESI-MS/MS. Some signals were tentatively identified as hordatines (signal 2–4 in Figure 1a) or DiFAs and oxylipins (signals 6–11 in Figure 1b and signal 6–17 in Figure 1c) but will not be presented within this section since the methods had to be optimized in terms of chromatographic separation. All results regarding those compounds will be discussed in Sections 3.2 and 3.3. Identification was based on comparison of MS (parent ion) and MS/MS (fragment ion) data and the retention time (t_R) with those of commercially available standards or published

TABLE 2 Identification of compounds in B50 A extracts by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-ESI-MS (negative and positive mode, t_R : retention time, DP: declustering potential, CE: collision energy; x: compound contained; (x): only precursor ion detected in MS/MS mode; -: compound not detected; fragment ions listed in order of decreasing intensity

| Peak | Compound (tentative identification) | t_R (min) | $[M+H]^+$ / $[M-H]^-$ (m/z) | Fragments (m/z) | CE (eV) | DP(V) | Extracts | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 |
|----------------------------------|-------------------------------------|-------------|-----------------------------|--|---------|-------|----------|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|
| A extracts | | | | | | | | | | | | | | |
| No UV signal | Tryptophan | 10.1 | 205 ^a | 188, 146, 159, 205, 170, 132 | 15, 20 | 100 | x | x | - | x | x | - | - | - |
| 1 | Coumaroyl hydroxy-tyramine | 14.7 | 293 ^a | 293, 147, 275, 259 | 20 | 100 | - | x | - | x | x | x | - | x |
| 2 (overlaid signal) | (+)-Catechin | 16.1 | 289 ^b | 123, 109, 137, 97 | -40-50 | -100 | - | (x) | - | x | x | x | (x) | (x) |
| 2 (overlaid signal) | Catechin-dimer/Procyanidin B | 16.2 | 577 ^b | 125, 245, 203, 151, 137, 109, 289 | -50 | -100 | - | (x) | - | x | - | - | - | - |
| 2-4 Hordalinins see Section 3.2. | | | | | | | | | | | | | | |
| No UV signal | Not identified | 21.3 | 189 ^a | 125, 170, 97 | 20 | 100 | - | - | x | - | - | - | x | - |
| No UV signal | Not identified | 31.5 | 348 ^a | 295, 155, 277, 195, 173, 213, 171, 259, 313, 348 | 20 | 100 | x | x | x | x | x | x | x | (x) |
| | | 34.7 | | | | | (x) | x | - | x | x | x | x | - |
| 5 | Not identified | 34.7 | 527.6 ^a | 527, 509, 425.5, 491, 473.5, 455, 349, 367, 332 | 20 | 100 | x | x | - | (x) | x | x | x | (x) |
| 6 | Not identified | 35.4 | 367.5 ^a | | 20 | 100 | x | x | (x) | x | x | x | x | x |
| | | 36.3 | | | | | x | x | (x) | x | - | - | - | x |
| | | 37.8 | | | | | (x) | x | - | - | - | - | - | (x) |
| 7 | Not identified | 35.5 | 365.5 ^a | 347, 330.5, 365.5, 259, 217 | 20 | 100 | x | x | (x) | x | (x) | x | (x) | x |
| | | 36.3 | | | | | x | x | - | x | - | x | - | - |
| | | 36.8 | | | | | x | x | - | x | - | x | - | - |
| No UV signal | LPE 18:2 | 37.9 | 478 ^a | 478, 337, 460, 306 | 20 | 100 | x | x | (x) | (x) | - | - | x | x |
| | | 39.3 | | | | | x | x | - | x | - | x | - | (x) |
| No UV signal | LPE 18:0 | 40.1 | 454 ^a | 313, 454, 436 | 20 | 100 | x | x | - | x | - | x | (x) | - |

^a[M+H]⁺.

^b[M-H]⁻.

TABLE 3 Identification of compounds in BSG HA extracts by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-ESI-MS (negative and positive mode, t_R : retention time, DP: declustering potential, CE: collision energy; x: compound confirmed; (x): only precursor ion detected in MS/MS mode; -: compound not detected; fragment ions listed in order of decreasing intensity

| Peak | Compound (tentative identification) | t_R (min) | $[M+H]^+$ (m/z) | $[M-H]^-$ (m/z) | CE (eV) | DP (V) | Extracts |
|--------------------|-------------------------------------|-------------|---------------------|------------------------------------|---------|--------|-------------|
| | | | | | | | HA1 HA2 HA3 |
| | No UV signal | 9.9 | 192 ^a | 83, 101, 139, 59, 99, 157, 175, 69 | 20 | 100 | x x x |
| 1 | Not identified | 16.1 | 247 ^b | 247, 171 | -20 | 100 | - x x |
| 1 (overlap signal) | Not identified | 16.1 | 199 ^a | 139, 121, 199, 97 | 20 | 100 | x x x |
| 2 | Suberic acid | 16.9 | 173 ^b | 173, 111, 155, 83 | -20 | 100 | - x x |
| 3 | Not identified | 17.3 | 215 ^a | 83, 139, 121, 197, 123 | 20 | 100 | x x x |
| | | 19.4 | | | | | x x x |
| | No UV signal | 19.6 | 187 ^b | 125, 187, 169, 97 | -20 | -100 | - x x |
| 4 | pCA | 19.3 | 163 ^b | 119, 117, 73, 163 | -20 | -100 | x x x |
| 5 | FA | 20.6 | 193 ^b | 134, 178 | -20 | -100 | x x x |
| 6-11 | DIFA and TrFA see Section 3.3 | | | | | | |

^a[M+H]⁺.

^b[M-H]⁻.

data if no standard was available. Besides polyphenolic compounds, such as hydroxycinnamic acids, hordatines and catechin, tryptophan, phospholipids, and dicarboxylic acids were identified.

Some A extracts (A1, A2, A4, and A5) showed the presence of tryptophan (not visible in chromatogram recorded at 300 nm but at 280 nm, data not shown), an essential amino acid, which was verified using a reference substance. It has already been reported to be present in BSG (Essien & Udotong, 2010), but was not found in extracts from BSG 3 (A3, A6, and A7). This could be due to different storage times since microorganisms can degrade amino acids. Besides hordatines (see Section 3.2), coumaroyl hydroxy-*agmatine*, a monomeric precursor of hordatines, was identified by mean of its fragmentation pattern (von Röpenack et al., 1998). It was not observed in the A1, A3, and A6 extracts, which was not surprising for extract A1 as it was produced from BSG composed of 50% wheat/50% barley grain malt, and hordatines are known to be largely barley-specific compounds. Extracts from BSG3 did not contain the hordatine precursor except in previously defatted samples (A7). This might be for two reasons. It is possible that the hordatine precursor was concentrated by the defatting process, or the defatting procedure may have caused modifications of the contained components. Catechin derivatives, such as (+)-catechin and procyanidin B, were detected in some extracts, mainly from BSG 2 (A2, A4, and A5), and were verified by using a reference substance. Catechins have previously been detected in BSG. Procyanidin dimers (m/z 577) and catechin (m/z 289) were observed recently in BSG extracts from acetone-water liquid-liquid extraction (LLE) (Martin-García et al., 2019). Both are already reported to be potent inhibitors of α -glucosidase (Bräunlich et al., 2013; You et al., 2011), indicating that they might contribute to the A extracts inhibitory effects detected in our previous study (Becker et al., 2021). Besides the phenolic compounds, three lysophosphatidylethanolamines (LPEs) (m/z 478 and m/z 454) were detected by their characteristic fragments of m/z 337 and 313 resulting from a loss of m/z of 141 (Fang & Barcelona, 1998). Phospholipids accounted for around 9.1% in lipid fractions of BSG, which corresponded to around 11% of the total (Niemi et al., 2012). No single phospholipids have been reported to be present in spent grains so far. Regarding the different BSG batches, no clear correlation was observed, and phospholipids were detected in all batches under study. However, a recently published study demonstrated that phospholipids in milk thistle oil inhibit α -glucosidase (Harrabi et al., 2021). Therefore, they might also be important regarding the enzyme-inhibition by the A extracts found in our last study (Becker et al., 2021). Further compounds were detected but could not be identified; most of them eluted in a similar region as the LPEs, indicating relatively high lipophilicity. Additionally, most of them (m/z 348, 367, and 365) were observed in up to three isomeric forms. Compounds 6 and 7 only differed by 2 Da, which could indicate that compound 6 was the saturated form of compound 7. Also, both showed similar fragments corresponding to two times loss of 18 Da, which was probably due to the loss of water. A summary of all identified compounds in A extracts is shown in Table 2.

TABLE 4 Identification of compounds in BSG HE extracts by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-ESI-MS (negative ionization mode, t_R : retention time, DP: declustering potential, CE: collision energy; x: compound contained; (x): only precursor ion detected in MS/MS mode; -: compound not detected; fragment ions listed in order of decreasing intensity

| Peak | Compound (tentative identification) | t_R (min) | [M-H] ⁻ (m/z) | Fragments (m/z) | CE (eV) | DP (V) | Extracts | | | | | | | |
|---------------------|--|--------------|--------------------------|--------------------|---------|--------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|
| | | | | | | | HE1 | HE2 | HE3 | HE4 | HE5 | HE6 | | |
| 1 | CA (probably <i>cis</i> - and <i>trans</i> -isomer) | 16.7 17.8 | 179 | 135, 179, 153 | -20 | -100 | - | x | - | x | x | x | x | x |
| 1 (overlaid signal) | Suberic acid | 16.9 | 173 | 173, 111, 155, 83 | -20 | -100 | x | (x) | x | - | x | x | x | x |
| 2 | Coumaric acid dimer | 19.1 | 373 | 163, 327, 283, 119 | -20 | -100 | x | x | x | x | - | x | - | x |
| 3 | pCA (probably <i>cis</i> - and <i>trans</i> -isomer) | 19.3 20.4 | 163 | 119, 117, 73, 163 | -20 | -100 | x | x | x | x | x | x | x | x |
| No UV signal | Azelaic acid | 19.6 | 187 | 125, 187, 169, 97 | -20 | -100 | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 4 | FA (probably <i>trans</i> -isomer) | 20.5 | 193 | 134, 178, 149, 193 | -20 | -100 | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 5 | FA (probably <i>cis</i> -isomer) | 21 | 193 | 134, 178, 149, 193 | -20 | -100 | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 6-17 | DIFAs and TriFAs; see Section 3.3 | | | | | | | | | | | | | |

As expected from the HPLC chromatograms recorded at 300 nm, HA extracts contained different compounds from A extracts (Table 3). The extraction process used to prepare the HA extracts has not been reported in the literature until now. They are best described as LLE (acetone) extracts from alkali pre-treated BSG. It is well known that alkaline hydrolysis of BSG releases bound polyphenols, mainly hydroxycinnamic acids, which form part of the cell wall structure as cross linkers (Stefanello et al., 2018). Thus, FA and pCA were observed in all three HA extracts and verified by using a reference substance. Besides the monomeric hydroxycinnamic acids, precursor ions of DiFAs and trihydroxy oxylipins were observed (full scan; m/z 100–1000; data not shown) and analyzed further by tandem mass spectrometry (see Sections 3.3.1. and 3.4). Moreover, two dicarboxylic acids, i.e., suberic and azelaic acid, were identified by their fragmentation patterns and showed good agreement with the reference substance fragmentation and t_R . Cereals and whole grains are known to be a good source of carboxylic acids (Lohaus et al., 1983) and have been detected in BSG. However, as noted for the A extracts, some compounds remained unidentified.

HE extracts (Table 4) contained similar compounds to those in HA extracts, but the signals for hydroxycinnamic acids were more intense and isomeric forms of pCA and FA presenting the same fragmentation pattern were detected. Additionally, two isomers of CA already detected in BSG (Moreira et al., 2013; Verni et al., 2020) were observed in all HE extracts. The isomers for FA, pCA, and CA were tentatively assigned as *cis*- and *trans*-isomers which can be expected from literature (Callipo et al., 2010) with the *trans*-isomer being the main naturally occurring one. Moreover, a dimer of coumaric acid was identified by means of its fragmentation pattern (Spinola et al., 2018). As in HA extracts, DiFAs, dehydrotriferulic acids (TriFAs), and oxylipins were indicated in negative full scans (m/z : 100–1000 Da; data not shown), and the results are discussed in Sections 3.3 and 3.4.

3.2 | Characterization of A extracts: Identification of phenolamides and quantification of hordatines

The results of the initial LC-MS (MS) experiments (see Section 3.1.) showed that A extracts differed significantly from HA and HE extracts regarding the main compounds, which were tentatively identified as hordatines according to our previously reported study (Becker et al., 2022). In the frame of this work, 60% acetone was used, as it was described in literature as among the most appropriate solvents for the extraction of polyphenols (Meneses et al., 2013). However, a similar solvent (75% acetone) was also used by Kohyama and Ono to isolate hordatines from barley (Kohyama & Ono, 2013). Enhanced product ion scans were performed to specify each hordatine structure and led to further phenolamides being detected. Also, the total hordatine content as pCA-Eq was determined as lately reported by HPLC-DAD (Becker et al., 2022).

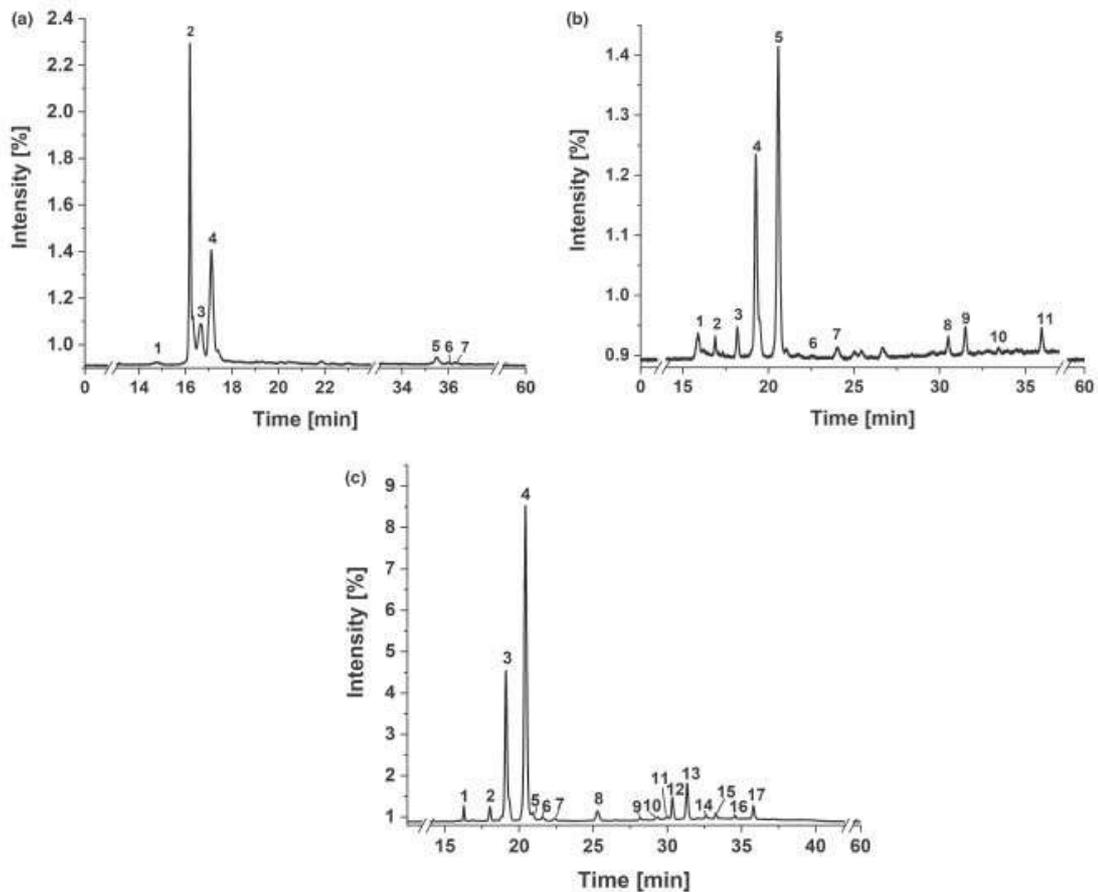


FIGURE 1 HPLC-DAD chromatograms ($\lambda = 300\text{ m}$) of (a) A5 (acetone extract of BSG 2, defatted), (b) HA2 (acetone extract of hydrolysis residue of BSG 2), and (c) HE2 (ethyl acetate extract of alkaline hydrolysis of BSG 2) extract; numbering of signals, which were further analyzed by MS/MS experiments; data presented in Tables 2 to 4

3.2.1 | Identification of phenolamides in extracts

Phenolamides are an important group of secondary plant metabolites and are also known as hydroxycinnamic acid amides. Their structure comprises at least two components: a phenolic moiety, such as *p*CA, FA, CA, or sinapic acid, and amine part, such as dopamine, tyramine, tryptamine, agmatine, or spermidine, linked to each other by an amide bond. Oligomeric structures and glycosylated forms can also occur and were already reported many years ago for barley. Specific phenolamides, hordatines (Figure 2), which are dimeric forms of hydroxycinnamoyl agmatines, were identified in barley leaves (von Röpenack et al., 1998) in beer where they contribute to astringency (Kageyama et al., 2011; Pihlava et al., 2016) and also in BSG (Becker et al., 2022), which demonstrates their high heat and enzyme stability. Furthermore, some hydroxycinnamoyl

putrescines and spermidines were already detected in barley beer (Pihlava, 2014).

Phenolamide structures were clarified by enhanced product ion scans and characteristic fragments according to our previously reported results (Becker et al., 2022) and by means of published data. HPLC-ESI_{pos}-MS/MS chromatograms and corresponding MS² spectra of some selected hordatines can be found in the Appendix S1: Supplement Material B.

The most characteristic fragment ions for all hordatines are the double-charged parent ion $[M+2H]^{2+}$ as well as the fragments resulting from the agmatine moiety for hordatines A, B, and C, and their glycosides (m/z 157 ($C_5H_{12}N_4O^+$), 131 ($C_5H_{14}N_4^+$), 114 ($C_5H_{14}N_4^+-NH_2$), 98 ($C_5H_{12}N_4O^+-CH_2N_2$), and 72 ($C_5H_{14}N_4^+-CH_2N_2$)) and the hydroxylated agmatine moiety for hordatines A1, B1, C1 and A2, B2, C2, as well as their glycosides (m/z 147 ($C_5H_{12}N_4O^+$) and 173

| hordatine | R ₁ | R ₂ | X ₁ | X ₂ |
|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| A | H | H | H | H |
| B | OCH ₃ | H | H | H |
| C | OCH ₃ | OCH ₃ | H | H |
| A1 | H | H | OH | H |
| B1 | OCH ₃ | H | OH | H |
| C1 | OCH ₃ | OCH ₃ | OH | H |
| A2 | H | H | OH | OH |
| B2 | OCH ₃ | H | OH | OH |
| C2 | OCH ₃ | OCH ₃ | OH | OH |

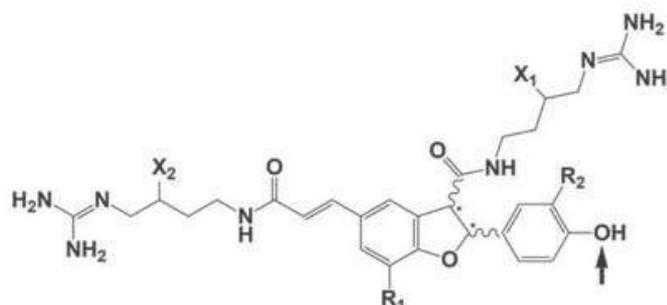


FIGURE 2 Structures of hordatines found in BSG extracts; all aglycons have been detected, monoglycosidic forms for hordatines A–C and A1–C1, and diglycosidic forms for hordatines A–C; glycosylation (1–3 hexose units) occurs at the hydroxyl group position indicated by the arrow; and sugar moiety: hexose (hex); numbering adapted from published data (Kageyama et al., 2013; Pihlava, 2014)

(C₆H₁₂N₄O₂⁺). For glycosidically conjugated hordatines, a neutral loss of 162u resulting from the loss of a hexose unit was also specific.

Besides hordatines, monomeric hydroxycinnamic acid agmatines, such as feruloylagmatine, a precursor of hordatine B and C, were detected. In contrast to the dimeric forms, namely the hordatines, only single-charged parent ions were found. Characteristic fragments resulted from cleavage of the amide bond and loss of an agmatine moiety to feruloyl (*m/z* 177) and coumaroyl moieties (*m/z* 147).

Similar fragmentation as for feruloylagmatine was also observed for the spermidine conjugates coumaroyl feruloyl spermidine and bis-coumaroyl spermidine. Loss of a polyamine moiety also resulted in *m/z* 177 for the feruloyl and *m/z* 147 for the coumaroyl unit. Based on the enhanced product ion scans, no information about the position of the hydroxycinnamoyl acid on spermidine could be obtained.

As also seen within our last study (Becker et al., 2022), many different isomers (*cis* and *trans*, regio-isomer, or epimers of the hexose unit) of each hordatine can occur and may be found in the extracts whereby a summary of all phenolamides is shown in Table 5. Regarding the aglycons, the isomers found within this study varied slightly from our previous results. Especially, the amount of double hydroxylated hordatine isomers A2 to C2 was lower within the investigated extracts compared to the isolated fractions in our previously reported study (Becker et al., 2022). This might be due to the much more specified isolation process since the crude isolate which would be comparable to the extracts investigated here (A1–A7) was fractionated and thus hordatines were more concentrated in each fraction. Therefore, it might be possible that some isomers are only contained in very small amounts and have not been detected within our extracts. When comparing the different isomers for glycosides, similar differences can be found whereby for some hexosides (e.g., hordatine C and C1 hexoside) more isomers were detected within this study in each extract. Nevertheless, no hexosides of hordatines A2 to C2 were observed in none of the extracts, too. Furthermore, the two processes to extract the hordatines varied and it cannot be

excluded that this might also lead to modifications of the original hordatine structure.

Comparing the amount of hordatines present in the extracts and taking into account the much higher measured concentrations for extracts A1–A3, it is likely that extracts A4–A7 contained considerably more different hordatine structures. This was an expected result for extract A1 since hordatines are known to be barley-specific compounds and A1 was produced from malt originating from 50% wheat.

Regarding the biosynthetic precursors of hordatines, similar results were already observed in our previously reported study. Both precursors were also found in our hordatine-rich fractions prepared from BSG (Becker et al., 2022). Also, differences between the BSG batches were observed in the study presented here. *N*-coumaroylagmatine was only detected in BSG 2 extracts (A2, A4, and A5). Also, *N*-feruloylagmatine isomers were more dominant in extracts from BSG 2 since the second isomer as well as the glycosylated structure were only both seen in extracts A2, A4, and A5. In addition to agmatine-containing phenolamides, two hydroxycinnamoyl spermidines were identified. Both were not observed or only in small amounts in extracts from BSG 3 (A3, A6, and A7). Spermidine conjugates have not been identified in BSG so far but were reported to be present in barley (Pihlava, 2014).

3.2.2 | Total hordatine content of extracts

Total hordatine content in A extracts was determined as pCA-Eq as previously described (Becker et al., 2022) and ranged from 14.2 ± 0.5 to 172.2 ± 2.1 µg pCA-Eq/mg extract. The amounts can be considered an estimation of total hordatines in BSG extract due to slight matrix effects and calculation as equivalents. However, significant differences between the extracts were observed (Figure 3). Extract A1, originating from malt with around 50% wheat content, had a significantly lower total hordatine content than all the other

TABLE 5 Phenolamides (hordatines, hydroxycinnamic acid agmatines, and hydroxycinnamoyl spermidines) found in A1–A7 extracts tentatively identified by double-charged parent ion and characteristic fragments; x: contained and fragmentation sufficient, (x): insufficient fragmentation due to low concentration, partially only parent ion observed, -: not detected; fragment ions listed in order of decreasing intensity

| Phenolamide | t_R (min) | $[M+H]^+$ (m/z) | $[M+2H]^{2+}$ (m/z) | Main Fragments (m/z) | Extracts | | | | | | |
|----------------------------------|-------------|---------------------|-------------------------|--|----------|-----|-----|----|----|-----|-----|
| | | | | | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 |
| N-Feruloyl agmatine hexose (hex) | 11.8 | $[M+H]^+$ + 469 | | 469, 307, 177, 145, 117, 89 | (x) | x | - | x | x | x | x |
| N-Feruloyl agmatine (2 isomers) | 14.5 | $[M+H]^+$ + 307 | | 307, 145, 177, 89, 117 | (x) | (x) | - | x | x | - | - |
| | 17.2 | | | | x | x | x | x | x | x | x |
| N-Coumaroyl agmatine | 15.8 | $[M+H]^+$ + 277 | | 277, 147, 119, 91 | - | x | - | x | x | - | - |
| p-Coumaroyl feruloyl spermidine | 26.2 | $[M+H]^+$ + 468 | | 468, 147, 177, 204, 117, 234, 322, 452 | x | x | - | x | x | (x) | (x) |
| Is-Coumaroyl spermidine | 25.5 | $[M+H]^+$ + 438 | | 438, 147, 119, 204, 91, 421, 292, 403, 398, | x | x | (x) | x | x | (x) | (x) |
| Hordatine A (2 isomers) | 16.5 | 276 | | 276, 395, 291, 263, 247, 207, 178, 189, 115, 152, 421, 378, 534, | (x) | x | x | x | x | x | x |
| | 18.5 | | | | x | x | x | x | x | x | x |
| Hordatine B (3 isomers) | 15.7 | 291 | | 291, 425, 321, 278, 165, 178, 157, 131, 425, 114, 98, 451 | x | x | x | x | x | x | x |
| | 18.2 | | | | x | x | x | x | x | x | x |
| | 18.6 | | | | (x) | x | (x) | x | x | x | x |
| Hordatine C (2 isomers) | 18.7 | 306 | | 306, 455, 481, 351, 165, 152, 293, 131, 114, 157, 265, 323 | x | x | x | x | x | x | x |
| | 19.3 | | | | x | x | x | x | x | x | x |
| Hordatine A hexoside (2 isomers) | 12.4 | 357 | | 357, 291, 263, 265, 247, 395, 551, 157, 131, 114 | - | x | - | x | x | x | x |
| | 13.9 | | | | x | x | x | x | x | x | x |
| Hordatine B hexoside (3 isomers) | 11.8 | 372 | | 372, 321, 293, 295, 291, 278, 425, 235, 157, 131, 114, 98 | x | x | (x) | x | x | x | x |
| | 13.7 | | | | x | x | x | x | x | x | x |
| | 14.5 | | | | (x) | x | - | - | x | x | x |
| Hordatine C hexoside (4 isomers) | 12.3 | 387 | | 387, 351, 455, 307, 157, 114, 131, 325 | x | x | - | x | x | x | - |
| | 12.5 | | | | | | | | | | |
| | 14.1 | | | | x | x | - | x | x | x | x |
| | 14.4 | | | | x | x | x | x | x | x | x |

(Continues)

11111111, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/fsn.12111 by University of Applied Sciences, Wiley Online Library on [02/08/2021]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

TABLE 5 (Continued)

| Phenolamide | t_R (min) | [M + H] ⁺ [M + 2H] ²⁺ (m/z) | Main Fragments (m/z) | Extracts | | | | | | |
|-------------------------------------|--|---|---|----------|-----|-----|-----|-----|----|-----|
| | | | | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 |
| Hordatine A difhexoside (6 isomers) | 11.5 11.8 12.3 12.8 13.4 13.7 | 438 | 438, 395, 291, 265, 247, 421, 235, 509, 534, 157, 114, 98, 85 | - | - | - | x | x | x | x |
| Hordatine B difhexoside (4 isomers) | 11.7 12.6 13.1 13.5 | 453 | 453, 321, 425, 278, 235, 207, 581, 539, 157, 114, 98 | x | - | x | x | x | x | x |
| Hordatine C difhexoside (2 isomers) | 12.9 14 | 468 | 468, 455, 351, 594, 325, 306, 481, 611, 157, 756, 98 | x | x | (x) | x | x | x | x |
| Hordatine A trihexoside (3 isomers) | 11.7 12.3 | 519 | 519, 276, 291, 438, | (x) | x | x | x | x | x | x |
| Hordatine B trihexoside (6 isomers) | 13.2 11.6 12.1 12.4 13 13.4 13.8 | 534 | 357, 265, 551, 696, 713, 858, 876 534, 291, 453, 581, 265, 247, 743, 726, 905, 564 | - | (x) | - | (x) | (x) | x | x |
| Hordatine C trihexoside (3 isomers) | 12.6 13.4 13.8 | 549 | 549, 306, 611, 773, 756, 351, 455, 935 | - | (x) | (x) | (x) | x | x | (x) |

© 2018 John Wiley & Sons, Ltd. *Journal of Mass Spectrometry*, 2018, 53, 1–12. DOI: 10.1002/jms.4666

TABLE 5 (Continued)

| Phenolamide | t_R (min) | $[M+H]^+$ $[M+2H]^{2+}$ (m/z) | Main Fragments (m/z) | Extracts | | | | | | | |
|---------------------------------------|--|-------------------------------|--|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 | |
| Hordathine A1 (3 isomers) | 14.5 15.4 16.5 | 284 | 284, 393, 189, 178, 115, 291, 421, 438, 411 | (x) | - | - | x | x | x | x | x |
| Hordathine B1 (6 isomers) | 12.6 13.5 | 299 | 299, 278, 165, 425, 321, 176, 189, 130, 293, 283 (only isomers at 12.6 and 14.5 min) | - | - | - | - | - | - | - | x |
| | 14.5 15.3 16.2 17 | | | (x) | (x) | (x) | (x) | (x) | (x) | (x) | x |
| Hordathine C1 (2 isomers) | 16.8 17.5 | 314 | 314, 297, 279, 114, 165, 455, 351, 395 | - | x | (x) | - | (x) | - | (x) | (x) |
| Hordathine A1 hexoside (3 isomers) | 11.5 11.9 12.7 | 365 | 365, 7, 291, 263, 348, 207, 147, 395 | (x) | x | - | x | x | (x) | (x) | - |
| Hordathine B1 hexoside (6 isomers) | 10.3 10.9 11.2 11.5 12.1 12.6 | 380 | 380, 321, 293, 295, 277, 178, 165, 425, 564, 147 | - | - | - | (x) | x | x | x | x |
| Hordathine C1 hexoside (5 isomers) | 11.4 11.8 12.3 13.2 13.7 | 395 | 395, 351, 355, 293, 307, 265, 378, 455, 165, 147 | - | - | - | - | (x) | (x) | (x) | (x) |
| Hordathine A2 ^a (1 isomer) | 17.7 | 292 | not detectable | (x) | (x) | (x) | (x) | (x) | (x) | (x) | (x) |
| Hordathine B2 (1 isomer) | 15 | 307 | 307, 278, 293, 165, 178, 130, 441, 321 | x | x | x | x | (x) | (x) | (x) | x |
| Hordathine C2 (1 isomer) | 15.5 | 322 | 322, 281, 265, 308, 165, 130, 299, 351, 471, 513 | (x) | x | (x) | x | (x) | x | (x) | (x) |

^aIsomer at 17.7 min overlapped with hordathine B (m/z 292); therefore, there was no clear distinction between the fragments of hordathines B and A2.

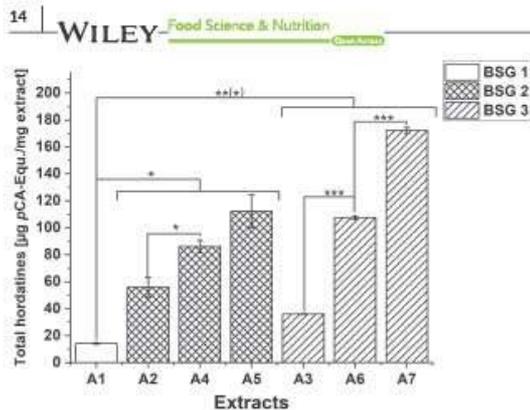


FIGURE 3 Total hordatine content in A extracts (acetone extraction) expressed as μg p-coumaric acid equivalents (pCA-Eq)/mg extract. Values are expressed as means \pm SD of two independent extract solutions each injected three times. Significant differences between different BSG samples and extraction processes were analyzed: * $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$

A extracts ($p < .001$, $.01$, and $.05$), which was expected since hordatines originate from barley. Additionally, differences between extraction processes (see Section 2.2) were observed. Hence, A4 and A6 from process 3 contained significantly more hordatines than the corresponding A2 and A3 extracts from process 1 ($p < .001$, $.05$). Previous defatting of the raw material (A5 and A7) resulted in higher hordatine content compared to nondefatted samples (A4 and A6), which was significant for A6 and A7 ($p < .001$). To compare our findings with literature data, we calculated the yield-related hordatine content showing the hordatine content in BSG dw (Appendix S1: Supplemental Material B), which should be treated with caution due to the last SPE purification step (Becker et al., 2021). Those BSG-related values showed similar dependencies between the different BSG batches and extraction processes. Defatted BSG extracts (A5 and A7) had higher total hordatine contents than the corresponding nondefatted extracts (A4 and A6). Extract A1, from 50% wheat share, had the lowest content. The differences between extractions 1 and 2 were not so pronounced.

Quantitative data of hordatines content are relatively limited. The total hordatine content determined as pCA-Eq was only reported for beer by the group of Pihlava et al. (Pihlava et al., 2016) and in our previous study for hordatine-rich fractions prepared from BSG (Becker et al., 2022). Total hordatines content in beer showed an average value of around 5.6 ± 3.1 mg pCA-Eq/L with maximum value of around 18.7 mg pCA-Eq/L (Pihlava et al., 2016). These values revealed that the relatively high amounts of hordatines present in malt were transferred to wort, and thereafter to the final product beer. However, our previous results demonstrated that hordatines also remained in BSG in high amounts of around $40 \mu\text{g}$ pCA-Eq/g B5 dw. This was confirmed within our study presented here, where total hordatine contents of 242 to $1550 \mu\text{g}$ pCA-Eq/g BSG dw (Appendix S1: Supplemental Material B) were determined. This was even higher than the amounts found in our previously reported study and also than

the content observed in beer. However, the main target of the analysis was the identification of bioactive compounds within the BSG extracts. Extracts A2–A7 showed strong inhibitory activities towards α -glucosidase (Becker et al., 2021) and hordatines accounted for a relevant part of the A extracts with up to 17% (extract A7). Our previous reported study demonstrated that the hordatines contribute to the enzyme-inhibition but the specific active hordatine structure could not be identified. Nevertheless, our findings also indicate a correlation between hordatine content and bioactivity. However, a reference substance is needed for quantification in order to obtain unambiguous conclusions about the hordatine amounts. Also, a validation of the extraction process including repetition and determination of the recovery rates within the SPEs could be performed with a reference substance. Without this evaluation, the calculations of the amount contained in BSG remain merely an estimation.

3.3 | Characterization of HE and HA extracts: Quantification of hydroxycinnamic acids and structural elucidation of ferulic acid oligomers (FAO)

The results of the initial HPLC–MS(/MS) experiments (see Section 3.1) showed that HA and HE extracts differed significantly from A extracts regarding some of the main compounds tentatively identified as FAOs, which were not observed in A extracts. Since they are mainly part of the cell wall structure they have to be released chemically or enzymatically whereby in the frame of this work alkaline hydrolysis was used. Compared to studies focusing on isolation of FAO (Hernanz et al., 2001; Pedersen et al., 2015), the NaOH concentration was relatively high (4 M), probably leading to higher amounts of monomeric FA than DiFAs. MS/MS experiments were performed to clarify the different structures of FAOs, but only DiFAs could be identified. Furthermore, hydroxycinnamic acids were quantified, whereby the amount of DiFAs was determined as FA-Eq due to the lack of available reference substances.

3.3.1 | Structural elucidation of ferulic acid dehydromers (DiFAs) by mass spectrometry (HPLC–ESI_{neg}–MS/MS)

DiFAs in HA and HE extracts were characterized using tandem mass spectrometry in the negative ionization mode. Characteristic fragment ions and the typical fragment distribution were used to determine the structures of each isomer by means of published data (Callipo et al., 2010). Altogether, a total of 10 DiFAs were identified whereby 2 were only present in low amounts or coeluted with more intense DiFA signals (Appendix S1: Fig. in Supplemental Material C). TriFAs, as indicated by the full scans from the first MS experiments (see Section 3.1.), could not be identified by tandem mass spectrometry due to low intensities.

A summary of all DiFAs, their tentative structures according to literature data, and characteristic fragment ions are summarized in

Table 6. In general, most isomers were found in HE4–HE6 extracts, followed by HE1–HE3 and HA1–HA3 extracts. All DiFA structures could clearly be distinguished by their specific fragment ions, peak intensities, and comparison with reference data from the literature. The elution order in RP-HPLC was similar to that published by Callipo et al. who analyzed DiFAs in cereals after liberation from the cell wall structure with slight differences (Callipo et al., 2010): 8–8'-aryltetralin <8–8'<8–5'<5–5'<8–O–4' form isomers (Figure 4).

For each structure, different diastereoisomers could be observed, e.g., 8–8'-DiFA and 8–O–4'-DiFA, where two or rather four isomers were detected. In general, *trans-trans*-isomers were expected to be the most abundant naturally occurring isomers, followed by *trans-cis* and *cis-cis*-isomers. Isomers in cyclic form may be present in the more stable *anti* or *syn* form.

Many signals appeared to be unspecific as they were detectable for nearly every DiFA structure (m/z 385), such as m/z 341 (loss of CO_2), 326 (loss of CO_2 and CH_3), 311 (loss of CO_2 and CH_2O), 297 (loss of $2 \times \text{CO}_2$), 282 (loss of $2 \times \text{CO}_2$ and CH_3), and 267 (loss of $2 \times \text{CO}_2$ and CH_2O). However, each subgroup of DiFAs also showed specific fragmentation patterns, as already reported in detail before (Callipo et al., 2010) and described here in brief. The 8–8'-aryltetralin isomer (10.8 min; Appendix S1: Fig. Supplement C (1)) showed specific signals at m/z 217, 173, 158, 123, and 108, respectively. Linear 8–8' isomers were found in two forms (eluting at 11.4 and 14.7 min, Appendix S1: Fig. Supplement C (2), (4)). The earlier eluting isomer was more abundant and therefore expected to be the *trans-trans*-isomer. Diagnostic signals of m/z 173, 159, and 145 were ascribed to cyclic fragments that can only be generated due to the conjugated structure between two aromatic rings. The 8–5' and 5–5'-isomers were more difficult to distinguish. One difference was the loss of water of the decarboxylated fragmentation m/z 341 for 8–5'-DiFA (Appendix S1: Fig. Supplement C (3)), leading to a phenolic lactone of m/z 323, which was found for the signal at 13.9 min and slightly also for the signal at 18.4 min (Appendix S1: Fig. Supplement C (5)), tentatively assigning them the *trans-trans*- and *cis-trans*-8–5'-DiFA according to literature data (Callipo et al., 2010). The 5–5'-DiFA (Appendix S1: Fig. supplement C, (6)) was characterized by a very stable parent ion as well as loss of 60 and 76 Da, giving rise to fragments of m/z 281 and 265, which was observed for the signal at 23.6 min. Additionally, it was confirmed using a reference substance (friendly provided by Prof. Dr. Mirko Bunzel, KIT). Since the *anti* configuration is the most stable and the *trans* configuration the naturally occurring one, the isomer found was considered to be the *anti-trans*-isomer. All remaining signals (26.5, 28.5, 30.2, and 32.5 min; Appendix S1: Fig. Supplement C (7)–(10)) showed similar signals at m/z 193, 178, 149, and 134, corresponding to the typical fragmentation of FA due to the less stable C–O bond compared to C–C bonds. Four isomers were observed which were tentatively assigned as *trans-trans*-, *trans-cis*-, *cis-trans*-, and *cis-cis*-isomers of 8–O–4'-DiFAs, whereby the main isomer was also verified using a reference substance (Prof. Dr. Bunzel, KIT).

3.3.2 | Quantification of hydroxycinnamic acids

Hydroxycinnamic acid derivatives were quantified in HA and HE extracts by HPLC-DAD. DiFAs were quantified as FA-Eq and no CF could be calculated. Thus, the results, already expressed as equivalents, were considered to be an estimation. However, differences between the BSG batches and extraction groups could be evaluated. All extracts contained relatively high amounts of hydroxycinnamic acid derivatives. HA extracts showed significantly lower contents ($p < .001$) than HE extracts for all four groups—CA, pCA, FA, and DiFAs—with the exception of CA in HE5, whose content was below the LOQ (Figure 5). Altogether, the hydroxycinnamic acid content accounted to around 3% of the total HA extract and up to 48% of the total HE extract. Regarding our main goal of the study, the identification of active compounds especially the large percentage in the HE extracts is interesting. The HE extracts investigated showed inhibitory activity toward glycogen phosphorylase α (GPa) and α -glucosidase (Becker et al., 2021). Hydroxycinnamic acids such as FA and DiFAs are reported to be potent inhibitors of different enzymes of the glucose metabolism (Adisakwattana, 2017; Narasimhan et al., 2015; Ye et al., 2022). Thus, their contribution to the enzyme-inhibition detected in our study (Becker et al., 2021) is likely. The huge difference between the hydroxycinnamic acid contents in HA compared to HE extracts was expected since HA extracts were prepared from the residue of alkaline hydrolysis with the latter serving to produce the HE extracts; i.e., huge amounts of hydroxycinnamic acids were already extracted during the alkaline hydrolysis (HE extracts) whereby only the remaining hydroxycinnamic acids in the residue were extracted with acetone (HA extracts).

For all extracts, the contents could be ranked as follows: FA > pCA > DiFA > CA; data presented in Table 7. Similar results for BSG extracts from alkaline hydrolysis have already been reported. Stefanello et al. detected around 103 mg pCA/100 g BSG and twice the amount of *trans*-FA (Stefanello et al., 2018); Alonso-Riaño et al. (2020) determined FA contents of 1305 $\mu\text{g/g}$ BSG and 538 $\mu\text{g pCA/g}$ BSG; and Birsan et al. reported contents of 845 $\mu\text{g FA/g}$ BSG and 387 $\mu\text{g pCA/g}$ BSG but only 0.33 $\mu\text{g CA/g}$ BSG (Birsan et al., 2019). However, their extraction processes were similar to the process used for the HE extracts, i.e., purification by LLE using ethyl acetate (Becker et al., 2021). Birsan et al. likewise reported a FA content about twice as high as that of pCA in BSG dw. In our study, the FA content was around three- to fourfold higher than the pCA amount in the HE and HA extracts (around 10-fold higher for HE1). However, the CA content in HE extracts was much higher than that reported by Birsan et al. All quantitative results reported in the literature used for comparison were provided in mg/g BSG. Therefore, to compare the amounts observed in our study, we calculated the hydroxycinnamic acid derivative amount in BSG dw in relation to extract yield that had previously been published (Becker et al., 2021). It should be mentioned that these calculations only provided an estimation since many purification steps (SPE and LLE) were performed without determination of recovery rates. As the extraction was only performed once, no validation was available. Yield-related amounts

TABLE 6 DiFAs found in HA1–HA3 and HE1–HE6 extracts tentatively identified; x: contained and fragmentation sufficient, (x): insufficient fragmentation due to low concentration, partially only unspecific fragment ions or signals in TIC detected, -: not detected; characteristic fragments are shown in bold; fragment ions listed in order of decreasing intensity; related HPLC-MS/MS-chromatogram can be found in the supplements (Appendix S1: Supplement Material C)

| Assumed structure of DiFA | t_R (min) | $[M-H]^-$ | Main fragments (m/z) | Extracts | | | | | | | | |
|---------------------------|-------------|-----------|---|----------|---|-----|-----|-----|-----|---|-----|-----|
| | | | | HA | | | HE | | | | | |
| | | | | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 8-8'-Aryltetralin DiFA | 10.8 | 385.2 | 341, 282, 267, 173 , 326, 123 , 217 , 297, 203, 158 , 108, 311, 239 | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| trans-trans-8-8'-DiFA | 11.4 | 385.2 | 159 , 123, 173 , 281, 145 , 267, 341, 108, 91, 297 | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| trans-trans-8-5'-DiFA | 13.9 | 385.2 | 282, 267, 341, 326, 323 , 311, 308, 385, 239 | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| trans-cis-8-8'-DiFA | 14.7 | 385.2 | 282, 159 , 123, 267, 281, 297, 326, 145 , 108, 341 | - | - | - | x | x | x | x | (x) | x |
| trans-cis-8-5'-DiFA | 18.4 | 385.2 | 341, 267, 282, 326, 311, 297, 249, 239, 323 | - | - | - | x | x | x | x | x | x |
| trans-trans-5-5'-DiFA | 23.6 | 385.2 | 385^a , 282, 341, 281 , 326, 267, 370, 265 , 253, 236 , 239, 309, 297, 293, 311 | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 8-O-4'-DiFA | 26.5 | 385.2 | 193 , 178 , 149 , 134 , 341, 282, 267, 385 | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 8-O-4'-DiFA | 28.5 | 385.2 | 193 , 178 , 134 , 311, 282, 326, 385, 149 | (x) | - | (x) | (x) | (x) | x | x | x | x |
| 8-O-4'-DiFA | 30.2 | 385.2 | 193 , 178 , 134 , 149, 385 | (x) | - | - | (x) | (x) | x | x | x | x |
| 8-O-4'-DiFA | 32.5 | 385.2 | 193 , 178 , 149 , 385 | - | - | - | - | - | (x) | x | - | (x) |

^aVery high stability of parent ion.

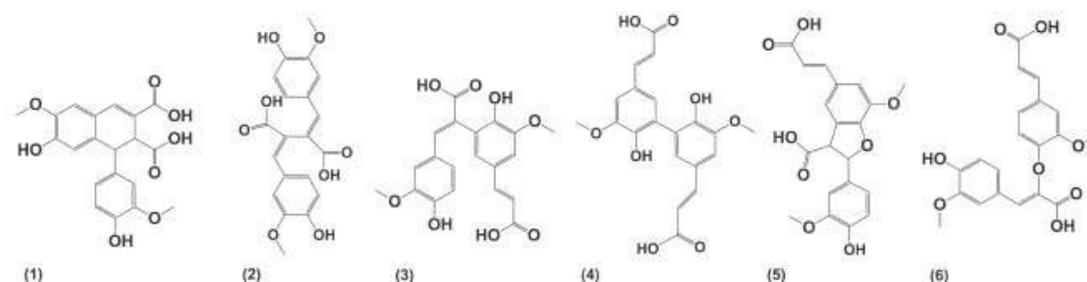


FIGURE 4 Structures of principal ferulic acid dehydrodimers (DiFAs); trivial names are as follows: (1) 8-8'-aryltetralin, (2) 8-8', (3) 8-5', (4) 5-5', (5) 8-5'-cyclic/benzofuran, and (6) 8-O-4' (Callipo et al., 2010; Garcia-Conesa et al., 1997)

were as follows: for HE extracts: 1251.5 ± 6.9 – 3283.2 ± 19.8 $\mu\text{g FA/g BSG}$, 338.7 ± 19.4 – 970.1 ± 63.1 $\mu\text{g pCA/g BSG}$, n.d. – 366.6 ± 15.4 $\mu\text{g CA/g BSG}$, and 254.5 ± 6.8 – 507.8 ± 25.1 $\mu\text{g FA-Eq/g BSG}$; for HA extracts: 543.3 ± 93.7 – 673.6 ± 41.6 $\mu\text{g FA/g BSG}$, 176.0 ± 8.4 – 260.4 ± 8.5 $\mu\text{g pCA/g BSG}$, and 65.6 ± 4.2 – 90.3 ± 8.6 $\mu\text{g FA-Eq/g BSG}$. The hydroxycinnamic acid content observed not only in our HE extracts but also in our HA extracts produced from the alkaline hydrolysis residue was much higher or at least in a comparable range than reported values, which may be due to the SPE used for purification and concentration of polyphenols.

Regarding FAO quantification, Verni et al. recently reported amounts in BSG (Verni et al., 2020). They distinguished between free and bound polyphenols by using LLE with organic solvents as the first extraction step and alkaline hydrolysis as the second step. Hydroxycinnamic acids were not detected in extracts from LLE, except for some dihydrohydroxycinnamic acids. High amounts of hydroxycinnamic acids were observed in extracts after alkaline hydrolysis, i.e., 53 mg/kg FA, 312 mg/kg isoferulic acid, 41 mg/kg pCA, 35 mg/kg CA, 568 mg/kg DiFAs, 450 mg/kg tetrameric FA, and 87 mg/kg TriFA. The amounts of monomeric hydroxycinnamic acids

determined by Verni et al. were much lower than those detected in our HE and HA extracts, except CA, which was not observed in HA extracts. However, the DiFA content was significantly lower in HA extracts and about half the amount up to the same value in HE extracts. We did not find any trimeric or tetrameric FA in detectable amounts. This might be due to slight differences in the extraction processes. Firstly, 4 M NaOH was used for the preparation of HE and HA extracts, whereas Verni et al. (2020) used 2 N NaOH. A higher concentration of alkali might result in higher hydrolysis rates of the cell wall structure, and therefore higher amounts of monomeric instead of oligomeric structures. Furthermore, about 20 years ago, Hernanz et al. quantified hydroxycinnamic acids in BSG whereby DiFAs were analyzed as single isomers using synthesized reference substances instead of quantification as FA-Eq (Hernanz et al., 2001). They found 565 to 794 $\mu\text{g/g}$ BSG pCA, 1860 to 1948 $\mu\text{g/g}$ BSG FA, 119 to 171 $\mu\text{g/g}$ BSG 8-5' DiFA open form, 150 to 160 $\mu\text{g/g}$ BSG 5-5' DiFA, 443 to 526 $\mu\text{g/g}$ BSG 8-O-4'-DiFA,

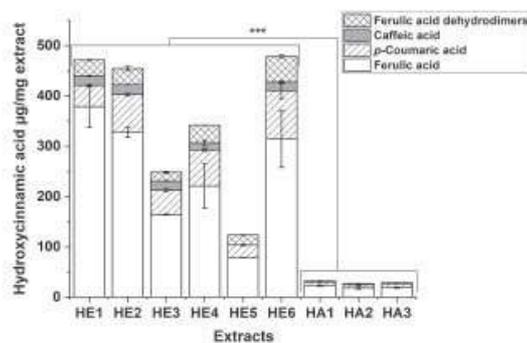


FIGURE 5 Hydroxycinnamic acid derivatives (CA, pCA, FA, and DiFA) in HA and HE extracts expressed as μg hydroxycinnamic acids/mg extract. Values are expressed as means \pm SD of two independent extract solutions each injected two to four times. Significant differences between different BSG samples and different extraction processes were analyzed: *** $p < .001$. Only significant differences between HE and HA extracts are shown in the Figure

TABLE 7 Hydroxycinnamic acid contents in HA and HE extracts expressed as $\mu\text{g}/\text{mg}$ extract and μg FA-Eq/mg extract \pm SD

| Extract | FA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ extract) \pm SD | pCA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ extract) \pm SD | CA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ extract) \pm SD | DiFA (μg FA-Eq/mg extract) \pm SD |
|---------|--|---|--|---|
| HA1 | 22.55 \pm 1.23 | 7.04 \pm 0.34 | n.d. | 2.92 \pm 0.38 |
| HA2 | 18.11 \pm 3.12 | 6.77 \pm 0.80 | n.d. | 2.19 \pm 0.14 |
| HA3 | 19.08 \pm 1.18 | 7.38 \pm 0.24 | n.d. | 2.56 \pm 0.81 |
| HE1 | 378.57 \pm 41.02 | 42.33 \pm 2.43 | 18.99 \pm 0.81 | 31.82 \pm 0.85 |
| HE2 | 327.40 \pm 9.97 | 75.38 \pm 2.76 | 19.56 \pm 0.39 | 32.23 \pm 4.02 |
| HE3 | 164.16 \pm 0.99 | 48.51 \pm 3.16 | 18.33 \pm 0.77 | 17.13 \pm 1.94 |
| HE4 | 221.00 \pm 44.32 | 71.33 \pm 2.10 | 14.33 \pm 6.08 | 35.50 \pm 0.32 |
| HE5 | 78.22 \pm 0.43 | 25.58 \pm 1.41 | <LOQ | 19.84 \pm 0.75 |
| HE6 | 314.80 \pm 56.83 | 94.85 \pm 15.06 | 18.35 \pm 1.55 | 50.78 \pm 2.51 |

^an.d., not detected.

and 181 to 232 $\mu\text{g/g}$ BSG 8-5' DiFA benzofuran form, depending on the malt used for brewing. Their determined contents are much higher than observed by Verni et al. as well as our results, which might be due to the higher alkaline concentration and differences in the quantification method used.

Some differences were observed between the different BSG batches. Among the HA extracts, no major differences between the BSG batches were detected. However, this was not the case for HE extracts. Extracts from BSG3 (HE3 and HE5) showed significantly ($p < .001$ and $p < .01$) lower FA contents than all other HE extracts. This also applied to the pCA contents ($p < .001$), except HE1, which showed relatively low pCA content. The HE6 extract produced from defatted BSG3 displayed the highest amounts of all hydroxycinnamic acid derivatives within extracts HE3-HE6, indicating that the defatting process enhanced the extractability of hydroxycinnamic acids. This effect was also observed for the HA extracts. Furthermore, the extraction process of HE1-HE3 extracts seemed to be more effective in extracting hydroxycinnamic acids than the method used for HE4-HE6 extracts, which were seen in higher amounts for all monomeric hydroxycinnamic acid contents in extracts from process 2. The main difference between the two extraction processes (Table 1) was the order of the two steps. For HE4-HE6, the BSG raw material was directly treated by alkaline hydrolysis, whereas for HE1-HE3, the BSG was first extracted with 60% acetone and the residue was used for alkaline hydrolysis. A similar study was recently performed by Ideia et al. (Ideia et al., 2020). However, in contrast to our results, they did not find significantly higher FA content for the acetone pretreated samples and concluded that acetone did not effectively release FA from lignocellulosic material (Ideia et al., 2020). In our study, the different content of hydroxycinnamic acids might be due to different volumes of NaOH used for the extraction. For extracts HE4-HE6, a ratio of 10 ml NaOH/g BSG was used, whereas nearly three times the amount of 27 ml NaOH/g BSG was used for the preparation of HE1-HE3 (Becker et al., 2021). This was to obtain better performance in the follow-up LLE with ethyl acetate. The influence of NaOH concentration on the extractability of FA and pCA has already been investigated. Mussatto et al. demonstrated

that reaction time, temperature, and concentration of NaOH influenced the hydroxycinnamic acids content and found the highest values for the maximum conditions of 2% NaOH (% w/v), 90 min, and 120°C (Mussatto et al., 2007).

3.4 | Identification of oxylipins in BSG extracts

Besides polyphenolic compounds, such as hydroxycinnamic acids and hordatines, hydroxylated fatty acids were detected in all extracts (HA, HE, and A) under study. Different isomers of trihydroxyoctadecenoic (TriHOME) and trihydroxyoctadecanoic acid (TriHODA) were identified by HPLC-MS/MS by means of published MS data (Bhunia et al., 2018; Martin-Arjol et al., 2010) and partially available reference substances. All of them were linoleic acid-derived oxylipins. Eight TriHOMEs and two TriHODAs were found in total, with the TriHOME isomer at 28.3 min and the TriHODA isomer at 28.9 min (Appendix S1: Supplement Material D) being the predominant structures in all extracts. It was reported previously that only 4%–5% of malt lipids are released into the wort and the majority of lipids remain in the BSG, where probably around 30% of the lipids are oxidized during mashing, which might have generated the oxylipins found in our studies (Anness & Reud, 1985).

An overview of all oxylipins detected in each extract is provided in Table 8. In general, most isomers of TriHOME were found in HE extracts, followed by HA extracts, with the lowest content in A extracts, where only the isomer at 27.5 min was present. Furthermore, TriHODA isomers were not identified in A extracts (except in A1 and A6) but were identified in HA and HE extracts. These findings indicate that most of the oxylipins were (a) released by alkaline hydrolysis, or (b) generated and modified during the extraction process with alkaline solvent. It has already been reported many years ago that TriHOMEs are present in beer (Esterbauer & Schauenstein, 1977) and are produced during the malting and mashing process by lipoxygenase (LOX) reaction, resulting in two isomers: (9, 10, 13)- and (9, 12, 13)-TriHOME, which further represent eight diastereomers and eight enantiomers. However, the enzyme-catalyzed reaction by barley LOX is highly regio- and stereoselective, leading mainly to the formation of (9S, 12S, and 13S)-TriHOME, which can be found in high amounts in wort and beer. This isomer elutes at 27.5 min, corresponding to the retention time of the isomer found mainly in A extracts. Even if the signal intensities in A extracts were relatively low, the fragment distribution was very similar. This indicates that residues of the characteristic (9S, 12S, 13S)-TriHOME in beer were extracted by 60% acetone, which was also used for the production of HA extracts. However, (9S, 12S, 13S)-TriHOME was rarely found in HE extracts, whose main isomer corresponded to the retention time of the standard (9S, 10S, 13S)-TriHOME at 28.3 min. In general, the TriHOME isomers differ in their fragment pattern, but it was difficult to compare in the frame of our study because most of the isomers coeluted. The large variety of isomers in HE and

HA extracts may be due to the alkaline treatment. During the enzyme-catalyzed reaction to form TriHOMEs, intermediate allylic epoxy alcohols derived from 9- and 13-hydroperoxides are formed (Hamberg, 1991), which can then be hydrolyzed by alkali. This hydrolysis, in contrast to enzymatic cleavage, is not regio- or stereoselective, and therefore different isomers can be produced. To distinguish between the TriHOME isomers and to test the above hypothesis, optimization of the method is necessary. Methods to separate 16 different isomers have already been reported (Fuchs et al., 2018). To differentiate the TriHOME isomers characteristic, fragment ions such as m/z 127, 129, and 199 can be considered and are specific for structural elements concerning the number of hydroxy groups after the double bond. Martin-Arjol et al. demonstrated that the fragment ion of m/z 127 is typical for 9,10,13-TriHOME isomers (two hydroxy groups before double bond) whereby m/z 129 is mainly observed for 9,12,13-TriHOME isomers (two hydroxy groups after double bond) (Martin-Arjol et al., 2010). Due to low-signal intensities, these fragments were not detected for each isomer within our study but can be referred to as an indication for at least all isomers.

With regard to our main goal, the identification of the active compounds in our extracts, oxylipins, probably does not contribute to the inhibition of the glucose metabolism enzymes α -glucosidase and GP α (Becker et al., 2021) since they were found in nearly all extracts including the nonactive HA extracts. However, Nadeem et al. reported an inhibition of α -glucosidase by extracts containing trihydroxy fatty acids (Nadeem et al., 2020). Therefore, our assumption should be confirmed by quantification and isolation of oxylipins followed by the investigation of pure substances in the enzyme-inhibition assays.

4 | CONCLUSION

BSG extracts prepared by SLE with 60% acetone (A1–A7), SLE with 60% acetone and alkaline hydrolysis of the respective residue (HA1–HA3), or alkaline hydrolysis followed by LLE with ethyl acetate (HE1–HE6) from three BSG batches (Becker et al., 2021) were analyzed by HPLC-ESI-MS/MS. The main compounds were identified and afterward quantified by HPLC-DAD in order to draw conclusions on the active compounds in the extracts. In general, extracts A1–A7 differed strongly from HA1–HA3 and HE1–HE6 extracts. Catechin, phenolamides, some phospholipids, and tryptophan were detected in extracts A1–A7, whereas hydroxycinnamic acids, such as FA and pCA as well as DiFAs, were identified in HA and HE extracts. Furthermore, dicarboxylic acids such as azelaic and suberic acids were observed. Moreover, all extracts contained isomers of TriHOME, which have only been reported before in beer (Esterbauer & Schauenstein, 1977). The oxidized forms of linoleic acid were probably generated during mashing by enzymatic reactions, which are likely to be regio- and stereoselective, leading to at least one isomer (Garbe et al., 2005). A extracts only contained one TriHOME, whereas HA and HE extracts contained various isomers,

TABLE 8 Oxylipins found in BSO extracts tentatively identified; x: contained and fragmentation sufficient, (x): insufficient fragmentation due to low concentration, partially only unspecific fragment ions or signals in TIC detected, -: not detected

| Oxylipin | t _g (min) | [M-H] ⁻ | Extracts | | | | | | | | | | | | | | Fragment ions (m/z) | | | | | | | |
|----------------------|----------------------|--------------------|------------|---|---|---|---|---|---|-------------|---|---|---|---|---|-----|---------------------|-------------|---|-----|---|---|----------------------------------|--|
| | | | A extracts | | | | | | | HE extracts | | | | | | | | HA extracts | | | | | | |
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | | 2 | 3 | | | | | |
| TriHOME | 27.6 | 329.5 | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | (x) | - | - | x | x | x | - | 329, 211, 171, 229, 157, 139, 99 | |
| TriHOME | 28.3 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | x | x | x | x | x | x | x | 329, 211, 229, 171, 139, 99 |
| TriHOME | 29.2 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | x | x | x | x | x | x | - | 329, 171, 211, 229, 139, 157, 127, 99 |
| TriHOME | 32.8 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | x | - | - | - | - | - | (x) | 329, 211, 199, 171, 129, 229 |
| TriHOME | 34.4 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | x | x | x | (x) | x | x | (x) | 329, 201, 171, 129 |
| TriHOME | 35.2 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | (x) | x | - | - | x | x | (x) | 329, 201, 171, 139, 293, 271 |
| TriHOME | 36.7 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | (x) | x | x | x | x | x | (x) | 329, 171, 210, 127, 211 |
| TriHOME | 39.1 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | x | x | x | x | x | (x) | 329, 199, 181, 211, 129 |
| TriHODA | 28.9 | 331.4 | x | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | x | x | x | x | x | x | x | 331, 313, 157, 187, 201, 127, 171, 295 |
| TriHODA | 31.2 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | (x) | 331, 201.5, 195 |
| Reference substances | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| References | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9S, 12S, 13S-TriHOME | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9S, 10S, 13S-TriHOME | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

15216771, 2020, 1, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/fsn.12501 by University of Applied Sciences, Wiley Online Library on [05/05/2020]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

which might be due to the alkaline treatment. For the first time, oxylipins were identified in BSG. Also, the identification of phospholipids has not been reported so far. Both lipidic compounds are not well studied regarding the inhibiting potential toward glucose metabolism enzymes, but there are some recently published studies (Harrabi et al., 2021; Nadeem et al., 2020) indicating that the compounds might contribute to the bioactivity observed in our study (Becker et al., 2021).

Extraction of hydroxycinnamic acids from BSG by alkaline treatment is a well-established method (Hernanz et al., 2001; Verni et al., 2020). Our results are mostly comparable to published data. However, the content of DiFAs was lower and the amounts of monomeric structures higher in our extracts. This indicates that the usage of more concentrated NaOH results in more extensive hydrolysis of the dimeric structures. Differences between the compositions after the use of different extraction methods were observed. HA extracts (prepared by acetone extraction of the residue after alkaline hydrolysis) had significantly lower amounts of hydroxycinnamic acids than HE extracts (prepared from alkaline hydrolysis followed by ethyl acetate extraction). This was expected since acetone was only used to extract the hydrolysis residue and most of the liberated polyphenols were already extracted by the NaOH solution. Hydroxycinnamic acids are already well-known inhibitors of α -glucosidase and GP α (Adisakwattana, 2017; Narasimhan et al., 2015) and recently also DiFAs were reported to be potent inhibitors of α -glucosidase (Ye et al., 2022). Especially for HE extracts, these compounds may be relevant for the inhibition since they account for up to 48% of the total extract. HA extracts did not inhibit the α -glucosidase, but GP α (Becker et al., 2021). However, HA extracts did not contain DiFAs and only 3% of the total extract accounted for hydroxycinnamic acids. Thus, our results gave strong evidence of these polyphenols to be relevant for the inhibiting potential of the BSG extracts.

Besides hydrolytic extraction methods, SLE has often been used for extraction of polyphenols from BSG with various extraction solvents (Birsan et al., 2019; Bonifácio-Lopes et al., 2020; Martín-García et al., 2019) and many phenolic compounds, such as catechin, syringic, and sinapic acid, vanillin, and proanthocyanidins, have been detected. Additionally, some phenolamides, such as hordatines and spermidine conjugates, were observed for the first time in BSG. Altogether, 27 different phenolamide structures were identified, including 2 hydroxycinnamoyl spermidines, 4 hydroxycinnamoyl agmatines, and 21 hordatines, such as hordatines A, B, and C (Pihlava et al., 2016), hordatines A1, B1, and C1, as well as their glucosides and the aglycones hordatines A2, B2, and C2. Most hordatine structures were found in up to six isomeric forms. Furthermore, extraction process 3 (A4–A7) yielded more different hordatine isomers compared to A1–A3 (from process 1, Table 1). This was expected for A1 since hordatines are barley specific, and BSG 1, used as the A1 raw material, originated from 50% wheat. Relatively high amounts of up to 172 $\mu\text{g pCA-Eq/mg}$ extract corresponding to 1550 $\mu\text{g pCA-Eq/g}$ BSG dw were found, indicating BSG is a good source of phenolamides. Furthermore, hordatines might contribute to the inhibitory potential of A extracts on α -glucosidase which was also shown in

our recently published study (Becker et al., 2022). However, the specific hordatine structure responsible for enzyme-inhibition is still not clear. Again, our results demonstrate the need for a reference substance for unambiguous quantitative data and investigation of pure substances in the enzyme-inhibition assay.

All extracts contained various compounds and notable amounts of different phenolic compounds. Alkaline hydrolysis resulted in hydroxycinnamic acid as the main compound (3% of the total HA extracts; up to 48% of the total HE extracts) and SLE with 60% acetone mainly extracted phenolamides such as hordatines (up to 17% of the total A extracts). Both compound classes were present in relatively high amounts. The quantification of the total hordatine content as well as the content of DiFAs has to be interpreted with caution as the results were only semiquantitative owing to the lack of available reference substances. However, differences in the amounts of hordatines and hydroxycinnamic acids between the different BSG batches and extraction methods could be seen as all extracts were analyzed in the same way. Thus, it was shown that extract A1 produced from BSG with 50% barley had the lowest hordatine content, and extracts from BSG 3 contained less hydroxycinnamic acids than BSG 1 and BSG 2 extracts. Nevertheless, for quantification, the precision can be improved by using reference substances. Methods to synthesize or isolate DiFAs have already been reported (Bunzel et al., 2004, 2008).

Nevertheless, our results provide good evidence of the bioactive components in the extracts investigated (Becker et al., 2021) and enable targeted follow-up studies to be carried out in the future. Thus, hordatines seem to be relevant for α -glucosidase inhibition and hydroxycinnamic acids including the DiFAs should be focused on both α -glucosidase- and GP α -inhibition. Finally, the quantification should be improved and the extraction process validated by the use of reference substances to gain precise information on the amounts of bioactive compounds in BSG.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge financial support from the EU-INTERREG project BIOVAL (no. 018-4-09-021). The authors gratefully acknowledge all the project partners within the BIOVAL project, especially the Orval Brewery (Florenville, Belgium), the chair of Bioprocess Engineering (TUK; Prof. Dr. Roland Ulber; Dr. Alexander Akermann, Dr. Jens Weiermüller), for providing the BSG samples, as well as the inorganic chemistry group (TUK; Prof. Dr. Werner Thiel, Dr. Pascal Weingart, Ranja Saynisch) for their support in performing extractions. We thank all collaborators of the BIOVAL consortium for their constructive collaboration. We thank Prof. Dr. Mirko Bunzel for providing some DiFAs as reference substances that helped to verify our results. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

FUNDING INFORMATION

This research was funded by the EU-INTERREG project BIOVAL supported by the European Funds for Regional Development, project no. 018-4-09-021.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this article.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

ORCID

Daniela Becker  <https://orcid.org/0000-0003-1107-8252>

REFERENCES

- Aarabi, A., Honarvar, M., Mizani, M., Faghian, H., & Gerami, A. (2016). Extraction and purification of ferulic acid as an antioxidant from sugar beet pulp by alkaline hydrolysis. *Italian Journal of Food Science*, 28(3), 362–375. <https://doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v143>
- Adisakwattana, S. (2017). Cinnamic acid and its derivatives: Mechanisms for prevention and management of diabetes and its complications. *Nutrients*, 9(2), 1–27. <https://doi.org/10.3390/nu9020163>
- Alonso-Riaño, P., Sanz Diez, M. T., Blanco, B., Beltrán, S., Trigueros, E., & Benito-Román, O. (2020). Water ultrasound-assisted extraction of polyphenol compounds from brewer's spent grain: Kinetic study, extract characterization, and concentration. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(3), 265. <https://doi.org/10.3390/antiox9030265>
- Anness, B. J., & Reud, R. J. R. (1985). Lipids in wort. *Journal of the Institute of Brewing*, 91(5), 313–317. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1985.tb04349.x>
- Arts, M. J. T. J., Grun, C., de Jong, R. L., Voss, H.-P., Bast, A., Mueller, M. J., & Haenen, G. R. M. M. (2007). Oxidative degradation of lipids during mashing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(17), 7010–7014. <https://doi.org/10.1021/jf070505+>
- Aura, A.-M., Niemi, P., Mattila, I., Niemela, K., Smeds, A., Tamminen, T., & Poutanen, K. (2013). Release of small phenolic compounds from brewer's spent grain and its lignin fractions by human intestinal microbiota in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(40), 9744–9753. <https://doi.org/10.1021/jf4024195>
- Barth, S. J. (2021). *BarthHaas report hops 2020/2021* (1st ed.). BarthHaas GmbH & Co KG.
- Becker, D., Bakuradze, T., Hensel, M., Beller, S., Yélamos, C. C., & Richling, E. (2021). Influence of brewer's spent grain compounds on glucose metabolism enzymes. *Nutrients*, 13(8), 2696. <https://doi.org/10.3390/nu13082696>
- Becker, D., Permann, S., Bakuradze, T., Stegmüller, S., & Richling, E. (2022). Isolation and characterisation of Hordatine-rich fractions from Brewer's spent grain and their biological activity on α -glucosidase and glycogen phosphorylase α . *Sustainability*, 14(14), 8421. <https://doi.org/10.3390/su14148421>
- Bhunja, R. K., Showman, L. J., Jose, A., & Nikolau, B. J. (2018). Combined use of cutinase and high-resolution mass-spectrometry to query the molecular architecture of cutin. *Plant Methods*, 14, 117. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0384-6>
- Birsan, R. I., Wilde, P., Waldron, K. W., & Raj, D. K. (2019). Recovery of polyphenols from brewer's spent grains. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8, 1–12. <https://doi.org/10.3390/antiox8090380>
- Bonifácio-Lopes, T., Teixeira, J. A., & Pintado, M. (2020). Current extraction techniques towards bioactive compounds from brewer's spent grain - a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(16), 2730–2741. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655632>
- Bräunlich, M., Slimestad, R., Wangensteen, H., Brede, C., Malterud, K. E., & Barsett, H. (2013). Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors. *Nutrients*, 5(3), 663–678. <https://doi.org/10.3390/nu5030663>
- Bunzel, M., Funk, C., & Steinhart, H. (2004). Semipreparative isolation of dehydrodiferulic and dehydrotriferulic acids as standard substances from maize bran. *Journal of Separation Science*, 27(13), 1080–1086. <https://doi.org/10.1002/jssc.200301703>
- Bunzel, M., Heuermann, B., Kim, H., & Ralph, J. (2008). Peroxidase-catalyzed oligomerization of ferulic acid esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10368–10375. <https://doi.org/10.1021/jf801825z>
- Callipo, L., Cavaliere, C., Fuscoletti, V., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Laganà, A. (2010). Phenylpropanoate identification in young wheat plants by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: Monomeric and dimeric compounds. *Journal of Mass Spectrometry*, 45(9), 1026–1040. <https://doi.org/10.1002/jms.1800>
- Couallier, V. (2013). Statistical models and methods for reliability and survival analysis. In *ISTE*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118826805>
- Del Rio, J. C., Prinsen, P., & Gutiérrez, A. (2013). Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals. *Journal of Cereal Science*, 58(2), 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.07.001>
- Essien, J. P., & Udotong, I. R. (2010). Amino acid profile of biodegraded brewers spent grains (BSG). *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 12(1), 103–106. <https://doi.org/10.4314/jasem.v12i1.55582>
- Esterbauer, H., & Schauenstein, E. (1977). Isomere Trihydroxyoctadecensäuren in Bier: Beweise für ihr Vorkommen und ihre quantitative Bestimmung. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 164, 255–259.
- European Commission. Joint Research Centre. (2016). *Guidance document on the estimation of LOD and LOQ for measurements in the field of contaminants in feed and food*. Publications Office. <https://doi.org/10.2787/8931>
- Fahrmeir, L., Heumann, C., Künstler, R., Pigeot, I., & Tutz, G. (2016). *Statistik* (8th ed.). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-50372-0>
- Fang, J., & Barcelona, M. J. (1998). Structural determination and quantitative analysis of bacterial phospholipids using liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 33(1), 23–35. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(98\)00037-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(98)00037-2)
- Fuchs, D., Hamberg, M., Sköld, C. M., Wheelock, Å. M., & Wheelock, C. E. (2018). An LC-MS/MS workflow to characterize 16 regio- and stereoisomeric trihydroxyoctadecenoic acids. *Journal of Lipid Research*, 59(10), 2025–2033. <https://doi.org/10.1194/jlr.D087429>
- Garbe, L.-A., Hübke, H., & Tressl, R. (2005). Enantioselective formation pathway of a trihydroxy fatty acid during mashing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 63(4), 157–162. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-63-0157>
- García-Conesa, M. T., Plumb, G. W., Kroon, P. A., Wallace, G., & Williamson, G. (1997). Antioxidant properties of ferulic acid dimers. *Redox Report*, 3(4), 239–244. <https://doi.org/10.1080/1351002.1997.11747116>
- Hamberg, M. (1991). Trihydroxyoctadecenoic acids in beer: Qualitative and quantitative analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(9), 1568–1572. <https://doi.org/10.1021/jf00009a006>
- Harrabi, S., Ferchichi, A., Sakhri, H., Feki, M., & Hossaineian, F. (2021). Phospholipid and n-alkane composition, anti- α -glucosidase and anti-cyclooxygenase activities of milk thistle oil. *European Food Research and Technology*, 247(6), 1557–1567. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03732-y>
- Hernanz, D., Nuñez, V., Sancho, A. I., Faulds, C. B., Williamson, G. [G.], Bartolomé, B. [B.], & Gómez-Cordovés, C. (2001).

- Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydromers in barley and processed barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4884–4888. <https://doi.org/10.1021/jf010530u>
- Ideia, P., Sousa-Ferreira, I., & Castilho, P. C. (2020). A novel and simpler alkaline hydrolysis methodology for extraction of ferulic acid from brewer's spent grain and its (partial) purification through adsorption in a synthetic resin. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(5), 1–13. <https://doi.org/10.3390/foods9050600>
- Jay, A. J., Parker, M. L., Faulks, R., Husband, F., Wilde, P., Smith, A. C., Faulds, C. B., & Waldron, K. W. (2008). A systematic micro-dissection of brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science*, 47(2), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2007.05.006>
- Kageyama, N., Inui, T., Fukami, H., & Komura, H. (2011). Elucidation of chemical structures of components responsible for beer aftertaste. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 69(4), 255–259. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2011-0901-01>
- Kageyama, N., Inui, T., Fukami, H., & Komura, H. (2013). Structures in the hordatine family with cis-cinnamoyl moieties. *Cerevisia*, 38(2), 55. <https://doi.org/10.1016/j.cervis.2013.09.018>
- Kohyama, N., & Ono, H. (2013). Hordatine a β -D-glucopyranoside from ungerminated barley grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(5), 1112–1116. <https://doi.org/10.1021/jf304453c>
- Kunze, W. (2010). *Technology brewing malting* (4th ed.). VLB.
- Lohaus, E., Bios, I., & Rudiger, W. (1983). Carboxylic acids in wheat, rye and barley. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 38(7–8), 524–530. <https://doi.org/10.1515/znc-1983-7-805>
- Lu, S., & Gibb, S. W. (2008). Copper removal from wastewater using spent-grain as biosorbent. *Bioresource Technology*, 99(6), 1509–1517. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.024>
- Lynch, K. M., Steffen, E. J., & Arendt, E. K. (2016). Brewers' spent grain: A review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 553–568. <https://doi.org/10.1002/jib.363>
- Mandalari, G., Faulds, C. B., Sancho, A. I., Saija, A., Bisignano, G., LoCurto, R., & Waldron, K. W. (2005). Fractionation and characterisation of arabinoxylans from brewers' spent grain and wheat bran. *Journal of Cereal Science*, 42(2), 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.03.001>
- Martin-Arjol, I., Bassas-Galia, M., Bermudo, E., Garcia, F., & Manresa, A. (2010). Identification of oxylipins with antifungal activity by LC-MS/MS from the supernatant of *Pseudomonas* 42A2. *Chemistry and Physics of Lipids*, 163(4–5), 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.02.003>
- Martin-García, B., Pasini, F., Verardo, V., Diaz-de-Cerio, E., Tylewicz, U., Gómez-Caravaca, A. M., & Caboni, M. F. (2019). Optimization of sonotrode ultrasonic-assisted extraction of proanthocyanidins from brewers' spent grains. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(8), 282. <https://doi.org/10.3390/antiox8080282>
- Meneses, N. G., Martins, S., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013). Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*, 108, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.02.015>
- Merten, D., Erman, L., Marabelli, G. P., Leners, B., Ney, Y., Nasim, M. J., Jacob, C., Tchoumtchoua, J., Cajot, S., & Bohn, T. (2022). Potential health effects of brewers' spent grain as a functional food ingredient assessed by markers of oxidative stress and inflammation following gastro-intestinal digestion and in a cell model of the small intestine. *Food & Function*, 13(9), 5327–5342. <https://doi.org/10.1039/D1FO03090F>
- Michalkiewicz, A., Biesaga, M., & Pyrzyńska, K. (2008). Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography. A*, 1187(1–2), 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.001>
- Moreira, M. M., Morais, S., Carvalho, D. O., Barros, A. A., Delerue-Matos, C., & Guido, L. F. (2013). Brewer's spent grain from different types of malt: Evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds. *Food Research International*, 54(1), 382–388. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.023>
- Mussatto, S. I., Dragone, G., & Roberto, I. C. (2007). Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*, 25(2), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.11.001>
- Mussatto, S. I., Fernandes, M., Rocha, G. J. M., Orfao, J. J. M., Teixeira, J. A., & Roberto, I. C. (2010). Production, characterization and application of activated carbon from brewer's spent grain lignin. *Bioresource Technology*, 101(7), 2450–2457. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.025>
- Mussatto, S. I. (2014). Brewer's spent grain: A valuable feedstock for industrial applications. *Journal of Food and Agriculture*, 94(7), 1264–1275. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6486>
- Nadeem, M., Mumtaz, M. W., Danish, M., Rashid, U., Mukhtar, H., Irfan, A., Anwar, F., & Saari, N. (2020). UHPLC-QTOF-MS/MS metabolites profiling and antioxidant/antidiabetic attributes of *Cuscuta reflexa* grown on *Casaria tomentosa*: Exploring phytochemicals role via molecular docking. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 918–940. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1764578>
- Narasimhan, A., Chinnaiyan, M., & Karundevi, B. (2015). Ferulic acid exerts its antidiabetic effect by modulating insulin-signalling molecules in the liver of high-fat diet and fructose-induced type-2 diabetic adult male rat. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquée, Nutrition Et Métabolisme*, 40(8), 769–781. <https://doi.org/10.1139/apnm-2015-0002>
- Niemi, P., Tamminen, T., Smeds, A., Viljanen, K., Ohra-aho, T., Holopainen-Mantila, U., Faulds, C. B., Poutanen, K., & Buchert, J. (2012). Characterization of lipids and lignans in brewer's spent grain and its enzymatically extracted fraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(39), 9910–9917. <https://doi.org/10.1021/jf302684x>
- Olajire, A. A. (2020). The brewing industry and environmental challenges. *Journal of Cleaner Production*, 256, 102817. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.03.003>
- Pedersen, M. B., Bunzel, M., Schäfer, J., Knudsen, K. E. B., Sørensen, J. F., Yu, S., & Lærke, H. N. (2015). Ferulic acid dehydromer and dehydromer profiles of distiller's dried grains with solubles from different cereal species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(7), 2006–2012. <https://doi.org/10.1021/jf505150g>
- Pihlava, J.-M. (2014). Identification of hordatines and other phenolamides in barley (*Hordeum vulgare*) and beer by UPLC-QTOF-MS. *Journal of Cereal Science*, 60(3), 645–652. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.07.002>
- Pihlava, J.-M., Kurtelius, T., & Hurme, T. (2016). Total hordatine content in different types of beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(2), 212–217. <https://doi.org/10.1002/jib.311>
- Sahin, A. W., Hardiman, K., Atzler, J. J., Vogelsang-O'Dwyer, M., Valdeperez, D., Münch, S., Cattaneo, G., O'Riordan, P., & Arendt, E. K. (2021). Rejuvenated brewer's spent grain: The impact of two BSG-derived ingredients on techno-functional and nutritional characteristics of fibre-enriched pasta. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 68, 102633. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102633>
- Santos, M., Jiménez, J., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., & del Nozal, M. (2003). Variability of brewer's spent grain within a brewery. *Food Chemistry*, 80(1), 17–21. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00229-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00229-7)
- Spínola, V., Llorent-Martínez, E. J., & Castilho, P. C. (2018). Antioxidant polyphenols of Madeira sorrel (*Rumex maderensis*): How do they survive to in vitro simulated gastrointestinal digestion? *Food Chemistry*, 259, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.112>
- Stefanello, F. S., Dos Santos, C. O., Bochi, V. C., Fruet, A. P. B., Soquetta, M. B., Dörr, A. C., & Nörnberg, J. L. (2018). Analysis of polyphenols in brewer's spent grain and its comparison with corn silage and cereal brans commonly used for animal nutrition. *Food*

- Chemistry, 239(239), 385–401. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.130>
- Szaja, A., Montusiewicz, A., Lebioccka, M., & Bis, M. (2020). The effect of brewery spent grain application on biogas yields and kinetics in co-digestion with sewage sludge. *PeerJ*, 8, e10590. <https://doi.org/10.7717/peerj.10590>
- Verni, M., Pontonio, E., Krona, A., Jacob, S., Pinto, D., Rinaldi, F., Verardo, V., Diaz-de-Cerio, E., Coda, R., & Rizzello, C. G. (2020). Bioprocessing of brewers' spent grain enhances its antioxidant activity: Characterization of phenolic compounds and bioactive peptides. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1831. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01831>
- von Röpenack, E., Parr, A., & Schulze-Lefert, P. (1998). Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(15), 9013–9022. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.15.9013>
- Wannenmacher, J., Gastl, M., & Becker, T. (2018). Phenolic substances in beer: Structural diversity, reactive potential and relevance for brewing process and beer quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(4), 953–988. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12352>
- Wellnitz, J., & Gluschke, M. (2004). *Leitlinie zur Methodvalidierung* (1st ed.). Texte. Umweltbundesamt Retrieved from <https://www.umweltbundesamt.de/publikationen/leitlinie-zur-methodvalidierung>
- Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P., & Christakopoulos, P. (2008). Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresource Technology*, 99(13), 5427–5435. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.010>
- Ye, C., Zhang, R., Dong, L., Chi, J., Huang, F., Dong, L., Zhang, M., & Jia, X. (2022). A-glucosidase inhibitors from brown rice bound phenolics extracts (BRBPE): Identification and mechanism. *Food Chemistry*, 372, 131306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131306>
- You, Q., Chen, F., Wang, X., Luo, P. G., & Jiang, Y. (2011). Inhibitory effects of muscadine anthocyanins on α -glucosidase and pancreatic lipase activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9506–9511. <https://doi.org/10.1021/jf201452v>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Becker, D., Stegmüller, S., & Richling, E. (2022). Characterization of brewer's spent grain extracts by tandem mass spectrometry and HPLC-DAD: Ferulic acid dehydromers, phenolamides, and oxylipins. *Food Science & Nutrition*, 00, 1–23. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3178>

Supplement Material**Supplement A:** Detailed information about instrumentation and MS-parameters

Table 1: Instrumentation used for identification and quantification of compounds in BSG extracts

| system | components | analysis |
|-----------|--|--|
| HPLC-MS 1 | HPLC Agilent 1100 Series with VWD (variable wavelength detector; Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) PE Sciex API 2000 triple-quadrupole mass spectrometer (SCIEX, Framingham, Massachusetts, USA). | BSG extract characterisation (section 2.3) |
| HPLC-MS 2 | HPLC Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) Sciex API 3200 triple-quadrupole mass spectrometer (SCIEX, Framingham, Massachusetts, USA) | BSG extract characterisation (section 2.3) structural elucidation of DiFA and identification of oxylipins (section 2.5) |
| HPLC-MS 3 | HPLC Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) QTRAP 5500 mass spectrometer (SCIEX, Framingham, Massachusetts, USA) | identification of phenolamides (section 2.4) |
| HPLC-DAD | HPLC Agilent 1200 Series with diode array-detector (DAD; Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) | quantification of total hordatine content (section 2.6) and hydroxycinnamic acids (section 2.7) |

Table 2: MS-parameters used for the different analysis methods

| analysis method | MS-parameters |
|--|--|
| ESI _{pos} -MS(/MS)-analysis of BSG extracts (section 2.3) | ion spray voltage 4700 V CUR 10–20 psi nebuliser gas 30–40 psi CAD gas 2 psi heater gas 30–40 psi T 450 °C declustering potential (DP) 100 V focusing potential (FP) 340 V entrance potential (EP) 8–10.5 V collision cell entrance potential (CEP) 17.5–32 V cell exit potential (CXP) 50 V collision energy (CE) 15–35 eV |
| ESI _{neg} -MS(MS)-analysis of BSG extracts (section 2.3) | ion spray voltage –4500 V CUR 10–20 psi nebuliser gas 30–40 psi CAD gas 2–6 psi heater gas 30–40 psi T 450 °C DP –26 to –100 V |

| | |
|--|---|
| | FP -160 to -340 V EP -8 to -11.5 V CEP -12 to -38 eV CXP -2 to -15 V CE -20 to -50 V |
| ESI _{pos} -MS(MS)-analysis of phenolamides (section 2.4) | ion spray voltage 4700 V CUR 20 psi nebuliser gas 30 psi CAD gas -3 psi heater gas 30 psi temperature 450° C DP 100 V collision energy spread (CES) 30 EP 8 V; CEP 40 V CE 30-40 eV LIT fill time 1 msec, dynamic Q3 entry barrier 8 V exit lens voltage (EXB) -158.88 to -133.54 V auxiliary AC 0.14-0.91 V scan rate 1000 Da/s |
| ESI _{neg} -MS(MS)-analysis of DiFAs and oxylipins (section 2.5) | ion spray voltage -4500 V CUR 20 psi nebuliser gas 30 psi CAD gas 5-6 psi heater gas 30 psi T 450° C DP -45 to -100 V EP -10 to -10.5 V CEP -17 to -31.8 V CXP -2 to -4 V CE -20 to -35 eV |

Supplements B: HPLC-ESI_{pos}-MS/MS chromatograms of different hordatines and quantitative results of HPLC-DAD analysis

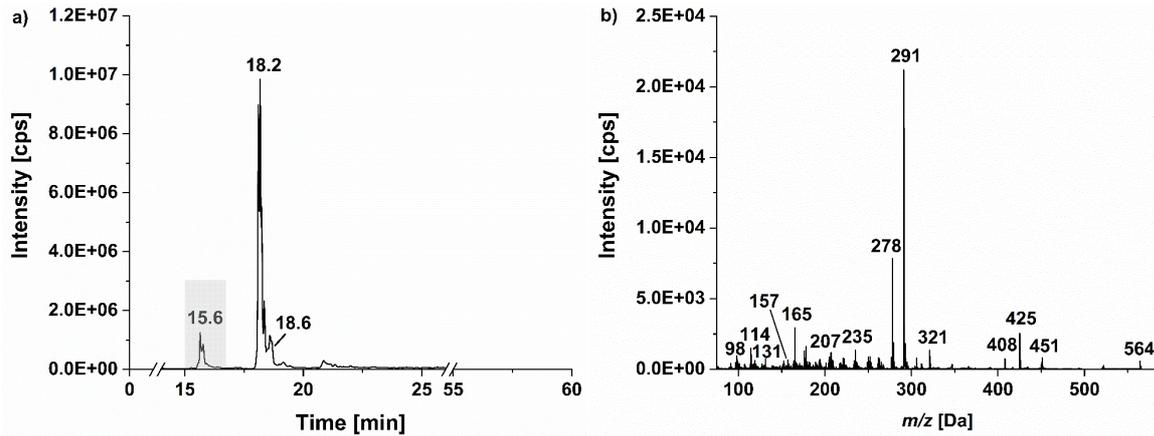


Figure 1: HPLC-ESI_{pos}-MS/MS chromatogram of hordatine B (m/z 291, a) and corresponding MS² spectrum of signal at 15.6 min (b) in extract A7 (acetone extract from BSG 3, defatted); CE: 40 eV, CES: 30, DP 100 V.

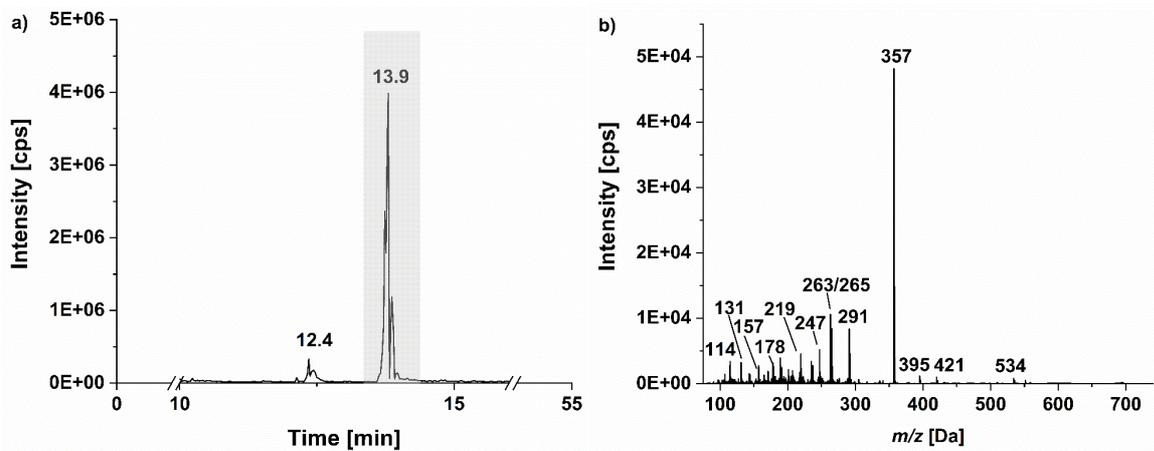


Figure 2: HPLC-ESI_{pos}-MS/MS chromatogram of hordatine A hexoside (m/z 357, a) and corresponding MS² spectrum of signal at 13.9 min (b) in extract A7 (acetone extract from BSG 3, defatted); CE 40 eV, CES 30, DP 100 V.

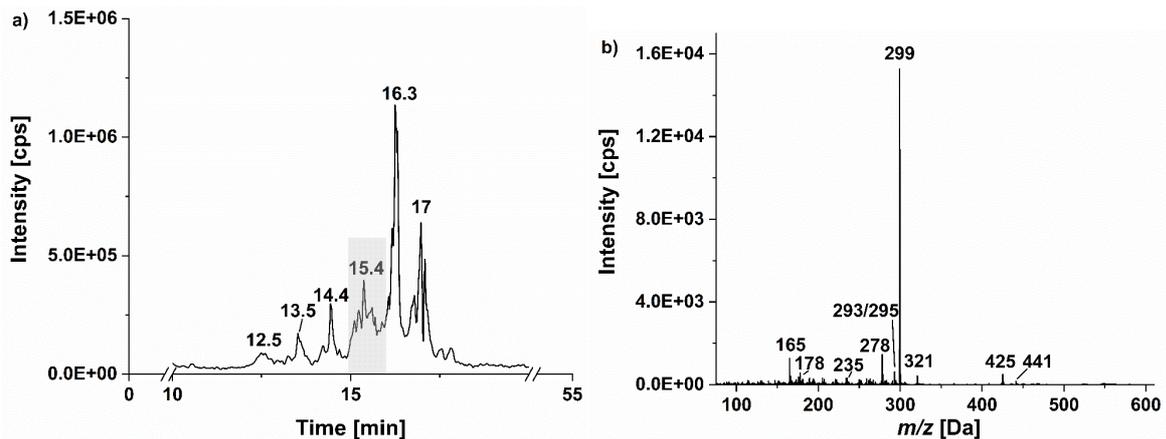


Figure 3: HPLC-ESI_{pos}-MS/MS chromatogram of hordatine B1 (m/z 299, a) and corresponding MS² spectrum of signal at 15.4 min (b) in extract A7 (acetone extract from BSG 3, defatted); CE 40 eV, CES 30, DP 100 V.

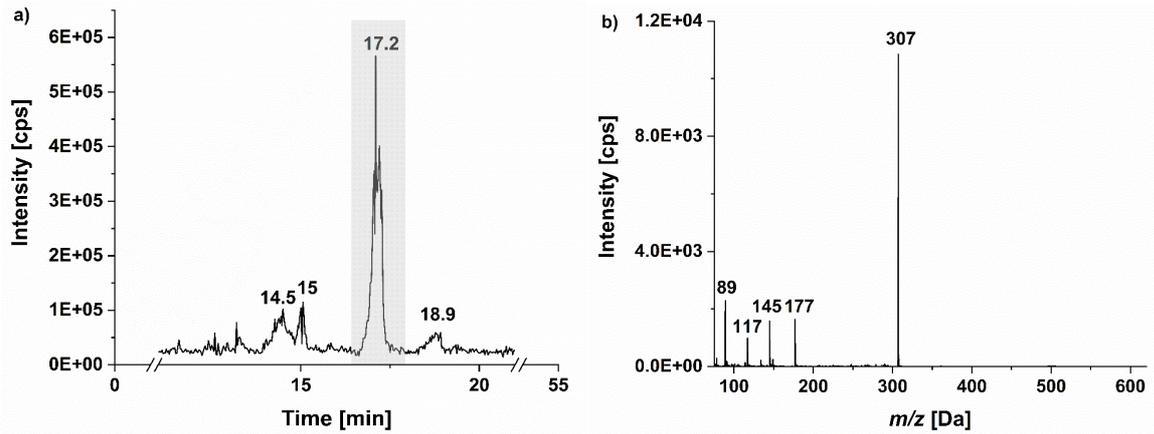


Figure 4: HPLC-ESI_{pos}-MS/MS chromatogram of feruloylglutamine (m/z 307, a) and corresponding MS² spectrum of signal at 17.2 min (b) in extract A4 (acetone extract from BSG 2); CE 40 eV, CES 30, DP 100 V.

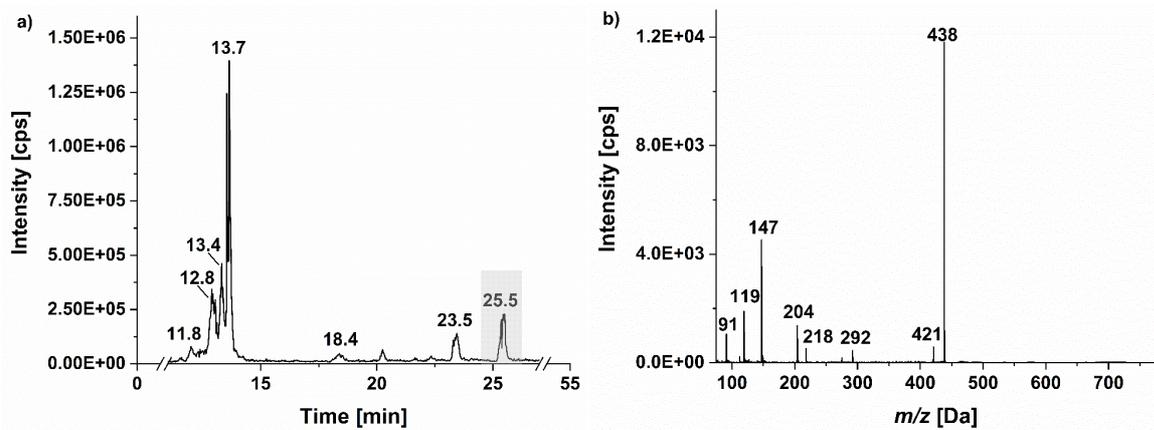


Figure 5: HPLC-ESI_{pos}-MS/MS chromatogram of bis-coumaroylspermidine (m/z 438, a) and corresponding MS² spectrum of signal at 25.5 min (b) in extract A2 (acetone extract from BSG 2); CE 40 eV, CES 30, DP 100 V.

Table 1: Total hordatine content in A extracts expressed as $\mu\text{g pCA-Eq}/\text{mg} \pm \text{SD}$ or yield related in BSG dw as $\mu\text{g pCA-Eq}/\text{g BSG dw} \pm \text{SD}$.

| Extract | Hordatines [$\mu\text{g pCA-Eq}/\text{mg extract}$] \pm SD | | Hordatines (yield related) [$\mu\text{g pCA-Eq}/\text{g BSG}$] \pm SD | |
|---------|---|-------|--|-------|
| A1 | 14.23 | 0.52 | 242.02 | 8.82 |
| A2 | 55.95 | 7.03 | 671.41 | 84.32 |
| A3 | 36.06 | 0.28 | 829.44 | 6.41 |
| A4 | 86.07 | 4.67 | 688.56 | 37.32 |
| A5 | 112.23 | 12.13 | 897.87 | 97.00 |
| A6 | 107.51 | 1.43 | 967.62 | 12.85 |
| A7 | 172.22 | 2.09 | 1550.06 | 18.80 |

Supplements C: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS chromatograms of extract HE4

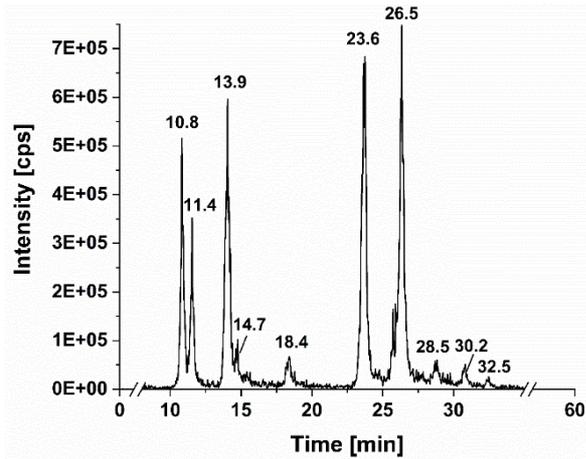


Figure 6: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS chromatogram of extract HE4 (ethyl acetate extract of alkaline hydrolysis of BSG 2), m/z 385 extracted; CE: -30 eV, DP -45 V.

Supplements D: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS chromatograms of oxylipins

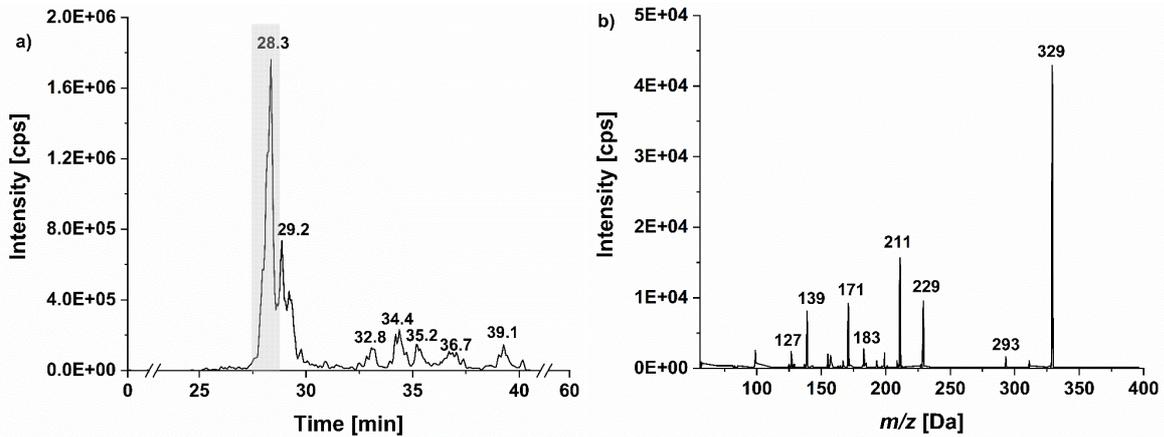


Figure 7: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS chromatogram of TriHOME isomers (m/z 329, a) and corresponding MS² spectrum of signal at 28.3 min (b) in extract HE5; CE -30 eV, DP -100 V.

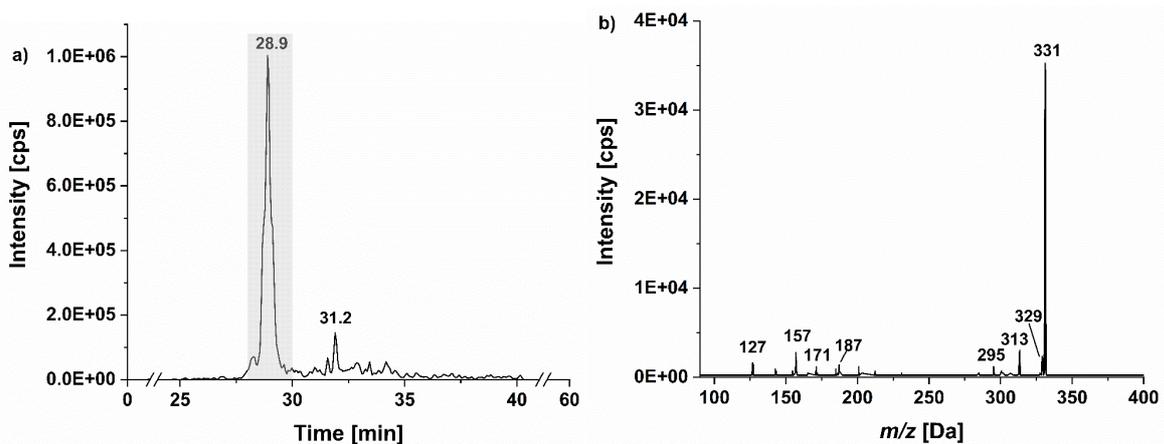


Figure 8: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS chromatogram of TriHODA isomers (m/z 331, a) and corresponding MS² spectrum of signal at 28.9 min (b) in extract HE5; CE -30 eV, DP -100 V.

4.3 Publikation 3: Isolation of hordatine-rich fractions from BSG and their influence on glucose metabolism enzymes

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit isolierten Hordatinfraktionen wurden in der Publikation als Fraktionen 1-10 bezeichnet. Zu besseren Differenzierung von den Fraktionen der FA-Oligomer-Isolierung (F-Fraktionen 1-37; s. Kapitel 4.4) werden sie im Folgenden als H-Fraktionen (H1-H10) bezeichnet.

Einleitung

Hordatine sind Dimere zweier HCAAs und gehören zur Gruppe der Phenolamide. Sie wurden bislang in Gerste [Nomura *et al.*, 1999; Röpenack *et al.*, 1998] sowie in Bier [Pihlava, 2014] nachgewiesen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten sie erstmals in BSG-Extrakten aus SLE mit 60 %-igem Aceton identifiziert und als *pCA*-Äq quantifiziert werden [Becker *et al.*, 2022b]. Ihre Biosynthese findet über den Phenylpropanoid- und den Polyamin-Syntheseweg statt, wobei FA, *pCA* und Sinapinsäure als Hydroxyzimtsäure-Bausteine auftreten können. So ergibt sich eine strukturelle Vielfalt, welche über Hordatin A (2x *pCA*), B (1x *pCA*, 1xFA), C (2xFA) und D (1xFA, 1x Sinapinsäure) sowie zusätzlich durch Modifikation des Agmatins über einfach hydroxylierte Hordatine (A1–C1), zweifach hydroxylierte Hordatine (A2–C2) und Hordatine mit unterschiedlich hohem Glykosylierungsgrad reicht [Gorzolka *et al.*, 2014; Gorzolka *et al.*, 2016; Pihlava, 2014]. Quantitative Daten sind nur begrenzt publiziert und reichen von Höchstwerten von 18,7 mg *pCA*-Äq/L in Bier [Pihlava *et al.*, 2016] über Höchstgehalte von 254 nmol Hordatin A und B/g Trockengewicht ungekeimter Gerste (139,7 µg/g berechnet als Hordatin A bzw. 147,5 µg/g berechnet als Hordatin B) [Kohyama und Ono, 2013]. Es ist bekannt, dass die Gehalte während der Keimung zunehmen [Nomura *et al.*, 1999], was die Hypothese des Auftretens in BSG stützt. Ihre biologischen Wirkungen sind bislang wenig erforscht. Sie wurden als antifungizid wirksam in der Gerstenpflanze [Röpenack *et al.*, 1998] sowie antioxidativ [Spreng und Hofmann, 2018] beschrieben. Basierend auf der im Rahmen der vorliegenden Arbeit detektierten Inhibition der α -Glucosidase und GP α durch BSG-Extrakte, wurde ein entsprechendes inhibitorisches Potential vermutet (vgl. Kapitel 4.1. Publikation 1 und 2 [Becker *et al.*, 2021])

Zielsetzung

Im Fokus stand die Isolierung verschiedener Hordatine aus BSG und deren Auftrennung in einzelne angereicherte Fraktionen, welche im Anschluss mittels *enhanced resolution scans* via HPLC-MS/MS analysiert werden sollten. Weiterhin sollten die Fraktionen hinsichtlich ihres inhibitorischen Potentials gegenüber α -Glucosidase und GP α untersucht und die Menge enthaltener Hordatine semiquantitativ als *pCA*-Äq bestimmt werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Mittels eines mehrstufigen Isolations- und Aufreinigungsprozesses konnten insgesamt zehn Hordatin-Fraktionen (H1–H10) gewonnen werden. Zudem wurde ein nicht ausreichend aufgetrennter Rest des Rohisolates, der ebenfalls Hordatine enthielt, aus Vorversuchen erhalten. Dieser wurde lediglich zur präziseren Bestimmung der Ausbeute betrachtet. Die Gesamtmenge des Isolates belief sich auf 21,5 mg, was ca. 14,8 mg/100 g BSG entspräche. Dies ist aufgrund der umfangreichen Aufarbeitungsschritte als ungefähre Annäherung zu

betrachten. Die im Anschluss durchgeführte massenspektrometrische Analyse ergab, dass alle H-Fractionen Hordatine enthielten und eine Trennung in Glykoside, hydroxylierte Hordatine und nicht hydroxylierte Hordatine erfolgreich war. Die Identifikation der Hordatine erfolgte analog der zuvor durchgeführten Studie anhand der Hauptfragmente [Becker *et al.*, 2022b]. So führte die präparative Trennung mit einer RP-Säule zur Auftrennung der glykosylierten Hordatine v.a. in Fraktionen H1–H6, hydroxylierter Hordatine in H7 und H8 sowie Hordatinen A–C in H9 und H10. Aufgrund der zusätzlichen Methylgruppen bei Hordatin C, C1, C2 im Vergleich zu Hordatin A, A1, A2 eluierten diese stets etwas später als die Hordatine, welche *p*CA statt FA enthielten. Insgesamt wurden 71 verschiedene Hordatine bzw. deren *cis/trans*- und Regioisomere sowie die beiden monomeren Vorläufer Feruloyl- und Coumaroylagmatin nachgewiesen. Eine Auftrennung aller einzelnen Hordatine war aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit jedoch nicht möglich. Die semiquantitative Bestimmung der Hordatingehalte ergab je nach Fraktion starke Unterschiede und lag zwischen $60,7 \pm 3,1$ bis $259,6 \pm 6,1$ $\mu\text{g pCA-Äq/mg}$ Fraktion, wobei der Korrekturfaktor von 5, welcher aus Literaturdaten stammt [Pihlava *et al.*, 2016], noch nicht einberechnet wurde. Hier zeigte sich die Relevanz von Referenzsubstanzen, denn unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors ergäben sich unrealistische Werte über 100 %. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich nicht alle Hordatine hinsichtlich der UV-Absorption gleich verhalten. Trotzdem können anhand der Daten Vergleiche innerhalb der Fraktionen sowie zu den BSG-Extrakten A1–A7, die im Rahmen der Dissertation entstanden [Becker *et al.*, 2022b] gezogen werden. Es zeigte sich, dass die H-Fractionen alle deutlich höhere Gehalte als die BSG-Extrakte aufwiesen. Dies kann auf die präparative Trennung zurückgeführt werden, welche zu einer Aufkonzentrierung der Hordatine in den Fraktionen im Vergleich zu den Extrakten führte. Hinsichtlich der biologischen Aktivität wurde kein inhibitorisches Potential der H-Fractionen gegenüber GP α jedoch gegenüber α -Glucosidase beobachtet. Sowohl H5 als auch H8 erwiesen sich als potente Inhibitoren mit IC₅₀-Werten von $194,1 \pm 1,8$ $\mu\text{g/mL}$ bzw. $78,2 \pm 4,6$ $\mu\text{g/mL}$. Somit enthielt v.a. H8 starke Inhibitoren und zeigte ein stärkeres Inhibitionspotential als die Positivkontrolle (PK) Acarbose mit einem IC₅₀-Wert von $116,1 \pm 22,3$ $\mu\text{g/mL}$. Beide Fraktionen lagen hinsichtlich ihres Hordatingehaltes im unteren bis mittleren Bereich, weshalb davon auszugehen ist, dass spezifische Hordatine für die Inhibition verantwortlich waren. So könnten in den Fraktionen die Leitsubstanzen wie Glykoside (in H5) und der Vorläufer Coumaroylagmatin (in H8) als Inhibitoren in Frage kommen, was jedoch in Folgestudien verifiziert werden müsste.

Fazit

Hordatine gehören zur Gruppe der Phenolamide und sind aufgrund ihrer Stabilität in Bier und BSG, zwei stark prozessierten Produkten, zu finden. Ihre Strukturvielfalt zeigte sich anhand der 71 detektierten Hordatine bzw. deren Isomere und erschwerte die Isolierung einzelner Substanzen aus BSG. Lediglich eine Auftrennung in einzelne Gruppen wie Glykoside, hydroxylierte oder nicht hydroxylierte Hordatine gelang. Möglicherweise ist die Synthese gegenüber einer Isolierung aus Rohmaterialien zur Gewinnung der Einzelsubstanzen vorzuziehen. Zwar ist die Quantifizierung ohne Referenzsubstanzen ein kritischer Faktor, jedoch erlauben die semiquantitativen Ergebnisse den Vergleich zwischen Proben, die mittels gleicher Methodik analysiert wurden. So zeigte sich, dass die erhaltenen H-Fractionen höhere Gehalte aufwiesen als die ebenfalls im Rahmen der Dissertation hergestellten BSG-Extrakte.

Hinsichtlich der biologischen Wirkungen konnte ein inhibitorisches Potential zweier Fraktionen gegenüber α -Glucosidase beobachtet werden, welches jedoch mit höherer Stichprobenanzahl verifiziert werden sollte. Weiterhin könnten *molecular docking*-Studien mit den vermuteten Leitderivaten in den inhibitorischen Fraktionen herangezogen werden.

Veröffentlichtes Manuskript

Article

Isolation and Characterisation of Hordatine-Rich Fractions from Brewer's Spent Grain and Their Biological Activity on α -Glucosidase and Glycogen Phosphorylase α

Daniela Becker *, Sandra Permann, Tamara Bakuradze, Simone Stegmüller and Elke Richling *

Department of Chemistry, Division of Food Chemistry and Toxicology, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schrödinger-Straße 52, 67663 Kaiserslautern, Germany; permann@rhrk.uni-kl.de (S.P.); bakuradze@chemie.uni-kl.de (T.B.); stegmueller@chemie.uni-kl.de (S.S.)

* Correspondence: d_becker@chemie.uni-kl.de (D.B.); richling@chemie.uni-kl.de (E.R.); Tel.: +49-163-205-4061 (E.R.)

Citation: Becker, D.; Permann, S.; Bakuradze, T.; Stegmüller, S.; Richling, E. Isolation and Characterisation of Hordatine-Rich Fractions from Brewer's Spent Grain and Their Biological Activity on α -Glucosidase and Glycogen Phosphorylase α . *Sustainability* **2022**, *14*, 8421. <https://doi.org/10.3390/su14148421>

Academic Editors: Roberto Ciccoritti and Tiziana Amoriello

Received: 17 June 2022

Accepted: 5 July 2022

Published: 9 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Hordatines are a characteristic class of secondary metabolites found in barley which have been reported to be present in barley malt, beer and, recently, brewer's spent grain (BSG). However, little is known about their biological activities such as antioxidative effects in beer or antifungal activity as their main task within the plants. We conducted an in vitro investigation of the activity of hordatines isolated from BSG towards enzymes of glucose metabolism. Hordatine-rich fractions from BSG were prepared by solid-liquid extraction (SLE) with 60% acetone followed by purification and fractionation. The fractions were characterised and investigated for their in vitro inhibitory potential on α -glucosidase and glycogen phosphorylase α (GP α). Both enzymes are relevant within the human glucose metabolism regarding the digestion of carbohydrates as well as the liberation of glucose from the liver. In total, 10 hordatine-rich fractions varying in the composition of different hordatines were separated and analysed by mass spectrometry. Hordatine A, B and C, as well as hydroxylated aglycons and many glycosides, were detected in the fractions. The total hordatine content was analysed by HPLC-DAD using a semi-quantitative approach and ranged from 60.7 ± 3.1 to 259.6 ± 6.1 μ g *p*-coumaric acid equivalents/mg fraction. Regarding the biological activity of fractions, no inhibitory effect on GP α was observed, whereas an inhibitory effect on α -glucosidase was detected (IC₅₀ values: 77.5 ± 6.5 – 194.1 ± 2.6 μ g/mL). Overall, the results confirmed that hordatines are present in BSG in relatively high amounts and provided evidence that they are potent inhibitors of α -glucosidase. Further research is needed to confirm these results and identify the active hordatine structure.

Keywords: brewer's spent grain; α -glucosidase; glycogen phosphorylase α ; glucose metabolism; hordatine; phenolamides; fractionation bioactive

1. Introduction

Brewer's spent grain (BSG) contains various phenolic compounds, such as hydroxycinnamic acids (ferulic, coumaric, sinapic and caffeic acid) as well as ferulic acid dimers, but also flavonoids, e.g., catechin, quercetin and chrysoeriol [1,2]. Recently, barley-specific phenolic compounds named hordatines, already detected in barley grain (*Hordeum vulgare*) [3,4] and beer [5], were also found in BSG extracts prepared by solid-liquid extraction (SLE) [6].

Hordatines are characteristic secondary plant metabolites in barley, where they possess antifungal activity. They belong to the group of phenolamides comprising a phenolic compound coupled to an amine by an amide bond. Different hordatines, e.g., hordatine A and B, as well as their glucosides were reported many years ago [4,7]. However, little is known about this substance class so far, and only limited data regarding the hordatine

content in barley or barley related products are available. Kohyama and Ono reported values for hordatine A β -D-glucopyranoside of 103 to 254 nmol/g dw (dry weight; i.e., 0.073–0.181 mg/g as hordatine A glucoside) in ungerminated barley [8]. However, it is well known that the amount increases during germination. Nomura et al. reported maximum values of 90 nmol hordatine A/g fresh weight (corresponding to 49.5 μ g/g) and 93 nmol hordatine B/g fresh weight (corresponding to 54.0 μ g/g) in wheat-barley chromosome addition lines 72–96 h after seeding [3]. In beer, total hordatine contents were determined by Pihlava et al. [5] as *p*-coumaric acid equivalents (*p*CA-Eq) and ranged from 5.6 \pm 3.1 mg *p*CA-Eq/L up to 18.7 mg *p*CA-Eq/L. However, since the values were expressed as equivalents, they are difficult to compare with the amounts detected in barley by Nomura et al. and Kohyama and Ono [3,8]. In a recent study, we detected hordatines in BSG extracts and quantified them as ranging from 14.2 \pm 0.5 to 172.2 \pm 2.1 μ g *p*CA-Eq/mg extract [6]. Taken together, these findings demonstrate the relatively high stability of hordatines as they are able to withstand many brewing steps, such as high temperature during kilning.

To date, the biological activity of hordatines has not been widely studied. Only their strong antifungal [4,7] and antioxidative [9] activities have been described. Furthermore, hordatine-rich BSG extracts have been shown to be strong inhibitors of α -glucosidase and glycogen phosphorylase α (GP α), although the active compounds of the complex mixtures were not clearly identified [6,10]. Both enzymes play an important role in glucose metabolism, and their inhibition can lower blood glucose levels. α -Glucosidase is found in the small intestine and liberates α -glucose from the non-reducing end of α -glucose residues [11], whereas GP α is located in the liver and participates in the release of glucose from glycogen [12,13]. Hordatines belong to the group of phenolamides, which represent a large group of phenolic compounds mainly present in flowers or pollen grains resulting from the conjugation of phenolic acids with amines [14]. Other phenolamides are hydroxycinnamoylputrescines and hydroxycinnamoyltyramines. Caffeoylputrescine has been reported to be a strong inhibitor of yeast α -glucosidase [15] and some hydroxycinnamoyltyramines have been identified as potent α -glucosidase inhibitors [16,17].

Hordatines have relatively complex structures within the class of phenolamides. Their biosynthesis occurs via two pathways, i.e., the phenylpropanoid and polyamine pathways. First, the hydroxycinnamate is conjugated by coenzyme A-ligase (CoA-ligase), forming hydroxycinnamoyl-CoA, and arginine is decarboxylated by arginine decarboxylase (ADC), resulting in agmatine. Agmatine coumaroyltransferase (ACT) catalyses the conjugation of hydroxycinnamoyl-CoA and agmatine to form the hordatine precursors *p*-coumaroylagmatine and feruloylagmatine (Figure 1a). These monomeric precursors are subsequently oxidatively dimerised leading to the formation of hordatines (Figure 1b) [4,18]. Depending on the hydroxycinnamoyl moiety and structural modifications, such as hydroxylation of the agmatine, different hordatines can be formed. Hordatine A (dimer of *p*-coumaroylagmatine), hordatine B (dimer of *p*-coumaroylagmatine and feruloylagmatine) and hordatine C (dimer of feruloylagmatine) are formed as the main hordatines. To a lesser extent, hordatine D including a sinapoylagmatine was detected years ago [19], and hydroxylated hordatines such as A1–C1 and A2–C2 are also found [20]. The hydroxylation is located in the agmatine moiety and can therefore be present either one or two times [19]. Besides the aglycons, glycosides are often detected, henceforth referred to as hordatine hexosides. Mainly, one or two hexoside units [19–21] have been found, but up to nine hexoside units have been reported in beer samples [5]. Thus, the substance class of hordatines includes their aglycons as well as glucosides.

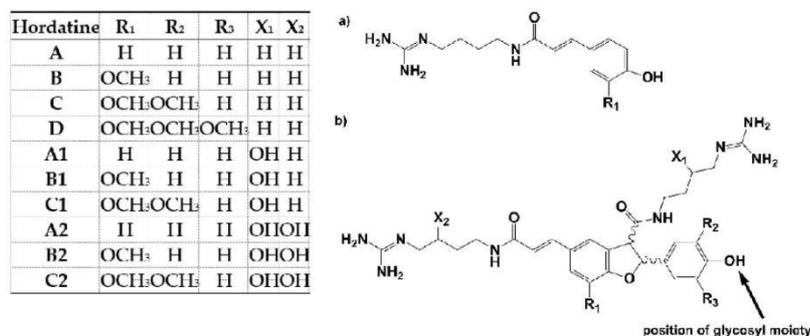


Figure 1. (a) Chemical structures of hordatine precursors *p*-coumaroylagmatine (R₁=H) and feruloylagmatine (R₁= OCH₃). (b) Chemical structures of hordatines; glycosylation occurs at the hydroxyl group position indicated by the arrow; numbering adapted from published data [21].

The aim of this study was the isolation of hordatines and hordatine hexosides from BSG and their fractionation to obtain fine fractions with different hordatine structures, which were subsequently analysed via HPLC-MS(/MS). Additionally, to evaluate the biological activity of hordatines, *in vitro* enzyme-inhibition studies were performed to investigate their bioactivity regarding glucose metabolism. Furthermore, a semi-quantitative analysis of total hordatine content in each fraction was performed for comparison with each other.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Chemicals were of analytical grade and obtained from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany) unless otherwise stated. Acetonitrile (LC-MS grade and super gradient grade HPLC) as well as methanol and acetone (LC-MS grade) were obtained from VWR Chemicals (Darmstadt, Germany). Formic acid was purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany) and formic acid (Optima LC-MS grade) was from Fisher chemicals (Waltham, USA). Sodium dihydrogen phosphate dihydrate was purchased from Riedel de Haen (Berlin, Germany). Magnesium sulphate heptahydrate, disodium hydrogen phosphate monohydrate and potassium hydrogen phosphate were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). NADP disodium salt as well as glycogen from oysters were from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). DMSO was from J&K Scientific (Marbach/Neckar, Germany). C18ec material (64 Å, 31 µm) was from Macherey-Nagel (Düren, Germany). Glucose-6-phosphatedehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* (G6PDH, EC 1.1.1.49) was purchased from Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA) and 4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (pNPG) was from Acros Organics (Fair Lawn, New Jersey). The drug used as a positive control was Glucobay®100 from Bayer Pharmaceuticals (Leverkusen, Germany), in which acarbose is the active compound. Glycogen phosphorylase α from rabbit muscle (GPα, EC 2.4.1.1), α-glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.20), phosphoglucomutase from rabbit muscle (PGM, EC 5.4.2.2), *p*-coumaric acid (purity ≥ 98%) and 3,4-dimethoxycinnamic acid (purity 99%) were from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany).

2.2. Brewer's Spent Grain (BSG) Sample

Brewer's spent grain (BSG) was provided by the conventional Orval brewery in Belgium (Florenville, Belgium) and was prepared from a mixed malt (from barley) consisting of Pilsen malt (90%), caramel malt (9%) and peeled, roasted barley (1%). It was lyophilised and then milled to a fine powder using a grain mill (KoMo Fidibus 219, Hopfgarten, Austria). Defatting was performed with pure acetone overnight by Soxhlet extraction (1 g solid:16 mL solvent; performed by our project partner, the working group of Prof. Dr. Thiel, TUK). The samples were dried by volatilisation of the acetone.

2.3. Isolation, Purification and Fractionation

Isolation of hordatines from BSG was performed by SLE with 60% acetone (acetone/water, 60/40, *v/v*) according to our previous study [10] and also following the isolation process of Kohyama and Ono [8] with modifications. To begin, 145 g of defatted BSG sample was mixed twice with 725 mL of 60% acetone and extracted under stirring at 60 °C in a water bath for 30 min. The solid residue was eliminated by filtration, and the organic phases were combined. Acetone was removed under reduced pressure at 40 °C to a total volume of around 500 mL of crude isolate, which was then purified by column chromatography.

Two columns, both packed with C18ec material (64 Å, 31 µm from Macherey-Nagel Düren, Germany; 90 mL bed volume), were pre-conditioned with 450 mL of 0.1% formic acid in methanol and equilibrated with 900 mL of formic acid/double-distilled (dd) H₂O (0.1/99.9; *v/v*). Each column was loaded with 250 mL of the crude isolate. Afterwards, the columns were washed with 720 mL of 0.1% aqueous formic acid. The elution was performed with 320 mL of methanol, and the purified samples were combined and reduced to a total volume of around 80 mL under reduced pressure.

For preparative HPLC fractionation, an Agilent (Santa Cruz, California) 1200 series system equipped with a MWD detector (G1365D), two preparative pumps (G1361A) and a fraction collector (G1364C) was used. The HPLC conditions were as follows: column: VDSpher PUR C18-SE (5 µm, 250 × 20 mm; VDS optilab, Berlin, Germany); solvent system A (formic acid/ddH₂O (0.1/99.9; *v/v*)), B (formic acid/acetonitrile (0.1/99.9; *v/v*)); flow 15 mL/min; injection volume 10 mL; gradient profile: isocratic 2% B over 7 min, from 2 to 10% B over 1 min, from 10 to 30% B over 28 min, from 30 to 95% B over 1 min, isocratic 95% B for 9 min and re-equilibration at 2% B for 12 min; detection wavelengths 230 and 280 nm. The collection mode was time-dependent, beginning at 4 min as follows: from 4–16 min every 2 min, from 16–26 min every 0.5 min and from 26 to 30 min every 2 min. A total of 28 fractions were collected, their volumes were reduced (to around 2 mL) by vacuum centrifugation (Concentrator plus, Eppendorf, Hamburg, Germany) and samples were analysed by HPLC-UV-ESI(+)-MS using an Agilent 1100 series instrument equipped with a degasser (G1322A), quaternary pump (G1311A), autosampler (G1387A), column oven (G1316A) and VWD detector (G1314A) (Agilent Technologies, Santa Clara, California USA) coupled to a AB Sciex API 2000 triple-quadrupole mass spectrometer (SCIEX, Framingham, Massachusetts, USA). Q1 scans (150–525 Da) were performed (data not shown) to check which hordatines were present. The HPLC conditions were as follows: VDSpher PUR C18-SE (5 µm, 250 × 4.6 mm; VDS optilab, Berlin, Germany); solvent system A (formic acid/ddH₂O (0.1/99.9; *v/v*)), B (formic acid/acetonitrile (0.1/99.9; *v/v*)); flow 800 µL/min; injection volume 20 µL; gradient profile: isocratic 2% B over 4.9 min, from 2 to 10% B over 0.1 min, from 10 to 30% B over 30 min, from 30 to 95% B over 0.1 min, isocratic 95% B for 10 min and re-equilibration at 2% B for 12 min; detection wavelength 300 nm. The ESI-MS conditions were as follows: ion spray voltage (ISV) 4700 V; curtain gas (CUR) 20 psi; nebuliser gas 30 psi; heater gas 30 psi; temperature (*T*) 450 °C; declustering potential (DP) 100 V; focusing potential (FP) 340 V; entrance potential (EP) 10.5 V; collision cell entrance potential (CEP) 10.23–23.7 V. According to the *m/z* detected in the Q1 scans (150–525 Da), fractions were combined by means of the observed doubly charged parent ion $[M+2H]^{2+}$ to give 10 hordatine fractions (1–10), which were subsequently lyophilised. Some leftovers originating from the method development were also lyophilised to obtain a more precise yield but were not analysed further; all yields are shown in Section 3.1.

2.4. Enhanced Resolution LC-ESI-MS(/MS) Analysis

Fractions 1–10 were characterised using a more sensitive mass spectrometer and two different scan modes (enhanced MS, EMS; enhanced product ion, EPI) on an Agilent 1290 Infinity system equipped with a degasser (G1379B), binary pump (G4220A), autosampler (G4226A) and column oven (G1330B) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

coupled to a QTRAP 5500 mass spectrometer based on a triple quadrupole ion path, where the last mass selector was a linear ion trap (LIT) instead of the third quadrupole (SCIEX, Framingham, Massachusetts, USA). The HPLC conditions were as follows: VDSpher C18-SE 5 μm column (VDS Optilab, Berlin, Germany); solvent system: A 0.1% aqueous formic acid, B 0.1% formic acid in acetonitrile; gradient profile: isocratic 2% B for 4.9 min, from 2 to 10% B over 0.1 min, from 10 to 23.5% B over 20 min, from 23.5 to 35% B over 0.1 min, from 25% to 50% B over 10 min, from 50 to 95% B over 0.1 min, isocratic 95% B for 10 min and re-equilibration at 2% B for 10 min; flow rate 800 $\mu\text{L}/\text{min}$; injection volume 5 μL ; column oven 35 $^{\circ}\text{C}$. Different concentrations of fractions were prepared from a 2 mg/mL stock solution in DMSO depending on the amount of total hordatines as well as the signal intensity of the analysed m/z in EPI scans. Thus, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were used for EMS scans and 5–25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for EPI scans. The ESI⁺-MS(/MS) conditions were as follows: ISV 4500 V (EMS), 4700 V (EPI); CUR 20 psi; nebuliser gas 30 psi; collision gas (CAD) -3 psi; heater gas 30 psi; T 400 $^{\circ}\text{C}$ (EMS), 450 $^{\circ}\text{C}$ (EPI); DP 65 V (EMS), 100 V (EPI); EP 10 V (EMS), 8 V (EPI); collision energy (CE; only for EPI) 40 V; collisional energy spread (CES; only for EPI) 20 V. LIT parameters were as follows: fill time 0.05 msec (EMS), 1 msec (EPI), dynamic; Q3 entry barrier: 8 V; exit lens voltage (EXB) -158.88 to -133.54 V; auxiliary AC (AF3) 0.14–0.91 V; scan rate 1000 Da/s. EMS scans (250 to 600 Da) were performed for all fractions and analysed by extracting the m/z of the doubly charged parent ion. Hordatines ranging from non-hydroxylated to hydroxylated aglycons as well as glycosides were previously detected in beer and barley-seeds [5,19]. The fractions obtained in the present study were checked for these hordatines. Afterwards, EPI scans were performed using the fraction(s) giving high signals for the respective m/z to clearly confirm the parent ion observed in the EMS scans by typical fragmentation.

2.5. Quantification of Total Hordatine Content by HPLC–DAD

The total hordatine content was determined as *pCA*-Eq adapted from Pihlava et al. using *pCA* as reference substance due to the lack of a commercial available reference [5]. Quantification was based on the peak area of compounds in relation to the peak area of an internal standard (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3,4-dimethoxycinnamic acid; IS) using an external calibration (1–50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *pCA*).

HPLC conditions were as described in Section 2.4. using a HPLC Agilent 1200 Series with a degasser (G1322A), quaternary pump (G1311A), autosampler (G1329A), column oven (G1316A), and diode array-detector (DAD) (G1315D) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA); detection wavelength was 280 nm (reference wavelength 360 nm); an injection volume of 20 μL and concentrations of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in methanol/formic acid (99.9/0.1, *v/v*) were used for each fraction and membrane filtered (0.45 μm) prior to injection.

Owing to low yields and a focus on bioassays, the analysis was performed only twice. The precision of the method was determined by inter-(five-replicate analysis of one concentration of *pCA* in a row) and intra-day (one concentration of *pCA* on five days in a row) repetition experiments; the coefficient of variation was 0.5% for intra-day and 0.8% for inter-day experiments. LOD was determined as 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and LOQ as 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ using a calibration approach (five concentrations of *pCA* 0.25–2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) adapted from the European Commission/Joint Research Centre [22].

Due to the different UV absorption of hordatines and *pCA*, a correction factor (CF) was used. This could not be determined experimentally due to the lack of availability of pure reference substances. Thus, results were multiplied by a CF of 5 obtained from published data [5].

2.6. α -Glucosidase Inhibition Assay

Inhibition of α -glucosidase was analysed as previously reported [10] using a spectrophotometric method on a microplate reader (Biotek, Bad Friedrichshall, Germany). Samples were assayed in triplicate with five concentrations of acarbose (positive control) dissolved in ddH₂O (0.4–2 mg/mL); DMSO or ddH₂O was used as a negative control. Stock

solutions of 2 mg/mL of fractions 1–10 in DMSO were investigated for their inhibitory potential and dilutions (four to five; concentration depending on inhibitory potential) were prepared to calculate the respective fraction's IC_{50} value, provided the inhibition of the stock solution was above 50%. A blank (phosphate buffer saline (PBS) instead of enzyme solution) was analysed alongside each sample, taking into account the samples' intrinsic colours in the inhibition calculation. All concentrations and IC_{50} values were calculated relative to the final concentration in each well of the plate as previously reported [10].

2.7. Glycogen Phosphorylase α (GP α) Inhibition Assay

The inhibitory potential of the fractions towards GP α was investigated using a spectrophotometric method adapted from earlier studies [10]. Samples were assayed in triplicate, and a blank (100 mM glucose in buffer B instead of GP α) was analysed alongside each sample to account for the samples' intrinsic colour in the inhibition calculation. Five different concentrations of caffeine dissolved in ddH₂O (0.5–1.75 mg/mL) were used as a positive control; DMSO or ddH₂O was used as a negative control. Fractions were dissolved in DMSO to a concentration of 2 mg/mL to investigate their inhibitory potential on GP α .

Buffer A (3 mM adenosine monophosphate, 40 mM β -glycerophosphate, 8 mM L-cysteine free base at pH 6.8), buffer B (20 mM sodium dihydrogen phosphate dihydrate, 2 mM magnesium sulphate heptahydrate; pH 7.2), assay buffer (buffer B: ddH₂O, 1:1, v:v), enzyme stock solutions (5 U/mL GP α , 500 U/mL PGM, 500 U/mL G6PDH), enzyme mix (93.75 mU/mL GP α , 100 mM glucose in assay buffer), assay medium (5 U/mL G6PDH, 12 U/mL PGM and 3.148 mg/mL NADP in assay buffer) and glycogen solution (2 mg/mL in assay buffer) were prepared as described by Becker et al. [10].

For the assay, 20 μ L aliquots of the sample, positive control and negative control were transferred to a 96-well microplate and each mixed with 50 μ L of the assay medium followed by addition of 80 μ L of the enzyme mix or 100 mM glucose. Afterwards, 80 μ L of glycogen was added, which started the reaction. After 30 min of incubation at 37 °C, the absorbance at $\lambda = 340$ nm was measured using a microplate reader (Biotek, Bad Friedrichshall, Germany). Concentrations and the IC_{50} value of caffeine were calculated relative to the final concentrations in each well.

2.8. Statistical Analysis

Results are presented as the mean and standard deviation (SD) of three to eight independent experiments (GP α and α -glucosidase inhibition assay) or the mean and range (R) of two independent experiments (quantification by HPLC-DAD and IC_{50} values of fraction 5 and 8 in α -glucosidase inhibition assay). Statistical analysis was performed with Origin 2019G (OriginLab, Northampton, MA, USA) and Excel Office Professional Plus 2016 (Microsoft, Redmond, DC, USA). The data were checked for normality (Anderson Darling test) and homogeneity of variance (Fisher test).

3. Results

Previous studies have shown that hordatines are minor components in BSG [6] and also important bioactive components in BSG extracts [10]. Thus, a targeted isolation process including purification and fractionation was developed to obtain highly concentrated hordatine fractions or pure compounds for testing. Furthermore, a preparative separation was used to obtain different fractions with regards to the contained hordatines; i.e., separation of aglycons and glycosides as well as of non-hydroxylated and hydroxylated hordatines was intended. Due to the high similarity of the structures, the latter turned to be more complex than expected and only partial separation was achieved. However, using RP-chromatography, hordatines eluted between 12–19 min in the following elution order: hordatine hexosides (hexosides (hex) of H (hordatine) A/B/C/A1/B1/C1) < hydroxylated

hordatines (A1-C1, A2-C2) < non-hydroxylated hordatines (A-C). Each fraction's hordatine content was determined as *p*CA-Eq by HPLC-DAD and high contents were observed. Moreover, all fractions were analysed by mass spectrometry, and various hordatines, ranging from aglycons and hexosides of HA/B/C, HA1/B1/C1 as well as aglycons HA2/B2/C2, were identified by their doubly charged parent ion. Enhanced product ion scans of the doubly charged parent ion were conducted for each hordatine to confirm its structural moiety. All fractions were finally investigated regarding their inhibitory potential towards two enzymes of glucose metabolism (α -glucosidase and GP α), which has not been studied before. Our previous results indicated that hordatines might contribute to the inhibition of α -glucosidase by BSG extracts. Here, we investigated our fractions in an *in vitro* enzyme inhibition assay, but due to the low yields obtained during our isolation process, the investigations only provided a screening and results were expressed as the mean of two independent experiments assayed in triplicate.

3.1. Isolation of Hordatines from BSG

Hordatines were isolated in a multi-step process including SLE with 60% acetone, purification by column chromatography with C18ec material and separation by preparative HPLC. Altogether, 10 fractions as well as some leftovers from method development were obtained after lyophilisation. Figure 2 shows a chromatogram of fractions 1–10 resulting from the preparative purification. The leftovers from trial runs also contained hordatines (detected via a full scan, data not shown) but did not exhibit sufficient separation of the hordatines. Therefore, they were only lyophilised to gain a more precise yield

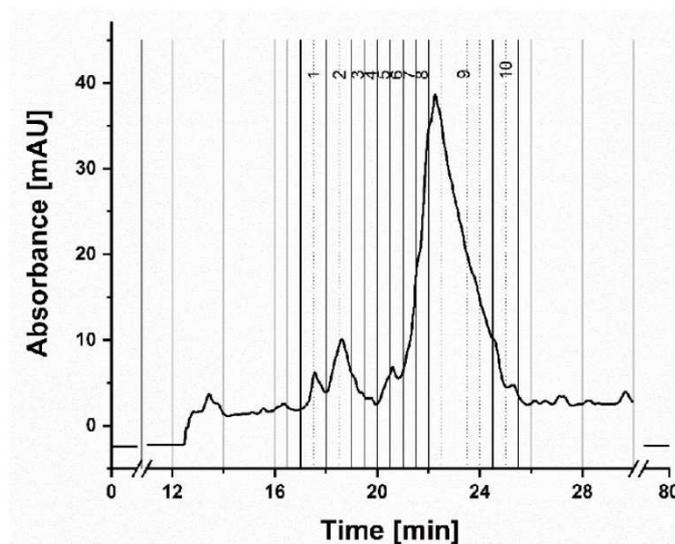


Figure 2. HPLC-DAD chromatogram of the preparative fractionation recorded at $\lambda = 280$ nm; collection tubes 1–8 were analysed but did not contain hordatines, collection tubes 9–26 were combined according to their main compounds, resulting in fractions 1–10, collection tubes 27–29 were discarded; grey and dotted lines: collection tubes, black lines: fractions 1–10.

Depending on the fraction, the yield ranged from 1.04 to 7.08 mg (0.72 to 4.89 mg/100 g defatted dw BSG; Table 1) and amounted to a total of 21.52 mg (14.84 mg/100 g defatted dw BSG). The highest yield was observed for fraction 9, which also had the largest elution area of around 2.5 min.

Table 1. Yield of isolation process for each fraction, leftovers and sum in total as well as related on defatted dw BSG.

| Fraction | Total Yield [mg] | Yield Related on Defatted dw BSG [mg/100 g] | Fraction | Total Yield [mg] | Yield Related on Defatted dw BSG [mg/100 g] |
|----------------|------------------|---|-----------|------------------|---|
| 1 | 1.10 | 0.76 | 7 | 1.04 | 0.72 |
| 2 | 1.26 | 0.87 | 8 | 1.09 | 0.75 |
| 3 | 1.04 | 0.72 | 9 | 7.08 | 4.89 |
| 4 | 1.07 | 0.74 | 10 | 3.03 | 2.09 |
| 5 | 1.24 | 0.86 | leftovers | 2.39 | 1.65 |
| 6 | 1.20 | 0.83 | | | |
| Yield in total | | | 21.52 mg | | 14.84 |

3.2. Characterisation of Fractions: Structure Determination by Mass Spectrometry and Quantification of Total Hordatine Content

Fractions 1–10 were further analysed in terms of the total hordatine content and identification of single hordatines. The total hordatine content was determined as pCA-Eq since no suitable reference substances were available, and high contents were detected in all fractions. It was already known [19,20] that hordatines are mainly observed as doubly charged positive parent ions $[M+2H]^{2+}$. Previous findings [5] were used to systematically search for the expected hordatines in the fractions by EMS methodology. EPI scans of each m/z were performed to confirm the respective hordatine structure.

3.2.1. Hordatine and Other Phenolamide Derivatives Determined in Isolated Fractions

In our recently published study [6], many different hordatines were identified in BSG extracts after SLE with 60% acetone based on their doubly charged $[M+2H]^{2+}$ parent ions and characteristic fragments. This was also observed by Gorzolka et al. and Pihlava et al. in barley seeds and beer [5,19]. In the present study, each fraction was analysed by HPLC-ESI⁺-MS full scans (EMS scan; 250–600 Da) and according to our previous findings and literature scanned for the m/z of the expected hordatines, such as HA/B/C, HA1/B1/C1 and HA2/B2/C2 as well as mono-/di- and tri-hexosides (hex/di-hex/tri-hex). All of them were detectable in the fractions. Additionally, a peak at m/z 321 was found with a very low signal intensity and tentatively identified as hordatine D. Table 2 summarises the main signals of each fraction and the suggested hordatines contained. Hexosides were mostly observed in fractions 1–6, hydroxylated hordatines in fractions 7 and 8 and non-hydroxylated hordatines in fractions 9 and 10. Furthermore, the hordatine precursors *N*-coumaroylagmatine and, to a lesser extent, *N*-feruloylagmatine were observed.

Table 2. Summary of the most intense $[M+2H]^{2+}$ signals in HPLC-ESI⁺-MS full scans (EMS) of each fraction and tentatively identified hordatines; bold printed m/z : additionally analysed by HPLC-ESI⁺-MS/MS (EPI scan).

| Fraction | m/z of $[M+2H]^{2+}$ and Related Retention Time(s) [min] ^a | Main Hordatine or Phenolamide ^b |
|----------|---|--|
| 1 | 519 (11.0, 12.1, 12.9), 534 (10.7, 11.2), 453 (10.8, 11.1, 11.8, 13.5), 438 (11.2, 12.3, 12.8, 13.7) | HA-dihex/trihex; HB-dihex/trihex |
| 2 | 372 (12.1, 13.8), 357 (12.7, 13.9), 438 (12.4, 13.7), 453 (11.9, 13.6) | HA-hex/dihex; HB-hex/dihex |
| 3 | 357 (12.2, 12.5, 13.8, 13.9), 387 (12.6, 14.4), 468 (12.0, 12.4, 14.2), 372 (11.5, 12.0, 13.8), 438 (12.4, 13.8), 519 (10.6, 11.0, 11.5, 12.1), 534 (10.7, 12.5), 549 (11.8, 12.4, 14.1, 15.1) | HA/B/C-hex, HC-dihex |
| 4 | 453 (11.2, 12.9), 438 (11.5, 12.9), 387 (12.6, 14.4), 395 (11.7, 12.9), 380 (10.6, 11.2, 11.5, 12.0, 13.0), 534 (10.8, 11.3, 12.3, 13.0, 14), 519 (11.5, 13.1), 549 (11.5, 12.8, 13.2, 14.3), 365 (11.5, 11.9, 12.3, 12.9, 13.1), 372 (12, 13.3, 13.8, 14.7) | HA/B-dihex, HC-hex, HC1-hex |

| | | |
|----|--|-------------------------------------|
| 5 | 438 (12.4, 13.8), 453 (11.9, 13.6), 372 (11.4, 12.0, 13.8), 357 (12.2, 12.6, 13.6, 14.1), 519 (12.5, 13.3, 13.8), 534 (11.3, 12.0, 12.6, 13.7, 13.9), 292 (14.3, 15.6), 307 (13.6, 14.0, 15.3, 16.0), 322 (12.8, 14.7, 16.1) | HA-hex/dihex; HB-hex/dihex |
| 6 | 387 (12.6, 14.3), 357 (12.5, 13.9), 468 (12.6, 12.8, 14.3, 14.5), 372 (12, 13.8), 551 ^c (16.7), 299 (14.7, 17.2), 284 (16.6), 307 (13.6, 14, 14.9, 15.3, 17.6) | HA-hex, HC-hex/dihex |
| 7 | 291 (16.0, 18.5), 299 (14.8, 15.2, 16.5, 17.3, 18.0), 284 (15.7, 17.6), 387 (12.6, 14.4), 372 (13.1, 14.6), 567 ^c (17.6), 581 ^c (16.0, 18.3), 551 ^c (16.8, 18.8), 314 (15.4, 17.2, 17.9) | HB, HA1, HB1, HC-hex |
| 8 | 276 (16.7, 18.7), 277 ^c (13.7, 16.2), 291 (15.9, 18.3), 307 (13.6, 15.2), 551 ^c (16.6, 18.6) | HA, HB, HB2, N-coumaroylagmatine |
| 9 | 291 (16.5, 18.9, 19.1), 276 (16.7, 18.7), 581 ^c (16.1, 18.5), 551 ^c (16.7; 18.5), 306 (16.6, 19.1), 299 (14.7, 17.3), 284 (15.7, 17.6), 321 (18.0, 19.1, 19.8) | HA/B |
| 10 | 276 (16.7, 18.7), 291 (15.9, 18.4), 581 ^c (15.9, 18.4), 551 ^c (16.9; 18.6), 306 (16.6, 19.1) | HA/B/C |

^a as far as clearly identifiable, mainly visible in EPI scan ^b 3–4 most intense signals ^c [M+H]⁺.

Besides EMS (enhanced full scans) (250–600 Da), EPI (enhanced product ion) scans were performed for specific fractions (Table 2; bold printed *m/z*) and compared to our previous results. The main fragments are discussed below and summarised in Table 3. Comparison with literature data [5,19] and our own so-far unpublished observations as well as by mean of characteristic fragment ions enabled the signals to be assigned to the respective hordatine. Each *m/z* that was identified as a [M+2H]²⁺ parent ion was detected at 2–6 different retention times, resulting in the same fragments as in the tandem MS experiments (EMS).

Table 3. Identification of phenolamides in fractions by HPLC-ESI⁺-MS/MS (EPI) according to their *m/z* of [M+2H]²⁺ and [M+H]⁺ as well as their fragment ions listed in order of decreasing intensity.

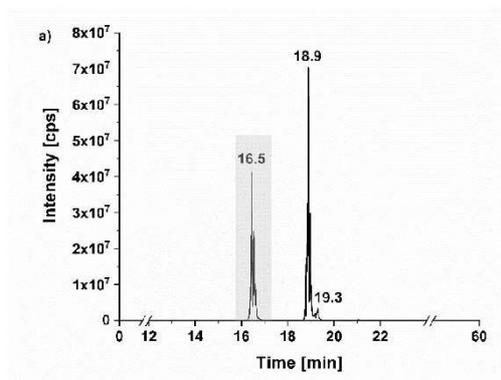
| Hordatine/Phenolamide Derivative | Retention Time [min] ^a | <i>m/z</i> [M+2H] ²⁺ | Fragment Ions [<i>m/z</i>] |
|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--|
| N-coumaroylagmatine | 13.7, 16.2 | 277 ^b | 277, 147, 91, 119 |
| N-feruloylagmatine | 14.9, 17.5 | 307 ^b | 307, 177, 145, 134, 117, 89, 290, 149 |
| HA | 16.7, 18.7 | 276 | 395, 276, 291, 263, 421, 207, 98, 131, 114, 157, 189, 178, 219, 235, 247, 265, 534, 378, 379 |
| HB | 16.5, 18.9, 19.3 | 291 | 291, 278, 321, 425, 295, 114, 131, 157, 165, 262, 293, 221, 207, 178, 189, 451, 366, 564 |
| HC | 16.6, 19.1 | 306 | 306, 351, 455, 265, 157, 114, 131, 98, 293, 325, 481, 594, 336, 221, 237, 165, 277, 297 |
| HD^c | 19.1, 19.8 | 321 | 321, 177, 485, 165, 381, 355, 337, 426, 249, 147, 131, 98, 511 |
| HA1 | 15.7, 17.6 | 284 | 291, 284, 189, 147, 178, 395, 265, 263, 235, 255, 173, 114, 437, 478, 533, 550, 378, 411 |
| HB1 | 14.7, 15.2, 16.6, 17.3, 18 | 299 | 299, 321, 278, 293, 147, 165, 425, 173, 270, 114, 467, 178, 581, 441, 408 |
| HC1 | 15.4, 17.2, 17.9 | 314 | 314, 351, 308, 265, 293, 147, 130, 114, 455, 173, 471, 497, 325, 593, 611 |
| HA2 | 14.3, 15.6 | 292 | 292, 411, 291, 178, 189, 263, 207, 235, 454, 147, 393, 549, 283, 265, 173 |
| HB2 | 13.6, 14, 15.3, 16 | 307 | 307, 321, 441, 278, 147, 423, 293, 298, 467, 484, 165, 173, 579, 596, 194, 207, 235, 130 |
| HC2 | 12.8, 14.7, 16.1 | 322 | 322, 351, 471, 308, 265, 173, 147, 497, 453, 514, 130, 609, 626 |

| | | | |
|-----------|----------------------------------|-------|--|
| HA-hex | 12.7, 14 | 357 | 357, 276, 291, 265, 534, 263, 395, 551, 247, 219, 157, 131, 114, 421, 97, 98, 509 |
| HB-hex | 12.1, 13.3, 13.8, 14.7 | 372 | 372, 291, 321, 425, 295, 293, 278, 564, 157, 581, 451, 114, 98, 539, 297, 235, 726 |
| HC-hex | 12.6, 14.4 | 387 | 387, 306, 351, 293, 325, 455, 595, 481, 323, 265, 237, 157, 131, 114, 98, 611 |
| HA1-hex | 11.5, 11.9, 12.3, 12.9, 13.1 | 365.6 | 365.6, 284, 265, 266, 263, 291, 207, 235, 247, 438, 551, 335, 307, 568, 131, 98 |
| HB1-hex | 10.6, 11.2, 11.5, 12, 13 | 380 | 380, 299, 321, 293, 278, 362, 425, 295, 467, 580, 173, 147 |
| HC1-hex | 11.7, 12.9 | 395 | 395, 314, 351, 610, 323, 471, 308, 265, 157, 627, 114, 98, 131, 480, 481, 453 |
| HA-dihex | 12.4, 13.7, 13.9 | 438 | 438, 291, 265, 395, 551, 263, 247, 357, 421, 534, 696, 509, 157, 131, 114, 98, 713 |
| HB-dihex | 11.9, 13.6 | 453 | 453, 425, 321, 295, 291, 278, 293, 277, 581, 564, 539, 372, 157, 114, 98, 97, 726, 743 |
| HC-dihex | 12.6, 12.8, 14.3, 14.5 | 468.6 | 468.6, 351, 306, 455, 612, 595, 325, 293, 157, 114, 131, 265, 98, 757, 569, 481 |
| HA-trihex | 11, 12.1, 12.9, 12.5, 13.3, 13.8 | 519 | 519, 265, 276, 291, 292, 357, 438, 534, 551, 713, 875, 859, 696, 263, 247, 219 |
| HB-trihex | 12, 12.6, 13.7, 14 | 534 | 534, 291, 265, 295, 321, 743, 581, 451, 425, 517, 277, 247, 219, 113, 905 |
| HC-trihex | 12.5, 14.1, 15.1 | 549 | 549, 306, 611, 351, 455, 325, 481, 773, 569, 594, 293, 756, 935, 157 |

^a different retention times due to various isomers ^b [M+H]⁺ ^c very low signal intensity, partially overlapped with signal at 18.5 min.

Besides the doubly charged parent ions, singly charged parent ions were also observed, as well as loss of 59 from the doubly charged parent ions. Furthermore, neutral losses of 15, 17, 18, 28, 42, 59, 130 and 156 Da as well as 146 and 172 were seen in most spectra, as already reported by Gorzolka and coworkers for hordatines [19]. Additionally, specific fragments resulting from the agmatine moiety, such as m/z 157, 131, 114 and 98, were found [20,23]. Examples of MS² spectra of some hordatines, including HB, HB2, HA1 and HA-dihex, are shown below.

Fraction 9 showed three peaks (16.5, 18.9 and 19.3 min; Figure 3a) for its main m/z 291, whose MS² spectra of the peak at 16.5 min is shown (Figure 3b). The m/z fragments in descending signal intensity were as follows: 291, 278, 581, 425, 321, 293, 295, 165, 114, 131, 157, 98, 178, 207, 221, 235, 262, 451 and 564 as well as 408, 392 and 306 with low intensities. The characteristic losses and fragment signals are labelled in Figure 3b.



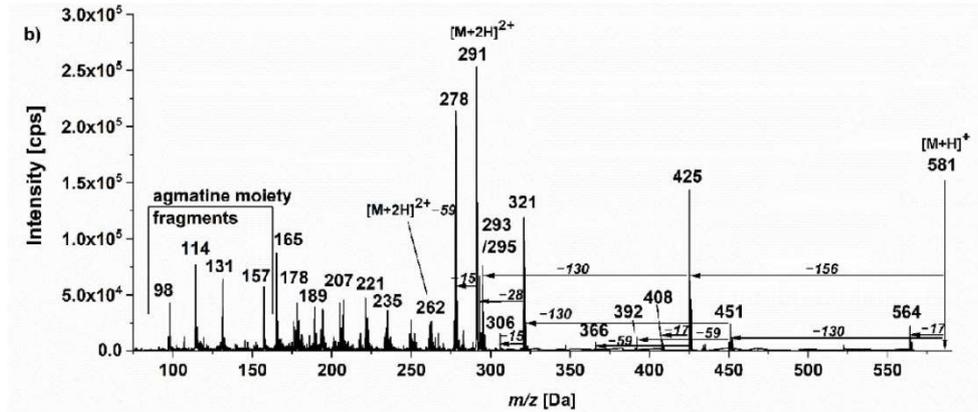
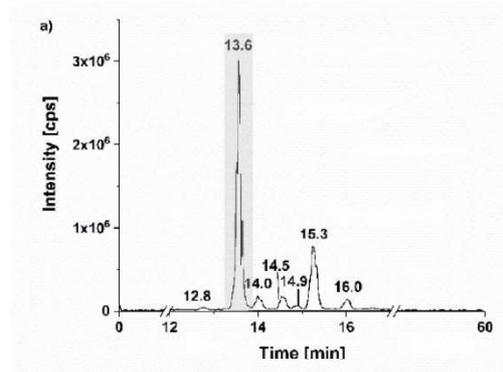


Figure 3. HPLC-ESI⁺-MS/MS chromatogram of hordatine B (m/z 291, (a)) and corresponding MS² spectrum of the peak at 16.5 min (b) of fraction 9; marked are the singly and doubly charged parent ions of m/z 581 and m/z 291, respectively, as well as characteristic losses of 15, 17, 28, 130, and 156 Da, and specific fragments of m/z 98, 114, 131 and 157 resulting from the agmatine moiety.

One of the main signals in fraction 5 was m/z 307, which was observed at at least seven retention times (Figure 4a). However, only peaks at 13.6, 14.0, 15.3 and 16.0 min showed the characteristic fragmentation pattern for hordatines. The peaks at 12.8 and 14.5 min resulted in main fragment ions of m/z 307, 147, 119 and 91 and at 14.9 min m/z of 307, 177, 145, 89 and 117, where the latter was tentatively identified as *N*-feruloylagmatine [20,24]. The m/z fragments for the peak at 13.6 min in descending order of signal intensity were as follows: 307, 321, 441, 278, 147, 173, 293, 298, 423, 295 and 484 as well as 165, 129, 113, 194, 221, 250, 579, 467 and 596 with low intensities. Some characteristic losses and fragment signals are labelled in Figure 4b.



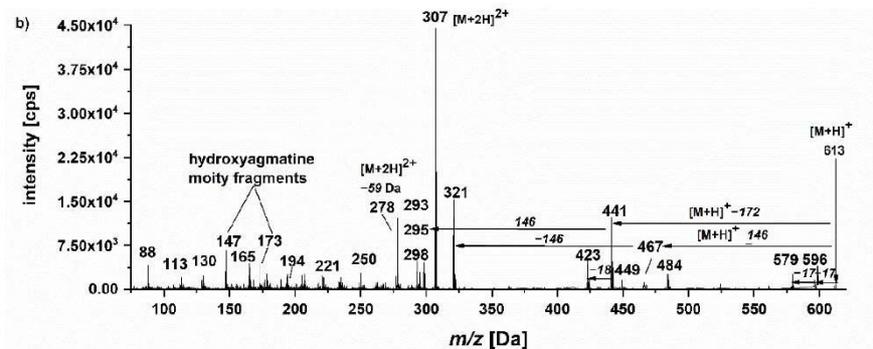


Figure 4. HPLC-ESI-MS/MS chromatogram of hordatine B2 (m/z 307, (a)) and corresponding MS² spectrum of the peak at 13.6 min (b) of fraction 5; marked are the doubly charged parent ion of m/z 307 and singly charged parent ion with loss of 17 of m/z 596 as well as characteristic losses of 17, 18, 59, 146 and 172 Da and specific fragments of m/z 129, 147 and 173 resulting from the hydroxyagmatine moiety.

Fraction 7 resulted in three peaks for m/z of 284 (Figure 5a), where peaks at 15.7 and 17.6 min showed the same fragmentation pattern representative of hydroxylated hordatines. The following fragment ions were detected in order of descending intensity for the peak at 17.6 min: 291, 284, 395, 265, 263, 255, 178, 147, 173, 189 and 276 as well as 336, 478, 436, 421, 533, 550, 114, 129 and 131 with low intensities (Figure 5b). The third peak at 16.8 min demonstrated a different fragmentation pattern as follows: 411, 291, 284, 393, 178, 207, 131, 115, 98, 157, 265, 235 and 438 as well as 478, 533 and 550 with low intensities. Due to the lack of characteristic fragment ions of the hydroxyagmatine moiety (m/z 147 and 173), we could not clearly confirm the structure as hordatine A1.

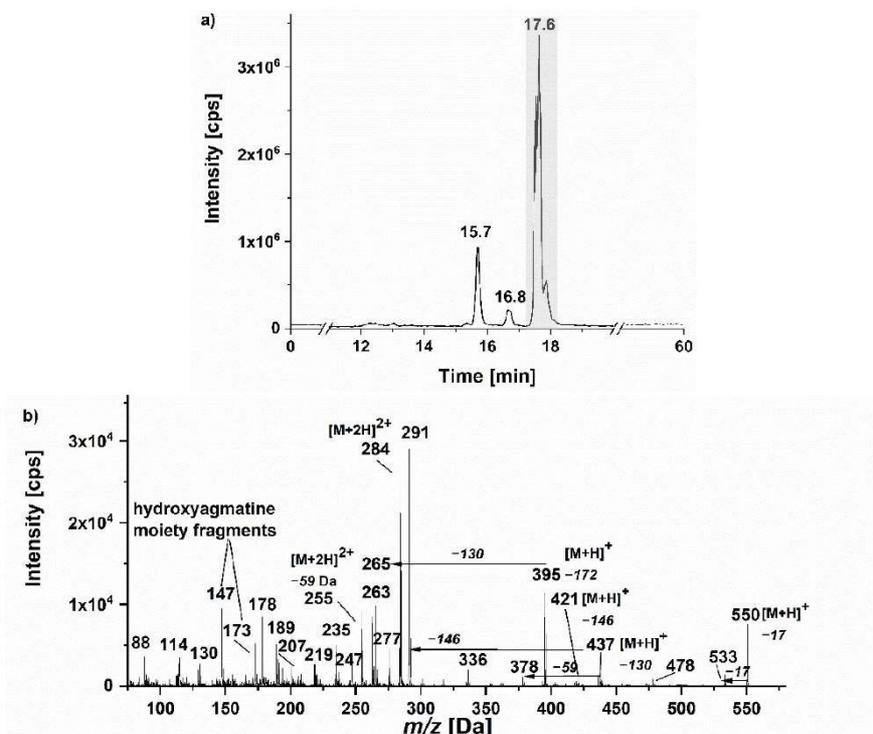


Figure 5. HPLC-ESI⁺-MS/MS chromatogram of hordatine A1 (m/z 284, (a)) and corresponding MS² spectrum of the peak at 17.6 min (b) of fraction 7; marked are the doubly charged parent ion of m/z 284 and single charged parent ion with loss of 17 of m/z 550 as well as characteristic losses of 17, 59, 130, 146 and 172 Da and specific fragments of m/z 129, 131 147 and 173 resulting from the (hydroxy)agmatine moiety.

Earlier eluting fractions (mainly fractions 1–6) contained compounds showing specific losses of 162 Da. Thus, in fraction 5, two intense peaks (at 12.4 and 13.7 min) for m/z 438 were observed (Figure 6a) and the following fragment ions were detected in descending intensity order: 438, 276, 291, 551, 395, 265, 421, 157, 131, 114, 509, 534, 551, 671, 696 and 713, where most of the signals had very low intensity, indicating high stability of the parent ion.

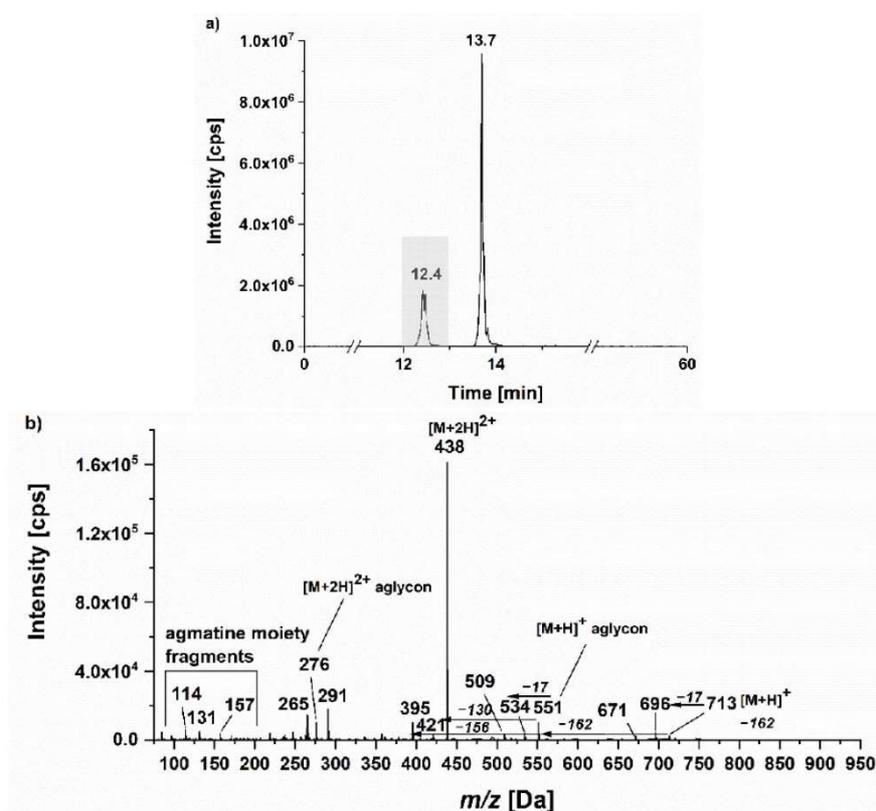


Figure 6. HPLC-ESI⁺-MS/MS chromatogram of hordatine A dihexoside (m/z 438, (a)) and corresponding MS² spectrum of the peak at 12.4 min (b) of fraction 5; marked are the doubly charged parent ion of m/z 438 as well as the characteristic losses of 17, 130, 156 and 162 Da and specific fragments of m/z 114, 131 and 157 resulting from the agmatine moiety.

3.2.2. Total Hordatine Content in Isolated Fractions

Each fraction (1–10) was analysed for its total hordatine content expressed as *p*CA-Eq using HPLC-DAD, and high contents ranging from 60.7 ± 3.1 to 259.6 ± 6.1 μ g *p*CA-Eq/mg fraction were found (Table 4). The highest content was determined for fraction 9, followed by fraction 10, whose contents were two- to four-fold higher than those of the other fraction. Because *p*-coumaric acid and hordatines differ in their UV-absorption response, a correction factor of five was applied, as previously reported by Pihlava et al. [5], resulting in five-fold higher values. However, the correction factor has to be considered

critically, as evident by the corrected values for fractions 9 and 10. Their contents were clearly above 100%, demonstrating that the correction factor was an estimation and cannot replace quantification using analytical standards as a reference.

Table 4. Total hordatine content in fractions 1–10 expressed as $\mu\text{g pCA-Eq/mg fraction} \pm R$ and $\mu\text{g pCA-Eq/100 g BSG dw} \pm R$.

| Fraction | Hordatines [$\mu\text{g pCA-Eq/mg Fraction}$] $\pm R$ (without Correction Factor) | Hordatines [$\mu\text{g pCA-Eq/mg Fraction}$] $\pm R$ (with Correction Factor) |
|----------|--|---|
| 1 | 88.4 \pm 3.9 | 441.9 \pm 19.7 |
| 2 | 63.7 \pm 1.7 | 318.3 \pm 8.4 |
| 3 | 77.3 \pm 2.7 | 386.5 \pm 13.3 |
| 4 | 153.9 \pm 0.4 | 769.3 \pm 2.1 |
| 5 | 106.5 \pm 0.5 | 532.3 \pm 2.5 |
| 6 | 60.7 \pm 3.1 | 303.6 \pm 15.3 |
| 7 | 112.4 \pm 4.4 | 561.9 \pm 21.8 |
| 8 | 65.1 \pm 4.7 | 325.3 \pm 23.5 |
| 9 | 259.6 \pm 6.1 | 1298.1 \pm 30.4 |
| 10 | 229.5 \pm 11.0 | 1147.6 \pm 54.8 |

3.3. Influence of Hordatine-Rich Fractions on Glucose Metabolism Enzymes

In addition to characterisation of the hordatines in the fractions, their possible influence on glucose metabolism enzymes was also investigated. The inhibitory potential on GP α and α -glucosidase was tested in vitro using photometric assays and compared to that of the positive controls Acarbose (for α -glucosidase) and caffeine (for GP α) expressed as IC₅₀ values, i.e., the concentration at which the enzyme's activity was reduced by 50%, provided the inhibition was strong enough to calculate these values. The highest-tested concentrations were 210 $\mu\text{g/mL}$ in the α -glucosidase inhibition assay and 174 $\mu\text{g/mL}$ in the GP α inhibition assay (for both assays: final concentration in the assay). The highest tested concentrations resulted from the availability of the 2 mg/mL stock solution.

3.3.1. Inhibitory Potential towards α -Glucosidase Activity

The α -glucosidase inhibiting potential for fractions 1–10 was investigated using the well-known inhibitor acarbose (a diabetes drug) as a positive control, which had a measured IC₅₀ value of 116.1 \pm 22.3 $\mu\text{g/mL}$. Fractions 5 and 8 exhibited strong inhibition of the enzyme with IC₅₀ values of 194.1 \pm 1.8 $\mu\text{g/mL}$ and 78.2 \pm 4.6 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Fraction 8 showed stronger inhibition than the positive control acarbose (Figure 7).

However, the IC₅₀ values were only a mean value of two independent experiments due to the limited availability of the hordatine fractions, and therefore should be treated with caution. The other fractions did not cause inhibition or caused only slight inhibition. Therefore, no IC₅₀ value could be calculated for those fractions (data not shown).

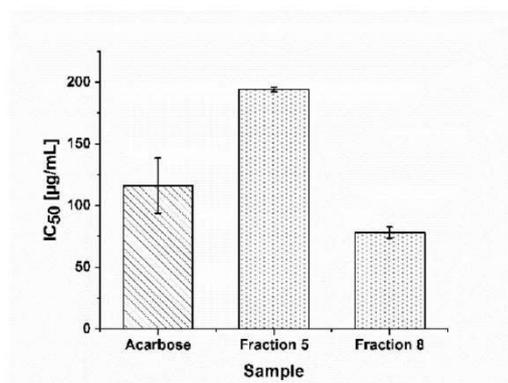


Figure 7. IC₅₀ values of positive control acarbose and fractions 5 and 8 in the α -glucosidase inhibition assay; values are presented as means of $n = 8 \pm SD$ for the positive control and $n = 2 \pm R$ for the fractions.

3.3.2. Inhibitory Effect on GP α Activity

The inhibitory effect of fractions 1–10 on GP α was investigated using the well-established spectrophotometric *in vitro* assay. Caffeine, a known potent inhibitor, was used as a positive control and showed an IC₅₀ value of $124.8 \pm 1.9 \mu\text{g/mL}$. However, none of the tested fractions resulted in strong inhibition of the enzyme. In fact, almost no inhibition was observed even at the highest tested concentration of $174 \mu\text{g/mL}$. Therefore, no IC₅₀ value could be calculated for any of the fractions.

4. Discussion

In total, 10 different fractions amounting to 21.5 mg in total (including some leftovers of method development trials) were isolated from BSG using a multistep procedure. Fractions 1–10 were characterised by tandem mass spectrometry and quantitated by HPLC-DAD regarding the specific hordatines in each fraction as well as their total hordatine content expressed by a semi-quantitative approach as *pCA*-Eq. Both experiments highlighted the complexity of the analysis, as demonstrated by the large number of hordatine structures and different isomers. Thus, only partial separation into hexosides and hydroxylated or non-hydroxylated aglycons was achieved due to their structural similarity. In addition, the lack of appropriate reference substances impeded the quantification and only allowed a semi-quantitative approach, which should be considered critically with regard to the correction factor. Furthermore, the first results on the biological effect of hordatines on glucose metabolism enzymes were shown, indicating an inhibitory effect on α -glucosidase.

4.1. Structural Elucidation of Hordatines and Their Quantification in Isolated Fractions

Enhanced-resolution full scans of fractions 1–10 followed by MS² experiments of all *m/z* signals that could be attributed to hordatines revealed that all fractions contained hordatines, and assignments were made according to our previous study [6] and other publications [19–21,23,24]. Depending on their polarity, they eluted in RP-HPLC between 12–19 min as follows: hordatine hexosides < hydroxylated hordatines < non-hydroxylated hordatines. A highly specific characteristic of hordatines is their occurrence mainly as a doubly charged parent ion $[M+2H]^{2+}$, whereas the singly charged parent ion $[M+H]^+$ is often only detected with low intensity. Some typical fragment ions could be used for identification, and the possible fragmentation pathways will be discussed below. An overview of the specific fragment ions and characteristic neutral losses is provided in Table 5; note that the corresponding structure of some specific fragment ions remains unclear.

Table 5. Characteristic fragment ions [*m/z*] and neutral losses for hordatines in fractions.

| Fragment Ion [<i>m/z</i>] | Chemical Formula | Neutral Loss [Da] | Moiety |
|-----------------------------|---|-------------------|--|
| 157 | C ₆ H ₁₃ N ₄ O ⁺ | 17 | NH ₃ |
| 131 | C ₅ H ₁₅ N ₄ ⁺ | 18 | H ₂ O |
| 114 | C ₅ H ₁₂ N ₃ ⁺ | 162 | C ₆ H ₁₂ O ₆ (hexose) |
| 98 | C ₅ H ₈ NO ⁺ | 42 | CN ₂ H ₂ |
| 72 | C ₄ H ₁₀ N ⁺ | 59 | CN ₃ H ₅ |
| 173 | C ₆ H ₁₃ N ₄ O ₂ ⁺ | 156 | C ₆ H ₁₂ N ₄ O |
| 147 | C ₅ H ₁₅ N ₄ O ⁺ | 130 | C ₅ H ₁₁ N ₄ |
| 129 | C ₅ H ₁₃ N ₄ ⁺ | 146 | C ₅ H ₁₄ N ₄ O |
| 189 | - | 172 | C ₆ H ₁₂ N ₄ O ₂ |
| 178 | - | 28 | CO |
| 165 | - | 15 | CH ₃ |
| | | 30 | OCH ₃ |

In general, hexosides and aglycons of hordatine A, B and C as well as A1, B1 and C1 showed typical fragment ions of *m/z* 157, 131, 114, 98 and 72 resulting from the agmatine moiety. Similar fragment ions of *m/z* 173, 147 and 129 were observed for hexosides and aglycons of hordatine A1, B1 and C1 as well as A2, B2 and C2, verifying the presence of hydroxyagmatine in the structure. The agmatine or hydroxyagmatine moiety can be cleaved from the parent ion as a singly charged fragment as written above or via neutral loss (−156, −130, −146, −172 Da), where the latter (−172 Da) was mainly observed for the singly charged parent ion. Furthermore, partial loss of the agmatine moiety via loss of a polar group (−59 and −42 Da) was detected. This was mainly observed for the doubly charged parent ion and gave rise to specific fragment ions. The presence of different hexosides was verified by the specific loss of 162 Da representing the loss of a hexose moiety. Noticeable was the high stability of the hexosides. Cleavage of the hexose moiety was not very pronounced and the doubly charged parent ion appeared with high intensity. The remaining fragment ions were partially explainable by neutral loss of an amine group (−17 Da), carbon monoxide (−28 Da) or methyl- (−15 Da) and methoxy (−30 Da) radicals. Some fragment ions that were observed in many spectra of the various hordatines, such as *m/z* 189, 178 and 165, could not be explained by the abovementioned fragmentation pathways. However, since they were observed for nearly all hordatines, it can be assumed that they represent a precursor fragment of the heterocyclic system.

Besides the hordatines, some hydroxycinnamic acid agmatines, such as feruloyl- and coumaroylagmatine, were detected. As they are precursors of the hordatines, which are dimers of those hydroxycinnamic acid agmatines, their occurrence in BSG was expected. Characteristic fragments include the singly charged parent ion and fragments derived from the loss of the agmatine moiety (−130 Da), resulting in *m/z* 177 and 147 for the feruloyl and coumaroyl moieties, respectively. The coumaroyl part further loses carbon monoxide (−28 Da), resulting in *m/z* 119, whereas the feruloyl part first loses carbon monoxide (*m/z* 149) and afterwards a methyl group (−15 Da), resulting in *m/z* 134. Additionally, *m/z* 177 loses 2× carbon monoxide and the O-methyl group (−30 Da), resulting in a fragment with *m/z* 91 [24].

Regarding the total hordatine content of the fractions, the results should be evaluated critically due to the lack of available reference substances. Thus, only a semi-quantitative approach with *p*-coumaric acid as a reference substance could be used. When applying the correction factor of five from the literature data [5], contents ranging from 303.6 to 1298.1 µg *p*CA-Eq/mg fraction were found. However, this correction factor may not be applicable for various reasons. First, the correction factor was used to quantitate a mixture of different hordatines, mainly HA/B/C and their hexosides. Compared to the study of Pihlava and coworkers [5], our fractions contained fewer different hordatines, e.g., hexosides and aglycons were mostly not in the same fraction in our study. Therefore, the correction factor of five may not be applicable. Furthermore, the composition of hordatines

within different materials (BSG or beer) might vary; the correction factor of five was reported in studies where beer was investigated. Although both products (beer and BSG) originate from malt, and thus similar compounds might be expected, BSG and beer are processed differently after the lautering process [25], which might lead to variations in the hordatine distribution. For example, a higher concentration of hordatine hexosides than hordatine aglycons might be expected in beer due to the higher water solubility of the glycosides. This can be estimated from the $\log P$ value, which is -0.18 for HA-hexoside and 1.52 for HA (calculated with ALOGPS 2.1). Finally, the quantification of hordatines was performed by only a semiquantitative approach and reference substances are essential for exact quantification. Nevertheless, it was useful to adjust the results by the correction factor of five (Table 4) to compare with our recently performed study [6] obtained with a similar extraction method and BSG raw material for some extracts. However, differences existed in the defatting process, the solid–liquid ratio applied in SLE and the purification step. The highest content in acetone extracts in our previously published study (calculated with a correction factor of five) was observed as $172.2 \mu\text{g pCA-Eq/mg extract}$ [6], whereas the hordatine content in our fractions in the present study ranged from 303.6 to $1298.1 \mu\text{g pCA-Eq/mg fraction}$. The results can be compared with each other since the same quantification method, calculation and correction factor of five were used. Hence, regardless of whether the content is a realistic value, it was evident that the hordatine fractions exhibited two- (fraction 6) to almost eight-fold (fraction 9) higher content than the acetone extract (A7) with the highest content of $172.2 \mu\text{g pCA-Eq/mg extract}$ in our recent study [6]. Compared to other studies [5,8], the total hordatine content seems to be relatively high, although no clear correlation can be made due to the limited data and varying raw material. A recent study reported a total hordatine content in different types of beer with average value of around $5.6 \pm 3.1 \text{ mg pCA-Eq/L}$ and a maximum value of around 18.7 mg pCA-Eq/L . [5] To compare our results, a crude estimation via relation of the content to the BSG used can be performed. Altogether, our fractions contained around $6084 \text{ mg pCA-Eq hordatines}$, which were isolated from $145 \text{ g defatted BSG dw}$. With around 13.5% lipid fraction (data not shown, results from defatting process) and an average content of $70\text{--}80\%$ water [26], $280\text{--}300 \text{ g}$ can be estimated as the initial fresh weight of BSG. This suggests a theoretical yield of $2180\text{--}2340 \text{ mg pCA-Eq/100 g BSG fresh weight}$. Furthermore, around 20 kg BSG is produced per 100 L beer , i.e., 100 g/0.5 L beer [26]. The highest hordatine content reported in beer is $18.7 \text{ mg pCA-Eq/L beer}$ [5] or $9.35 \text{ mg pCA-Eq/0.5 L beer}$, which corresponds to $100 \text{ g BSG fresh weight}$. Our calculations resulted in theoretical amounts of more than $2000 \text{ mg pCA-Eq/100 g BSG fresh weight}$. This is about 200-fold higher than the highest observed content in beer. These calculations include many estimations and should therefore be considered critically. However, they suggest that higher amounts of hordatines remain in BSG than are transferred to beer during the brewing process.

4.2. Inhibitory Activity towards Glucose Metabolism Enzymes

Our previous studies on BSG extracts [10] provided strong evidence that hordatines might have inhibitory effects towards α -glucosidase and $\text{GP}\alpha$ activity. This was supported in the present study by our screening results of the biological effect on α -glucosidase but not on $\text{GP}\alpha$. In general, little is known about the biological activity of hordatines apart from their main function of antifungal effects within the plants [3]. In beer, antioxidative effects [9] of hordatines as well as stimulating effects on gastrointestinal motility via muscarinic M3 receptor binding were described so far [27]. However, biological activity towards enzymes of the glucose metabolism were not investigated until now. Thus, the focus of the discussion will be on the comparison of the results achieved in the enzymatic assays with the extracts from our previous study as well as with already published studies of other phenolamides such as phenylethyl cinnamides.

Based on the amount and main hordatines detected in the two fractions (fraction 5 and 8) active towards α -glucosidase, the inhibition is likely due to the specific hordatines rather than quantity, as fractions 5 and 8 did not have the highest total hordatine content.

However, as discussed earlier, this should be treated with caution because the quantification as *p*CA-Eq is only an estimation. Regarding the main hordatines, fraction 5 was rich in hexosides of HA and HB and besides the mono-hexosides, di-hexosides were also found. Maltose and other maltose-like substrates are hydrolysed by α -glucosidase, indicating that glycosides are bound in the substrate-binding pocket [28]. Thus, the hordatine glycosides may bind there also. However, only kinetic studies could show whether the underlying mechanism is competitive inhibition. Fraction 8 was one of the fractions with the lowest hordatine content and was characterised by the monomeric component *N*-coumaroylagmatine as constituent. Phenylethyl cinnamides such as *p*-coumaroyl-/feruloyl-/ and caffeoyl-tyramines have already been shown to have strong α -glucosidase inhibitory potential, and a non-competitive inhibition mechanism has been described [16,17]. Although the tyramine structure differs from the agmatine structure, it is plausible that they may have behaved similarly in our studies. When comparing the inhibitory potential of the two fractions with the acetone BSG extracts of our previous study [10], similar IC₅₀ values were observed. The most active acetone extracts (A4, A5 and A7) had IC₅₀ values (around 67–85 μ g/mL) comparable to that of fraction 8. However, although the inhibitory potential seemed similar, the total hordatine contents were different, i.e., all the acetone extracts had lower contents than the isolated fraction 8. This result also indicates that specific hordatines may be responsible for the inhibition [10].

In contrast to the effects on α -glucosidase, our present study did not verify the assumptions of inhibitory potential of hordatines towards GP α - activity, which were observed by the hordatine-rich acetone BSG extracts in our previous study [10]. Thus, all fractions, regardless of the total hordatine content and specific hordatines present, did not inhibit the enzyme. These findings suggest that hordatines are not potent inhibitors of GP α . When comparing the hordatine structures with those of known potent inhibitors, such as caffeine and flavopiridol, a cyclin-dependent kinase inhibitor, different glucose analogues such as *N*-acetyl- β -D-glucopyranosylamine, imino sugars, or phthalic acid and dihydropyridine diacid derivatives [29], many differences can be observed. Pyridine elements, as in most glucose analogues, and free carboxy groups as contained in the allosteric inhibitors or the flavone structure are not part of the hordatine structures. Nevertheless, molecular docking studies could be performed to analyse single hordatines, especially the glycosides to confirm our findings.

5. Conclusions

Hordatines, members of the large group of phenolamides, are very stable as they have been found in beer and BSG, both highly processed products. However, limited data are available about their biological activity, although their antifungal activity in plants has been known for many years [7], and antioxidative effects have been described for hordatines A–C from beer [9]. A recent *in silico* study by Dahab et al. suggested they may also be potent inhibitors of COVID-19 RNA-polymerase and protease [30]. Moreover, our recently published *in vitro* study showed potent inhibition of α -glucosidase and GP α by BSG extracts that contained hordatines [6,10], which was confirmed by the present screening study for α -glucosidase from yeast.

These findings suggest that hordatines may have various biological effects and further investigations should be performed. Beer is the most-consumed alcoholic drink worldwide [31], and BSG is produced in high amounts, up to 39 million tons per year [32,33]. In addition, the use of barley as a human food source has increased due to its nutritional value, such as dietary fibre content [34]. The occurrence of hordatines in everyday products as well as in waste might also be relevant.

However, our studies demonstrated the complexity of the hordatine content in BSG. In total, ten aglycons (i.e., HA/B/C/D, HA1/B1/C1, HA2/B2/C2) and 12 glycosides (mainly non-hydroxylated hordatines) as well as stereo (cis and trans) and regioisomers (mainly for HB) of each hordatine were detected, resulting in 71 different hordatines. Due to their chemical similarity, chromatographic separation was difficult, but fractions containing

groups of hordatines, such as glycosides, hydroxylated and non-hydroxylated hordatines, were achieved. Another important issue was the lack of an available reference substance, which meant a semiquantitative approach had to be used, which can only be regarded as a rough estimation and suitable for comparison with samples that have been measured with the same method. Reference substances are also needed to determine an appropriate correction factor as our studies indicated that specific correction factors for each hordatine may be necessary. Nevertheless, our results showed that many different hordatine aglycons and glycosides are contained in high amounts in BSG and are not completely extracted into beer during the lautering process.

Furthermore, they seem to possess a strong inhibitory effect on α -glucosidase, which needs to be confirmed by repetition studies and investigated in depth by molecular docking or studies of pure (isolated) substances in *in vitro* enzyme-inhibition assays. However, due to the large number of hordatines present, targeted synthesis may be more effective at generating pure substances than isolation from raw materials such as BSG.

Author Contributions: D.B.: conceptualisation, investigation, methodology, formal analysis, data curation, writing—original draft, visualisation. T.B.: supervision, writing—review & editing. S.S.: supervision, writing—review & editing. S.P.: investigation. E.R.: funding acquisition, project administration, conceptualisation, supervision, resources, validation, writing—review & editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the EU-INTERREG project BIOVAL supported by the European Funds for Regional Development, project no. 018-4-09-021.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: This paper is dedicated to Peter Schreier on the occasion of his 80th birthday. The authors gratefully acknowledge financial support from the EU-INTERREG project BIOVAL (no. 018-4-09-021). The authors gratefully acknowledge all the project partners within the BIOVAL project, especially the Orval brewery (Florenville, Belgium), for providing the BSG samples, the working group of Inorganic Chemistry of Werner Thiel (Pascal Weingart, Ranja Saynisch, TUK), for their support performing extractions, and coworkers from Celabor, for performing lyophilisation of the BSG samples. We thank all collaborators of the BIOVAL consortium for their constructive collaboration.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interest or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Abbreviations

| | |
|--------------------|------------------------------------|
| ACT | Agmatine coumaroyltransferase; |
| ADC | arginin decarboxylase; |
| BSG | brewer's spent grain; |
| CAD | collision gas; |
| CE | collision energy; |
| CEP | collision cell entrance potential; |
| CES | collisional energy spread; |
| CoA-ligase | coenzyme A-ligase; |
| CUR | curtain gas; |
| ddH ₂ O | double distilled water; |
| DP | declustering potential; |
| dw | dry weight; |
| EMS | enhanced MS |
| EP | entrance potential; |

| | |
|------------------|---|
| EPI | enhanced product ion; |
| ESI | electrospray ionisation; |
| EXB | exit lens voltage; |
| FP | focusing potential; |
| G6PDH | glucose-6-phosphate dehydrogenase; |
| GP α | glycogen phosphorylase α ; |
| hex, | hexoside; |
| IC ₅₀ | inhibitory concentration 50%; |
| IS | internal standard; |
| ISV | ion spray voltage; |
| LIT | linear ion trap; |
| PBS | phosphate buffer saline; |
| pCA-Eq | p-coumaric acid equivalents; |
| PGM | phosphoglucomutase; |
| pNPG | 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside |
| T | temperature; |
| SD | standard deviation; |

References

- Verni, M.; Pontonio, E.; Krona, A.; Jacob, S.; Pinto, D.; Rinaldi, F.; Verardo, V.; Díaz-de-Cerio, E.; Coda, R.; Rizzello, C.G. Bio-processing of brewers' spent grain enhances its antioxidant activity: Characterization of phenolic compounds and bioactive peptides. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1831. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01831>.
- Birsan, R.I.; Wilde, P.; Waldron, K.W.; Rai, D.K. Recovery of polyphenols from brewer's spent grains. *Antioxidants* **2019**, *8*, 380. <https://doi.org/10.3390/antiox8090380>.
- Nomura, T.; Sue, M.; Horikoshi, R.; Tebayashi, S.; Ishihara, A.; Endo, T.R.; Iwamura, H. Occurrence of hordatines, the barley antifungal compounds, in a wheat-barley chromosome addition line. *Genes Genet. Syst.* **1999**, *74*, 99–103. <https://doi.org/10.1266/ggs.74.99>.
- Von Röpenack, E.; Parr, A.; Schulze-Lefert, P. Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 9013–9022. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.15.9013>.
- Pihlava, J.-M.; Kurtelius, T.; Hurme, T. Total hordatine content in different types of beers. *J. Inst. Brew.* **2016**, *122*, 212–217. <https://doi.org/10.1002/jib.311>.
- Becker, D.; Stegmüller, S.; Richling, E. Characterisation of brewer's spent grain extracts by tandem mass spectrometry and HPLC-DAD: Ferulic acid dehydrodimers, phenolamides and oxylipins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2022**, submitted and under review.
- Stoessl, A. The antifungal factors in barley. IV. Isolation, structure, and synthesis of the hordatines. *Can. J. Chem.* **1967**, *45*, 1745–1760. <https://doi.org/10.1139/v67-283>.
- Kohyama, N.; Ono, H. Hordatine A β -D-glucopyranoside from ungerminated barley grains. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1112–1116. <https://doi.org/10.1021/jf304453c>.
- Spreng, S.; Hofmann, T. Activity-guided identification of in vitro antioxidants in beer. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 720–731. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05674>.
- Becker, D.; Bakuradze, T.; Hensel, M.; Beller, S.; Yélamos, C.C.; Richling, E. Influence of brewer's spent grain compounds on glucose metabolism enzymes. *Nutrients* **2021**, *13*, 2696. <https://doi.org/10.3390/nu13082696>.
- Adisakwattana, S. Cinnamic acid and its derivatives: Mechanisms for prevention and management of diabetes and its complications. *Nutrients* **2017**, *9*, 163. <https://doi.org/10.3390/nu9020163>.
- Narasimhan, A.; Chinnaiyan, M.; Karundevi, B. Ferulic acid regulates hepatic GLUT2 gene expression in high fat and fructose-induced type-2 diabetic adult male rat. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *761*, 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.04.043>.
- Narasimhan, A.; Chinnaiyan, M.; Karundevi, B. Ferulic acid exerts its antidiabetic effect by modulating insulin-signalling molecules in the liver of high-fat diet and fructose-induced type-2 diabetic adult male rat. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **2015**, *40*, 769–781. <https://doi.org/10.1139/apnm-2015-0002>.
- Roumani, M.; Besseau, S.; Gagneul, D.; Robin, C.; Larbat, R. Phenolamides in plants: An update on their function, regulation, and origin of their biosynthetic enzymes. *J. Exp. Bot.* **2021**, *72*, 2334–2355. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa582>.
- Assefa, S.T.; Yang, E.-Y.; Asamenew, G.; Kim, H.-W.; Cho, M.-C.; Lee, J. Identification of α -glucosidase inhibitors from leaf extract of pepper (*Capsicum* spp.) through metabolomic analysis. *Metabolites* **2021**, *11*, 649. <https://doi.org/10.3390/metabo11100649>.

16. Moradi-Afrapoli, F.; Asghari, B.; Saeidnia, S.; Ajani, Y.; Mirjani, M.; Malmir, M.; Dolatabadi Bazaz, R.; Hadjiakhoondi, A.; Salehi, P.; Hamburger, M.; et al. In vitro α -glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*. *Daru* **2012**, *20*, 37. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-37>.
17. Liu, X.; Luo, J.; Kong, L. Phenylethyl cinnamides as potential α -glucosidase inhibitors from the roots of *Solanum Melongena*. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 851–853.
18. Burhenne, K.; Kristensen, B.K.; Rasmussen, S.K. A new class of N-hydroxycinnamoyltransferases. Purification, cloning, and expression of a barley agmatine coumaroyltransferase (EC 2.3.1.64). *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13919–13927. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213041200>.
19. Gorzolka, K.; Bednarz, H.; Niehaus, K. Detection and localization of novel hordatine-like compounds and glycosylated derivatives of hordatines by imaging mass spectrometry of barley seeds. *Planta* **2014**, *239*, 1321–1335. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2061-y>.
20. Pihlava, J.-M. Identification of hordatines and other phenolamides in barley (*Hordeum vulgare*) and beer by UPLC-QTOF-MS. *J. Cereal Sci.* **2014**, *60*, 645–652. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.07.002>.
21. Gorzolka, K.; Kölling, J.; Nattkemper, T.W.; Niehaus, K. Spatio-temporal metabolite profiling of the barley germination process by MALDI MS imaging. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0150208. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150208>.
22. European Commission. Joint Research Centre. *Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food*; Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM): Geel, Belgium, 2016.
23. Mandal, D.; Köhrer, C.; Su, D.; Russell, S.P.; Krivos, K.; Castleberry, C.M.; Blum, P.; Limbach, P.A.; Söll, D.; Rajbhandary, U.L. Agmatidine, a modified cytidine in the anticodon of archaeal tRNA(Ile), base pairs with adenosine but not with guanosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 2872–2877. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914869107>.
24. Dong, X.; Gao, Y.; Chen, W.; Wang, W.; Gong, L.; Liu, X.; Luo, J. Spatiotemporal distribution of phenolamides and the genetics of natural variation of hydroxycinnamoyl spermidine in rice. *Mol. Plant* **2015**, *8*, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.11.003>.
25. Lynch, K.M.; Steffen, E.J.; Arendt, E.K. Brewers' spent grain: A review with an emphasis on food and health. *J. Inst. Brew.* **2016**, *122*, 553–568. <https://doi.org/10.1002/jib.363>.
26. Kunze, W. *Technology Brewing Malting*, 4th ed.; VLB: Berlin, Germany, 2010.
27. Yamaji, N.; Yokoo, Y.; Iwashita, T.; Nemoto, A.; Koike, M.; Suwa, Y.; Wakimoto, T.; Tsuji, K.; Nukaya, I.I. Structural determination of two active compounds that bind to the muscarinic M3 receptor in beer. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2007**, *31*, S9–S14. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00280.x>.
28. Visnapuu, T.; Meldre, A.; Põšnograjeva, K.; Viigand, K.; Ernits, K.; Alamäe, T. Characterization of a maltase from an early-diverged non-conventional yeast *blastobotrys adenivorans*. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *21*, 297. <https://doi.org/10.3390/ijms21010297>.
29. Hayes, J.M.; Kantsadi, A.L.; Leonidas, D.D. Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: Potential treatment for type 2 diabetes. *Phytochem. Rev.* **2014**, *13*, 471–498. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9360-6>.
30. Dahab, M.A.; Hegazy, M.M.; Abbass, H.S. Hordatines as a potential inhibitor of COVID-19 main protease and RNA polymerase: An in-silico approach. *Nat. Prod. Bioprospect.* **2020**, *10*, 453–462. <https://doi.org/10.1007/s13659-020-00275-9>.
31. Colen, L.; Swinnen, J. Economic growth, globalisation and beer consumption. *J. Agric. Econ.* **2016**, *67*, 186–207. <https://doi.org/10.1111/1477-9552.12128>.
32. Mussatto, S.I.; Dragone, G.; Roberto, I.C. Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *J. Cereal Sci.* **2006**, *43*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>.
33. Steiner, J.; Procopio, S.; Becker, T. Brewer's spent grain: Source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *Eur. Food Res. Technol.* **2015**, *241*, 303–315. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2461-7>.
34. Sullivan, P.; Arendt, E.; Gallagher, E. The increasing use of barley and barley by-products in the production of healthier baked goods. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, *29*, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.10.005>.

4.4 Isolierung von FA-Oligomere aus BSG

Als Leitsubstanzen in den BSG-Extrakten HA und HE, welche entweder aus alkalischen Aufschlüssen direkt (HE) oder aus SLE des Rückstandes eines alkalischen Aufschlusses stammen, wurden Hydroxyzimtsäurederivate identifiziert. Da v.a. FA innerhalb der Zellwandstruktur als verknüpfendes Element in der Arabinoxylanmatrix verestert vorliegt, waren FA sowie deren Oligomere als Komponenten in Extrakten aus alkalischen Aufschlüssen zu erwarten. Die Freisetzung der so gebundenen Polyphenole mittels alkalischer Hydrolyse und HCAs bzw. FA-Oligomere als Bestandteile des BSGs sind vielfach beschrieben [Stefanello *et al.*, 2018; Mussatto *et al.*, 2007a; Verni *et al.*, 2020; Birsan *et al.*, 2019]. Um zu untersuchen, inwiefern die vordergründig in den *full scans* (s. Kapitel 4.2) der BSG-Extrakte anhand ihres Präkursorions $[M-H]^-$ von m/z 385 vermuteten DiFAs zur Inhibition der beiden Enzyme α -Glucosidase und GP α (s. Kapitel 4.1) beitragen, sollten sie gezielt isoliert und fraktioniert werden. Die isolierten DiFAs sollten zur Klärung der tatsächlich vorliegenden Strukturen in den BSG-Extrakten beitragen. Um zu gewährleisten, dass die gleichen DiFAs bzw. FA-Oligomere erhalten wurden, wie sie in den Extrakten zu finden waren, wurde die Isolierung aus BSG gegenüber einer Synthese bevorzugt.

4.4.1 Gewinnung und Ausbeute der F-Fractionen

Die Isolierung der FA-Oligomere gliederte sich in mehrere Prozessschritte. Das erhaltene Rohisolat bestand aus einer braunen, hochviskosen Flüssigkeit mit einer Ausbeute von ca. 5,1 % (bezogen auf gefriergetrockneten, entfetteten und enzymatisch vorbehandelten BSG) bzw. 0,8 % (BSG dw ohne Vorbehandlung). Dieses wurde zunächst mittels GPC fraktioniert, um Monomere wie *p*CA und FA abzutrennen. Im Anschluss wurden die fünf Fraktionen aus der GPC semipräparativ weiter aufgetrennt, sodass am Ende 37 Fraktionen mit teils sehr geringen Mengen (s. Tab. 32) entstanden, welche in Summe etwa 5,7 % des Rohisolats entsprachen. Bezogen auf die Trockenmasse des unbehandelten BSG entsprach die Gesamtausbeute der Fraktionen ca. 0,05 %. Jedoch konnten fünf Fraktionen (F15, F17, F21, F24, F25) nach Lyophilisierung nicht ausgewogen werden oder die Mengen war zu gering, um sie weiter analysieren zu können. Die geringe Ausbeute ist einerseits durch die mehrstufigen Aufreinigungsprozesse zu erklären und andererseits handelt es sich bei Polyphenolen um Minorkomponenten. So detektierten Verni *et al.* ebenfalls nur geringe Mengen von ca. 0,11 % FA-Oligomere in BSG, wobei sich die Extraktion von dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Isolierungsprozess unterschied [Verni *et al.*, 2020].

4.4.2 Charakterisierung der F-Fractionen via HPLC-ESI(-)-MS/MS

Die Charakterisierung der erhaltenen F-Fractionen erfolgte an zwei verschiedenen MS-Geräten via negativer *full scans* gefolgt von *EPI scans* oder MS^2 *scans*. Die Identifikation enthaltener Inhaltsstoffe erfolgten mittels Referenzsubstanzen für *trans*-FA, *trans*-*p*CA, Azelainsäure sowie zwei DiFAs (gekennzeichnet durch # in Tab. 4 sowie dargestellt im Anhang Tab. 33). Weitere Inhaltsstoffe wurden anhand von Literaturdaten identifiziert. Zunächst soll ein Überblick über alle in den F-Fractionen gefundenen Substanzen gegeben werden, bevor im Anschluss die Identifizierung anhand charakteristischer Fragmentierungen erläutert wird.

Insgesamt konnten in den Fraktionen neben den *cis*- und *trans*-Isomeren der FA und *pCA* sowie verschiedenen DiFAs auch TriFAs, Azelainsäure, Isomere der TriHOME und der TriHODA detektiert werden (Tab. 4). Weiterhin fanden sich als bislang nicht identifizierte Komponenten in einigen Fraktionen das m/z 723,5 bei 18,5 min sowie das m/z 357 bei 11; 12,2 und 13,9 min und das m/z 409 bei 11,2; 13,5 und 14,5 min mit Fragmenten von m/z 193, 178 und 134. Letzteres spricht für ein FA-Derivat aufgrund der charakteristischen Fragmente, welche dem Methylgruppenverlust gefolgt von einer CO₂-Abspaltung der FA entsprechen [Sinosaki *et al.*, 2020].

Trotz vorgeschalteter Größenausschlusschromatographie (GPC) zur Abtrennung der kleineren Monomere von den DiFAs waren im Großteil der F-Fractionen (**F1–F9, sowie F11 und F36**) die Monomere FA und *pCA* sowie die Dicarbonsäure Azelainsäure enthalten. Daher konnten die zuvor eluierenden DiFAs (zwischen 10–12 min) nicht ohne Verunreinigung durch Monomere erhalten werden. Die Coelution von FA mit den beiden 8-8'-DiFA-Isomeren stellte sich erst nach der Lyophilisierung der Fraktionen heraus, da die UV-Spektren während der Fraktionierung überlagerten und im *full scan* keine hohe Intensität des m/z 385 beobachtet werden konnte. Dieses Problem wurde bereits in der Literatur in anderen Studien beschrieben, die ebenfalls eine komplexe Trennung der zuletzt eluierenden Monomere von den zuerst eluierenden DiFAs beobachteten. Dobberstein und Bunzel nutzten eine Sephadex LH20-Säule mit zwei verschiedene HPLC-Gradienten, was zeitaufwändiger war [Dobberstein und Bunzel, 2010], jedoch eine vollständige Trennung der zuletzt eluierenden FA-Monomeren von den zuerst eluierenden DiFAs ermöglichte.

Die Fraktionen aus späterer Retention der semipräparativen Aufreinigung (**F11–F14, F16, F26, F30, F31, F33–F35**, ca. 17–31 min) waren mit Isomeren von TriHOME und TriHODA lipidreich, was auf den hohen organischen Anteil im Gradienten zurückgeführt werden kann. Da im vergleichbaren Retentionsbereich Di- und Trimere detektiert wurden, konnte der Gradient dahingehend nicht weiter angepasst werden. Der eingesetzte BSG war vor der Isolierung mittels Soxhlet-Extraktion entfettet und im Anschluss über drei enzymatische Behandlungen, gefolgt von einer alkalischen Hydrolyse weiter aufgeschlossen worden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die freien Fettsäuren, v.a. Linolsäure, im Zuge dieser Prozessierung aus der Matrix freigesetzt wurden und zu Oxylipinen weiter oxidiert wurden. Aufgrund des ähnlichen Molekulargewichts von ca. 330 g/mol wurden sie durch die GPC nicht aus dem Rohisolat entfernt.

Auffallend waren Fraktionen **F3–F5**, welche zwei bislang nicht identifizierte Substanzen mit m/z 357 und m/z 409 als Präkursorionen enthielten, wobei hinter letzterem aufgrund der Fragmentierung (m/z 193, 178 und 134) ein FA-Derivat vermutet wurde. Als weitere nicht identifizierte Substanz konnte in einem Großteil der Fraktionen (21 von 37) in teils sehr hoher Intensität das m/z 723,5 bei $R_t = 18$ min detektiert werden. Im Gegensatz zu den anderen Fraktionen zeigte sich hier keine Abhängigkeit von beiden Aufreinigungsschritten. Weder war die Substanz aufgrund des recht hohen Molekulargewichtes nur in Fraktionen aus späterem Retentionsbereich in der GPC enthalten, noch war sie ausschließlich in Fraktionen aus dem entsprechenden Retentionsbereich aus der semipräparativen HPLC (entspräche $R_t = 15$ min) zu finden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine Verunreinigung der Säule oder ein Artefakt handelt, das sich während der Lyophilisierung bildete.

Insgesamt wurden neben den genannten, nicht zu den Oligomeren der FA gehörenden Substanzen neun DiFAs (sowie zwei Signale des gleichen Präkursorions mit m/z 385) und sieben TriFAs nachgewiesen, wobei nicht für alle in jeder Fraktion eine eindeutige Fragmentierung und teils lediglich die Präkursoren im MS²-Scan erkennbar waren. Diese demnach hypothetischen Zuordnungen sind in der Tabelle (s. Tab. 4) durch Klammern gekennzeichnet. Die Identifizierung und Aufklärung des tatsächlichen Isomers erfolgte mittels MS²-Scan in der Fraktion, welche eine hohe Signalintensität des jeweiligen Präkursorions bei entsprechender R_t aufwies. Die Schwankungen der R_t ergaben sich durch die Messungen an zwei MS-Geräten und die Nutzung zweier Säulen zwar gleichen Modells doch unterschiedlichen Alters und Abnutzungsgrad des Materials. DiFAs wurden bevorzugt an HPLC-MS-Gerät II, während TriFAs an HPLC-MS-Gerät III strukturell untersucht wurden. Die Verwendung des sensitiveren Gerätes III war aufgrund der geringeren Signalintensität der TriFAs notwendig.

Tab. 4: Übersicht der in den F-Fractionen detektierten und zugeordneten Substanzen bzw. m/z mit zugehöriger Retentionszeit und Fragmentierung sowie den sie enthaltenden F-Fractionen. Kennzeichnung der mittels Referenzsubstanz identifizierten Komponenten (#). DiFA: Ferulasäure Dehydrodimer, FA: Ferulasäure, TriFA: Ferulasäure Dehydrotrimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis, TriHODA: Trihydroxyoctadecensäure, TriHOMe: Trihydroxyoctadecensäure

| Substanz* | Reten- tionszeit | [M-H] ⁻ | Fragmente** | enthalten in*** |
|--|---------------------|--------------------|---|---|
| <i>trans</i> -FA [#] | 11,2 | 193 | 134, 178, 149, 133, 117, 106 | F1–F9, F11, F36 |
| <i>cis</i> -FA | 10,5 | 193 | | F1–F8, (F9), F11, F36 |
| <i>trans</i> -pCA [#] | 10,2 | 163 | 119, 93, 91, 117, 104 | F1–F9, F11, F36 |
| <i>cis</i> -pCA | 9,6 | 163 | | F1–F9, F11, F36 |
| Azelainsäure [#] | 10,5 | 187 | 125, 187, 97, 169, 123, 143 | F1–F9, F11, F36 |
| ? | 18,5– 19,3 | 723,5 | 723,5; 677,5; 451, 226, 147 | F6–F9, F11–F14, F16, F20, F22, F23, F26, F28, F31–F35, (F36), F37 |
| ? | 11 | 357 | 162 | (F3), (F4) |
| ? | 12,2 | 357 | 192 | (F3), (F4) |
| ? | 13,4 | 357 | 162, 178, 134, 192, 357, 148, 298, 313, 342, 206 | F3, F4 |
| FA-Derivat? | 11,2 | 409 | 409, 193 | F3-F4 |
| FA-Derivat? | 13,5 | 409 | | (F3), (F4) |
| FA-Derivat? | 14,2 | 409 | 134, 178 | F5 |
| DiFA (8-8'- (Aryltetralin)- Isomer) | 10,7– 11,2 | 385,2 | 282, 341, 326, 173, 267, 123, 217, 298, 108, 158, 239 | F1–F3, (F22), F27 |
| DiFA (8-8'-Isomer) | 11,4– 11,8 | 385,2 | 158, 159, 282, 281, 173, 123, 145, 267 | F2–F3, F27 |
| DiFA | 14 | 385,2 | 267, 297, 326, 282, 341, 311, 385 | F3, F4, (F5), (F6), (F8), (F9), (F10), |

| | | | | |
|---|---------------|---------|--|--|
| (8-5'-Isomer) | | | | (F11), F16, (F20), (F23), F27, (F28) |
| DiFA (8-5'-Isomer) | 15,5 | 385,2 | 297, 267, 341, 282, 309, 326, 385 | F27, F29 |
| DiFA [#] (5-5'-Isomer) | 23,3– 24,2 | 385,2 | 282, 385, 341, 326, 267, 265, 297, 325, 370, 293, 309 | (F1), (F2), F8–F11, (F12), (F13), (F16), F23, F29, F30 |
| DiFA | 24,5– 25,2 | 385,2 | 341, 297, 385, 267 | F9, F10, (F11), (F12), (F13), (F23), (F30) |
| DiFA [#] (8-O-4'-Isomer) | 25,9– 26,6 | 385,2 | 193, 178, 149, 134, 267, 282, 297, 311, 326, 341, 239 | (F1), (F2), F9–F13, (F16), (F18), (F19), F23, F30, (F31) |
| (DiFA) | 28,5 | 385, 2 | nur Signal im TIC vorhanden | (F2), (F12) |
| DiFA (offenes Isomer) | 30,9 | 385,2 | 193, 385 | (F12), (F13) |
| (DiFA) | 32,4 | 385,2 | nur Signal im TIC vorhanden | (F16) |
| DiFA | 35,8 36,5 | - 385,2 | 282, 297, 267, 189, 146, 173, 158, 109 | F1–F3, (F22), (F37) |
| TriFA (5-5'/8'- 8'' (Aryltetralin)- Isomer) | 14 | 577,2 | 533, 489, 577, 445, 409, 365 | F27 |
| TriFA (5-5'/8'- 8'' (Aryltetralin)- Isomer) | 15,5 | 577,2 | 533, 489, 445, 577, 409, 365 | F27 |
| TriFA (5-5'/8'- 8''-Isomer) | 20 | 577,2 | 489, 577, 445, 531, 533, 559 | (F27) |
| TriFA (8-8' (Aryltetralin)/4'- O-8''-Isomer) | 21,7 | 577,2 | 341, 577, 533, 489, 355, 193, 387, 297, 445, 513, 559, 149, 134, 163 | F7, F28 |
| TriFA | 23,6 | 577,2 | 577, 489, 533 | F28 |
| TriFA (5-5'/4'-O- 8''-Isomer) | 35,1 | 577,2 | 193, 355, 178, 149, 134, 430, 311, 279 | F14, F16 |
| TriFA (8-O-4'/8'- O-4''-Isomer) | 40,5 | 577,2 | 193, 385, 163, 134, 148, 577 | F16 |
| TriHOME | 26,2 | 329,2 | 329, 211 | F11 |
| TriHOME [#] | 27,5 | 329,2 | 329, 171, 211, 229, 139, 183 | F11, (F30) |
| TriHOME [#] | 28,2 | 329,2 | 329, 211, 171, 229, 139, 157, 99, 183, 193, 201, 209, 129, 127 | F11–F14, F16, F18, F19, F26, F30, F32, F34, F35 |
| TriHOME | 28,6 | 329,2 | 329, 171, 139, 211, 229, 157, 183, 201, 209, 127, 99, 125, 293, 311 | F13, (F32), F33 |
| TriHOME | 29 | 329,2 | 329, 171, 157, 139, 127, 211, 293, 127, 99 | F13, F16, (F26), F31 |
| TriHOME | 29,5 | 329,2 | 171, 139, 329, 157, 127 | F14, (F18), (F19), F31 |

| | | | | |
|---------|------|-------|--|--------------------------------------|
| TriHOME | 33,5 | 329,2 | 329, 211, 199, 181, 169, 129, 293, 311 | F14, F16, (F19), F33, F34, (F35) |
| TriHOME | 35,4 | 329,2 | 329, 201, 139, 171, 311, 293 | F19, F33, F34 |
| TriHOME | 35,9 | 329,2 | 329, 171, 201, 199, 129, 139 | F16, F19, F33–F35 |
| TriHOME | 37 | 329,2 | 329, 201, 171, 139, 293, 127 | F16, (F19), F33 |
| TriHOME | 38 | 329,2 | 329,6; 199, 211, 227, 171, 169, 129, 99 | F34, F35 |
| TriHOME | 39 | 329,2 | 329, 211, 201, 171, 181, 311, 293, 129 | F16 |
| TriHOME | 34,7 | 329,2 | 329, 199, 211, 201, 181, 293, 171, 129, 275, 311 | F14, F19, F33, F34 |
| TriHODA | 27,8 | 331,2 | 331, 213, 295, 173, 140 | (F12) |
| TriHODA | 28,8 | 331,2 | 331,2 313, 295, 201, 157, 143, 187, 201, 127 | F11–F14, F16, F26, F30, F31, F33–F35 |
| TriHODA | 34 | 331,2 | 331 | (F33) |
| TriHODA | 35,4 | 331,2 | 331 | (F33) |
| TriHODA | 36,3 | 331,2 | 331 | (F33), F34 |

* exaktes DiFA-Isomer anhand der massenspektrometrischen Daten postuliert

** nach absteigender Intensität und nicht in jeder Fraktion detektiert, dargestellt sind Fragmente deren Spektren im Folgenden im Kapitel gezeigt sind

*** () = nur Präkursor oder wenige Fragmente detektiert

Substanz mittels Referenzsubstanz identifiziert (vgl. Anhang Tab. 33)

Die strukturelle Aufklärung einzelner DiFAs und TriFAs erfolgte mittels charakteristischer Fragmente. Anhand der spezifischen, diagnostischen Fragmente und im Vergleich mit Literaturdaten [Callipo *et al.*, 2010] konnten sechs der neun DiFAs aufgeklärt sowie bei einem Isomer das Strukturelement einer offenen Form identifiziert werden. Für die TriFAs konnten jedoch lediglich Strukturmerkmale bestimmt und Hypothesen für die vorliegenden Strukturen aufgestellt werden. Neben den Fragmenten war die Retentionsfolge ein erster Hinweis zur Identifikation der DiFAs, welche von Callipo *et al.* mittels RP-HPLC wie folgt beobachtet wurde: 8-8'-Aryltetralin < 8-8' < 8-5' < 5-5' < 8-5' -zyklisch < 8-O-4' -Isomer. Für jede DiFA-Struktur sind Stereoisomere möglich, wobei das *trans-trans*-Isomer das am häufigsten natürlich vorkommende ist, gefolgt vom *cis-trans*- und *cis-cis*-Isomer. Die zyklischen DiFAs können weiterhin in der *syn*- und *anti*-Form vorliegen, wobei letztere die stabilere ist [Callipo *et al.*, 2010].

Neben FA, *pCA* sowie Azelainsäure konnten in Fraktion F2 einige DiFAs detektiert werden (Abb. 15) und wurden zur Strukturaufklärung der dimeren Strukturen, welche bei 11,2; 11,8 und 36,3 min eluierten, herangezogen.

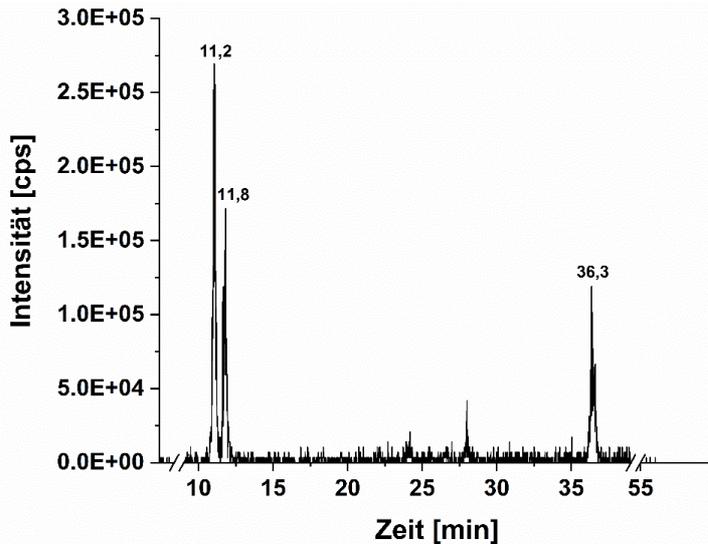


Abb. 15: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F2 mit Ionenspur m/z 385; identifiziert als DiFA; Hauptsignale eluierten bei $R_t=$ 11,2; 11,8 und 36,3 min. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer

Die DiFA ($R_t=$ 11,2 min) wies neben den eher unspezifischen Fragmenten mit dem m/z 385 $[M-H]^-$, 341 ($-CO_2$), 326 ($-CO_2$ und $-CH_3$ -Radikal), 297 ($-2x CO_2$), 282 ($-2x CO_2$ und $-CH_3$ -Radikal) und 267 ($-2x CO_2$ und $-CH_2O$) die für das 8-8'-Aryltetralin-Isomer charakteristischen Produktionen m/z 217, 173, 158, 123 und 108 auf (Abb. 16). Ein Fragmentierungsmuster wurde von Callipo *et al.* bereits postuliert (Abb. 17). Da keine Produktionen bei m/z 325, 310 und 281 detektiert wurden, ist davon auszugehen, dass es sich beim vorliegenden Isomer um die stabilere *anti*-Form handelt [Callipo *et al.*, 2010].

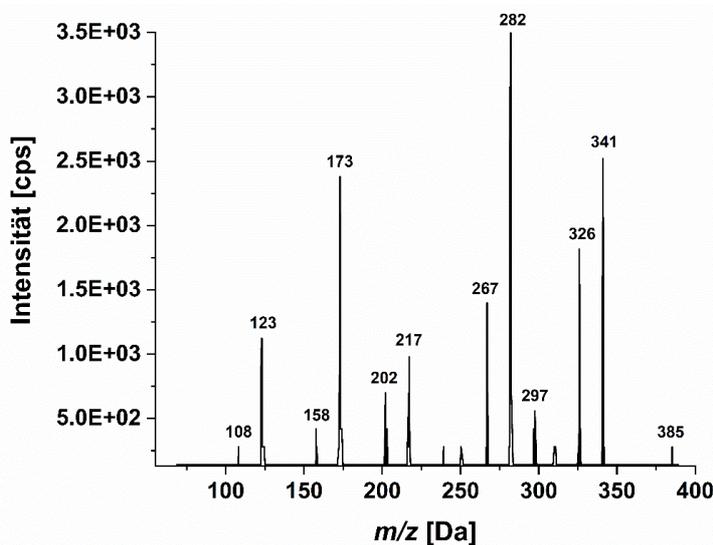


Abb. 16: ESI-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei $R_t=$ 11,2 min; anhand der Literaturdaten und der Fragmente identifiziert als 8-8'-Aryltetralin-DiFA [Callipo *et al.* 2010]. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

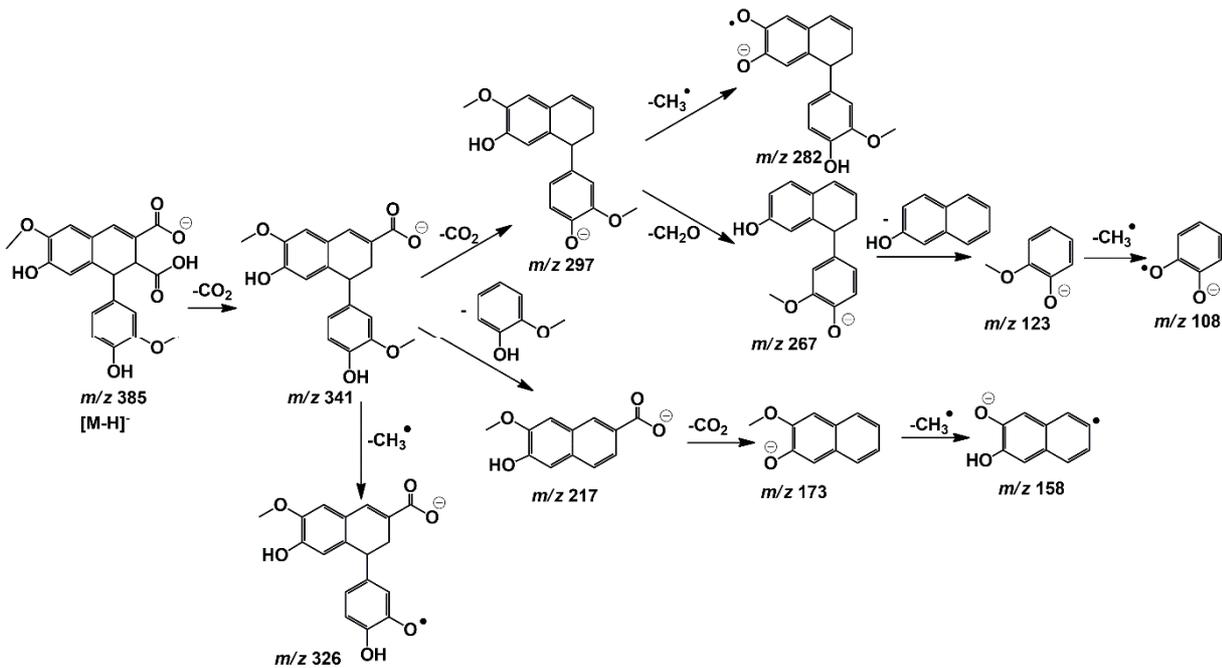


Abb. 17: Postuliertes Fragmentierungsmuster der 8-8'-Aryltetralin-DiFA (nach Callipo *et al.*, 2010). DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer

Die DiFA ($R_t = 11,8$ min) wurde in deutlich geringerer Intensität detektiert, wobei für die lineare 8-8'-DiFA spezifische Produktionen mit m/z 159 sowie 145 (Abb. 18) detektiert werden konnten. Deren Bildung beruht auf dem Vorliegen der konjugierten Struktur innerhalb der beiden aromatischen Ringe, wodurch es zur Bildung stabiler zyklischer Produktionen kommt (Abb. 19). Lediglich ein 8-8'-Isomer wurde in den Fraktionen identifiziert. Da die FA natürlicherweise v.a. in der *trans*-Form vorkommt, wird angenommen, dass es sich um das *trans-trans*-Isomer handelt. Dies gilt es noch zu bestätigen [Callipo *et al.*, 2010].

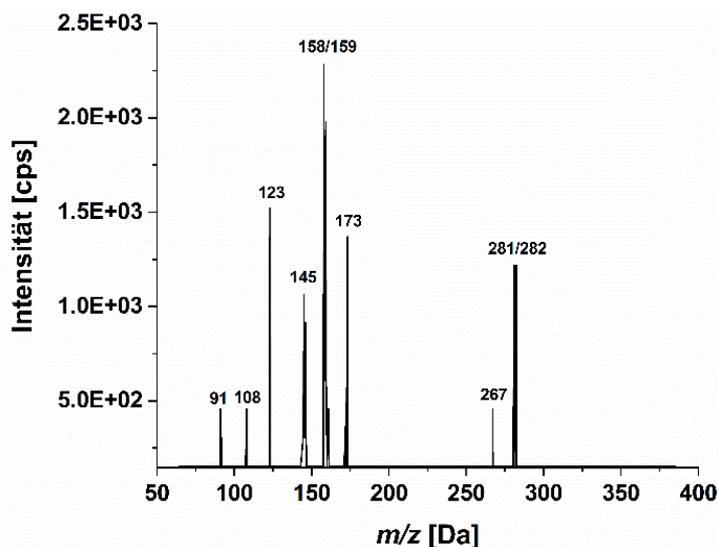


Abb. 18: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei $R_t = 11,8$ min; anhand der Literaturdaten und der Fragmente identifiziert als 8-8'-DiFA [Callipo *et al.*, 2010]. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

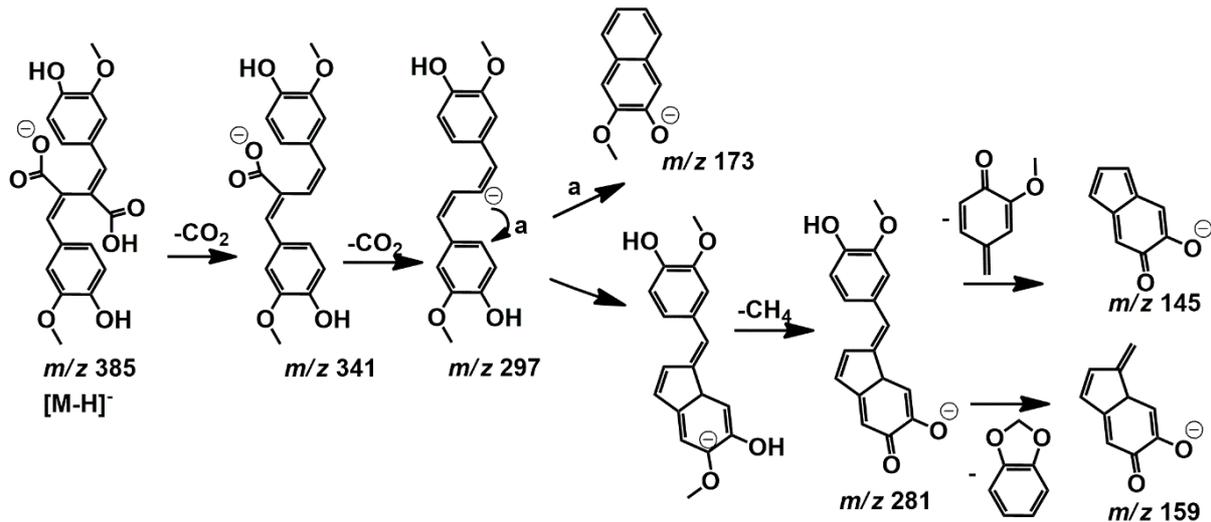


Abb. 19: Postuliertes Fragmentierungsmuster der 8-8'-DiFA (nach Callipo *et al.*, 2010). DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer

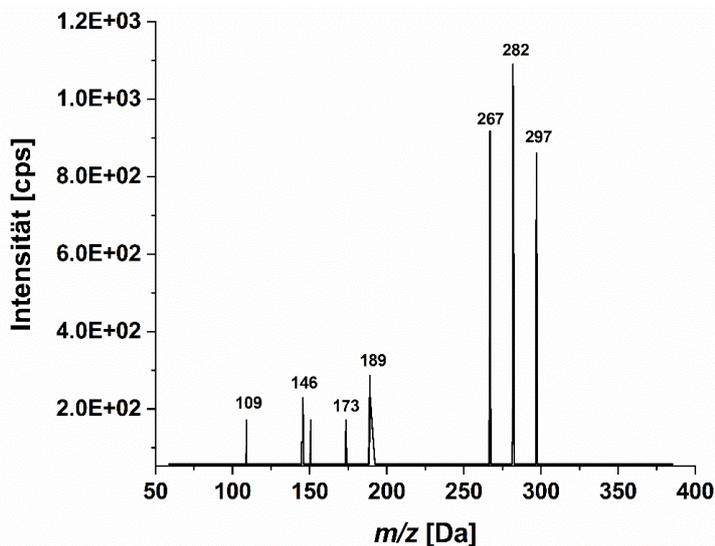


Abb. 20: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei $R_t = 36,3$ min; identifiziert als DiFA. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Ein weiteres Signal des Präkursorions mit m/z 385 wurde bei $R_t = 36,3$ min beobachtet. Hauptsächlich traten die unspezifischen Produktionen bei m/z 297, 282 und 267 auf sowie die Fragmente beim Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z 189, 173, 146 und 109 (Abb. 20). Das Produktion mit m/z 173 trat als eines der Fragmente der beiden Isomere 8-8'-DiFA und 8-8'-Aryltetralin-DiFA auf. Allerdings ließen sich die Produktionen mit m/z 109 und 146 sowie v.a. 189 nicht zu den genannten Strukturen zuordnen. Auffällig war die späte Retentionszeit, welche zum einen dafür sprach, dass es sich nicht um ein Stereoisomer der beiden DiFAs bei $R_t = 11,2$ und $11,8$ min handelte. Zum anderen deutete dies darauf hin, dass die enthaltene DiFA nicht von Beginn an in der Fraktion F2 enthalten war, da die Fraktion im Zuge der semi-präparativen Aufreinigung aus dem Retentionsbereich 7,5 bis 8,5 min stammte. Der Gradient der präparativen HPLC wurde unverändert für die analytische HPLC-Methodik angewandt, sodass eine Fraktion, welche bei $R_t = 7,5$ bis 8,5 min eluiert analytisch bei ca. 9–11 min detektiert werden müsste. Dies passte zu den beiden enthaltenen Isomeren bei 11,2 und 11,8

min, nicht jedoch zu dem Signal bei 36,3 min. Vermutlich kam es während der Lagerung bzw. vor der Lyophilisierung zu einer Umlagerung oder anderer Modifikation.

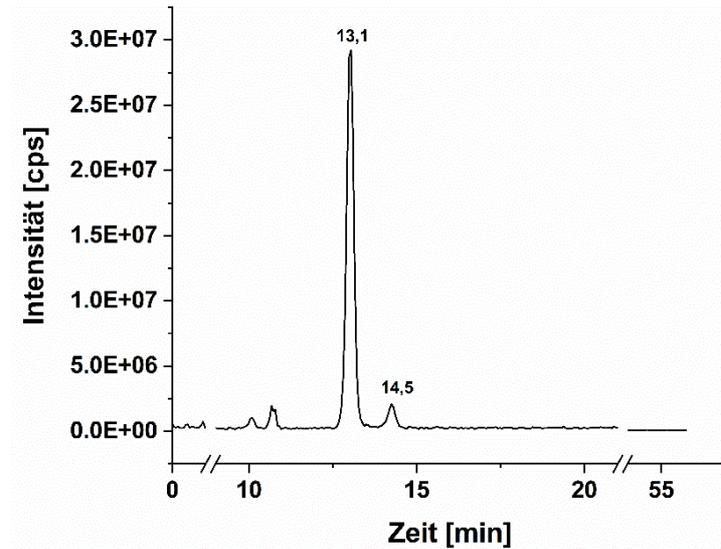


Abb. 21: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F27 mit Ionenspur m/z 385; identifiziert als DiFA; Signal bei $R_t = 13,1$ und $14,5$ min (Retentionszeitverschiebung von HPLC-MS II auf HPLC-MS III; $13,1$ min entspricht 14 min $14,5$ min entspricht $15,3$ min bei HPLC-MS II). DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer

Die Strukturen der DiFAs bei $R_t = 13,1$ und $14,5$ min konnten anhand der HPLC-ESI⁻-MS/MS-Untersuchung in Fraktion F27 aufgeklärt werden. Neben den Signalen bei $R_t = 11,2$ und $11,8$ min konnte mit hoher Signalintensität die DiFA bei $R_t = 13,1$ min sowie etwas kleiner ein Signal bei $R_t = 14,5$ min detektiert werden (Abb. 21). Hervorzuheben ist die verschobene R_t um ca. 1 min, welche wiederkehrend am HPLC-MS-Gerät III im Vergleich zu HPLC-MS-System I und II beobachtet wurde trotz gleicher Methodik.

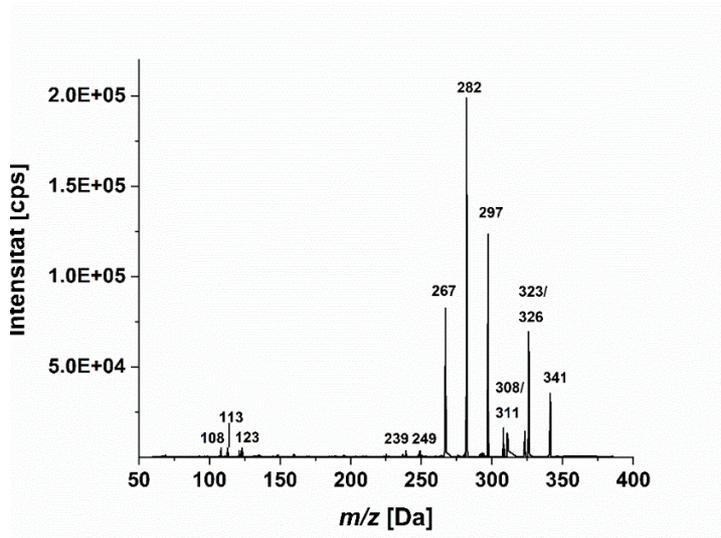


Abb. 22: ESI-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei $R_t = 13,1$ min; anhand der Literaturdaten und der Fragmente identifiziert als 8-5'-DiFA [Callipo *et al.*, 2010]. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Anhand der Literaturdaten konnte die DiFA bei $13,1$ min als 8-5'-Isomer identifiziert werden [Callipo *et al.*, 2010]. Neben den unspezifischen Fragmenten konnten, wie in der Literatur

beschrieben, die Produktionen m/z 323 und 308 (Abb. 22) detektiert werden, deren Bildung auf das in Abb. 23 dargestellte Fragmentierungsschema zurückgeführt werden können. Aufgrund des natürlichen Vorkommens handelt es sich vermutlich um das *trans-trans*-Isomer, was gestützt wird durch die Abwesenheit des Produktions mit m/z 309, welches für das *cis-trans*-Isomer sprechen würde.

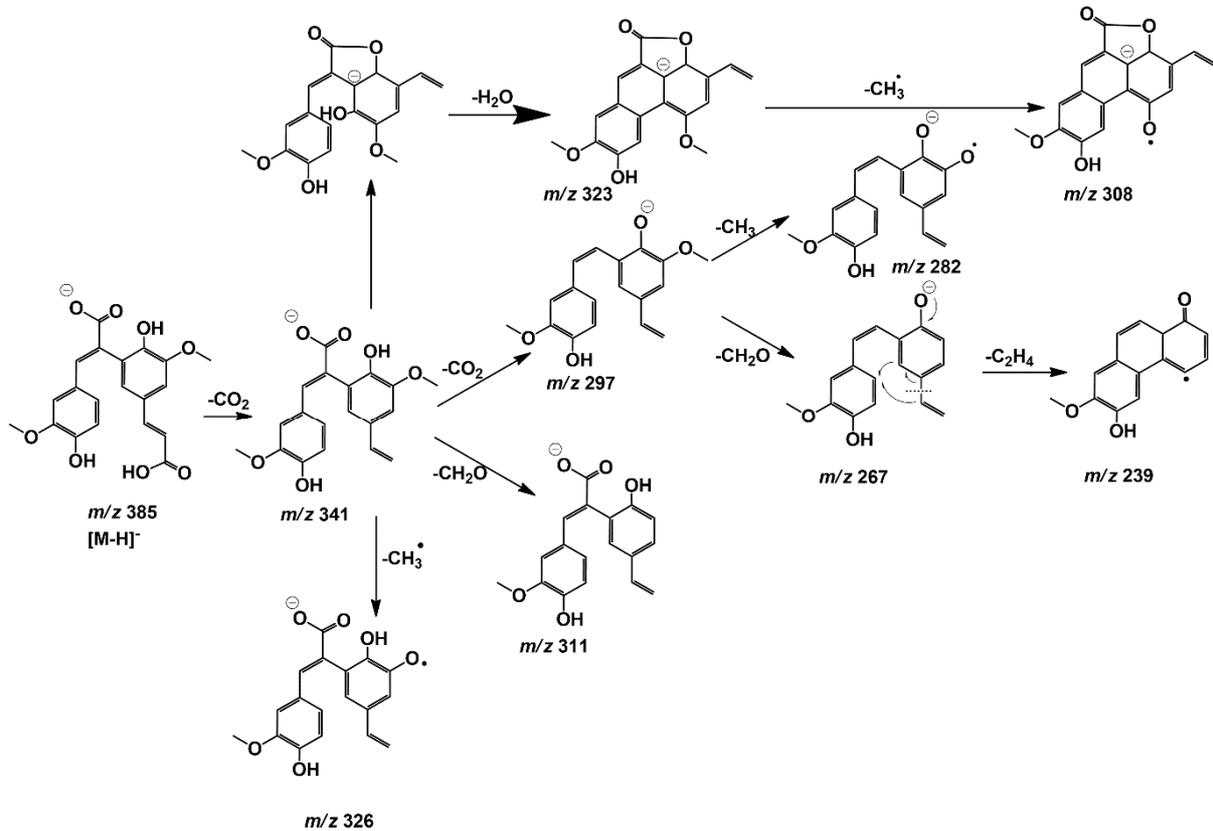


Abb. 23: Postuliertes Fragmentierungsmuster der 8-5'-DiFA; Mechanismus der Ringbildung von m/z 267 zu m/z 239 dargestellt (nach Callipo *et al.*, 2010). DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer

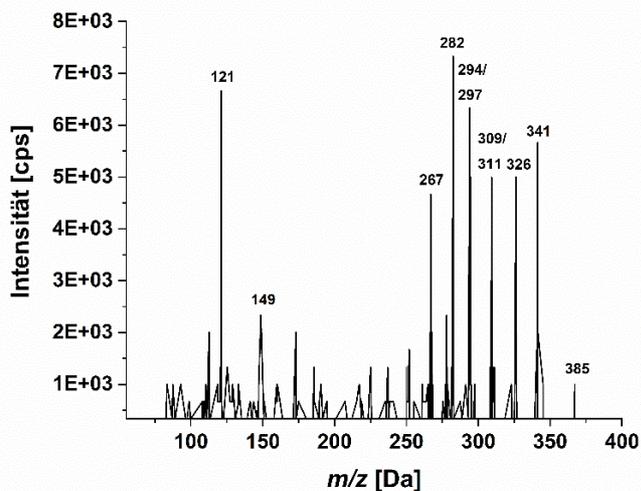


Abb. 24: ESI-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei $R_t = 14,5$ min; anhand der Literaturdaten und der Fragmente identifiziert als 8-5'-DiFA [Callipo *et al.*, 2010]. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Mit deutlich geringerer Intensität wurde ein weiteres Signal bei $R_t = 14,5$ min beobachtet, welches aufgrund seiner Produktionen und der ähnlichen R_t ebenfalls als 8-5'-DiFA identifiziert wurde. Neben dem Produktion m/z 311 wurde zusätzlich ein Produktion bei m/z 309 detektiert (Abb. 24), welches von Callipo *et al.* als charakteristisch für das *cis-trans*-Isomer beschrieben wurde und durch eine Methanolabspaltung eines intermediär gebildeten phenolischen Lactons nach CO_2 -Verlust (44 Da) entsteht [Callipo *et al.*, 2010].

Als weitere DiFA konnte in Fraktion F8 ein 5-5'-Isomer bei $R_t = 23,6$ min identifiziert werden (Abb. 25), welche zusätzlich zum Literaturvergleich mit einer Referenzsubstanz bestätigt wurde.

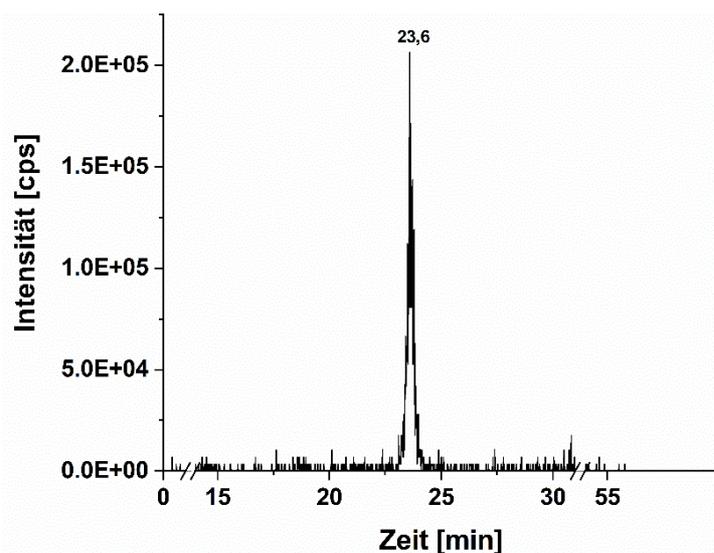


Abb. 25: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F8 mit Ionenspur m/z 385; identifiziert als DiFA; Signal bei $R_t = 23,6$ min. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer

Auffällig war bei dieser DiFA die große Stabilität des Präkursorions $[M-H]^-$ des Masse-zu-Ladungsverhältnisses m/z 385, welche von Callipo *et al.* nicht für die 5-5'-DiFA beschrieben worden war. Allerdings sprach die Retentionsfolge für dieses Isomer, welches schließlich anhand einer Referenzsubstanz ($R_t = 23,5$ min, s. Abb. 26 b und Anhang Tab. 33); freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom KIT; Prof. Dr. Mirko Bunzel) eindeutig identifiziert wurde. Die Intensitäts-Verteilung der Produktionen war leicht abweichend, was jedoch auf die generell geringere Intensität der Referenzsubstanz zurückgeführt werden kann. Größtenteils wurden unspezifische d.h. nicht diagnostische Produktionen mit m/z 370 ($-\text{CH}_3$ -Radikal), 341, 326, 297, 267 und 282 detektiert (Abb. 26), was sich wiederum mit den Literaturdaten von Callipo *et al.* sowie Bento-Silva *et al.* deckte [Callipo *et al.*, 2010; Bento-Silva *et al.*, 2020]. Das postulierte Fragmentierungsmuster ist dargestellt in Abb. 27.

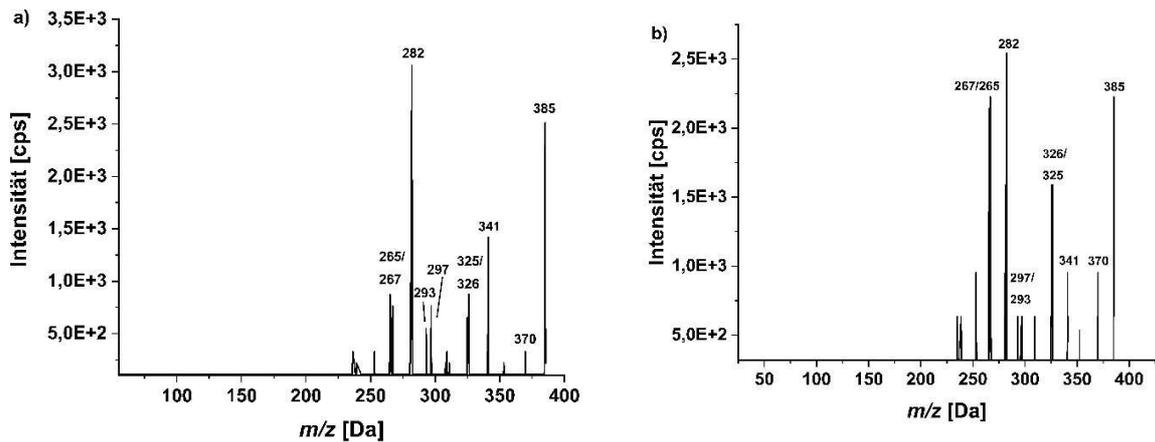


Abb. 26: ESI-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei $R_t = 23,6$ min (a) sowie der Referenzsubstanz (b); anhand der Literaturdaten und der Fragmente sowie ferner mittels Referenzsubstanz identifiziert als 5-5'-DiFA [Callipo *et al.*, 2010]. DiFA: Ferulasäure-Dehydromer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

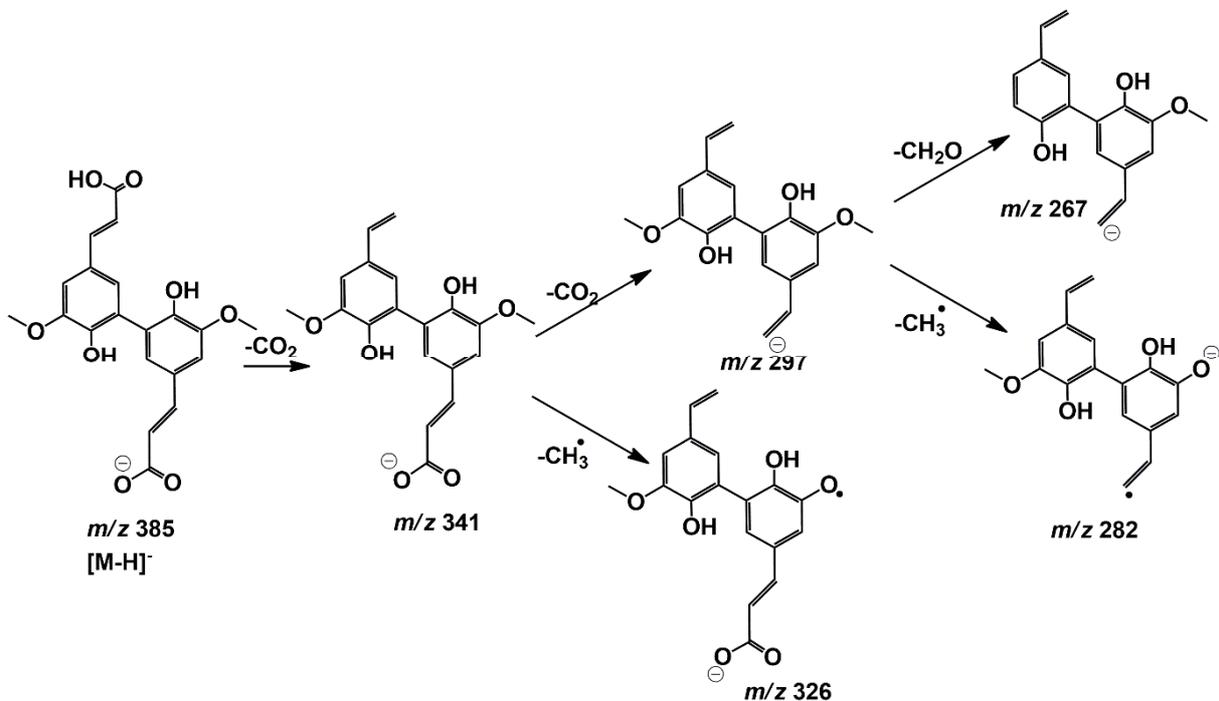


Abb. 27: Postuliertes Fragmentierungsmuster der 5-5'-DiFA (nach Callipo *et al.*, 2010). DiFA: Ferulasäure-Dehydromer

Die Folgefraktion F9 enthielt neben dem bereits diskutierten Isomer bei $R_t = 23,5$ min zwei weitere DiFAs bei $R_t = 24,7$ und $26,5$ min (Abb. 28) wobei letzteres strukturell in F10 aufgeklärt wurde. Das Dimer bei $R_t = 24,7$ min coeluierte mit der DiFA bei $R_t = 23,5$ min und war lediglich mit geringer Signalintensität vertreten.

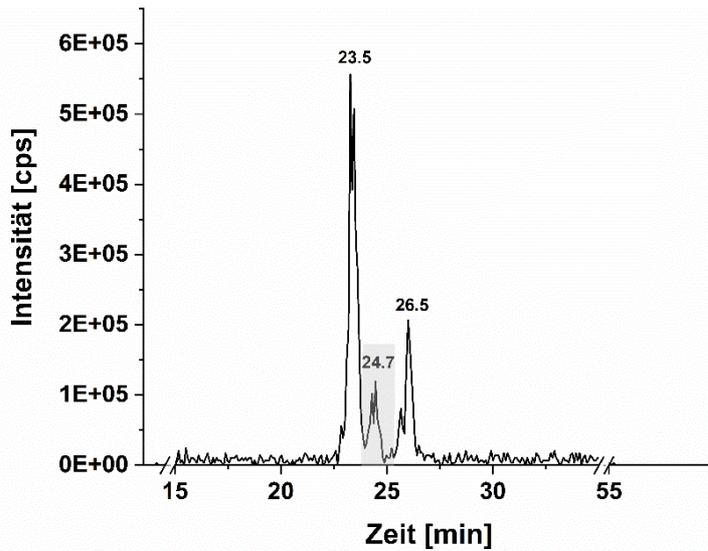


Abb. 28: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F9 mit Ionenspur m/z 385; identifiziert als DiFA; Signal bei R_t = 23,5; 24,7 und 26,5 min. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer

Die vergleichbare R_t sowie die hohe Stabilität des Präkursorions mit m/z 385 (Abb. 29) ließ das Auftreten des Stereoisomers der 5-5'-DiFA vermuten.

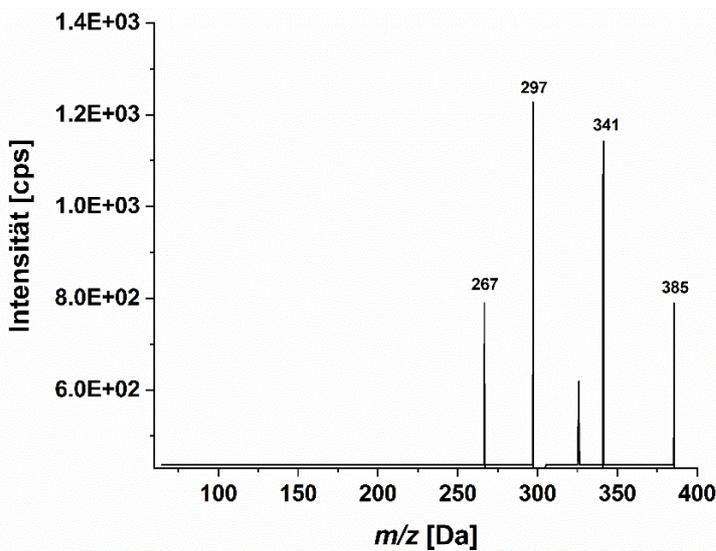


Abb. 29: ESI-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385; identifiziert als DiFA; Signals bei R_t = 24,7 min. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Zur Aufklärung des DiFA-Isomers bei R_t = 26,6 min wurde Fraktion F10 genutzt, welche neben den identifizierten 5-5'-Isomeren bei R_t = 23,5 und 24,9 min ein starkes Signal bei R_t = 26,6 min aufwies (Abb. 30).

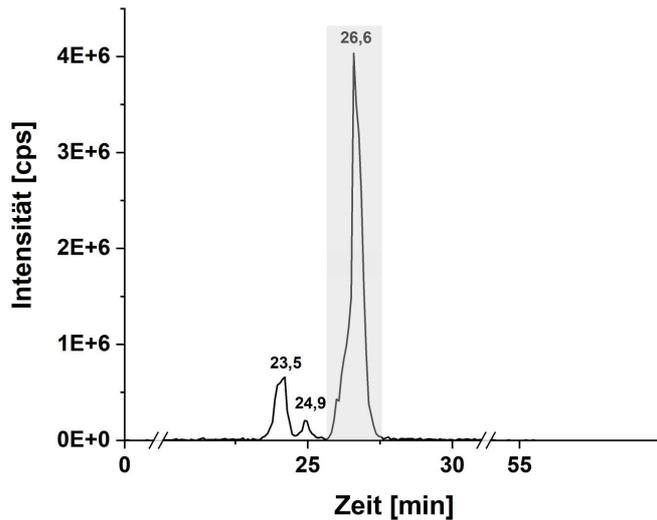


Abb. 30: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F10 mit Ionenspur m/z 385; identifiziert als DiFA; Signale bei $R_t = 23,5$; $24,9$ und $26,6$ min. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis, R_t : Retentionszeit

Das Isomer bei $R_t = 26,6$ min konnte anhand seiner charakteristischen Produktionen (Abb. 31 a) bei m/z 193, 178, 149, 134, welche denen der FA entsprechen, sowie anhand einer Referenzsubstanz (freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom KIT; Prof. Dr. Mirko Bunzel; vgl. s. Anhang Tab. 33 und Abb. 31 b) als eine 8-O-4'-DiFA identifiziert werden. Diese wird in der Literatur als sogenannte offene Form bezeichnet. Die Referenzsubstanz fragmentierte lediglich zu den Produktionen von m/z 193, 178, 149, 134. Neben diesen Signalen wurden hingegen bei Fraktion F10 bei $R_t = 26,6$ min auch die weniger diagnostischen Signale von m/z 267, 282, 326, 341 und 385 festgestellt. Dies könnte möglicherweise aufgrund der insgesamt höheren Signalintensität der Fraktion gegenüber der Referenzsubstanz beobachtet worden sein. Das Produktion bei m/z 193 ist charakteristisch für das Vorhandensein einer C-O-Bindung innerhalb der DiFAs und TriFAs, da es nur durch deren Bruch entstehen und bei den C-C-verknüpften DiFAs und TriFAs nicht auftreten kann. Das 8-O-4'-Isomer kann in vier Stereoisomeren vorliegen, wobei die *trans-trans*-Form mit Abstand die häufigste ist [Bento-Silva *et al.*, 2020; Callipo *et al.*, 2010].

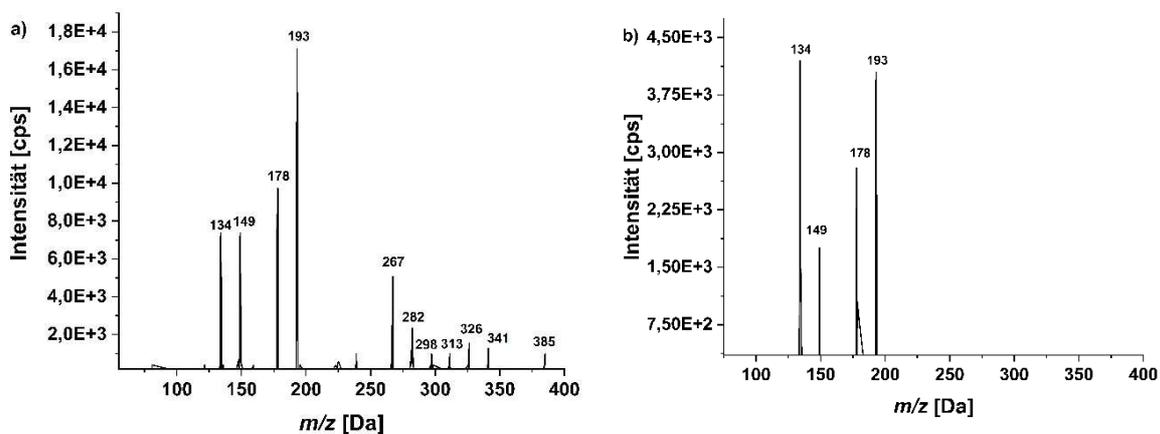


Abb. 31: ESI-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei $R_t = 26,6$ (a) sowie der Referenzsubstanz (b) min anhand der Literaturdaten und der Fragmente sowie ferner mittels Referenzsubstanz identifiziert als 8-O-4'-DiFA [Callipo *et al.*, 2010]. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Die spezifischen Produktionen bei m/z 193, 178, 149 und 134 sind der FA zuzuordnen und können anhand des folgenden Schemas erklärt werden (s. Abb. 32). Sie sind charakteristisch für eine in der DiFA-Struktur enthaltene C-O-Bindung [Callipo *et al.*, 2010]. Nach der Abspaltung einer Carboxylgruppe kommt es zum Bruch an der Etherbindung und FA (m/z 193) entsteht als eines der Hauptfragmente, welche anschließend weiter fragmentiert unter Abspaltung von CO_2 (m/z 149) oder einem Methylradikal (m/z 178) bzw. beidem (m/z 134).

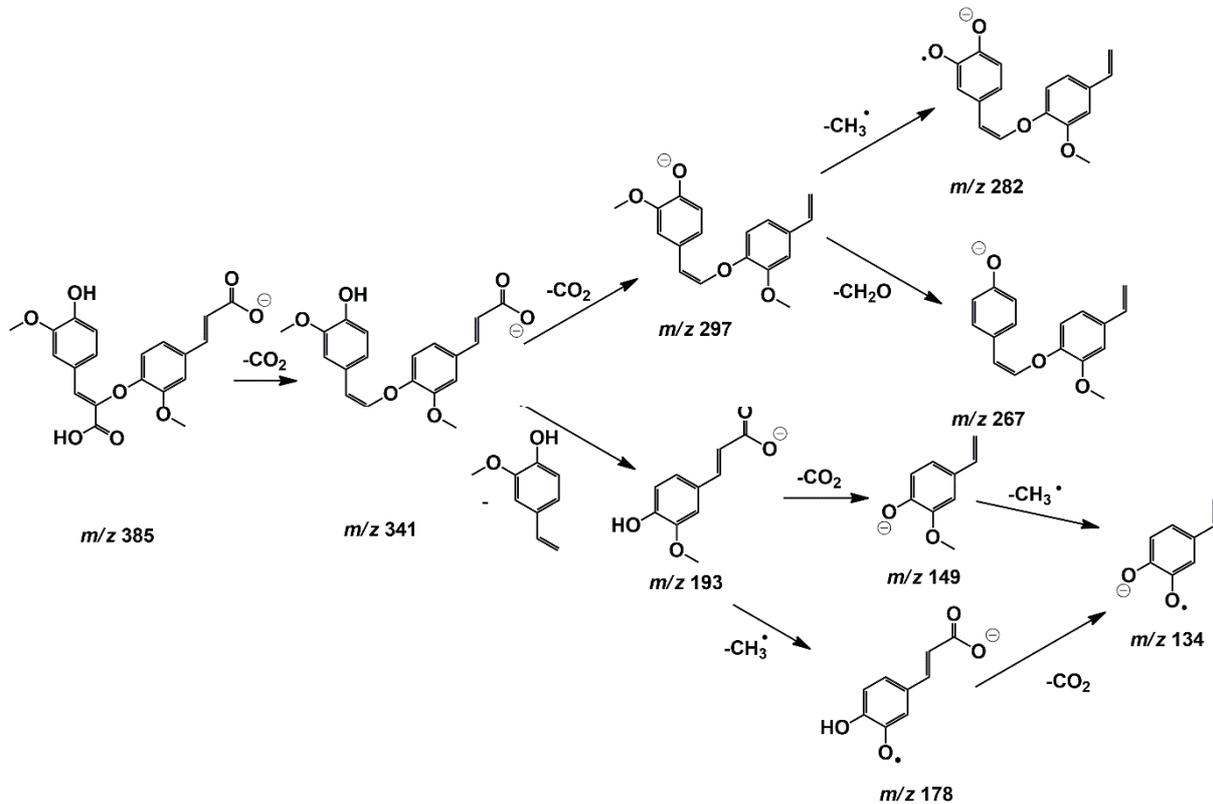


Abb. 32: Postuliertes Fragmentierungsmuster der 8-O-4'-DiFA (nach Callipo *et al.*, 2010). DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer

Mit sehr geringen Signalintensitäten waren in F12 zwei weitere Signale des Präkursorions m/z 385 bei $R_t = 28,5$ und $30,9$ min enthalten (Abb. 33). Allerdings war die Intensität für eine aussagekräftige Fragmentierung v.a. für das Signal bei $28,5$ min zu gering, sodass diese Struktur im Rahmen der Arbeit nicht aufgeklärt werden konnte. Es kann aufgrund der R_t und des Präkursorions angenommen werden, dass es sich um eine DiFA handelt, was allerdings mittels Aufkonzentrierung oder sensitiver Methodik verifiziert werden müsste.

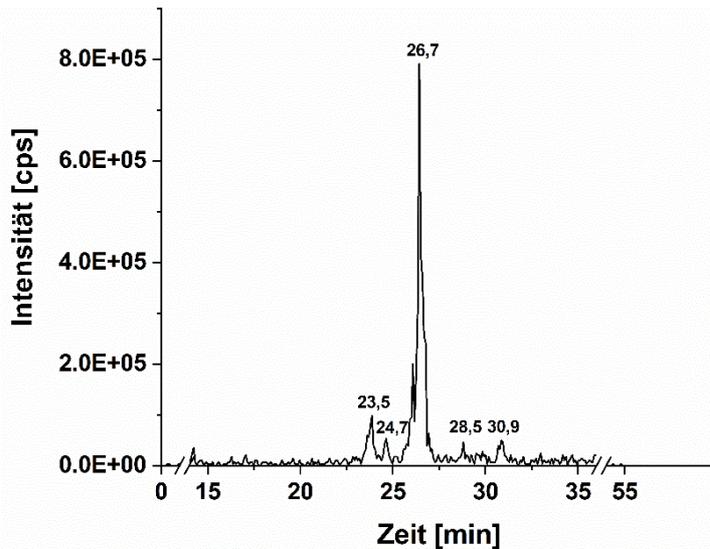


Abb. 33: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F12 mit Ionenspur m/z 385; Signal bei R_t = 23,5; 24,7; 26,7; 28,5 und 30,9 min DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer

Auch die DiFA bei R_t = 30,9 min war nur mit sehr geringer Intensität zu finden und lediglich das Präkursorion bei m/z 385 und ein Fragment mit m/z 193 wurden detektiert (Abb. 34). Letzteres lässt sich vermutlich auf die FA zurückführen wie für die 8-O-4'-DiFAs (Abb. 32) beschrieben. Daher ist bei diesem DiFA-Isomer davon auszugehen, dass eine C-O-Verbindung vorliegt, welches auf ein weiteres Stereoisomer der 8-O-4'-DiFA hindeutet. Allerdings sind andere DiFA-Strukturen mit C-O-Verbindung in der Literatur beschrieben wie die 4-O-5'-DiFA, sodass eine eindeutige Aussage nur mittels weiterer Fragmente oder alternativer Methoden wie bspw. NMR-Spektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*) getroffen werden kann [Bento-Silva *et al.*, 2020].

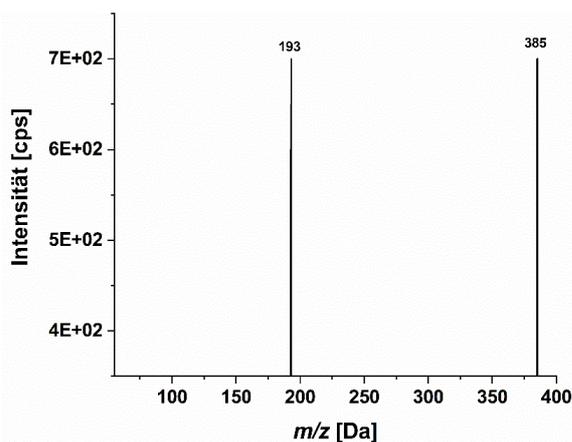


Abb. 34: ESI-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei R_t = 30,9 min; aufgrund des Fragmentions bei m/z 193 als offene DiFA angenommen. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Als letztes Signal des Präkursorions mit m/z 385 trat ein Signal bei R_t = 32,5 min auf, welches in Fraktion F16 erkennbar war (Abb. 35). Doch wie für die (angenommenen) DiFA-Signale bei R_t = 28,5 und 30,9 min war die Signalintensität zu schwach, um eine aussagekräftige Fragmentierung zu erhalten und eine DiFA lediglich vermutet werden kann. Die Struktur blieb

im Rahmen der Arbeit ungeklärt. Weitere Signale waren im Bereich von $R_t = 40$ min erkennbar. Allerdings wies lediglich das Signal bei $R_t = 40,5$ min Produktionen auf, die für eine DiFA sprachen. Im weiteren Verlauf durchgeführte Analysen der TriFAs zeigten jedoch, dass hier eine *insource*-Fragmentierung aufgetreten sein musste, da bei der gleichen R_t eine TriFA nachgewiesen werden konnte, welche sowohl zur Produktion bei m/z 385 als auch zur Produktion bei m/z 193 fragmentierte. Das Signal bei 40,5 min wurde daher nicht als DiFA-Signal betrachtet. Zudem zeigt sich in Fraktion F16, dass möglicherweise nach der präparativen Aufreinigung Umlagerungen von DiFA-Strukturen stattfanden, da die Fraktion aus einem Retentionsbereich innerhalb der präparativen Aufreinigung von ca. 29–31 min stammte, was bei der analytischen Chromatographie ca. 34–38 min entsprach. So trat die 5-5'-DiFA bei $R_t = 23,6$ min mit fast höchster Signalintensität aller DiFA-Signale auf, obwohl diese aufgrund der Fraktionierung nicht enthalten sein sollte. Nach der präparativen Trennung wurden die erhaltenen Fraktionen mittels Vakuumzentrifugation aufkonzentriert, wodurch auch die Säurekonzentration stieg. Weiterhin erfolgte die Aufkonzentrierung bei einer Temperatur von 40 °C, wodurch Umlagerungen möglich erscheinen. Bei hoher Temperatur wurden im Rahmen alkalischer Hydrolysen Pyrolysen von Benzyl-Phenylethern beschrieben. Mechanismen über Phenoxy- und Benzylradikal-Bildung und deren Wiederverknüpfung führten u.a. zur Bildung einer C-C-Bindung im Benzyl-Phenol [Roberts *et al.*, 2010]. Dies lässt sich bezüglich des Mechanismus übertragen auf eine potenzielle Umlagerung von 4-O-5'-DiFA zu 5-5'-DiFA. Da die Signale bei $R_t = 28,5$; 30,5 und 32,5 min nicht eindeutig einem Isomer zugeordnet werden konnten und lediglich beim zweiten Signal eine offene DiFA-Struktur vermutet wurde, könnte eine Umlagerung von einer 4-O-5'-DiFA möglich sein. Es handelt sich jedoch um eine Hypothese, welche mittels aussagekräftiger Fragmentierung geprüft werden muss.

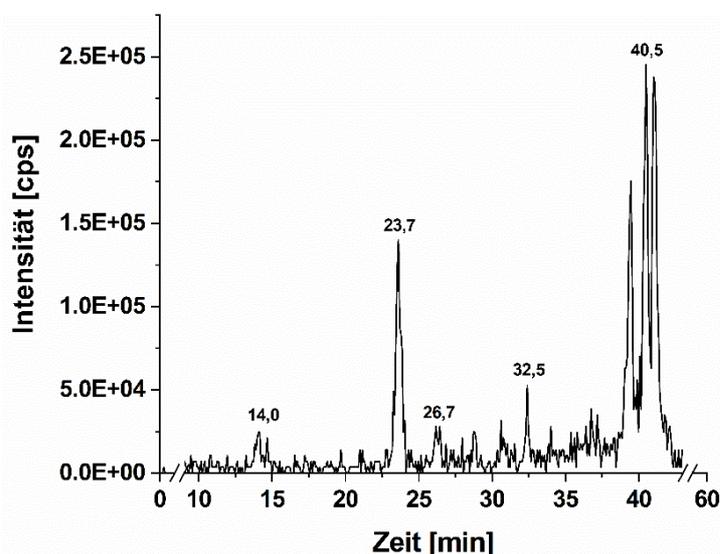


Abb. 35: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F16 mit Ionenspur m/z 385; Signal bei $R_t = 14$; 23,7; 26,7 und 32,5 min. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer

Die Strukturaufklärung der enthaltenen sieben TriFAs erwies sich als komplexer und konnte größtenteils nicht eindeutig aufgeklärt werden. Dies war v.a. der deutlich geringeren Signalintensität der TriFAs (Präkursorion mit m/z 577) im Vergleich zu der der DiFAs geschuldet. In Gerste wurden TriFA- und DiFA-Gehalte von Jilek und Bunzel bestimmt. Sie beschrieben einen TriFA-Gehalt von 24 $\mu\text{g/g}$ Vollkorgerstenmehl im Vergleich zum DiFA-

Gehalt von 332 µg/g weshalb die niedrige Signalintensität in unseren Studien womöglich an dem niedrigen Gehalt liegen könnte. Deren verwendete Extraktionsmethodik des alkalischen Aufschlusses gefolgt von einer EtOAc-Extraktion war vergleichbar mit der hier angewandten Aufarbeitung. Zudem verwendeten sie Gerste als Ausgangsmaterial was BSG als Rohstoff hinsichtlich der Arabinoxylan-Zellwandstruktur ähnlich ist. Demnach eigneten sich die Daten von Jilek und Bunzel als Grundlage, um mögliche TriFA-Strukturen in BSG aufzuklären. Die in Gerste enthaltenen TriFAs setzten sich zusammen aus 15 % 8-5'/8'-O-4'-Isomer, 14 % 5-5'/8'-5''-Isomer, 15 % 8-8' (Aryltetralin)/4'-O-8'-Isomer, 27 % 5-5'/8'-O-4'-Isomer und 29 % 8-O-4'-/8'-O-4'-Isomer. Sie verwendeten im Rahmen ihrer HPLC-Analytik eine Phenyl-Hexyl-Säule, welche der der im Rahmen der Arbeit verwendeten Säule hinsichtlich ihres Materials sehr ähnlich ist. Daher kann die Retentionsfolge der TriFAs als Indiz zur Strukturaufklärung herangezogen werden [Bunzel und Jilek, 2013]. Eine der genannten TriFAs, das 5-5'/8'-O-4'-Isomer, wurde bereits in BSG identifiziert [Moreira *et al.*, 2012].

Neben den Daten von Bunzel und Jilek konnten weitere Studien von Bento-Silva *et al.* zum Vergleich mit unseren Daten herangezogen werden. Sie beschrieben auftretende Produktionen – wie zuvor für die DiFAs – nach einfachem (m/z 533) oder doppeltem (m/z 489) CO₂-Verlust des Präkursorions [M-H]⁻ bei m/z 577. Das Produktion bei m/z 193 ermöglichte innerhalb der Gruppe der TriFAs eine strukturelle Zuordnung. Es deutete auf das Vorhandensein einer C-O-Bindung hin, welche ebenfalls für DiFA-Strukturen nachgewiesen wurden. Zudem wurden einige der für die DiFAs detektierten Produktionen detektiert. So waren u.a. die Masse-zu-Ladungsverhältnisse m/z 385 (-FA vom Präkursorion bei m/z 577), 341 (-CO₂ des Produktions bei m/z 385), 311 (-CO₂ und -CH₂O vom Produktion bei m/z 385), 326 (-CO₂ und -CH₃-Radikal vom Produktion bei m/z 385), oder 297 (-2x CO₂ vom Produktion bei m/z 385) bestimmt worden [Bento-Silva *et al.*, 2020].

Fraktion F27 enthielt insgesamt vier TriFAs bei R_t = 14,1; 15,3; 20,0 und 40,5 min (Abb. 36) Die trimeren Strukturen bei 20,0 und 40,5 min sind jedoch vermutlich nicht natürlicherweise von Beginn an enthalten. Fraktion F27 stammte im Zuge der präparativen Aufreinigung aus einem Retentionsbereich von 9–11,5 min. Da der Gradient und die Säule für die analytische HPLC übernommen wurden, sollten nur Substanzen enthalten sein, die einem Retentionsbereich von ca. 12–14,5 min entsprechen. Daher wurde von einer Umlagerung ausgegangen, wobei die Strukturaufklärung der spät eluierenden TriFA bei R_t = 40,5 min in Fraktion F16 erfolgte.

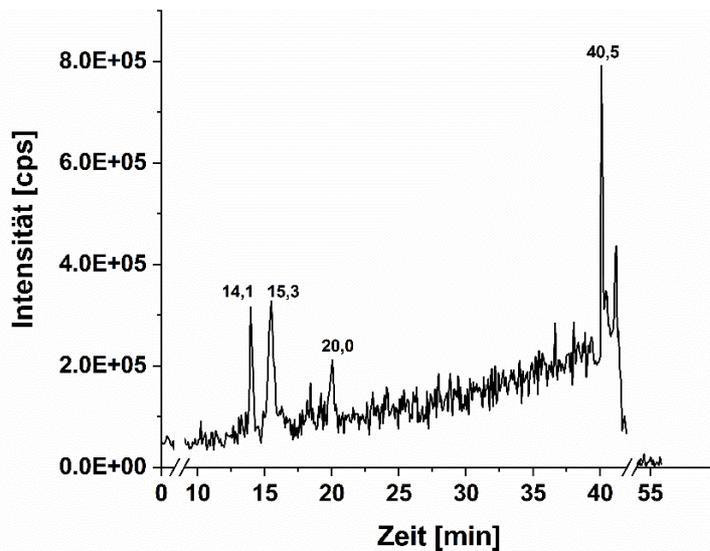


Abb. 36: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F27 mit Ionenspur m/z 577; identifiziert als TriFA; Signal bei $R_t=$ 14,1; 15,3; 20,0 und 40,5 min. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer

Die drei trimeren Strukturen ($R_t=$ 14,1; 15,3 und 20,0 min) des Präkursorions bei m/z 577 wiesen ein ähnliches Fragmentierungsmuster auf, wobei für alle drei Strukturen aufgrund des fehlenden Fragments bei m/z 193 eine C-O-Bindung innerhalb der Struktur ausgeschlossen wurde und von reinen C-C-Verknüpfungen innerhalb der drei verbundenen FAs ausgegangen wurde. Waterstraat und Bunzel beschrieben 2018 zwei TriFAs (5-5'/8'-8''-Aryltetralin-TriFA und 5-5'/8'-8''-TriFA), welche keine C-O-Bindung aufwiesen, jedoch natürlich in Weizen, Zuckerrübe, Amaranth und Mais als Teil der pflanzlichen Zellwand erfasst wurden. Ein Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnisse mit den Daten von Waterstraat und Bunzel wies strukturentscheidende Gemeinsamkeiten auf. So zeigten sich bei dem Präkursorion mit m/z 577 bei $R_t=$ 14,1 min mit Produktionen bei m/z 533, 489, 445, 577, 409, und 365 (Abb. 37) die gleichen Fragmente wie bei 5-5'/8'-8'' (Aryltetralin)-TriFA [Waterstraat und Bunzel, 2018]. Eine Aussage über die Stereoisomerie ist anhand der vorliegenden Daten nicht möglich. Als Produktionen waren neben der einfachen (m/z 533) und zweifachen (m/z 489) CO_2 -Abspaltung das m/z 365 detektierbar, welches analog der 8-8''-Aryltetralin-DiFA durch Spaltung der C(8)-C(8'')-Bindung und Verlust des Phenolderivates entsteht (Abb. 37).

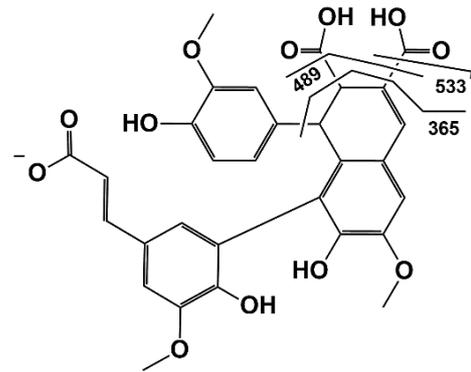
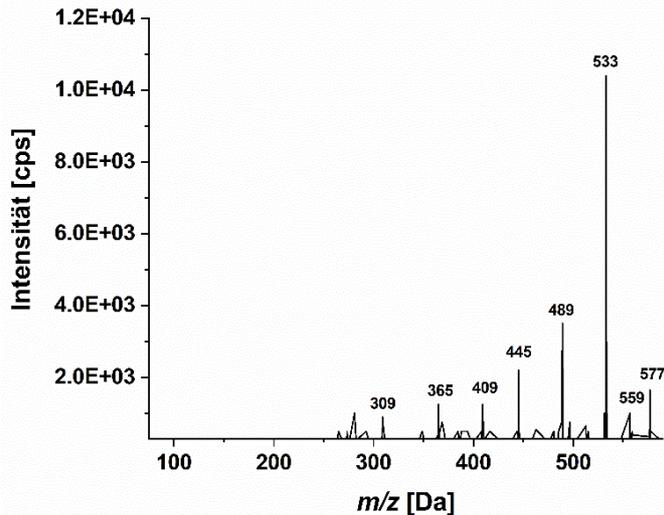


Abb. 37: ESI-MS²-Spektrum (*enhanced product ion scan*) des Präkursorions mit m/z 577 des Signals bei $R_t=14,1$ min; anhand der Literaturdaten identifiziert als 5-5'/8'-8'' (Aryltetralin)-TriFA; dargestellt sind die vermuteten Hauptfragmente [Bento-Silva *et al.*, 2020; Bunzel und Jilek, 2013; Waterstraat und Bunzel, 2018]. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Die TriFA bei $R_t=15,3$ min wies ein vergleichbares Fragmentierungsmuster auf (Abb. 38), weshalb es sich hierbei um ein Stereoisomer der 5-5'/8'-8'' (Aryltetralin)-TriFA handeln könnte. Allerdings war die Signalintensität geringer als bei der zuvor eluierenden TriFA ($R_t=14,1$ min), weshalb die Fragmentierung nicht eindeutig war und es sich demnach lediglich um eine Hypothese zur Struktur handelt.

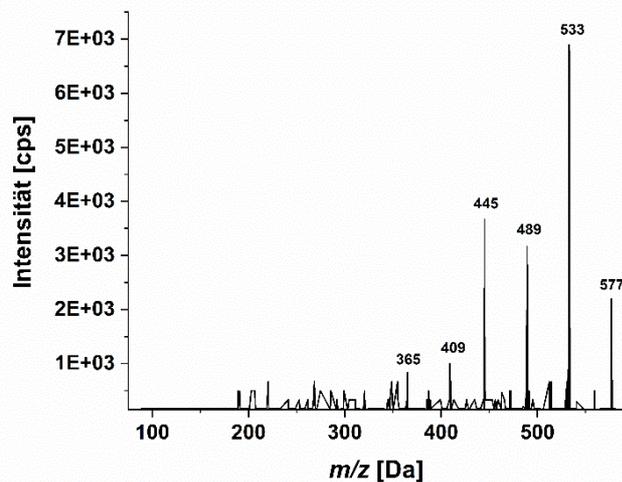


Abb. 38: ESI-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 577 des Signals bei $R_t=15,3$ min; anhand der Literaturdaten identifiziert als 5-5'/8'-8'' (Aryltetralin)-TriFA [Bento-Silva *et al.*, 2020; Bunzel und Jilek, 2013; Waterstraat und Bunzel, 2018]. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Ebenso konnte die Struktur der bei $R_t=20,0$ min eluierenden TriFA aufgrund geringer Signalintensität nicht eindeutig zugeordnet werden. Hier war auffällig, dass das Produktion bei m/z 533 nicht mehr als Hauptfragment wie bei den TriFAs bei $R_t=14,1$ und $15,3$ min auftrat, sondern höhere Signalintensitäten für die Produktionen bei m/z 445 und 489 auftraten (Abb. 39). Dies wurde von Waterstraat und Bunzel beschrieben [Waterstraat und Bunzel, 2018] und sprach für die nicht zyklische 5-5'/8'-8''-TriFA. Jedoch konnten die weiteren

charakteristischen Produktionen bei m/z 413, 415 und 294 nicht detektiert werden, weshalb die vorgeschlagene Struktur eine Vermutung bleibt.

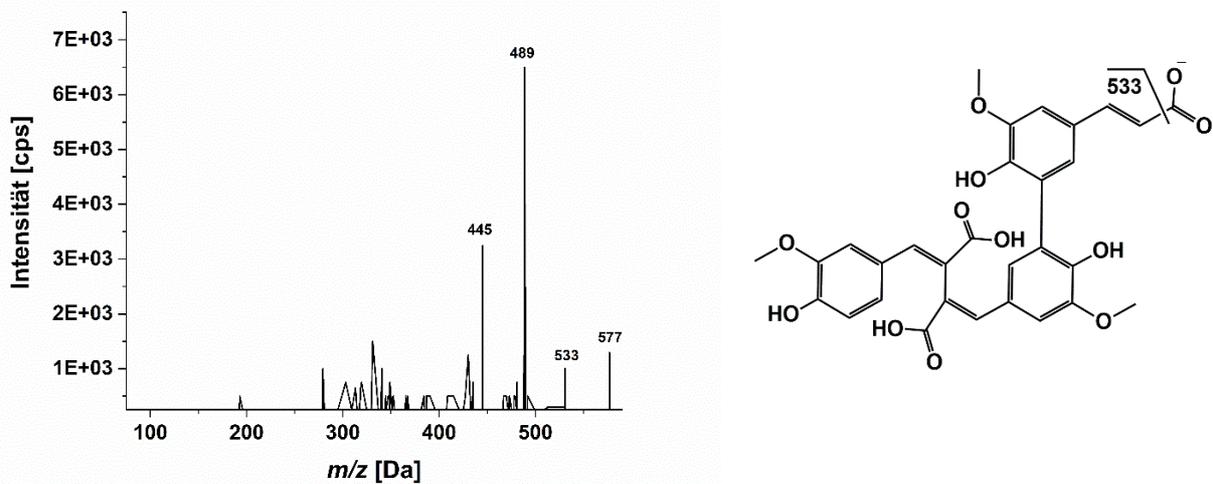


Abb. 39: ESI-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 577 des Signals bei $R_t = 20,0$ min; anhand der Literaturdaten identifiziert als 5-5'/8'-8''-TriFA [Bento-Silva *et al.*, 2020; Bunzel und Jilek, 2013; Waterstraat und Bunzel, 2018]. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Weitere TriFAs wurden im Retentionsbereich von 21–23 min erfasst, wobei ein deutliches Signal bei $R_t = 21,7$ min in Fraktion F7 festgestellt wurde (Abb. 40).

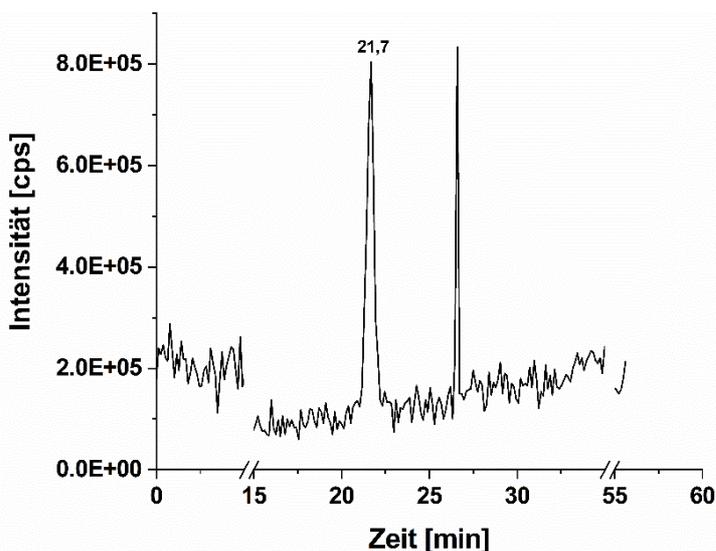


Abb. 40: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F7 mit Ionenspur m/z 577; identifiziert als TriFA; Signal bei $R_t = 21,7$ min. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer

Die TriFA bei $R_t = 21,7$ min wies Produktionen in hoher Signalintensität auf, was eine Strukturaufklärung zuließ. Neben den unspezifischen Produktionen bei m/z 577, 533 und 489 entstand als Hauptproduktion das Fragment mit m/z 341. Mit geringerer Signalintensität wurden die Masse-zu-Ladungsverhältnisse m/z 193, 355 und 311 detektiert, welche auf das Vorhandensein einer C-O-Bindung hinweisen (Abb. 41). Durch die Spaltung der C-O-Bindung entsteht wie bei 8-O-4'-DiFA ein FA-Fragment (m/z 193). Nach der Spaltung der Etherbindung kann es zum Verlust einer CH_2O (-30 Da)- bzw. CO_2 (-44 Da)- Gruppe oder beidem gemeinsam

(-74 Da) kommen, wodurch die Produktionen bei m/z 355, 341 und 311 erklärt werden können. Auch ein zweifacher CO_2 -Verlust (m/z 297) vom Produktion bei m/z 385 wurde detektiert. Bento-Silva *et al.* werteten dies als Hinweis für das Vorhandensein der 8-8'-Aryltetralin-DiFA. Aufgrund der Retentionsfolge und des signalintensivsten Produktions bei m/z 341, wie beschrieben von Bento-Silva *et al.*, wurde das TriFA-Isomer bei $R_t = 21,7$ min als 8-8'-(Aryltetralin)/4'-O-8'-TriFA postuliert [Bento-Silva *et al.*, 2020].

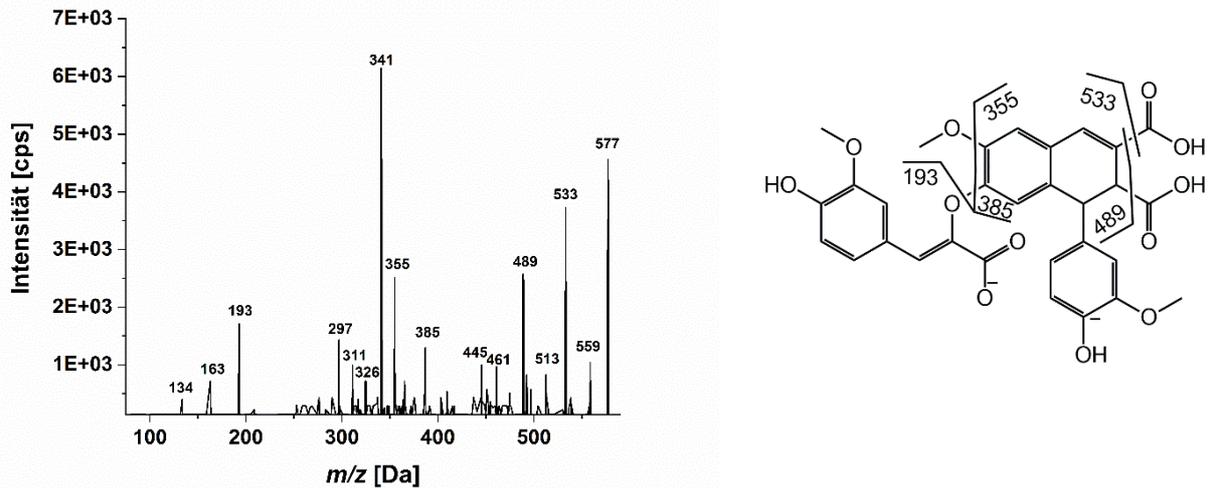


Abb. 41: ESI-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 577 des Signals bei $R_t = 21,7$ min; anhand der Literaturdaten als 8-8'-(Aryltetralin)/4'-O-8'-TriFA angenommen; dargestellt sind die charakteristische Spaltung der C-O-Bindung mit Folgefragmenten [Waterstraat und Bunzel, 2018; Bunzel und Jilek, 2013; Bento-Silva *et al.*, 2020]. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Eine weitere TriFA eluierte bei $R_t = 23,6$ min und war v.a. in Fraktion F28 enthalten, welche zusätzlich die strukturell identifizierte TriFA ($R_t = 21,7$ min) aufwies (Abb. 42).

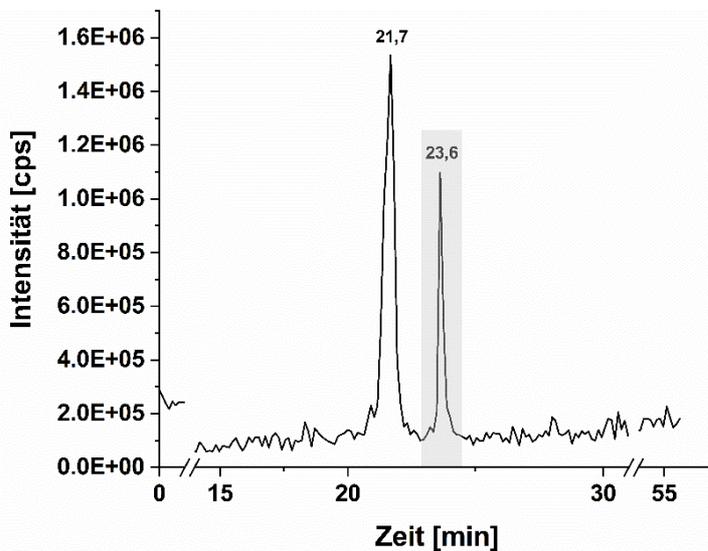


Abb. 42: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F28 mit Ionenspur m/z 577; identifiziert als TriFA; Signal bei $R_t = 21,7$ und $23,6$ min. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer

Im Gegensatz zu der vorherigen TriFA ($R_t = 21,7$ min) konnte keine aussagekräftige Fragmentierung erreicht werden und da keine Reinsubstanzen zur Verfügung standen, war keine Optimierung der Geräteparameter möglich. Es konnten lediglich unspezifische

Produktionen bei m/z 577, 533 und 489 sowie ein nicht strukturell aufgeklärtes Produktion bei m/z 289 detektiert werden. Da zusätzlich keine Fragmente, welche für eine C-O-Bindung sprechen (m/z 385, 193, 355), detektiert wurden, wurde zumindest dieses Strukturelement ausgeschlossen. Weitere Aussagen zur Struktur sind allerdings anhand der Fragmentierung nicht möglich.

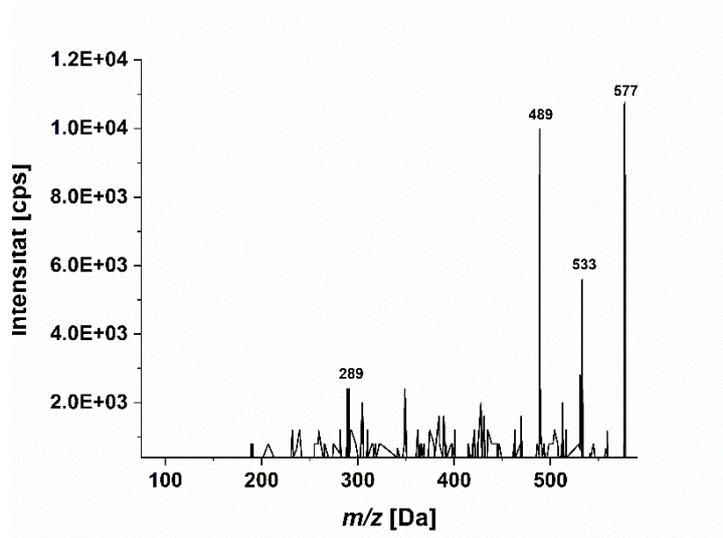


Abb. 43: ESI-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 577 des Signals bei $R_t= 23,6$ min, angenommen als TriFA. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Ein weiteres Signal beim Präkursorion des Masse-zu-Ladungsverhältnisses der TriFAs mit m/z 577 wurde bei $R_t= 35,1$ min in Fraktion F14 detektiert (Abb. 44).

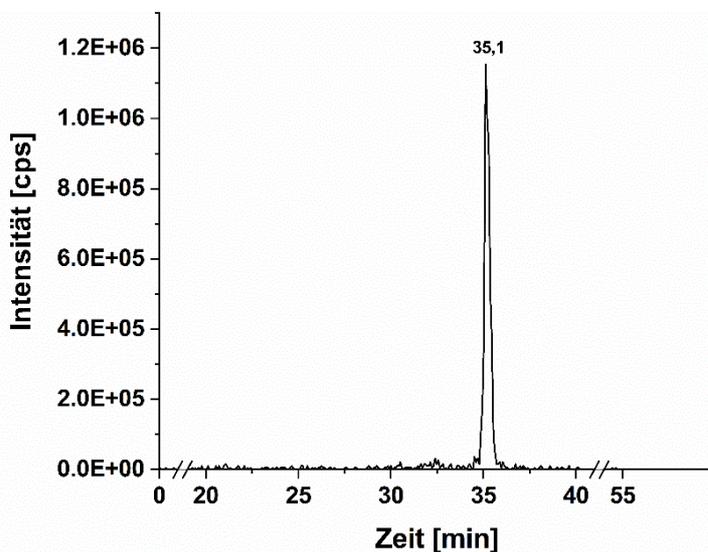


Abb. 44: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F14 mit Ionenspur m/z 577; identifiziert als TriFA; Signal bei $R_t= 35,1$ min. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer

Das Fragmentierungsmuster wies erneut auf das Strukturelement einer C-O-Bindung hin, da die hierfür charakteristischen Hauptproduktionen der Masse-zu-Ladungsverhältnisse m/z 193 gefolgt von m/z 355 nachgewiesen wurden (Abb. 45). Mit geringerer Intensität entstanden zudem die Produktionen bei m/z 311 und 297, welche wie beschrieben einem Verlust von CH_2O (-30 Da) und CO_2 (-44 Da) bzw. zweifachem CO_2 -Verlust des Produktions von m/z 385

entsprachen. Im Gegensatz zur TriFA bei $R_t = 21,7$ min war hier jedoch das Fragment m/z 385 nicht detektierbar. Anhand der Fragmentierung und der Literaturdaten von Bento-Silva *et al.* wurde das Isomer als 8-5'/4'-O-8''-TriFA oder 5-5'/4'-O-8''-TriFA beschrieben [Bento-Silva *et al.*, 2020]. Bezieht man die Ergebnisse von Bunzel und Jilek ein, so lässt sich vermuten, dass es sich um das 5-5'/4'-O-8''-Isomer handelt. Dies kann basierend auf dem Retentionszeitpunkt und von der in Gersten enthaltener Menge (27 % der Gesamtmenge an TriFAs) als das wahrscheinlichere Isomer angenommen werden [Bunzel und Jilek, 2013]. Diese Hypothese muss mit weiteren MS-Messungen sowie NMR-Messungen bestätigt werden.

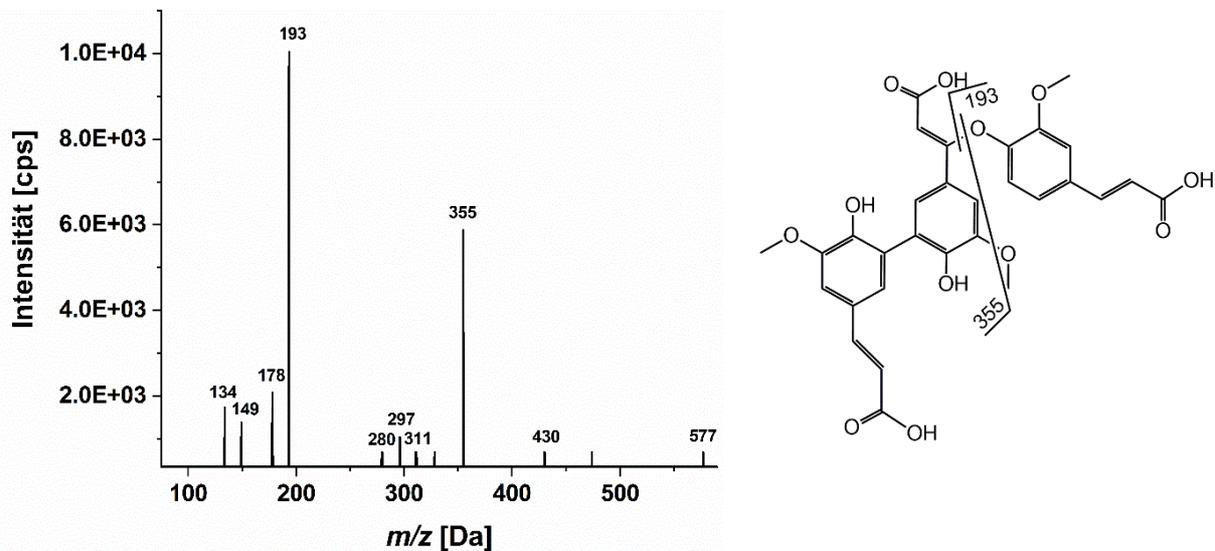


Abb. 45: ESI-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 577 des Signals bei $R_t = 35,1$ min; anhand der Literaturdaten als 5-5'/4'-O-8''-TriFA angenommen [Waterstraat und Bunzel, 2018; Bunzel und Jilek, 2013; Bento-Silva *et al.*, 2020]. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Ein weiteres TriFA-Isomer eluierte bei $R_t = 40,5$ min und konnte in Fraktion F16 charakterisiert werden (Abb. 46).

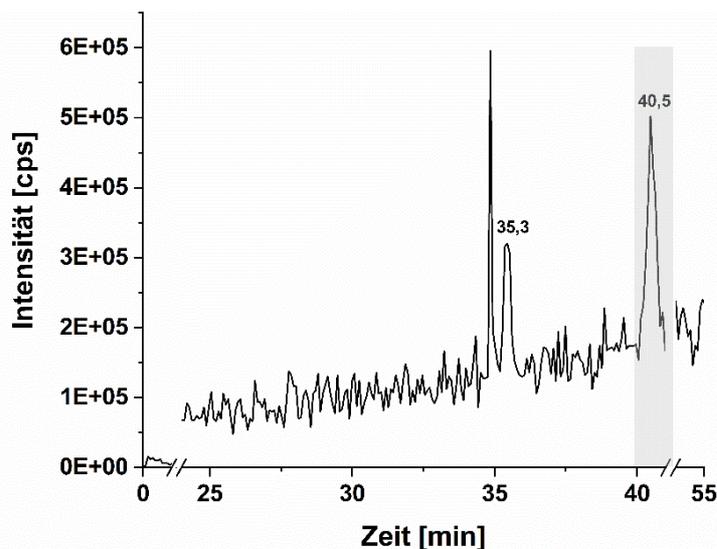


Abb. 46: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F16 mit Ionenspur m/z 577; identifiziert als TriFA; Signal bei $R_t = 40,5$ min. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer

Die späte R_t sowie die signalintensivste Produktion von m/z 193 gefolgt vom Präkursorion bei m/z 577, dem Produktion m/z 385 und den charakteristischen Fragmenten der FA-

Fragmentierung m/z 178, 149 und 134 (Abb. 47) [Callipo *et al.*, 2010] bekräftigten das Vorliegen einer zweifach offenen Form wie der 8-O-4'/8'-O-4''-TriFA. Dies wurde von Bento-Silva *et al.* beschrieben und wurde von Bunzel und Jilek als häufigstes Trimer in alkalisch aufgeschlossener Gerste publiziert [Bunzel und Jilek, 2013; Bento-Silva *et al.*, 2020].

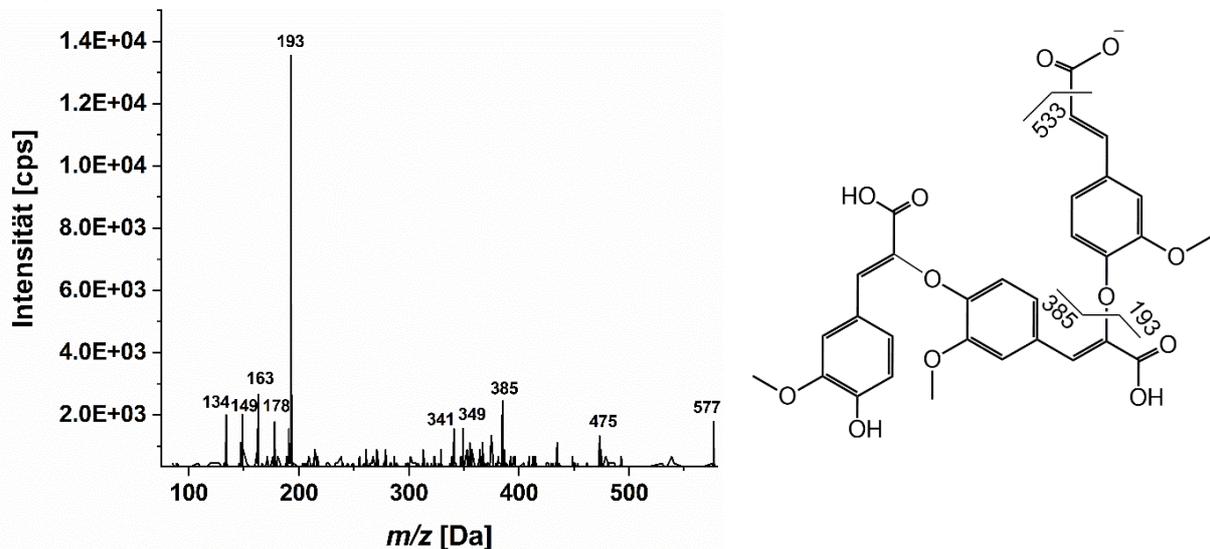


Abb. 47: ESI-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 577 des Signals bei $R_t = 40,5$ min; anhand der Literaturdaten als 8-O-4'/8'-O-4''-TriFA angenommen; charakteristische Spaltung der C-O-Bindung an zwei Positionen möglich [Waterstraat und Bunzel, 2018; Bunzel und Jilek, 2013; Bento-Silva *et al.*, 2020]. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Neben di- und trimeren FA-Derivaten fanden sich Oxylipine in den Fraktionen, wobei es sich um oxidierte Linolsäurederivate, verschiedene Isomere der TriHOME (Abb. 48) und TriHODA (Abb. 52) handelte.

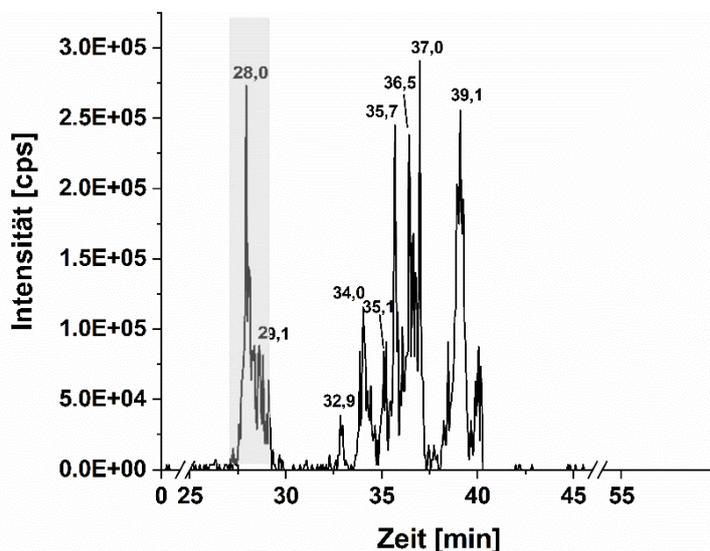


Abb. 48: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F16 mit Ionenspur m/z 329; identifiziert als TriHOME; Signale bei $R_t = 28,0$; 29,1; 32,9; 34,0; 35,1; 35,7; 36,5; 37,0 und 39,1 min. TriHOME: Trihydroxyoctadecensäure

Die verschiedenen Isomere wiesen eine gemeinsame Grundstruktur mit einer vergleichbaren Fragmentierung (m/z 329, 229, 211, 171, 139) auf. Dabei traten einerseits Unterschiede in der jeweiligen Signalintensität der Produktionen auf und andererseits teilweise verschiedene Fragmente. So unterschieden sich bspw. das Signal bei $R_t = 28,0$ min vom Signal bei $R_t = 36,9$ min in der Intensität des Präkursorions mit m/z 329. Zudem fanden sich bei der Substanz bei

$R_t = 36,9$ min (Abb. 50) zusätzliche Produktionen der Masse-zu-Ladungsverhältnisse m/z 129, 199, 201, 293 und 311, wobei beim Signal bei $R_t =$ von 28,0 min (Abb. 49) zusätzlich die Produktionen von m/z 127, 155 und 183 auftraten. Dies war zurückzuführen auf die Grundstruktur der verschiedenen TriHOME-Isomere, die sich durch die Position der Doppelbindung bzw. der Anzahl der Hydroxygruppen vor und nach der Doppelbindung definierte. Die Produktionen bei m/z 311, 293 und 211 lassen sich erklären über Wasserabspaltung an der Carboxylgruppe (für m/z 311) mit anschließender zweiter Wasserabspaltung unter Epoxidbildung (für m/z 293) oder Wasserabspaltung an der Carboxylgruppe vom Produktion m/z 229 (für m/z 211).

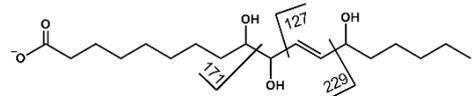
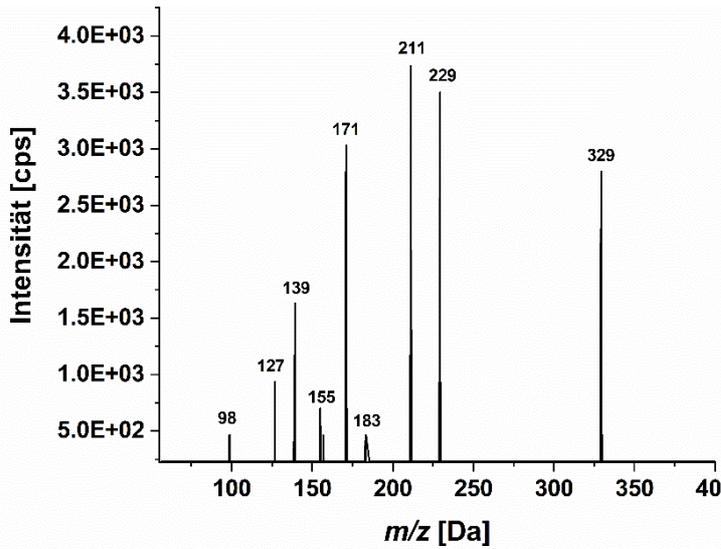


Abb. 49: ESI-MS²-Spektrum vom Präkursorion mit m/z 329 des Signals bei $R_t = 28,0$ min. m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

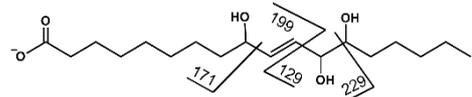
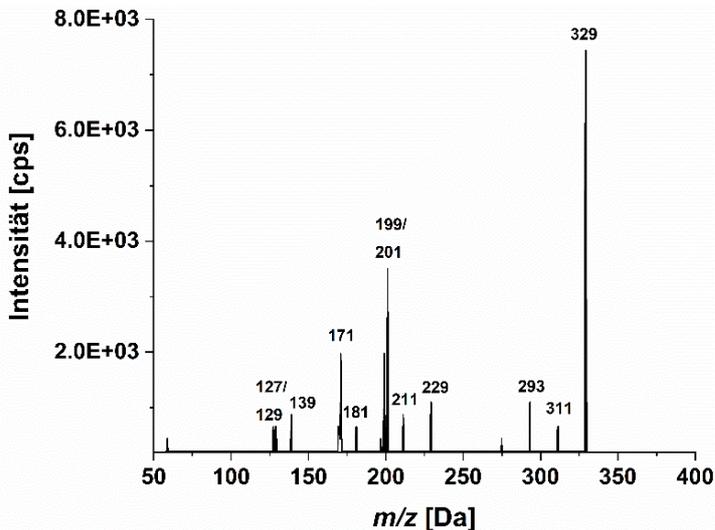


Abb. 50: ESI-MS²-Spektrum vom Präkursorion mit m/z 329 des Signals bei $R_t = 36,9$ min. m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

Einen Hinweis darauf, wie viele Hydroxygruppen sich vor bzw. nach der Doppelbindung befinden und damit, ob eine 9,10,13- oder eine 9,12,13-TriHOME vorliegt, geben die Fragmente m/z 127 bzw. 129, welche im MRM-Modus untersucht wurden (Abb. 51) [Martin-Arjol *et al.*, 2010]. Da die einzelnen Isomere teilweise nicht vollständig chromatographisch

aufgetrennt wurden, sind bei einigen Isomeren aufgrund der Coelution beide Übergänge innerhalb des Signals erkennbar. Doch lassen sich die Signale bei $R_t = 28,3$; $28,9$; $29,4$; $35,6$ und $37,4$ min einem TriHOME-Isomer mit zwei Hydroxygruppen vor der Doppelbindung (u.a. 9,10,13-TriHOME) und die Signale bei $R_t = 33,2$; $34,5$ und $36,9$ min einem Isomer mit zwei Hydroxygruppen nach der Doppelbindung (u.a. 9,12,13-TriHOME) zuordnen. Die genauen Positionen der Hydroxygruppen sind nicht aus den Produktionen ableitbar, können aber anhand der Oxidationsprozesse von Linolsäure an Position C(9), C(10), C(12) und C(13) angenommen werden. Entsprechende Strukturen wurden bereits in Bier nachgewiesen [Esterbauer und Schauenstein, 1977].

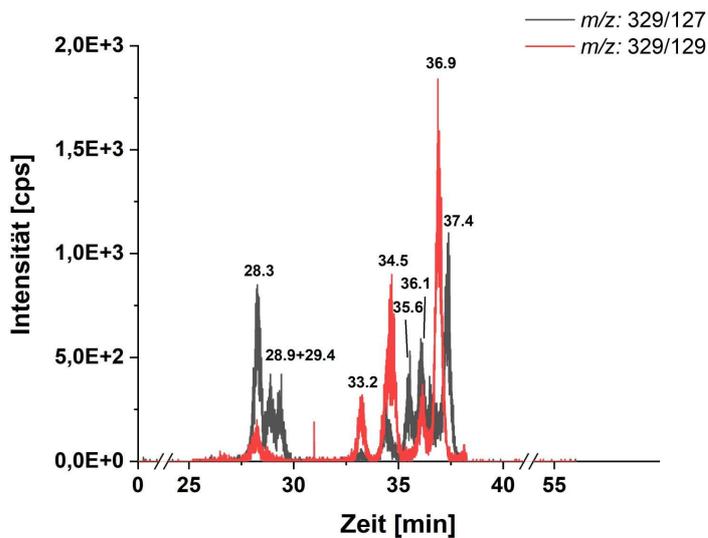


Abb. 51: HPLC-ESI⁻-MS-Chromatogramm der Fraktion F19 zur Differenzierung der TriHOME-Isomere; MRM-Modus: Übergang m/z 329/127 und m/z 329/129. TriHOME: Trihydroxyoctadecensäure, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis, MRM: *multiple reaction monitoring*

Zusätzlich zu den TriHOMEs wurden Signale des Masse-zu-Ladungsverhältnisses m/z 331 detektiert, welche Präkursorionen der TriHODA darstellen könnten. Das Signal bei $R_t = 28,7$ min (Abb. 52 und Abb. 53) konnte anhand der Fragmentierung zugeordnet werden. Analog zu den TriHOME-Isomeren, wurde die Produktion mit m/z 313 einer Wasserabspaltung an der Carboxylgruppe zugeordnet. Die Produktion des m/z 127 weist auf die Hydroxygruppenposition C(9) und C(10) hin. Die Position der dritten Gruppe konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Ausgehend von den TriHOME-Isomeren kann anhand der natürlicherweise vorkommenden Isomere von C(13) ausgegangen werden [Chen *et al.*, 2016], doch andere Positionen wie bspw. C(18) sind möglich [Bhunia *et al.*, 2018].

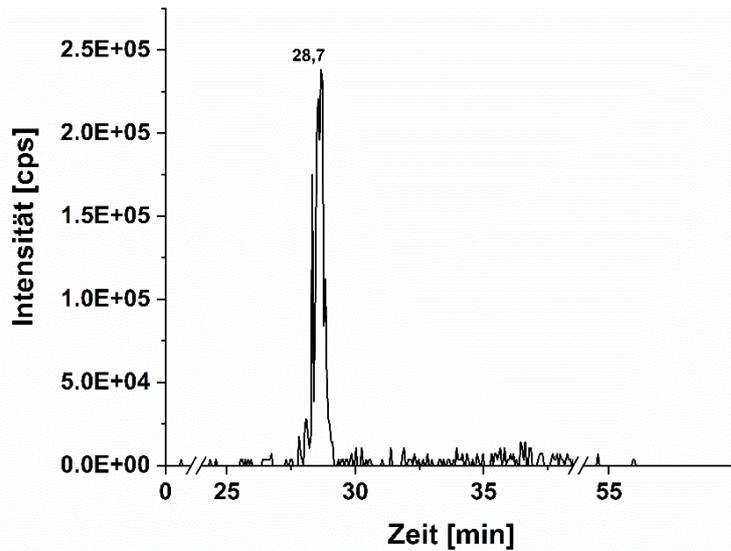


Abb. 52: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F16 mit Ionenspur m/z 331; identifiziert als TriHODA; Signal bei $R_t = 28,7$ min. TriHODA: Trihydroxyoctadecansäure

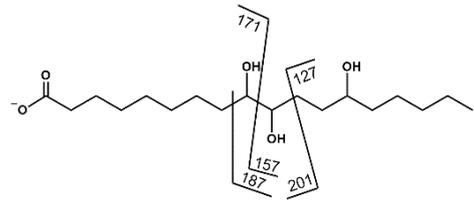
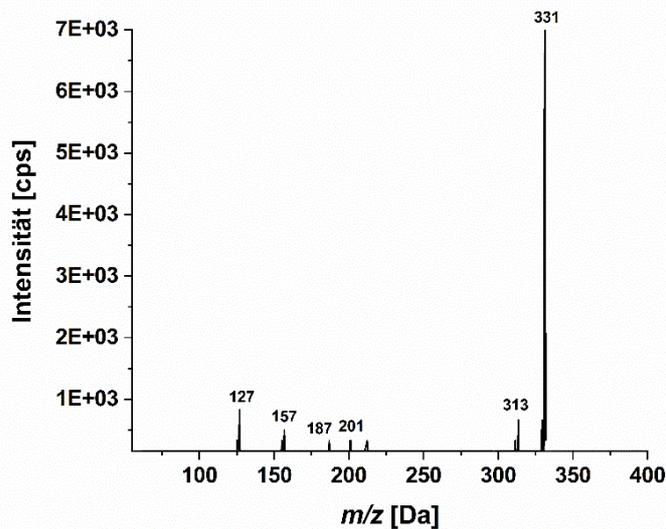


Abb. 53: ESI-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 331 des Signals bei $R_t = 28,7$ min. m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis

4.4.3 Einfluss der F-Fractionen auf α -Glucosidase

Die erhaltenen F-Fractionen wurden bei ausreichender Ausbeute im zellfreien *in vitro*- α -Glucosidase-Inhibitionsassay auf ihr inhibitorisches Potential untersucht, um Rückschlüsse auf den Beitrag der DiFAs in den hemmenden HE- und HA-Extrakten zu ermöglichen (vgl. Kapitel 4.1.). Entsprechende Zusammenhänge werden in Kapitel 5 im Detail diskutiert.

So wurden 32 der 37 Fraktionen mit Ausnahme von F15, F17, F21, F24, F25 im Inhibitionsassay untersucht ($n=2-4$) und anhand ihrer Inhibition in drei Kategorien (s. Tab. 5) unterteilt. In der höchsten untersuchten Konzentration (210 $\mu\text{g}/\text{mL}$) wiesen 20 von 32 Fraktionen keinen bis schwach inhibierenden Effekt ($< 10\%$ Inhibition) auf das Enzym und acht von 32 Fraktionen inhibierten die α -Glucosidase moderat (10–40%). Vier Fraktionen erwiesen sich als potente

Inhibitoren (Inhibition > 40 %), wobei aufgrund geringer Ausbeute der Fraktionen nur für F26 ein IC₅₀-Wert von 118,6 ± 9,6 µg/mL bestimmt werden konnte.

Alle starken Inhibitoren enthielten als Inhaltsstoffe Oxylipine sowie fast alle die nicht identifizierte Substanz des *m/z* 723,5, welche aufgrund ihres Auftretens in zahlreichen Fraktionen und, unabhängig der chromatographischen präparativen Trennungen, als Artefakt während des Lyophilisierungsprozesses angenommen wurde. Da die Struktur des *m/z* im Rahmen der Arbeit nicht aufgeklärt werden konnte, sind Rückschlüsse hinsichtlich dessen inhibitorischen Potentials schwierig.

Zusätzlich waren in F18–F20 je eine DiFA (8-O-4'-Isomer in F18 und F19, 8-5'-Isomer in F20) enthalten (vgl. S. 133 Tab. 4). Allerdings waren die genannten Inhaltsstoffe (Oxylipine, DiFAs sowie die unidentifizierte Struktur mit *m/z* 723,5) auch in anderen Fraktionen enthalten, welche sich nicht als effektive Inhibitoren erwiesen. Da keine Quantifizierung der einzelnen Inhaltsstoffe in den Fraktionen vorgenommen werden konnte, ist eine Korrelation der Ergebnisse mit enthaltenen Inhaltsstoffen und deren Gehalte nicht möglich. Daher konnte(n) die aktive(n) Komponente(n) nicht identifiziert werden. Möglicherweise sollte in Betracht gezogen werden, dass hohe Gehalte an Lipiden auch zu Denaturierung von Proteinen führen können, was für Proteine aus Ei durch Fettsäuren bereits beschrieben ist [Bull und Breese, 1967]. Auch eine Denaturierung der Enzyme würde im Inhibitionsassay zu einer Aktivitätsminderung führen, welche jedoch nicht auf eine Inhibition zurückgeführt wird. So führten Lipid-Hydroperoxide bzw. deren reaktive Radikale zu Enzym-Inaktivierung (bspw. Lactat-Dehydrogenase) [Chiba und Iwata, 2002]. Da in den Fraktionen oftmals Oxylipine nachgewiesen wurden, kann der inhibierende Effekt auch auf diese zurückgeführt werden.

Tab. 5: F-Fraktionen im α -Glucosidase-Inhibitionsassay kategorisiert nach ihrer prozentualen Inhibition in höchster untersuchter Konzentration von 210 µg/mL.

| Kategorie | Inhibitionsstärke [%] | Fraktion |
|-----------------------|-----------------------|--|
| kein Effekt - schwach | < 10 | F1–F3, F6–F9, F12–F14, F22, F23, F28, F30, F31, F33, F35–F37 |
| moderat | 10-40 | F4, F5, F10, F16, F27, F29, F32, F34 |
| stark | > 40 | F18–F20, F26 |

4.4.4 Einfluss der F-Fraktionen auf GP α

Einige der erhaltenen F-Fraktionen wurden im zellfreien *in vitro*-GP α -Inhibitionsassay auf ihr inhibitorisches Potential untersucht, um wie zuvor für die α -Glucosidase Rückschlüsse auf den Beitrag der DiFAs in den inhibitorisch wirksamen HE- und HA-Extrakten zu ermöglichen. Die Zusammenhänge werden in Kapitel 5 diskutiert.

Insgesamt konnten nur 24 der 37 Fraktionen (ohne F11–F13, F15, F17, F18, F20, F21, F24–F26, F32, F34) eingesetzt werden (n=2–3). Die Menge an Fraktionen war stark limitiert, sodass bei diesen Ergebnissen von einem ersten Screening gesprochen wird. Als höchste Konzentration wurde 174 µg/mL verwendet, mit Ausnahme von F7, F10 und F22, welche in einer Konzentration von 87 µg/mL untersucht wurden. Dies war ebenfalls der geringen Ausbeute geschuldet. Unter Anwendung der wie bei dem α -Glucosidase-Inhibitionsassay betrachteten

Kategorisierung nach Inhibitionsstärke ergab sich die folgende Verteilung: lediglich eine Fraktion (F23) zeigte keinen Effekt auf GP α , drei Fraktionen inhibierten das Enzym moderat und die restlichen 20 F-Fraktionen waren starke Inhibitoren (s. Tab. 6).

Tab. 6: F-Fraktionen im GP α - Inhibitionsassay kategorisiert nach ihrer prozentualen Inhibition in höchster untersuchter Konzentration von 174 bzw. 87 $\mu\text{g}/\text{mL}$

| Kategorie | Inhibitionsstärke [%] | Fraktion |
|-----------------------|-----------------------|--|
| kein Effekt – schwach | < 10 | F23 |
| moderat | 10-40 | F10, F22, F29 |
| stark | > 40 | F1-F9, F14, F16, F19, F27, F28, F30, F31, F33, F35–F37 |

Für 18 der starken Inhibitoren wurden IC₅₀-Werte bestimmt, welche im Bereich von $2,5 \pm 0,8$ – $193,5 \pm 16,2$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Abb. 54) lagen, wobei die PK Koffein mit einem IC₅₀-Wert von $124,3 \pm 10,6$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ im mittleren Bereich eingeordnet wurde. Hinsichtlich der in den Fraktionen enthaltenen Inhaltsstoffe ergab sich die gleiche Schwierigkeit, wie auch für die Korrelation der Ergebnisse im α -Glucosidase-Inhibitionsassay. Da keine quantitativen Daten zu den Inhaltsstoffen vorliegen, ist eine eindeutig Korrelation schwierig. In den beiden aktivsten Fraktionen F14 und F16 wurden Oxylipine detektiert (vgl. S. 133 Tab. 4), was jedoch auch für einige andere Fraktionen zutrifft. Jedoch konnten in F16 zusätzlich eine DiFA ($R_t = 32,4$ min) sowie zwei TriFAs ($R_t = 35,1$ und $40,5$ min) identifiziert werden, welche in anderen Fraktionen nicht nachgewiesen wurden. Lediglich die TriFA bei $R_t = 35,1$ min war ebenfalls in F14, der zweitaktivsten Fraktion, enthalten. Dies könnten Hinweise auf eine inhibitorische Wirkung der TriFAs sein. F28 als drittaktivste Fraktion, die neben der DiFA ($R_t = 14$ min) auch in F16 zu finden war, enthielt zwei TriFAs ($R_t = 21,7$ und $23,6$ min), was den postulierten Zusammenhang stützt. Weitere TriFAs konnten in F7 und F27 nachgewiesen werden. Für letztere wurde eine starke Inhibition mit einem IC₅₀-Wert von $81,0 \pm 16,1$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ beobachtet. F7 wurde in die Kategorie starker Inhibitoren eingruppiert, da eine Konzentration von 87 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zu 45 % Inhibition führte. Demnach kann ein IC₅₀-Wert in einem ähnlichen Bereich geschätzt, jedoch aufgrund limitierter Menge nicht bestimmt werden. In den Fraktionen F2–F9 sowie F36 und F37 konnten keine Oxylipine nachgewiesen werden und lediglich verschiedene Hydroxymizsäurederivate, Azelainsäure sowie die unidentifizierten Substanzen mit m/z 357, 409 und 723,5 waren enthalten. Jedoch korrelierte keiner der Inhaltsstoffe eindeutig mit einem Inhibitionspotential. Die Untersuchung der Reinsubstanzen FA, *p*CA und Azelainsäure (s. Kapitel 4.5.) könnte die Aufklärung der aktiven Komponenten unterstützen. Die verbliebenen aktiven Fraktionen F30, 31, 33 und 35 enthielten vermehrt Oxylipine, die unidentifizierte Substanz m/z 723,5 und nur wenige verschiedene FA-Derivate sowie diese in geringer Signalintensität. Die vier Fraktionen lagen jedoch im weniger aktiven Bereich (IC₅₀-Werte von ca. 100–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) als bspw. die TriFA-enthaltenden Fraktionen (IC₅₀-Werte < 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

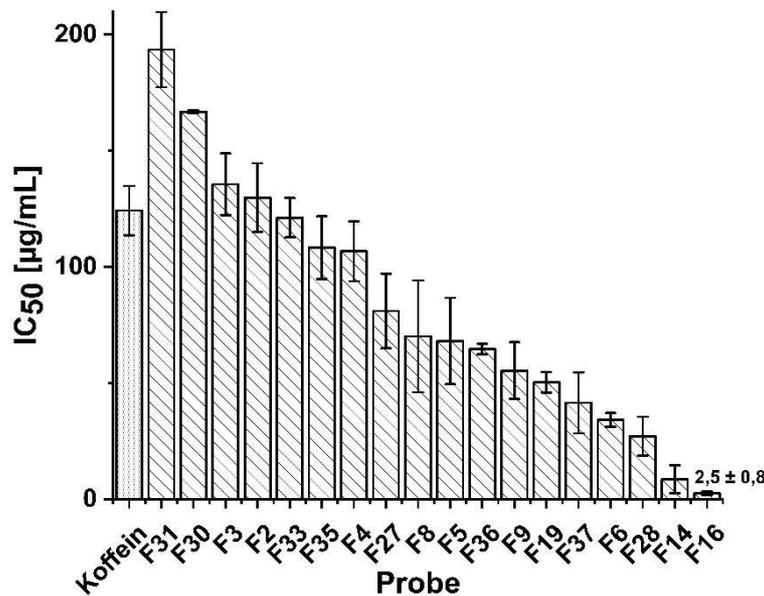


Abb. 54: IC₅₀-Werte der F-Fractionen mit zunehmender Inhibitionsstärke sowie der PK Koffein im GPα-Inhibitionsassay; Werte dargestellt als Mittelwert aus zwei–drei Experimenten (n=2–3) für die F-Fractionen ± SD oder ± SE bzw. 23 Experimenten für Koffein ± SD. GPα: Glykogenphosphorylase α, IC₅₀: inhibitory concentration 50 %, PK: Positivkontrolle, SD: standard deviation

Anhand der vorliegenden Daten, welche auf einer Identifikation enthaltener Inhaltsstoffe mit einer HPLC-ESI-MS-Methode ohne Quantifizierung basierten, ist eine eindeutige Korrelation der Inhaltsstoffe der Fractionen mit den Ergebnissen im Enzyminhibitionsassay nicht möglich. Zudem sind die Ergebnisse als Screening zu betrachten, da für die meisten Untersuchungen lediglich zwei unabhängige Experimente durchgeführt werden konnten. Auch konnten 13 Fractionen nicht analysiert werden. Ein möglicher Zusammenhang mit enthaltenen TriFAs konnte beobachtet werden, muss jedoch in zielgerichteten weiterführenden Studien untersucht werden. So ist eine erneute Isolierung in größerem Maßstab oder die Synthese von TriFAs als Reinsubstanzen zur Verifizierung der Ergebnisse bzw. Prüfung der Hypothesen notwendig.

4.5 Untersuchung ausgewählter Reinsubstanzen auf Enzyme des Glucosstoffwechsels

Als weitere Folgeuntersuchungen zu Identifikation der aktiven Komponenten in den Extrakten, sollten die detektierten Inhaltsstoffe als Reinsubstanzen in den *in vitro*-Enzyminhibitionsassays untersucht werden. Hierbei wurde sich beschränkt auf die Enzyme α-Glucosidase und GPα, bei welchen eine potente Inhibition durch die Extrakte beobachtet wurde. Da weder FA-Oligomere noch Hordatine kommerziell erhältlich waren, wurden diese wie beschrieben (s. Kapitel 4.3 und 4.4) nach zielgerichteten Isolierungen weiterführend untersucht. Als weitere Komponenten wurden u.a. Tryptophan, (+)-Catechin und Procyanidin B in den A-Extrakten sowie Azelainsäure, Suberinsäure, pCA, FA und CA in HA- und HE-Extrakten nachgewiesen (s. Kapitel 4.2).

Die Reinsubstanzen wurden in einer Konzentration von 210 μM im α -Glucosidase-Inhibitionsassay und 200 μM im GP α -Inhibitionsassay untersucht, wobei sich keine der Reinsubstanzen als starker Inhibitor erwies. Lediglich die beiden Flavonoide Procyanidin B₂ und (+)-Catechin führten zu einer moderaten Inhibition der α -Glucosidase. CA sowie FA inhibierten GP α moderat (Tab. 7).

Tab. 7: Ausgewählte Reinsubstanzen im α -Glucosidase- und GP α - Inhibitionsassay kategorisiert nach ihrer prozentualen Inhibition in höchster untersuchter Konzentration von 210 bzw. 200 μM . GP α : Glykogenphosphorylase α

| Kategorie | Inhibitionsstärke [%] | Substanz in α -Glucosidase-Inhibitionsassay | Substanz in GP α -Inhibitionsassay |
|-----------------------|-----------------------|---|--|
| kein Effekt - schwach | < 10 | Azelain- /Suberinsäure/pCA/ CA/FA, Tryptophan | Azelain- /Suberinsäure/pCA(263 μM), Procyanidin B ₂ , Tryptophan, (+)-Catechin |
| moderat | 10-40 | Procyanidin B ₂ , (+)- Catechin* | CA/FA** |
| stark | > 40 | - | - |

* beide nur Inhibitionsstärke von 11,6 bzw. 11,9 %

** beide nur Inhibitionsstärke von 10,3 bzw. 10,4 %

5 Zusammenfassende Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mittels verschiedener Extraktionsprozesse drei Extraktgruppen – HA, HE, A – aus drei verschiedenen BSGs hergestellt (vgl. Publikation 1 in 4.1; [Becker *et al.*, 2021]). Extrahiert wurden mittels ultraschallunterstützter alkalischer Hydrolysen mit Natronlauge, SLE mit wässrigem Aceton (60 %) sowie Kombinationen der beiden Methoden. Im Anschluss erfolgten verschiedene Aufreinigungsschritte wie die Extraktion mit EtOAc für die Extrakte aus alkalischem Aufschluss oder SPEs mit C18-Material für alle Extrakte. Die Bandbreite an verwendeten Methoden führte zu deutlichen Unterschieden hinsichtlich der Zusammensetzung der drei Extraktgruppen, was bereits bei der Bestimmung des TPC und TFC deutlich wurde. So wiesen die HE-Extrakte (alkalischer Aufschluss gefolgt von EtOAc-Extraktion und SPE) signifikant höhere TPCs als die A- (SLE und SPE) wie HA-Extrakte (SLE der festen Überreste aus alkalischem Aufschluss gefolgt von SPE) auf, was sich ähnlich für die jeweiligen TFCs darstellte. Für vereinzelte Extrakte (A1–A3, A6, HA1–HA2) konnte der TFC nicht detektiert werden, jedoch waren diese in HE-Extrakten tendenziell höher als für die A- und HA- Extrakte. Ähnliche Ergebnisse zeigten Stefanello *et al.* oder Birsan *et al.* [Stefanello *et al.*, 2018; Birsan *et al.*, 2019]. Im Anschluss an die Analyse der Extrakte hinsichtlich des TPCs und TFCs wurden diese auf ihr inhibitorisches Potential gegenüber vier verschiedenen Enzymen des Glucosestoffwechsels (α -Glucosidase, α -Amylase, DPP IV und GP α) untersucht. Hierbei erwiesen sich v.a. die A-Extrakte als potente Inhibitoren der α -Glucosidase und GP α . GP α wurde zusätzlich durch einige HE- wie auch HA-Extrakte stark inhibiert. Der Großteil der Extrakte hemmte DPP IV, wobei die Inhibitionsstärke im Vergleich zur PK Sitagliptin, einem eingesetzten Diabetes-Medikament, um den Faktor 10^6 geringer war. Daher wurde die DPP IV-Inhibition im Rahmen der Arbeit nicht verfolgt. Gegenüber α -Amylase konnte keine Hemmung durch die Extrakte beobachtet werden. Die Ergebnisse in den vier verschiedenen *in vitro*-Inhibitionsassays konnten nicht mit den detektierten TPCs oder TFCs korreliert werden. Die HE-Extrakte wiesen signifikant höhere TPCs und TFCs (mit Ausnahme von HE5) als die A-Extrakte auf, während sie gleichzeitig tendenziell schwächere α -Glucosidase- und GP α -Inhibitoren als die meisten A-Extrakte waren, was den Zusammenhang hoher TPC mit geringer Inhibitionsstärke implizierte. HE4 und HE5 hingegen inhibierten α -Glucosidase stärker als Extrakt A6 sowie letzterer zusätzlich stärker als A3. HE5 inhibierte GP α im gleichen Ausmaß wie die A-Extrakte. Innerhalb der A-Extrakte waren A5 und A7 die Extrakte mit höherem TPC und TFC wie auch gleichzeitig stärkerem Inhibitionspotential gegenüber α -Glucosidase und GP α . Die letztgenannten Zusammenhänge implizierten eine gegenteilige Korrelation. Dies deutet darauf hin, dass entweder eine andere Substanzklasse als Polyphenole oder nur ausgewählte Einzelsubstanzen für die Hemmung verantwortlich waren. Aus diesem Grund wurden weitere Untersuchungen mittels HPLC-DAD und HPLC-MS/MS durchgeführt, welche die Identifikation einzelner Substanzen in den Extrakten ermöglichte. So sollten die Leitsubstanzen identifiziert und diese in Relation zu dem Inhibitionspotential gegenüber den untersuchten Enzymen des Glucosestoffwechsels gesetzt werden.

Aufgrund der Extraktionsmethodiken und bekannter Literatur wurde erwartet, dass die Extrakte aus alkalischem Aufschluss (v.a. **HE** aber auch **HA**), größtenteils **Hydroxycimtsäurederivate**, den **gebundenen Polyphenolen** zugehörig, und die **A-Extrakte**

vorwiegend die **frei vorliegenden Polyphenole** enthielten. HCAs, v.a. FA, die in Pflanzenzellwänden die Verlinkungsstrukturen innerhalb der Arabinoxylane darstellen, zählen zu den gebundenen Polyphenolen und können durch alkalische Hydrolyse oder enzymatische Vorbehandlungen freigesetzt werden. Die genannten Methoden wurden für BSG schon vielfach angewandt [Stefanello *et al.*, 2018; Hernanz *et al.*, 2001; Verni *et al.*, 2020; Birsan *et al.*, 2019; Ideia *et al.*, 2020]. Als freie Polyphenole konnten in BSG-Extrakten aus SLE bislang neben geringeren Mengen an HCAs [Birsan *et al.*, 2019; Alonso-Riaño *et al.*, 2020] Flavonoide wie Catechine [Bonifácio-Lopes *et al.*, 2020] oder Proanthocyanidine [Martín-García *et al.*, 2019] nachgewiesen werden. Es wird unterschieden zwischen freien (extrahierbar mittels SLE) und gebundenen Polyphenolen (extrahierbar durch alkalischen Aufschluss oder enzymatische Behandlung). Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten HPLC-DAD und HPLC-MS/MS-Untersuchungen bestätigten die unterschiedliche Zusammensetzung der Extraktgruppen hinsichtlich ausgewählter Substanzklassen (vgl. Publikation 2).

5.1 A-Extrakte: Korrelation der Inhaltsstoffe mit der Enzyminhibition

In den A-Extrakten der vorliegenden Arbeit wurden keine HCAs detektiert. Allerdings waren in vereinzelt A-Extrakten (A1, A2, A4 und A5) Tryptophan, in fast allen A-Extrakten (außer A1 und A3) (+)-Catechin sowie in A2 und A4 ein Procyanidin B enthalten. Sowohl die beiden Polyphenole Procyanidin B₂ und (+)-Catechin als auch die Aminosäure Tryptophan wurden als Reinsubstanz im α -Glucosidase und GP α -Inhibitionsassay untersucht, um ihren Einfluss am hemmenden Potential der Extrakte festzustellen (s. Kapitel 4.5). Keine der drei Substanzen führte zu einer Inhibition der GP α . Gegenüber der α -Glucosidase konnte nur eine moderate Hemmung durch Procyanidin B₂ und (+)-Catechin beobachtet werden. Zu beiden Substanzen, gibt es ambivalente Literaturdaten hinsichtlich einer Inhibition der α -Glucosidase [Bräunlich *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014; You *et al.*, 2012]. You *et al.* bestimmten einen IC₅₀-Wert von ca. 3450 μ M für (+)-Catechin, was deutlich über der hier untersuchten Konzentration von ca. 210 μ M lag. Kamiyama *et al.* beobachteten keine inhibitorische Wirkung auf α -Glucosidase durch Catechin [Kamiyama *et al.*, 2010]. Hinsichtlich einer Inhibition der GP α weisen Studien daraufhin, dass Catechin keine hemmende Wirkung aufweist sondern eher die größeren Epigallocatechingallate [Jakobs *et al.*, 2006; Kamiyama *et al.*, 2010]. IC₅₀-Werte in Enzyminhibitionsassays sind aufgrund der variierenden Methodik schwer zu vergleichen. Da die Reinsubstanzen jedoch mittels der im Rahmen der Arbeit eingesetzten Methodik keinen inhibitorischen Effekt zeigten, wurden sie als aktive Komponenten des Extraktes ausgeschlossen. Insgesamt waren in den A-Extrakten vorrangig geringe Mengen an Polyphenolen enthalten, weshalb andere Inhaltsstoffe in den Fokus rückten.

Als weitere große Substanzklasse wurden verschiedene Lipide wie Lyso-Phosphatidylethanolamine und verschiedene Oxylipine wie TriHOME und TriHODA detektiert. Studien zu deren Beeinflussung des Glucosestoffwechsels sind bislang nicht beschrieben, lediglich (monohydroxylierte) Fettsäuren wurden untersucht. So zeigten Paul *et al.*, dass 10-Hydroxyoctadecensäure ein potenter Inhibitor der α -Glucosidase ist [Paul *et al.*, 2010]. Weiterhin erwiesen sich *Cuscuta reflexa* (Riesendodder) Extrakte, welche u.a. Ölsäure und 9,12,13-Trihydroxyoctadecensäure enthielten, als potente α -Glucosidase-Inhibitoren [Nadeem *et al.*, 2020], was den in den A-Extrakten enthaltenen Trihydroxyfettsäuren eine mögliche Rolle als aktive Komponente zukommen lässt.

Als charakteristische Leitsubstanzen wurde schließlich die Substanzklasse der Phenolamide nachgewiesen. Spezifisch für Gerste sind hier die Hordatine, welche neben vereinzelt Spermidinen sowie den biosynthetischen Vorläufern der Hordatine (HCAAs) am deutlichsten vertreten waren. Da die Signalintensitäten der Hordatine im Zuge der massenspektrometrischen Analyse zur Aufklärung der Inhaltsstoffe der Extrakte zu den intensivsten gehörten, wurden sie als Hauptinhaltsstoffe vermutet und im weiteren Verlauf näher untersucht. Aufgrund nicht kommerziell erhältlicher Referenzsubstanzen wurden die Hordatine als *p*CA-Äq nach einer Methode modifiziert nach Philava *et al.* semiquantitativ bestimmt und mit $14,2 \pm 0,5$ bis $172,2 \pm 2,1$ $\mu\text{g pCA-Äq/mg}$ Extrakt erfasst. Dies entspricht zwischen 1,2 und 17,2 % des Gesamtextraktes, was zumindest bei den Extrakten aus dem zweiten Extraktionsprozess (A4–A7) einem relativ großen Anteil entspricht. Daher wurde ein Zusammenhang mit dem inhibitorischen Potential des Extraktes untersucht (s. Tab. 8). Mittels Rangkorrelation nach Kendall (vgl. Kapitel 8.6.4.1) wurde der bestimmte Hordatingehalt mit der Inhibitionsstärke bzw. dem IC_{50} -Wert im α -Glucosidase und $\text{GP}\alpha$ -Inhibitionsassay analysiert. Die Korrelationskoeffizienten lagen bei $-0,49$ für die $\text{GP}\alpha$ - bzw. $-0,52$ für die Korrelation der α -Glucosidaseinhibition mit dem Hordatingehalt. Nach Cohen [Cohen, 2013] wird bei einem Wert zwischen $0,3$ – $0,5$ von einer mittleren Korrelation gesprochen. Die Ergebnisse wurden daher als ersten Hinweis auf die Korrelation eines hohen Hordatingehaltes mit einem niedrigen IC_{50} -Wert betrachtet, weshalb sich im Folgenden im Zuge einer Isolierung auf die Hordatine fokussiert wurde.

Tab. 8: Hordatingehalte und Ergebnisse der $\text{GP}\alpha$ - und α -Glucosidaseinhibition im Vergleich sowie zugehöriger Rangkorrelationskoeffizient nach Kendall der Extrakte (A1–A7). $\text{GP}\alpha$: Glykogenphosphorylase α . IC_{50} : inhibitory concentration 50 %, SD: standard deviation, *p*CA-Äq: *p*-Coumarsäure-Äquivalente

| A-Extrakt | Gesamthordatingehalt [$\mu\text{g pCA-Äq/ mg}$ Extrakt] \pm SD | IC_{50} -Wert [$\mu\text{g/mL}$] \pm SD α -Glucosidase | IC_{50} -Wert [$\mu\text{g/mL}$] \pm SD $\text{GP}\alpha$ |
|--------------------------------|---|--|--|
| A1 | $14,23 \pm 0,52$ | - | - |
| A2 | $55,95 \pm 7,03$ | $119,44 \pm 23,21$ | - |
| A3 | $36,06 \pm 0,28$ | $128,16 \pm 37,95$ | $39 \pm 9,8$ |
| A4 | $86,07 \pm 4,67$ | $82,62 \pm 23,81$ | $59 \pm 5,5$ |
| A5 | $112,23 \pm 12,13$ | $67,39 \pm 8,11$ | $12,6 \pm 1,1$ |
| A6 | $107,51 \pm 1,43$ | $268,11 \pm 29,37$ | $76,3 \pm 6,1$ |
| A7 | $172,22 \pm 2,09$ | $94,06 \pm 6,25$ | $15,7 \pm 2,8$ |
| Korrelationskoeffizient | | $-0,52$ | $-0,49$ |

5.2 Hordatinreiche Fraktionen: Rückschlüsse auf Hordatine als biologisch aktive Komponenten in A-Extrakten

Aufgrund der geringen Extraktausbeute konnte keine aktivitätsgeleitete Fraktionierung durchgeführt werden. Die als aktive Komponenten vermuteten Hordatine wurden daher separat mittels gezielter Isolierung aus BSG gewonnen (Kapitel 4.3.; [Becker *et al.*, 2022a]). Insgesamt konnten zehn Fraktionen mit unterschiedlicher Hordatinzusammensetzung und -menge isoliert werden. Dabei erwies sich die Auftrennung durch das Vorliegen von insgesamt

71 verschiedenen Hordatinen als sehr komplex und lediglich eine Auftrennung in die unterschiedlichen Gruppen (Hordatin-Hexoside sowie die natürlichen und die hydroxylierten Aglykone) wurde erzielt. Der Gesamthordatingehalt der Fraktionen lag mit $303,6 \pm 15,3$ bis $1298,1 \pm 30,4 \mu\text{g } p\text{CA-}\ddot{\text{A}}\text{q/mg}$ Fraktion deutlich über dem der Extrakte (vgl. Tab. 8). Es verdeutlicht die Notwendigkeit eine Referenzsubstanz zu verwenden, da die Verrechnung mit dem Korrekturfaktor von 5 aus der Literatur [Pihlava *et al.*, 2016] zu unrealistisch hohen Werten führt. Zur Vergleichbarkeit mit den Hordatingehalten der A-Extrakte sowie den Literaturdaten von Pihlava *et al.* wurde der Korrekturfaktor trotzdem miteinbezogen. Zur Untersuchung der biologischen Aktivität wurden die Fraktionen im GP α - und α -Glucosidase-Inhibitionsassay untersucht, wobei lediglich in letzterem ein hemmender Effekt durch Fraktion 5 und Fraktion 8 beobachtet werden konnte. Fraktion 5 wies einen IC₅₀-Wert von $194,1 \pm 1,8 \mu\text{g/mL}$ auf und war reich an Hordatin-Hexosiden mit einem Gesamthordatingehalt von $532,3 \pm 2,5 \mu\text{g } p\text{CA-}\ddot{\text{A}}\text{q/mg}$ Fraktion. Fraktion 8 war charakterisiert durch das Vorhandensein des Vorläufers *N*-Coumaroylagmatin und einem niedrigen Gesamthordatingehalt von nur $325,3 \pm 23,5 \mu\text{g } p\text{CA-}\ddot{\text{A}}\text{q/mg}$ Fraktion, erwies sich jedoch mit einem IC₅₀-Wert von $78,2 \pm 4,6 \mu\text{g/mL}$ als potentester Inhibitor der α -Glucosidase. Die hordatinreichsten Fraktionen (H9 und H10) hemmten lediglich moderat bzw. schwach, wohingegen H8 mit einer sehr geringen Konzentration an Hordatinen zu einer stärkeren Hemmung als die PK Acarbose mit einem IC₅₀-Wert von $116,1 \pm 1,8 \mu\text{g/mL}$ führte. Demnach war nicht der Gesamthordatingehalt ausschlaggebend für die Intensität der Hemmung. Die Untersuchung der H-Fraktionen lieferte wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der biologischen Wirkungen der Hordatine. So lag die Inhibition durch die H-Fraktionen in einer ähnlichen Range wie die der A-Extrakte (vgl. Kapitel 4.1) mit IC₅₀-Werten von $67,4 \pm 8,1$ bis $268,1 \pm 29,4 \mu\text{g/mL}$. Anhand der folgenden Überlegungen zeigte sich, dass vermutlich weitere Inhaltsstoffe der A-Extrakte zur Inhibition beitrugen. Um die Hypothese, dass nicht der Gesamthordatingehalt relevant ist, zu prüfen, kann bestimmt werden, welcher Hordatinkonzentration der jeweilige IC₅₀-Wert im α -Glucosidase-Inhibitionsassay entspricht. Durch Multiplikation des IC₅₀-Wertes mit dem Gesamthordatingehalt der Fraktion bzw. des Extraktes kann theoretisch berechnet werden, welche Hordatinmenge zu 50 % Inhibition führte, unter der Annahme, dass nur die Hordatine für die Wirkung verantwortlich waren. Für die beiden potenten H-Fraktionen entsprach der jeweilige IC₅₀-Wert einem Gesamthordatingehalt von $25,4 \pm 1,8$ (H8) bzw. $103,3 \pm 0,5$ (H5) $\mu\text{g } p\text{CA-}\ddot{\text{A}}\text{q/mL}$. Im Vergleich dazu lagen die Gesamthordatingehalte für die IC₅₀-Werte der A-Extrakte zwischen $4,0 \pm 0,03$ (A3) und $28,8 \pm 0,4$ (A6) $\mu\text{g } p\text{CA-}\ddot{\text{A}}\text{q/mL}$. Demnach wäre eine bedeutend geringere Gesamthordatinmenge bei den Extrakten ausreichend für eine vergleichbare Inhibitionsstärke. Aufgrund der Fraktionierung im Zuge der Isolierung wurden die einzelnen Hordatine in den Fraktionen im Vergleich zu den Extrakten aufkonzentriert. Daher müssen die anhand der H-Fraktionen 5 und 8 vermuteten aktiven Komponenten Hordatin-Hexoside sowie *N*-Coumaroylagmatin in den Extrakten geringer konzentriert als in den Fraktionen vorliegen. Zudem war der Vorläufer *N*-Coumaroylagmatin in den aktiven Extrakten A3, A6 und A7 nicht nachgewiesen worden. Lediglich Hordatin-Hexoside waren in allen A-Extrakten enthalten. Daher lässt sich zusammenfassen, dass Hordatine einen inhibierenden Effekt auf α -Glucosidase haben, jedoch die Hemmung durch die A-Extrakte zusätzlich durch weitere Inhaltsstoffe ausgelöst worden sein müsste. Möglicherweise tragen die enthaltenen Oxylipine

zur Inhibition bei. Weiterhin könnten bislang nicht identifizierte Komponenten oder nicht detektierbare Substanzen für die Inhibition verantwortlich sein. Synergistische Effekte sind nicht auszuschließen und möglicherweise ist die Zusammensetzung der Hordatine relevant für die Inhibition. Eindeutige Aussagen lassen sich hier jedoch nur mit Reinsubstanzen treffen, weshalb die Isolierung mit einer feineren Fraktionierung oder eine Synthese einzelner Hordatine zielführend wäre.

Hinsichtlich der GP α konnten die Ergebnisse zeigen, dass die Hordatine nicht zur Inhibition des Enzyms beitragen. Keine der untersuchten Fraktionen führte zu einer potenten Inhibition. Zusätzlich deutete die Berechnung des Gesamthordatingehaltes der IC₅₀-Werte darauf hin. Diese lagen für die inhibierenden A-Extrakte zwischen $1,4 \pm 0,01$ bis $8,2 \pm 0,1$ $\mu\text{g } p\text{CA-Äq/mL}$ und waren damit nochmals niedriger als jene für die α -Glucosidase. Wären die Hordatine die aktiven Komponenten hinsichtlich der GP α , so erscheint es unwahrscheinlich, dass keine der untersuchten H-Fraktionen inhibierende Effekte aufwies. Einzig synergistische Effekte bzw. die Zusammensetzung der Hordatine könnten für die Inhibition relevant sein. Dies konnte jedoch mit den aufkonzentrierten und in Hordatin-Gruppen separierte Fraktionen nicht untersucht werden. Wahrscheinlicher erscheint, dass die GP α -hemmende Wirkung der Extrakte auf anderen Inhaltsstoffen beruht, deren Struktur aufgrund der zahlreichen möglichen Bindungsstellen am Enzym sehr vielfältig sein können [Hayes *et al.*, 2014].

5.3 HE- und HA-Extrakte: Korrelation der Inhaltsstoffe mit der Enzyminhibition

Im Gegensatz zu den mittels reiner SLE mit wässrigem Aceton (60 % Aceton-Anteil) gewonnenen A-Extrakten enthielten die HA- und HE-Extrakte keine Flavonoide, sondern v.a. Hydroxymitsäurederivate sowie Oxylipine und verschiedene Dicarbonsäuren, wie Azelain- und Suberinsäure. Zur Identifikation der aktiven Komponenten wurden einige der Inhaltsstoffe als Reinsubstanzen in den Enzyminhibitionsassays untersucht. Allerdings inhibierten weder die drei HCAs *p*CA, FA und CA noch die beiden Dicarbonsäuren die α -Glucosidase, sodass der hemmende Effekt der Extrakte HE4 und HE5 nicht oder zumindest nicht nur durch diese erklärt werden konnte. Hinsichtlich der GP α konnten ähnliche Effekte beobachtet werden. Lediglich CA und FA führten zu einer moderaten Inhibition, jedoch nicht zu einer vergleichbar starken Inhibition wie die Extrakte selbst. Um eine präzisere Aussage über den Einfluss der HCAs auf die beiden Enzyme GP α und α -Glucosidase treffen zu können, wurden die Konzentrationen an FA, *p*CA und CA, welche in der im Enzyminhibitionsassay vermessenen Extraktkonzentration vorlag, berechnet. Diese sind in Tab. 9 dargestellt im Vergleich zu den einzeln vermessenen Reinsubstanzen. Berechnet wurden die vorliegenden Konzentrationen an FA, *p*CA und CA bei der maximal vermessenen Extraktkonzentration von 1,0 (für α -Glucosidase) bzw. 1,05 mg/mL (für GP α) oder am IC₅₀-Wert, sofern dieser im Enzyminhibitionsassay berechnet werden konnte. Der Vergleich der am IC₅₀-Wert vorliegenden Werte für α -Glucosidase zeigt, dass die beiden aktiven Extrakte HE4 und HE5 Gehalte ≤ 210 μM der drei HCAs aufwiesen, wobei diese die maximale im α -Glucosidase-Inhibitionsassay vermessene Konzentration an Reinsubstanzen war und nicht zu einer potenten Inhibition führte. Daher können einzig synergistische Effekte der drei HCAs verantwortlich sein für eine inhibierende Wirkung durch HCAs, was in einem Folgeexperiment

untersucht werden könnte. Da jedoch die anderen Extrakte, v.a. die HE-Extrakte trotz vergleichbar hoher Gehalte an HCAs und einem ähnlichen Verhältnis der drei Komponenten zueinander keinen stark inhibierenden Einfluss zeigten, erschien ein synergistischer Effekt als unwahrscheinlich. Daher wurden die monomeren Hydroxyzimtsäurederivate als aktive Komponenten ausgeschlossen und der Fokus auf die FA-Oligomere gelegt.

Hinsichtlich des Einflusses der HCAs auf die GP α zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Extraktgruppen HE und HA. Obwohl HA1 und HA2 zu den aktivsten Extrakten zählten, wiesen sie deutlich geringere Gehalte an FA und *pCA* als die ebenfalls aktiven HE-Extrakte auf. Zudem waren die Konzentrationen < 200 μ M, was der maximal vermessenen Konzentration an Reinsubstanz im GP α -Inhibitionsassay entsprach. Dies deutete darauf hin, dass andere Komponenten für den hemmenden Effekt verantwortlich waren. Für die HE-Extrakte war dies anhand der in Tab. 9 dargestellten Werte nicht deutlich zu beantworten. Die enthaltenen Konzentrationen lagen v.a. für FA mit ca. 130–300 μ M in einem vergleichbaren Bereich wie die der Reinsubstanz (200 μ M), die bei FA und CA zu einer moderaten Hemmung führte (vgl. S. 162 Tab. 7). Hier sollten demnach synergistische Effekte von bspw. FA und CA genauer betrachtet werden.

Tab. 9: In den Enzyminhibitionsassays untersuchte Konzentrationen der drei HCAs FA, CA und *pCA* berechnet in der maximal vermessenen Extraktkonzentration oder am IC₅₀-Wert sowie im Vergleich zu den einzeln untersuchten Reinsubstanzen. CA: Kaffeesäure, FA: Ferulasäure, GP α : Glykogenphosphorylase α , HCA: Hydroxyzimtsäure, IC₅₀: inhibitory concentration 50 %, *pCA*: *p*-Coumarsäure

| | Konzentration [μ M] im α -Glucosidase-Inhibitionsassay | | | Konzentration [μ M] im GP α -Inhibitionsassay | | |
|------------|---|------------------------------|-------------------------------|--|-----------------------------|------------------------------|
| | FA | CA | <i>pCA</i> | FA | CA | <i>pCA</i> |
| FA | 210 ^a | | | 200 ^a | | |
| CA | | 210 ^a | | | 200 ^a | |
| <i>pCA</i> | | | 210 ^a | | | 200 ^a |
| HA1 | 121,9 \pm 6,6 ^a | - | 45,0 \pm 2,1 ^a | 8,3 \pm 0,4 ^b | - | 3,0 \pm 0,1 ^b |
| HA2 | 97,9 \pm 16,9 ^a | - | 43,3 \pm 5,1 ^a | 6,2 \pm 1,1 ^b | - | 2,8 \pm 0,3 ^b |
| HA3 | 103,2 \pm 6,4 ^a | - | 47,2 \pm 1,5 ^a | n.v. | n.v. | n.v. |
| HE1 | 2047,1 \pm 221,8 ^a | 110,7 \pm 4,7 ^a | 270,9 \pm 15,5 ^a | 171,6 \pm 18,6 ^b | 9,3 \pm 0,4 ^b | 22,7 \pm 1,3 ^b |
| HE2 | 1770,4 \pm 53,9 ^a | 114,0 \pm 2,3 ^a | 482,4 \pm 17,6 ^a | 219,7 \pm 6,7 ^b | 14,1 \pm 0,3 ^b | 59,9 \pm 2,2 ^b |
| HE3 | 887,7 \pm 5,4 ^a | 106,8 \pm 4,5 ^a | 310,5 \pm 20,2 ^a | 132,5 \pm 0,8 ^b | 15,9 \pm 0,7 ^b | 46,3 \pm 3,0 ^b |
| HE4 | 237,9 \pm 47,7 ^b | 16,6 \pm 7,1 ^b | 90,9 \pm 2,7 ^b | 297,0 \pm 59,6 ^b | 20,8 \pm 8,8 ^b | 113,5 \pm 3,3 ^b |
| HE5 | 48,3 \pm 0,3 ^b | < LOQ ^b | 18,7 \pm 1,0 ^b | 278,3 \pm 1,5 ^b | < LOQ ^b | 107,8 \pm 6,0 ^b |
| HE6 | 1702,2 \pm 307,3 ^a | 106,9 \pm 9,0 ^a | 607,1 \pm 96,4 ^a | n.v. | n.v. | n.v. |

^a Substanzkonzentration in der maximal vermessenen Extrakt-/Reinsubstanzkonzentration

^b Konzentration am IC₅₀-Wert

n.v. nicht vermessen

Für die Enzymhemmung könnten die FA-Oligomere mitverantwortlich sein, deren Isolierung aus BSG im Anschluss statt einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung und in Ermangelung entsprechender Reinsubstanzen erfolgte. In den HA- und HE-Extrakten konnten verschiedene DiFAs mittels Produktionenscans identifiziert werden, wobei eine größere Anzahl

verschiedener Isomere in den HE- als in den HA-Extrakten vorlag (vgl. Kapitel 4.2). TriFAs konnten in den Extrakten nicht detektiert werden. Möglicherweise war die Konzentration zu gering. Auch Verni *et al.* wiesen ca. siebenfach geringere Gehalte an TriFAs in Vergleich zu DiFAs nach [Verni *et al.*, 2020]. Diese These einer zu geringen Konzentration wird gestützt durch das Vorhandensein einiger TriFAs in den F-Fractionen, welche ebenfalls mittels alkalischen Aufschlusses aus BSG gewonnen wurden (vgl. Kapitel 4.4.). Durch die doppelte Fraktionierung des Rohisolates kann von einer starken Aufkonzentrierung der einzelnen Hydroxymitsäurederivate in den Fraktionen ausgegangen werden.

Wie bei den A-Extrakten sollten weiterhin die Oxylipine als mögliche Inhibitoren nicht außen vor gelassen werden, da Studien von Nadeem *et al.* und Paul *et al.* Effekte von Trihydroxyfettsäuren bzw. Hydroxyfettsäuren auf α -Glucosidase zeigten (vgl. Kapitel 5.1) [Paul *et al.*, 2010; Nadeem *et al.*, 2020].

5.4 F-Fractionen: Rückschlüsse auf FA-Oligomere als aktive Komponenten in den HE- und HA-Extrakten

Nach Analyse der F-Fractionen zeigte sich, dass neben DiFAs und TriFAs weitere Inhaltsstoffe enthalten waren. So fanden sich neben Azelainsäure und einigen nicht identifizierten Komponenten (u.a. vermutlich FA-Derivate) verschiedene TriHOME- und TriHODA-Isomere. Wie für die drei Extraktgruppen (HE, HA, A) diskutiert, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Oxylipine einen Einfluss auf das inhibitorische Potential gegenüber α -Glucosidase und GP α aufweisen. Eine weitere Schwierigkeit ergab sich durch die geringe Ausbeute, die die Anzahl an Untersuchungen limitierte. So konnten die Hydroxymitsäurederivate nicht quantifiziert werden und die Anzahl der Stichproben von $n=2$ in den Enzyminhibitionsassays gleicht einem Screening. Zusätzlich konnten einige F-Fractionen nicht in den Enzyminhibitionsassays untersucht werden. 32 von 37 Fraktionen wurden im α -Glucosidase-Inhibitionsassay bzw. 24 von 37 im GP α -Inhibitionsassay untersucht. Daher war eine direkte Korrelation der Ergebnisse in den Enzyminhibitionsassays der F-Fractionen und Extrakte mit den jeweiligen Gehalten und Inhaltsstoffen bzgl. der Hydroxymitsäurederivate schwierig und wird nur als Trend herangezogen.

Ein Großteil der untersuchten Fraktionen (28 von 32) zeigte keinen bis moderat inhibierenden Effekt auf α -Glucosidase. Lediglich vier Fraktionen erwiesen sich als potente Inhibitoren, welchen gemeinsam war, dass sie keine monomeren HCAs und keine Azelainsäure enthielten. Auch die nicht identifizierten (vermutlichen) FA-Derivate sowie TriFAs wurden nicht in den vier Fraktionen nachgewiesen. Drei der potenten Fraktionen enthielten je eine DiFA, welche jedoch auch in anderen nicht inhibitorischen Fraktionen enthalten war. Zudem waren Oxylipine enthalten, was erneut den Hinweis auf deren hemmende Wirkung lieferte. Weiterhin zeigte sich, dass TriFAs vermutlich keine potenten Inhibitoren der α -Glucosidase sind, da die entsprechenden Fraktionen keinen bis maximal moderaten hemmenden Effekt aufwiesen. Zusammengefasst konnte die Isolierung der FA-Oligomere als erstes Screening keine weiterführenden Hinweise auf die aktiven Komponenten in den Extrakten gegenüber α -Glucosidase liefern. Um festzustellen, inwiefern die HCAs dazu beitragen, bzw. ob die Oxylipine für die Inhibition verantwortlich sind, müsste die Isolierung mit höherer Ausbeute wiederholt werden und eine feinere Fraktionierung zur Abtrennung der Oxylipine erfolgen.

Neben dem α -Glucosidase-Inhibitionsassay wurden die Fraktionen, sofern die Ausbeute ausreichend war, im *in vitro*-GP α -Inhibitionsassay untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen im α -Glucosidase-Inhibitionsassay waren hier größtenteils potente inhibitorisch wirksame Fraktionen bestimmt worden, wobei jedoch eine geringere Anzahl an Fraktionen (24 von 37) analysiert wurde. Eine potente Inhibitionsstärke mit IC₅₀-Werten von $2,5 \pm 0,8$ bis $193,5 \pm 16,2$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ wurde für 18 von 24 Fraktionen bestimmt. Die Inhibition durch einige Fraktionen war damit stärker als die der HE- und HA-Extrakte, welche IC₅₀-Werte von $28,7 \pm 6,1$ bis 261 ± 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aufwiesen. Die biologische Aktivität der F-Fraktionen und der HE- und HA-Extrakte waren hinsichtlich der GP α jedoch vergleichbar. Die aktivsten Fraktionen mit IC₅₀-Werten < 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ enthielten v.a. TriFAs, welche in den HE- und HA-Extrakten nicht detektiert werden konnten. Fraktion F28 und Extrakt HE5 ergaben einen nahezu gleichen IC₅₀-Wert, wobei sich die Übereinstimmung an detektierten Inhaltsstoffen auf das 8-5'-DiFA-Isomer beschränkte. Zwei TriFAs wurden in F28 nachgewiesen, jedoch nicht in den HE-Extrakten. Allerdings war in den vorangeschalteten *full scans* der HE-Extrakte ein *m/z* von 577 beobachtet worden (vgl. elektronischer Anhang Tab. 39 Seite G), was in Produktionsscans nicht bestätigt werden konnte. Wie in Kapitel 5.3 diskutiert, wurde vermutet, dass die Konzentration in den Extrakten zu gering war. Zudem wurden die HE- und HA-Extrakte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mit dem deutlich sensitiveren MS-Gerät auf TriFAs untersucht, was lediglich mit F-Fraktionen durchgeführt wurde. Da die Ergebnisse des GP α -Inhibitionsassays darauf hinweisen, dass v.a. TriFAs für die Inhibition verantwortlich sein könnten, wäre die sensitivere MS-Analytik der HE- und HA-Extrakte ein geeigneter Schritt zur weiteren Überprüfung dieser Hypothese.

Die gegenüber GP α weniger potenten Fraktionen F2–F9 und F36–F37 enthielten mit monomeren HCAs, Azelainsäure sowie den nicht identifizierten Substanzen mit *m/z* 357, 409 und 723,5 und einigen DiFAs größtenteils vergleichbare Inhaltsstoffe wie die Extrakte. Hier fand sich der erste Hinweis, dass die Oxylipine nicht zwangsläufig mit der Inhibition korrelieren, da diese Fraktionen keine TriHOMEs oder TriHODAs enthielten. Durch die Untersuchung der Reinsubstanzen (vgl. Kapitel 4.5) wurde ausgeschlossen, dass der inhibitorische Effekt durch die monomeren HCAs oder Azelainsäure ausgelöst wurde, sofern die Konzentration in den F-Fraktionen < 200 μM war. Es stellt sich hinsichtlich der aktiven Komponenten die Frage nach den nicht identifizierten Substanzen sowie der 8-8'-(Aryltetralin und lineare Form)- / 8-5'- / 5-5'- / 8-O-4'-DiFA und einigen nicht näher spezifizierten DiFAs, welche in den weniger potenten Fraktionen F2-F9 und F36-F37 enthalten waren.

Eine eindeutige Korrelation der GP α -Inhibition durch die F-Fraktionen und der Inhibition durch die HE- und HA-Extrakte mit den jeweiligen Inhaltsstoffen war anhand der Ergebnisse nicht möglich. Um die Aussagekraft zu verbessern, wäre eine Quantifizierung der Hydroxymitsäurederivate in den Fraktionen notwendig. Allerdings können die Ergebnisse der F-Fraktionen aufgrund der geringen Stichprobenzahl nur als Screening betrachtet werden und ein Großteil der Fraktionen konnte aufgrund der geringen Ausbeute nicht vermessen werden. Trotzdem erwiesen sich die TriFA-enthaltenden Fraktionen als sehr aktiv, weshalb das Screening der HE- und HA-Extrakte nach TriFAs an einem sensitiven MS-Gerät weitere Hinweise liefern könnte.

5.5 Methodikbetrachtung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Extraktions- und Isolationsprozesse in Anlehnung an bereits publizierte Studien angewandt. So waren v.a. die SLE mit organischen Lösungsmitteln wie 60 %-igem Aceton sowie alkalische Hydrolysen von BSG häufig zur Extraktion von Polyphenolen eingesetzt worden [Meneses *et al.*, 2013; Verni *et al.*, 2020; Stefanello *et al.*, 2018]. Die Ergebnisse der HPLC-MS/MS-Experimente zeigten, dass die Wahl der Extraktionsmethodik die extrahierten Komponenten aus BSG stark beeinflusste, was aufgrund von Literaturdaten zu erwarten war. HCA waren besonders durch den alkalischen Aufschluss (HE- und HA-Extrakte) freigesetzt und extrahiert worden, Phenolamide mittels SLE mit 60 %-igem Aceton (vgl. Publikation 2 Kapitel 4.2). Zusätzlich zu der allgemeinen Extraktionsmethodik spielen auch die einzelnen Parameter bei den angewandten Extraktionen eine bedeutende Rolle hinsichtlich der Inhaltsstoffe und der Frage möglicher Degradierungen oder Modifikationen während der Isolierung. BSG stellt ein Ausgangsmaterial dar, das durch den durchlaufenen Brauprozess bereits hohen Temperaturen, enzymatischen Reaktionen und wässriger Extraktion ausgesetzt ist [Fischer und Glomb, 2015]. So gehen während des Maischens und Läuterns Polyphenole in die Würze und letztlich in das Bier über, wobei 70–80 % der Polyphenole im Bier aus dem Malz stammen und sich aus phenolischen Säuren und Flavonoiden zusammensetzen [Fernández de Córdova und Medina, 2014]. Die im BSG vorliegenden Polyphenole sind größtenteils in der Zellwandmatrix gebunden und zudem kann von einer guten Hitzestabilität der verbliebenen freien Polyphenole ausgegangen werden. So sind v.a. HCA als quervernetzende Strukturen in den Hemicellulosen verestert [Stefanello *et al.*, 2018], weshalb chemische Vorbehandlungen (alkalische, enzymatische und saure Hydrolysen) sowie mechanische Methoden (Ultraschall, Mikrowellen) oft angewandt werden [Moreira *et al.*, 2012; Alonso-Riaño *et al.*, 2020; Bartolomé *et al.*, 2002; Mussatto *et al.*, 2007a]. Auch Extraktionen unter höherer Temperatur wurden eingesetzt und steigern durch Erhöhung des Diffusionsvermögens und der Löslichkeit die Ausbeute [Birsan *et al.*, 2019]. Die Extraktion von Polyphenolen mittels SLE wird meist bei Temperaturen zwischen 60–80 °C durchgeführt, da Polyphenole hitzelabil sind und thermal degradiert werden könnten. Antony und Farid fassten den Einfluss in einem kürzlich publizierten Review zusammen, wobei v.a. Anthocyane als hitzelabile Komponenten identifiziert wurden. Bei phenolischen Säuren konnte bei geringen Temperaturen, wie hier verwendet, noch kein signifikant negativer Einfluss beobachtet werden [Antony und Farid, 2022]. Im Rahmen der Arbeit wurde nach Meneses *et al.* ein Wasserbad von 60 °C zur SLE mit 60 %-igem Aceton (A-Extrakte) eingesetzt und das Extraktionsmittel unter dem Siedepunkt gehalten, um Verluste an Polyphenolen, wie sie von Palma *et al.* bei MeOH-Extraktion v.a. für Catechine bereits beobachtet wurden, zu verhindern [Palma *et al.*, 2001]. Für die alkalischen Hydrolysen (HA- und HE-Extrakte) wurde auf eine Erhitzung während der Extraktion verzichtet und stattdessen Ultraschall zur Erhöhung der Extraktionseffizienz eingesetzt. Artefaktbildungen im Zuge der Extraktionen können aber bspw. auch durch Sauerstoff oder Licht aufgetreten sein [Antony und Farid, 2022], welche zu Oxidationen geführt haben könnten. Die in allen drei Extraktgruppen detektierten Trihydroxyfettsäuren stellen potenzielle Oxidationsprodukte dar, die in Bier bereits nachgewiesen wurden [Hamberg, 1991] und auch während des Maischeprozesses gebildet werden [Garbe *et al.*, 2005]. Allerdings könnte die deutlich größere Isomerenvielfalt an TriHOME in den HE- und HA-Extrakten gegenüber den A-Extrakten

möglicherweise durch Oxidation während der Extraktion erklärt werden. Aufgrund der im Vergleich zu vielen anderen Studien milden Extraktionsbedingungen wurde jedoch von einem geringen Ausmaß an Artefaktbildung ausgegangen. Zudem könnten entsprechende Strukturen auch während des Brauprozesses entstanden sein und im BSG „natürlich“ vorkommen.

Eine Schwierigkeit der analytischen Fragestellungen ergab sich sowohl für die Extrakte (HA-HE- und A-Extrakte) als auch die beiden Fraktionen (H- und F-Fraktionen) besonders aus der Strukturvielfalt der Phenolamide und der DiFAs, deren vollständige chromatographische Auftrennung im Rahmen der Arbeit nicht umgesetzt werden konnte. Coelutionen vieler Hordatine traten auf, wobei die optimierte Methode (vgl. Kapitel 8.2.9.3) bereits eine signifikante Verbesserung zur ursprünglich eingesetzten Methode zur Identifikation der Polyphenole in Extrakten (vgl. Kapitel 8.2.9.1) darstellte. Die Coelutionen stellten hinsichtlich der Quantifizierung aufgrund des semiquantitativen Charakters kein Problem dar, führten jedoch zu einer unzureichenden Fraktionierung des Hordatinisolates (vgl. Kapitel 8.5). Die erhaltenen zehn H-Fraktionen waren daher Mischungen einzelner Hordatine, was die Interpretation der Ergebnisse in den Enzymassays erschwerte. So konnte final keine Einzelsubstanz als aktive Komponente identifiziert werden. Hinsichtlich der DiFAs war die Auftrennung mit Ausnahme der Coelution der beiden 8-8'-DiFA-Isomere mit FA sowie teilweise der Stereoisomere vollständig. Allerdings konnten auch mit der optimierten Methodik (vgl. Kapitel 8.2.9.2) trotz vorangeschalteter GPC keine reinen DiFAs aus dem FAO-Isolat (vgl. Kapitel 8.4) gewonnen werden und die 37 erhaltenen F-Fraktionen stellen wie zuvor für die H-Fraktionen Mischungen verschiedener DiFAs, TriFAs sowie weiteren Komponenten (vgl. Kapitel 4.4.2) dar. So konnten die Ergebnisse in den Enzyminhibitionsassays keinen Einzelsubstanzen zugeordnet werden. Es kann weiterhin angenommen werden, dass nicht alle in den Extrakten enthaltenen Komponenten erfasst wurden, da lediglich bis zu 17 % A-Extrakt sowie 3 % HA-Extrakt und bis zu 48 % HE-Extrakt des Gesamtextraktes quantifiziert wurden. Einige weitere Substanzen wurden identifiziert (vgl. Publikation 2 Kapitel 4.2) jedoch nicht quantifiziert. Mit Ausnahme der Oxylipine stellten die Signale fernab der HCAs (für HE- und HA-Extrakte) und der Hordatine (A-Extrakte) keine Hauptsignale dar und es erscheint unwahrscheinlich, dass diese Komponenten der fehlenden Menge des Gesamtextraktes entsprechen. Demnach stellt die verwendete Chromatographie einen kritischen Faktor bei der finalen Erfassung der Inhaltsstoffe in den Extrakten und Fraktionen dar.

Kritisch zu betrachten sind aufgrund der einmalig durchgeführten Isolierungen und Extraktionen auch die nachgewiesenen Gehalte an Hordatinen oder HCA-Derivaten in den Fraktionen und Extrakten sowie auch nachfolgend die Berechnung der Gehalte in BSG. Jeder der angewandten Extraktionsprozesse bestand aus mehreren Stufen gefolgt von einer Aufreinigung mittels SPE oder Säulenchromatographie. Um die quantitativen Daten valide auf die eingesetzte Menge an BSG zu beziehen, wäre zunächst die Bestimmung der Wiederfindungsraten der Substanzen notwendig. Jedoch wurden die im Rahmen der Arbeit erhaltenen Gehalte als Schätzung auf BSG bezogen (vgl. Publikation 2 Kapitel 4.2), um sie mit Literaturdaten vergleichen zu können. Für die A-Extrakte sind die auf BSG relativierten Gesamthordatingehalte Tabelle 1 im Supplement Material B der Publikation 2 [Becker *et al.*, 2022a] zu entnehmen, die HCA-Derivat-Gehalte in HE- und HA-Extrakten der folgenden Tabelle (Tab. 10).

So enthielt BSG 1 ca. 24,0 mg *pCA*-Äq/100 g BSG, BSG 2 67,1–89,8 µg mg *pCA*-Äq/100 g und BSG 3 82,9–155,0 mg *pCA*-Äq/100 g. Die Ergebnisse zeigten, dass die Extraktionsprozesse 1 und 3 vergleichbar waren, da die Gehalte der Extrakte aus Prozess 1 vergleichbar waren mit den Gehalten der Extrakte aus Prozess 3. So enthielten A2 und A4 (beide BSG 2) sowie A3 und A5 (beide BSG 3) vergleichbare Hordatinmengen, was die Reproduzierbarkeit der Extraktionsmethodik stützte. Prozess 1 und 3 waren bis auf den Mahlgrad des Ausgangsmaterials hinsichtlich der durchgeführten SLE vergleichbar. Insgesamt wären in den drei BSG-Chargen zwischen 0,024–0,15 % Hordatine enthalten, was für Minorkomponenten einem nicht unwesentlichen Anteil entspricht.

Bezüglich der HCA-Derivate in den Extrakten aus alkalischem Aufschluss waren diese Beobachtungen nicht festgestellt worden. Wie bereits in Kapitel 4.2 diskutiert, waren zwischen den HE-Extrakten aus Prozess 1 und Prozess 2 (vgl. Abb. 55) Unterschiede bezüglich der Gehalte zu beobachten, welche u.a. auf die unterschiedlichen NaOH-Konzentrationen zurückgeführt wurden. Daher kann auch kein Vergleich zwischen den BSG-Chargen, wie zuvor für die Hordatine durchgeführt werden. Mit bis zu 327 mg/100 g BSG ist FA in hoher Konzentration vertreten und entspricht ca. 0,3 % (HE1–HE3), 0,1–0,3 % (HE4–HE6) und 0,05–0,07 % (HA-Extrakte) des BSG. Alle anderen HCAs waren in geringerer Konzentration enthalten. Generell sind, wie zuvor für die Hordatine, 0,3 % für Minorkomponenten ein hoher Anteil. Alle auf BSG relativierten Gehalte sind jedoch lediglich als Schätzung zu betrachten und müssten in Validierungsexperimenten bestätigt werden.

Tab. 10: Übersicht der Gehalte an FA, *pCA*, CA und DiFAs in HE- und HA-Extrakten bezogen auf 100 g BSG Trockengewicht; FA= Ferulasäure, *pCA*= *p*-Coumarsäure, CA= Kaffeesäure, DiFA= Ferulasäure-Dehydrodimer

| Extrakt | FA | | <i>pCA</i> | | CA | | DiFA | |
|---------|----------------------|-------|----------------------|-------|----------------------|------|----------------------------|------|
| | [mg/ 100 g BSG] ± SD | | [mg/ 100 g BSG] ± SD | | [mg/ 100 g BSG] ± SD | | [mg FA-Äq/ 100 g BSG] ± SD | |
| HE1 | 302,86 | 32,82 | 33,87 | 1,94 | 15,19 | 0,64 | 25,46 | 0,68 |
| HE2 | 327,40 | 9,97 | 75,38 | 2,76 | 19,56 | 0,39 | 32,23 | 4,02 |
| HE3 | 328,32 | 1,98 | 97,01 | 6,31 | 36,66 | 1,54 | 34,25 | 3,88 |
| HE4 | 198,90 | 39,89 | 64,20 | 1,88 | 12,90 | 5,47 | 31,95 | 0,29 |
| HE5 | 125,15 | 0,69 | 40,92 | 2,26 | n.q. | n.q. | 31,74 | 1,20 |
| HE6 | 314,80 | 56,83 | 94,85 | 15,06 | 18,35 | 1,55 | 50,78 | 2,51 |
| HA1 | 56,38 | 3,07 | 17,60 | 0,84 | n.q. | n.q. | 7,31 | 0,95 |
| HA2 | 54,33 | 9,37 | 20,31 | 2,40 | n.q. | n.q. | 6,56 | 0,42 |
| HA3 | 67,36 | 4,16 | 26,04 | 0,85 | n.q. | n.q. | 9,03 | 0,86 |

n.q. =nicht quantifiziert

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Folgenden sollen die drei Hauptfragestellungen der vorliegenden Arbeit zusammengefasst betrachtet werden. Hierbei sollen die Extraktcharakterisierung, die Isolierung relevanter Inhaltsstoffe sowie die biologische Aktivität der Extrakte und die hierfür relevanten Komponenten näher beleuchtet werden.

6.1 Extraktcharakterisierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten zwei mehrstufige Extraktionsprozesse zur Generierung verschiedener BSG-Extrakte entwickelt werden. So umfasste der erste Prozess eine SLE mit wässrigem Aceton (60% organischer Anteil; Extrakte A1–A7) gefolgt von einem alkalischen Aufschluss des Rückstands mit Natronlauge (Extrakte HE1–HE3). Dahingegen wurden diese beiden Abfolgen im zweiten Prozess umgekehrt (HE4–HE6 und HA1–HA3). Alle Extrakte wurden final mittels SPE aufgereinigt und die HE-Extrakte zuvor zusätzlich einer EtOAc-Extraktion zur Entfernung freigesetzter Zucker (v.a. Mono–Oligosaccharide) unterzogen. Die Ausbeute war für alle Extrakte mit 0,8–3,5 g/100g sehr gering, was einerseits auf die exzessive Aufreinigung zurückzuführen war und andererseits auf die Tatsache, dass die Extraktion von Minorkomponenten im Vordergrund stand. Bezüglich der verschiedenen BSG-Chargen (BSG 1: A1, HE1; BSG 2: A2, A4, A5, HE2, HE4, HA1; BSG 3: A3, A6, A7, HE3, HE5, HE6, HA2, HA3) sowie dem Einfluss einer vorangegangenen Entfettung des BSGs (A5, A7, HE6, HA3) konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Ausbeute und Rohmaterial beobachtet werden. Lediglich die Extraktionsmethodik stellte einen Einflussparameter für die Ausbeute dar, welche für die HA-Extrakte am größten war.

Alle 16 Extrakte wurden sowohl qualitativ anhand ihres TPCs, TFCs sowie spezifischer Inhaltsstoffe via HPLC-ESI-MS/MS als auch (semi)quantitativ mittels HPLC-DAD hinsichtlich des Gesamthordatin- (A1–A7) bzw. des Hydroxyzimtsäuregehaltes (HA1–HA3 und HE1–HE6) untersucht. Die Daten der Charakterisierung wurden bezüglich des Einflusses der **Extraktionsmethodik** (HA-, A-, HE-Extrakt), **vorangegangener Entfettung** des Ausgangsmaterials und der **BSG-Charge** (BSG 1–3) verglichen.

Die zunächst durchgeführten Analysen des **TPCs** zeigten, dass die HE-Extrakte ($157,5 \pm 13$ bis $351,5 \pm 20,7 \mu\text{g GÄq/mg Extrakt}$) signifikant höhere Gesamtphenolgehalte als die HA- ($60,5 \pm 2,6$ bis $69,3 \pm 6,7 \mu\text{g GÄq/mg Extrakt}$) und die A-Extrakte ($24,6 \pm 3,3$ bis $107,2 \pm 15,8 \mu\text{g GÄq/mg Extrakt}$) aufwiesen. Hier zeigte sich deutlich die Relevanz der Extraktionsmethodik für die Höhe des TPC, welcher für alkalische Hydrolysen gefolgt von EtOAc-Extraktion (HE-Extrakte) signifikant größer war im Vergleich zu den beiden anderen Methoden (HA- und A-Extrakte). Neben dem Einfluss der Extraktionsmethodik wurde der Einfluss einer vorangeschalteten Entfettung des BSG sowie der BSG-Charge untersucht. So war ein gering höherer TPC-Gehalt für Extrakte aus zuvor entfettetem Material im Vergleich zum unbehandelten Rohmaterial nachgewiesen worden. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von Stefanello *et al.* publiziert, die etwa fünffach höhere TPC-Gehalte für Extrakte aus alkalischem Aufschluss gegenüber Aceton-Extrakten sowie leicht höhere TPC-Gehalte für zuvor entfettet Aceton-Extrakte beschrieben [Stefanello *et al.*, 2018]. Zudem zeigten die im Rahmen der Arbeit erhaltenen Extrakte aus BSG 3 im Vergleich zu den beiden anderen Chargen durchweg

niedrigerer TPC-Gehalte. Die HE-Extrakte aus BSG 1 und BSG 2 wiesen hingegen ähnliche TPC-Gehalte auf, unterschieden sich jedoch hinsichtlich der A-Extrakte. Da laut Literatur der TPC sowohl von dem verwendeten Malz und dessen Herstellungsprozess [Moreira *et al.*, 2013a; Dvořáková *et al.*, 2008] sowie dem Brauvorgang [Leitao *et al.*, 2012] abhängt, waren unterschiedliche TPCs für die drei BSG-Chargen zu erwarten. Die angewandte Extraktionsmethodik zeigte jedoch den größten Einfluss auf den TPC-Gehalt.

Ähnliche Beobachtungen konnten für den **TFC** gemacht werden, welcher etwa dreifach geringer war als der TPC. So konnte für einige Extrakte (A1–A3, A6, HA1–HA2) kein Gesamtflavonoidgehalt bestimmt werden. Der Trend hinsichtlich des niedrigsten Gehaltes in Extrakten des BSG 3 sowie höhere Gehalte in Extrakten aus zuvor entfettetem Ausgangsmaterial setzte sich hier fort. Auch Stefanello *et al.* beschrieb ca. drei–vierfach geringere TFC-Gehalte als TPC-Gehalte [Stefanello *et al.*, 2018]. Die insgesamt niedrigeren TFC-Werte gegenüber den TPC-Werten sind durch den deutlich spezifischeren Assay begründet, welcher nicht wie der Folin-Ciocalteu-Assay reduzierende Substanzen erfasst, sondern spezifisch Flavonoid-Strukturen (vgl. Kapitel 8.2.8).

Massenspektrometrische Untersuchungen bestätigten zunächst, was anhand von Literaturdaten vermutet worden war: Extrakte aus alkalischem Aufschluss (**HE1–HE6**) wie auch die mittels SLE aus dem Rückstand einer Hydrolyse hergestellten Extrakte (**HA1–HA3**) enthielten v.a. die sog. **gebundenen Polyphenole FA, CA, pCA** sowie in geringerem Maße **DiFAs**. Letztere werden durch Alkalibehandlung aus dem lignocellulosischem Material der pflanzlichen Zellwände freigesetzt [Stefanello *et al.*, 2018; Moreira *et al.*, 2012]. Die aus dem Rückstand des alkalischen Aufschlusses zur Herstellung der HE-Extrakte mittels SLE gewonnenen HA-Extrakte enthielten eine geringere Anzahl an HCAs. Der Großteil der freigesetzten HCAs war somit im ersten Schritt des Extraktionsprozesses im wässrigen, alkalischen Lösungsmittel extrahiert worden und nur geringe Reste wurden im zweiten Schritt mittels SLE isoliert. So konnte in den HA-Extrakten keine CA und nur die *trans*-Isomere der FA und *pCA* detektiert werden. Zudem war eine kleinere Anzahl von DiFAs enthalten. bspw. war die *trans-cis-8-8'*-DiFA und die *trans-trans-5-5'*-DiFA in den HA-Extrakten nicht detektierbar, wohingegen in den HE-Extrakten bis zu zehn verschiedene DiFAs beobachtet wurden. Dies spiegelte sich in den Gehalten wider. So war der FA-Gehalt in den HE-Extrakten 4–19-fach höher, der *pCA*-Gehalt 4–13-mal höher und der DiFA-Gehalt bestimmt als FA-Äq 7–20-fach höher als in den HA-Extrakten.

Zwischen den BSG-Chargen und innerhalb der HE-Extrakte von Methodik 1 (vgl. S. 196 Abb. 55 HE1–HE3) und 2 (HE4–HE6) konnten hinsichtlich der Gehalte Unterschiede beobachtet werden. So enthielten Extrakte aus BSG 3 tendenziell weniger FA und *pCA* als die der anderen BSG. Der aus entfettetem Rohmaterial gewonnene Extrakte HE6 aus BSG 3 wies hingegen den höchsten HCA-Gehalt auf und war signifikant höher als der vergleichbare Extrakt aus nicht entfettetem Material (HE5). Schließlich zeigte sich, dass Methode 1 (Prozess 1; alkalischer Aufschluss aus zuvor mit 60 %-igem Aceton extrahiertem BSG) effektiver FA, CA und *pCA* freisetzte und extrahierte als Methode 2 (Prozess 2; alkalischer Aufschluss aus BSG ohne vorherige SLE mit 60 %-igem Aceton), da die vergleichbaren Extrakte der Methode 1 (HE2–HE3) höhere Gehalte aufwiesen als Extrakte der Methode 2 (HE4–HE5). Um die beobachteten Unterschiede zu verifizieren, ist eine Validierung der Extraktionsmethodiken notwendig. So

müsste bspw. die Wiederfindung innerhalb der SPE evaluiert werden und die Extraktion mit gleichem Prozess und gleicher BSG-Charge mehrmals wiederholt werden.

Als weitere Schwierigkeit im Rahmen der Quantifizierung erwies sich das Fehlen der DiFAs als Reinsubstanzen. Um eine Abschätzung des Gehaltes vorzunehmen und v.a. einen Vergleich zwischen den einzelnen Extrakten ziehen zu können, wurden die DiFAs als FA-Äq bestimmt. Ähnlich wurde dies von Verni *et al.* publiziert, welche u.a. FA-Oligomere in enzymatisch behandeltem BSG als FA-Äq bestimmten [Verni *et al.*, 2020]. Studien von Dobberstein und Bunzel, die sich mit der Isolierung und Trennung von DiFAs und TriFAs aus Getreide beschäftigen, zeigen jedoch deutliche Unterschiede in der UV-Absorption sowohl zwischen DiFAs und FA als auch innerhalb der verschiedenen DiFA-Isomere [Dobberstein und Bunzel, 2010]. Eine tatsächliche Aussage über die Menge enthaltener DiFAs in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Extrakten ist daher nicht möglich. So kann lediglich ein Vergleich innerhalb der Extrakten vorgenommen werden. Folgeschritte wären hier gezielte Synthesen der DiFAs über oxidative Dimerisierung [Ralph *et al.*, 1994; Waterstraat und Bunzel, 2018] oder Isolierung aus dem Rohmaterial [Dobberstein und Bunzel, 2010; Bunzel *et al.*, 2004; Garcia-Conesa *et al.*, 1997]. Im Rahmen der Arbeit wurde sich für eine Isolierung aus BSG entschieden, um zu gewährleisten, dass alle DiFAs, welche in den Extrakten enthalten waren, im Zuge der Isolierung gewonnen wurden.

Neben den HCAs fanden sich in beiden Extraktgruppen (**HA und HE**) **Suberin- und Azelainsäure**, welche beide zur Gruppe der Dicarbonsäuren gehören und in Gerste natürlicherweise vorkommen [Khakimov *et al.*, 2014]. Eine weitere in beiden Gruppen enthaltene Substanzklasse waren trihydroxylierte Linolensäurederivate, welche zu den **Oxylipinen** zählen und enzymatisch über LOX in Pflanzen als Stressreaktion gebildet werden [Weichert *et al.*, 1999]. Bislang wurden sie in Bier detektiert, wo sie zum *off flavour* beitragen [Hamberg, 1991; Esterbauer und Schauenstein, 1977]. Hinsichtlich der qualitativen Bestimmung der einzelnen Inhaltsstoffe konnten keine bedeutenden Unterschiede zwischen den einzelnen BSG-Chargen oder ein Einfluss der Entfettung festgestellt werden. Auch in den Extrakten aus zuvor entfettetem Rohmaterial waren Oxylipine detektiert worden, was aufgrund ihrer Dreifachhydroxylierung und damit einhergehenden Erhöhung der Polarität ihr Vorkommen im wässrigen Extrakt aus alkalischer Hydrolyse nachvollziehbar ist.

Im Gegensatz dazu konnten keine HCAs in den **A-Extrakten** detektiert werden und **wenige freie Polyphenole** wie u.a. **Catechin oder Procyanidin B** waren enthalten. Als signalintensivste Komponenten fanden sich in A1–A7 Phenolamide, v.a. **Hordatine**. Dies war bisher nur für Bier [Pihlava *et al.*, 2016] und Gerste [Röpenack *et al.*, 1998] beschrieben und zeigte die ausgeprägte Stabilität dieser Substanzklasse auf. So fanden sich zahlreiche Hordatine wie die Hordatine A, B und C, ihre hydroxylierten Derivate Hordatin A1, B1, C1, A2, B2 und C2 sowie zusätzlich Glykoside bis hin zu Dreifachglykosylierung. Weiterhin konnten **Spermidin-Konjugate** beobachtet werden, welche jedoch kaum in Extrakten des BSG 3 enthalten waren. Nach ihrer Identifikation wurden die Hordatine quantifiziert, wobei wie bei den DiFAs eine Bestimmung als Äquivalente erfolgte. Nach einer Methode von Pihlava *et al.* wurden die Hordatine als *pCA*-Äq erfasst und unter Einbeziehung eines Korrekturfaktors Gehalte von $14,2 \pm 0,5$ bis $172,2 \pm 2,1$ $\mu\text{g pCA-Äq/mg}$ Extrakt bestimmt. Dabei enthielt A1 als Extrakt aus 50 % Weizenanteil (BSG 1) den geringsten Gehalt gefolgt von A2 und A3. Es zeigte sich, dass sich eine Entfettung des Rohmaterials positiv auf den Hordatingehalt auswirkte. Insgesamt konnte

im Rahmen der **Hordatinanalytik** der Extrakte ein deutlicher Einfluss des Rohmaterials (BSG, Malz) sowie dessen Vorbehandlung (Entfettung) beobachtet werden. Allerdings war die Quantifizierung aufgrund der Nichtverfügbarkeit einer Reinsubstanz schwierig, aber kann als eine Abschätzung zum Vergleich der Gehalte innerhalb der A-Extrakte betrachtet werden. Eine geeignetere Substanz zur Quantifizierung könnte neben den Hordatinen selbst deren Vorläufer *p*-Coumaroylagmatin darstellen, welcher kommerziell erhältlich ist. Hordatine sind bis dato nicht umfassend erforscht, wobei eine Syntheseroute beschrieben ist. Hierbei erfolgt eine oxidative Dimerisierung von *p*CA zum Dimer, welches im Anschluss mit einem *N,N'*-di-BOC-Agmatin zum *N,N',N'',N'''*-tetra-BOC-Hordatin A kondensiert [Yamaji *et al.*, 2007]. Methoden zur Isolierung von Hordatin A β -D-Glucopyranosid aus ungekeimter Gerste wurden 2013 von Kohyama und Ono beschrieben, wobei der Prozess dem hier durchgeführten Extraktionsprozess ähnelte [Kohyama und Ono, 2013]. Wie zuvor für die DiFAs war die Isolierung der Hordatine aus BSG durchgeführt worden mit dem Ziel, enthaltene Hordatine zu fraktionieren, charakterisieren und hinsichtlich der biologischen Wirkung zu untersuchen.

Neben den Phenolamiden und wenigen Flavonoiden, enthielten die A-Extrakte von BSG 1 und 2 (A1, A2; A4, A5) die Aminosäure **Tryptophan**. Weiterhin konnten unabhängig von der BSG-Charge oder der Vorbehandlung (Entfettung) in allen A-Extrakten **Lyso-Phosphatidylethanolamine** sowie eine **TriHOME** nachgewiesen werden, wobei diese sowie die Phenolamide im Rahmen der Arbeit zum ersten Mal in BSG identifiziert werden konnten.

6.2 Isolierung von Naturstoffen

Im Zuge der Extraktcharakterisierung wurden in allen drei Extraktgruppen (HA, HE, A) Inhaltsstoffe nachgewiesen, welche nicht kommerziell erhältlich waren, jedoch teilweise einen großen Anteil am Gesamtextrakt ausmachten. So waren besonders die HE-Extrakte gefolgt von den HA-Extrakten reich an **DiFAs**, wohingegen die A-Extrakte v.a. **Hordatine** enthielten. Für beide Substanzgruppen waren aus der Literatur **Isolierungsprozesse** bekannt, welche in modifizierter Form angewandt wurden.

Hordatine als Hauptinhaltsstoffe der A-Extrakte wurden mittels SLE mit 60 %-igem Aceton gefolgt von einer Säulenchromatographie mittels C18e Material aufgereinigt und final präparativ aufgetrennt. Insgesamt ergab sich eine geringe Ausbeute von 21,5 mg bzw. 14,8 mg/100 g entfettetem BSG, wobei eine Relation auf die Menge an BSG aufgrund der nur einmalig durchgeführten Isolierung und den zahlreichen Prozessschritten als Schätzung zu betrachten ist. Da es sich um sekundäre Pflanzenmetaboliten handelt, und damit um Minorkomponenten, war eine geringe Ausbeute zu erwarten. Allerdings gestaltete sich die Trennung der Hordatine als sehr komplex, da in Summe **71 verschiedene Hordatine** identifiziert werden konnten. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass neben dem Vorkommen hydroxylierter und nicht-hydroxylierter Hordatine sowie deren Glykoside jedes Hordatin als Stereoisomer oder für die Hordatine B, B1 und B2 sogar als Regioisomer auftreten können. Dies erschwerte die Auftrennung der einzelnen Hordatine, welche aufgrund der nur geringen strukturellen Unterschiede bereits komplex war. Final konnten zehn Fraktionen mit Gesamtgehalten von $60,7 \pm 3,1$ bis $259,6 \pm 6,1$ $\mu\text{g pCA-Äq/mg Fraktion}$ bzw. **$303,6 \pm 15,3$ bis $1298,1 \pm 30,4$ $\mu\text{g pCA-Äq/mg Fraktion}$** unter Einbeziehung des Korrekturfaktors generiert werden, welche in ihrer Zusammensetzung variierten. Die aufgrund des Korrekturfaktors

fünffach höheren Hordatingehalte über 100 % deuteten bereits auf die Notwendigkeit einer Referenzsubstanz zur Quantifizierung hin. Eine grobe Auftrennung der nicht-hydroxylierten, hydroxylierten und der Glykoside gelang, jedoch konnte kein Hordatins als Reinsubstanz isoliert werden.

Als weiterführende Arbeiten bietet sich hier die Isolierung im größeren Maßstab an. Zur Optimierung könnte der organische Anteil im Extraktionsmittel variiert werden, welche bei Kohyama und Ono bei 75% lag [Kohyama und Ono, 2013]. Die eingesetzte Menge an BSG müsste deutlich erhöht werden, um die Ausbeute zu steigern und die Chromatographie verbessert werden. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit böten andere Säulenmaterialien mit zusätzlichen Wechselwirkungen oder ausgeprägter sterischer Selektion hinsichtlich der Regioisomere sowie die chirale Chromatographie Verbesserungsmöglichkeiten. Zudem wäre interessant, welche der Hordatine natürlicherweise in ungekeimter bzw. gekeimter Gerste oder BSG vorkommen und welche durch die Prozessierung (Mälzen, Brauvorgang sowie eigentlicher Isolierungsprozess) entstanden sind. Da sich manche Fraktionen als aktiver in den *in vitro*-Enzyminhibitionsassays erwiesen als andere, wäre dies relevant hinsichtlich der Fragestellung, welches Rohmaterial am geeignetsten zur Isolierung ist. Alternativ wäre eine gezielte Synthese des Hordatins A eine Möglichkeit zur Gewinnung einer Reinsubstanz, welche v.a. zur Quantifizierung und Optimierung der MS-Methodik genutzt werden könnte. Hier käme bspw. die beschriebene Synthese von Yamaji *et al.* in Frage [Yamaji *et al.*, 2007] oder möglicherweise oxidative Kupplungsreaktionen ausgehend von *p*-Coumaroylagmatin angelehnt an die Biosynthese der Hordatine.

Als Hauptkomponenten in den HE-Extrakten sowie in geringerer Menge in den HA-Extrakten waren neben monomeren HCAs DiFAs detektiert worden, welche, wie die Hordatine, nicht als Reinsubstanzen kommerziell erhältlich waren. Um alle DiFAs zu erhalten, welche in den Extrakten beobachtet wurden, wurde die Isolierung gegenüber der Synthese bevorzugt. Eine Methode modifiziert nach Waterstraat und Bunzel, welche auf einer alkalischen Hydrolyse beruht, wurde angewandt auf BSG [Waterstraat *et al.*, 2016; Waterstraat und Bunzel, 2019]. Um FA und *p*CA von den DiFAs zu separieren, wurde der eigentlichen präparativen Trennung eine GPC vorgeschaltet, welche jedoch nicht zur vollständigen Abtrennung führte. In Summe konnten neun DiFAs und sieben TriFAs identifiziert werden, wobei keine der erhaltenen Fraktionen rein war. So waren die früh eluierenden DiFAs aufgrund der Verunreinigung mit FA und *p*CA nicht rein erhalten worden und die spät eluierenden DiFAs und TriFAs ab $R_t = 23\text{--}24$ min aufgrund von Vermischung mit TriHOME- und TriHODA-Isomeren.

Oxylipine waren in einem Großteil der Fraktionen enthalten, obwohl der BSG im Vorfeld entfettet worden war. Möglicherweise waren die TriHOME- und TriHODA-Isomere im Zuge der Isolierung aus der Matrix freigesetzt worden, oder Aceton, welches zur Entfettung verwendet worden war, war nicht geeignet zur Entfernung von Oxylipinen oder deren Vorläufern. Gao *et al.* verwendeten bspw. Chloroform sowie eine Chloroform-MeOH-Mischung zur Isolierung von Trihydroxyfettsäuren aus Trüffeln, was daher ein alternatives Extraktionsmittel darstellen könnte [Gao *et al.*, 2001]. Weiterhin könnte eine Entfettung des Rohisolates vor präparativer Trennung eine geeignete Maßnahme zur Entfernung der Oxylipine sein, falls diese erst im Zuge der Isolierung freigesetzt wurden. Grundsätzlich könnten die erhaltenen Fraktionen ein weiteres Mal mit optimierter HPLC-Methodik fein

fraktioniert werden, wobei die Ausbeute, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Isolierung nicht ausreicht.

Weiterhin waren teilweise unidentifizierte Komponenten in den F-Fractionen enthalten, wobei eine Substanz mit dem m/z 723,5 und Fragmenten bei m/z 677,5/ 451/ 226/ 147 in 21 Fractionen detektiert wurde. Der Gradient der analytischen HPLC-Methode entsprach dem der HPLC-Methode zur präparativen Fractionierung. Da die R_t der unbekannt Substanz bei 18,5 min lag, ist daher davon auszugehen, dass es sich um ein Artefakt handelt, welches sich möglicherweise erst nach der Fractionierung gebildet hat.

Trotz der neben den DiFAs und TriFAs enthaltenen Komponenten, konnten Fractionen mit hohen Signalintensitäten für einzelne DiFA-Isomere erhalten werden, welche die Strukturaufklärung der in den HE- und HA-Extrakten detektierten DiFAs unterstützte. So wurde im Rahmen der Fractionierung eine optimierte HPLC-Methode etabliert, welche die Trennung der DiFAs in den HE-Extrakten ermöglichte, wenn auch FA mit den 8-8'-Isomeren der DiFAs coeluierte.

Das Ziel, die einzelnen DiFAs als Reinsubstanzen zu isolieren, konnte wie für die Hordatine nicht erreicht werden. Die Isolierung sollte daher im größeren Maßstab sowie zusätzlich mit Entfettungsschritten mit Chloroform sowie einer Sephadex LH20-Säulung wiederholt werden. Da dieser Prozess damit sehr zeitaufwändig ist und die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchungen gezeigt haben, welche DiFA-Isomere enthalten sind, wären Synthesen der einzelnen DiFAs denkbar. Sie beruhen meist auf der Synthese des Ethylferulats und dessen oxidativer Kupplungsreaktion [Andreasen *et al.*, 2000]. Bei der oxidativen Dimerisierung entstehen mehrere Isomere, wobei sich die präparative Aufreinigung aufgrund nicht vorhandener Oxylipine oder FA leichter gestalten könnte. Die gleiche Forschergruppe veröffentlichte Studien zu regioselektiven Syntheserouten verschiedener DiFAs mittels Nutzung von Mizellen [Larsen *et al.*, 2001], was die Synthese deutlich spezifischer und u.U. die Auftrennung verschiedener Isomere hinfällig machen könnte.

6.3 Biologische Aktivität

Eines der Hauptziele der vorliegenden Arbeit war die Identifikation bioaktiver Komponenten in BSG, welche den Glucosestoffwechsel beeinflussen. Hierfür wurden vier relevante Enzyme (α -Glucosidase, α -Amylase, DPP IV, GP α) ausgewählt, welche an einer Vielzahl biologischer Prozesse im Körper beteiligt sind und daher eine große Bandbreite hinsichtlich des Glucosemetabolismus abdecken. So wurde in *in vitro*-Enzyminhibitionsassays zunächst der Einfluss der hergestellten HE-, HA- und A-Extrakte auf die Enzyme α -Amylase, α -Glucosidase, DPP IV und GP α untersucht. Hierbei zeigte sich, dass keiner der Extrakte einen stark inhibierenden Einfluss auf α -Amylase aufwies. Gegenüber der DPP IV konnte keine mit der PK Sitagliptin vergleichbare Inhibition beobachtet werden. Zwar waren für eine Vielzahl der Extrakte (A7, HE1–HE6, HA3) IC₅₀-Werte bestimmbar, doch diese waren ca. um den Faktor 10⁶ weniger potent als die PK, ein Wirkstoff in eingesetzten Diabetes-Medikamenten [Flatt, 2008]. Für die beiden anderen Enzyme (α -Glucosidase und GP α) wurde jedoch eine potente Inhibition beobachtet. Extrakte A2–A7 sowie HE4 und HE5 inhibierten α -Glucosidase vergleichbar stark und teilweise sogar stärker wie die PK Acarbose, ein Wirkstoff in

verwendeten Diabetes-Medikamenten wie GlucoBay® [Calder und Geddes, 1989]. Auch hinsichtlich der GP α konnten potente Inhibitionen beobachtet werden, wobei für alle untersuchten Extrakte (A3–A7, HE1–HE5, HA1–HA2) IC₅₀-Werte bestimmt werden konnten. Nahezu alle Extrakte außer HE2–HE4 waren signifikant potentere Inhibitoren als die PK Koffein. Im weiteren Verlauf wurde sich daher auf die beiden Enzyme GP α und α -Glucosidase fokussiert.

Einige der in den Extrakten identifizierten Substanzen wie FA, *p*CA, CA, Catechin, Azelainäure, Suberinsäure, Procyanidin B₂ und Tryptophan wurden als Reinsubstanzen in den beiden Enzyminhibitionsassays untersucht, wobei sich keine der Substanzen als potenter Inhibitor herausstellte. Sie wurden daher als aktive Komponenten in den Extrakten eher ausgeschlossen, wobei synergistische Effekte möglich sein könnten. Um dies zu untersuchen, könnten Mischungen der Reinsubstanzen in den Enzyminhibitionsassays analysiert werden, welche den in den Extrakten am IC₅₀-Wert vorliegenden Konzentrationen entsprechen. Zumindest für die HCAs FA, *p*CA, CA in den HE- und HA-Extrakten liegen nach Abschluss der vorliegenden Arbeit quantitative Daten vor, sodass eine entsprechende Untersuchung leicht umgesetzt werden könnte.

Da die Extraktausbeuten zu gering waren, um eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung anzuschließen, wurden zwei Isolierungen relevanter Inhaltsstoffe durchgeführt. Hordatine als signalintensivste Substanzgruppe in den A-Extrakten wurden mittels SLE isoliert und zehn hordatinreiche Fraktionen in den beiden Enzyminhibitionsassays untersucht. Die Ausbeute war gering, sodass die Analysen einem ersten Screening entsprachen, doch konnten Effekte auf die α -Glucosidase nicht aber auf GP α beobachtet werden. Demnach wurden die Hordatine als aktive Komponenten gegenüber der GP α ausgeschlossen. Die im α -Glucosidase-Inhibitionsassay potenten Fraktionen enthielten einerseits Hordatin-Hexoside (Fraktion H5) sowie den Vorläufer *p*-Coumaroylagmatin (Fraktion H8). Es wurde deutlich, dass spezifische Hordatine und nicht der Gesamthordatingehalt in den Extrakten für die Inhibition verantwortlich sein müssten. Um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren und die Arbeiten fortzuführen, müsste die Isolierung optimiert werden hinsichtlich der Auftrennung sowie der Ausbeute.

Hinsichtlich der HE- und HA-Extrakte wurden DiFAs aus BSG isoliert und die erhaltenen Fraktionen ebenfalls in den beiden Assays untersucht. Dabei erwiesen sich lediglich vier der 37 Fraktionen als inhibitorisch gegenüber α -Glucosidase, wobei keine Korrelation mit einem der Inhaltsstoffe zu erkennen war. Die enthaltenen DiFAs und Oxylipine waren auch in anderen nicht hemmenden Fraktionen detektiert worden. Die aktiven Komponenten der vier Fraktionen wurden daher nicht identifiziert und Rückschlüsse durch die Isolierung auf die inhibierenden Komponenten in den HE-Extrakten konnten nicht gezogen werden. Eine Substanzklasse, die jedoch von Bedeutung sein könnte, sind die Oxylipine, wobei bereits inhibitorische Effekte durch Trihydroxyfettsäuren bzw. Hydroxyfettsäuren beobachtet wurden [Paul *et al.*, 2010; Nadeem *et al.*, 2020].

Im GP α -Inhibitionsassay hingegen, konnte vermehrt ein potentes Inhibitionspotential durch die F-Fraktionen gezeigt werden. Obwohl ein Großteil der Fraktionen aufgrund geringer Ausbeute nicht untersucht werden konnte, erwiesen sich 18 Fraktionen als starke Inhibitoren mit teilweise 50-fach potenterer Inhibition als die PK Koffein. Eine eindeutige Aussage hinsichtlich der aktiven Komponenten in den Fraktionen war wie zuvor für die α -Glucosidase

schwierig, da keine quantitativen Daten vorlagen und die Fraktionen meist Mischungen verschiedener Komponenten waren. Allerdings zeichnete sich eine Korrelation mit enthaltenen TriFAs ab, da alle Fraktionen, welche besonders potent waren, entsprechende Strukturen enthielten. Wie zuvor für die Hordatine müsste in Zukunft die Isolierung mit optimierter Auftrennung sowie höherer Ausbeute wiederholt werden.

Die Substanzklasse der Oxylipine zieht sich durch alle Extrakte und F-Fractionen, weshalb sich hier definitiv Forschungsbedarf hinsichtlich deren Bioaktivität gegenüber den untersuchten Enzymen des Glucosestoffwechsels ergibt. Ein erster Schritt wären *molecular docking studies*, in welchen untersucht werden könnte, ob es Bindungsaffinitäten der detektierten TriHOMes und TriHODAs zu den Enzymen gibt [Muegge und Rarey, 2001]. Auch könnten sie als Reinsubstanzen in den Enzyminhibitionsassays vermessen werden. Da die Trihydroxyfettsäuren in Bier enthalten sind [Esterbauer und Schauenstein, 1977], kann von einer guten Löslichkeit im wässrigen Medium ausgegangen werden, sodass ihre Untersuchung in den wässrigen *in vitro*-Enzyminhibitionsassays problemlos möglich sein sollte.

Für die einzelnen Hordatine sowie die DiFAs und TriFAs stellen *molecular docking studies*, eine gute Möglichkeit dar, weitere Einblicke in das Inhibitionspotential zu erlangen. So könnte ein Screening der Substanzen genutzt werden, um die vermeintlich potentesten Strukturen herauszufiltern und sich in Synthesen oder Isolierungen auf diese zu fokussieren.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse jedoch, dass BSG den Glucosestoffwechsel beeinflussende Substanzen enthält. Die Screening-Ergebnisse der Isolierungen der Naturstoffe aus BSG weisen darauf hin, dass Hordatine und TriFAs ein Inhibitionspotential gegenüber α -Glucosidase bzw. GP α besitzen. Weiterhin rücken die Oxylipine, genauer gesagt die TriHOMes und TriHODAs, in den Fokus, da sie in allen Extrakten und vielen F-Fractionen detektiert wurden. Ihre Quantifizierung könnte weitere Hinweise auf die aktiven Komponenten in den Extrakten liefern.

7 Fazit

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die *in vitro*-Untersuchung von BSG-Inhaltsstoffen auf verschiedene Enzyme des Glucosestoffwechsels. So wurden zunächst BSG-Extrakte mittels unterschiedlicher Prozesse (HE-Extrakte: alkalische Hydrolyse gefolgt von EtOAc-Extraktion, HA-Extrakte: SLE mit 60 %-igem Aceton aus Rückstand der alkalischen Hydrolyse, A-Extrakte: SLE mit 60 %-igem Aceton) aus drei BSG-Chargen (BSG 1 (BioVT TUK): ca. 50 % Weizenmalz/50 % Pilsner Malz, BSG 2 (BioVT TUK): 100 % Weyermann® Vienna Malz und BSG 3 (Orval Brauerei, Florenville): 90 % Pilsner Malz, 9 % Karamell-Malz und 1 % gerösteter und geschälter Gerste) hergestellt und charakterisiert. Zu Beginn wurden die beiden Summenparameter TPC und TFC ermittelt bevor im Anschluss via HPLC-ESI-MS/MS-Messungen Einzelsubstanzen identifiziert sowie ausgewählte Leitsubstanzen mittels HPLC-DAD (semi)quantitativ bestimmt wurden.

Hinsichtlich der biologischen Wirkungen waren die A-Extrakte aktiver als die HA- und HE-Extrakte (vgl. Kapitel 4.1 [Becker *et al.*, 2021]) und führten (außer Extrakt A1) zu einer potenten Inhibition der α -Glucosidase und GP α . Unter den HE-Extrakten inhibierten nur zwei der sechs Extrakte α -Glucosidase und keiner der HA-Extrakte erwies sich als potenter Inhibitor. Gegenüber der GP α zeigten jedoch auch die HA- und HE-Extrakte einen stark inhibierenden Einfluss, welcher durchschnittlich vergleichbar oder weniger ausgeprägt als durch die A-Extrakte war. Die detektierte DPP-IV-Inhibition (v.a. durch HE-Extrakte) wurde aufgrund des 10⁶-fach geringeren IC₅₀-Wertes im Vergleich zur Positivkontrolle Sitagliptin nicht als biologisch relevant eingestuft und daher im Rahmen der Arbeit nicht weiter untersucht. Als viertes Enzym wurde die α -Amylase untersucht, wobei durch keine Extraktgruppe ein Effekt beobachtet werden konnte. Es ließ sich bereits festhalten, dass BSG Inhaltsstoffe mit α -Glucosidase und GP α -hemmendem Potential enthält.

Im Folgeschritt sollten die aktiven Komponenten der Extrakte identifiziert werden, wobei aufgrund der geringen Ausbeute der Extraktionen keine aktivitätsgeleitete Fraktionierung, wie sie häufig zur Identifikation der bioaktiven Komponenten in Pflanzenextrakten eingesetzt wird, [Mani *et al.*, 2022] durchgeführt werden konnte. Stattdessen ergab sich die gezielte Isolierung von Naturstoffen bzw. den identifizierten Leitsubstanzen aus BSG als dritte Fragestellung. Sowohl für die DiFA- als auch die Hordatin-Isolierung waren aus der Literatur bereits Methoden bekannt [Bunzel *et al.*, 2004; Kohyama und Ono, 2013], welche modifiziert im Rahmen der Arbeit angewandt wurden. Beide Substanzgruppen konnten erfolgreich aus BSG gewonnen werden, wobei Phenolamide erstmals in BSG nachgewiesen wurden. Allerdings wurden weder reine DiFAs noch reine Hordatine erhalten und die generierten F- bzw. H-Fraktionen stellten Mischfraktionen verschiedener Isomere dar. Die Isolierung der Hordatine gestaltete sich durch die große Strukturvielfalt als sehr komplex und in Summe konnten 71 Phenolamide nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 4.3 [Becker *et al.*, 2022a]), welche in zehn H-Fraktionen getrennt in „Hordatingruppen“ (Aglykone, Glykoside, hydroxylierte Hordatine) vorlagen. Die Auftrennung der DiFAs und TriFAs in den F-Fraktionen (vgl. Kapitel 4.4.2) war bis auf vereinzelte Isomere vollständig, allerdings enthielten zahlreiche Fraktionen weitere Substanzen wie Oxylipine, Azelainsäure oder die monomeren HCA. Möglichkeiten der Optimierung beider Isolierungen wurden im vorherigen Kapitel genauer erläutert (vgl. Kapitel 6.2). Alle Fraktionen wurden bei ausreichender Ausbeute im

α -Glucosidase- und GP α -Inhibitionsassay untersucht, um den Einfluss der Hordatine und DiFAs auf die beiden Enzyme festzustellen. Dies sollte im Anschluss ermöglichen, den Beitrag der beiden Substanzklassen am Inhibitionspotential der BSG-Extrakte zu beurteilen. Aufgrund des Vorliegens in Mischfraktionen war diese Korrelation allerdings schwierig und lediglich Hypothesen konnten aufgestellt werden. So ließ sich vermuten, dass TriFAs die GP α potent inhibieren (vgl. Kapitel 4.4.4) und Hordatin-Glykoside sowie *p*-Coumaroylagmatin die α -Glucosidase hemmen (vgl. Kapitel 4.1 [Becker *et al.*, 2022a]). Grundsätzlich zeigten die Ergebnisse der Arbeit, dass BSG ein geeignetes Ausgangsmaterial zur Gewinnung der beiden biologisch aktiven Substanzgruppen darstellt.

Neben den Leitsubstanzen ergaben sich als dritte Substanzgruppe mit potenzieller biologischer Wirkung die Oxylipine, welche in nahezu allen Fraktionen und Extrakten auftraten. Ihr Beitrag zur Inhibitionsstärke der Extrakte wurde im Rahmen der Arbeit nicht aufgeklärt, doch könnten gezielte Isolierungen und optimierte Auftrennung weitere Hinweise liefern.

Da BSG mit über 39 Millionen Tonnen weltweiter Menge jährlich das größte „Abfallprodukt“ der Brauindustrie darstellt, stellen Nutzungsmöglichkeiten neben Viehfutter nachhaltige Alternativen dar [Mussatto, 2014]. Aktuelle Studien konnten bereits seinen Nutzen zur Erhöhung des Nährwertes von Lebensmitteln aufzeigen [Sahin *et al.*, 2021; Pratap Singh *et al.*, 2020], aber auch biologische Wirkungen auf den Glucosestoffwechsel durch BSG-Proteinhydrolysate wurden untersucht [Connolly *et al.*, 2014]. Die Suche nach neuen, potenten Wirkstoffen zur Beeinflussung des Glucosestoffwechsels sind aufgrund der steigenden Inzidenz und Prävalenz von DM relevante Forschungsgebiete, wobei Pflanzenextrakte oftmals im Fokus standen [Magliano und Boyko, 2021; Alam *et al.*, 2022]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Leitsubstanzen und potenzielle Wirkstoffe bestimmten Hordatine und möglicherweise FAO waren im BSG mit max. 0,15 % bzw. 0,05 % enthalten. Eine Auswirkung von BSG bspw. als Zusatz in Brot [Merten *et al.*, 2022] auf den BZ im Menschen ist anhand der vorliegenden Daten nicht abzuschätzen. Zum einen wurde die Beeinflussung des Glucosestoffwechsels lediglich *in vitro* untersucht und zum anderen sind die quantitativen Daten aufgrund der nicht validierten Extraktionsmethodik und des semiquantitativen Charakters als Annäherung zu betrachten. Die geringen Gehalte der Minorkomponenten im BSG und die Tatsache, dass BSG als Zusatz und nicht alleiniges Lebensmittel konsumiert würde, lassen einen Einfluss auf den BZ durch BSG-haltiges Brot (bspw. 20 % Anteil am Mehl) als unwahrscheinlich einschätzen. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen vielmehr das Potential von BSG als Ausgangsmaterial zur Gewinnung bioaktiver Substanzen auf.

8 Material und Methoden

8.1 Materialien

8.1.1 Verbrauchsmaterialien

Diaphragma (Laboratory Film Parafilm® "M")

Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA

Einwegspritze (Omnifix® 5 mL, 2 mL, 1 mL)

B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Einwegkanüle (Sterican® G20 0,8/0,9 x 40 mm)

B. Braun Melsungen AG

Filterpapier

- Filterpapier (MN 615, 90 mm)
Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
- Filterpapier Grade P81, 2.5 cm
Whatman, Dassel, Deutschland

HPLC-Säulen und Vorsäulen

- Synergie 4u polar RP 80 Å, 250 x 4,6 mm mit Vorsäule Synergi Polar RP 3 x 4 mm
Phenomenex, Torrance, USA
- Synergi 4u polar RP 80 Å, 250 x 10 mm
Phenomenex, Torrance, USA
- TSKgel G1000HXL, 5 µm, 7.8x300 mm mit Vorsäule TSKgel HXL-L 6 mm ID 4 cm
Tosoh Bioscience, Griesheim, Deutschland
- VSPher PUR C18-SE, 5µm, 250 x 4.6 mm mit Vorsäule VDSphere PUR C18-SE 4 x 5 mm
VDS optilab, Berlin, Deutschland
- VSPher PUR C18-SE, 5µm, 250 x 20 mm
VDS optilab, Berlin, Deutschland

HPLC-Vials (32 x 11.6 mm)

WICOM (Amberg, Deutschland) und Buddeberg (Mannheim, Deutschland)

HPLC-Vials-Schraubkappen (9 mm, PP, 6 mm Loch)

WICOM (Amberg, Deutschland) und Buddeberg (Mannheim, Deutschland)

Inserts for HPLC-Vials

Diagonal (Münster, Deutschland) und Buddeberg (Mannheim, Deutschland)

Membranfilter (0,45 µm) PVDF

Diagonal (Münster, Deutschland) und Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)

Mikroplatten

- Klare 96-Well-Mikroplatten

Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

- Schwarze 96-Well-Mikroplatten für Fluoreszenz

VWR International, Radnor, USA

Pipettenspitzen 10/200/1000 µL

Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Pipettenspitzen 5000 µL

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

PP-Zentrifugenröhrchen 15/50 mL klar/braun

Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Reaktionsgefäße 1,5/2 mL

Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

SPE-Kartuschen

- Strata C18-E (55 µm, 70 Å; 20g/60 mL)

Phenomenex, Torrance, USA

8.1.2 Geräte

Biofreezer VIP Series

Sanyo, Eschborn, Deutschland

Gefriertrocknung „Alpha 1-4 LSC“

Christ, Osterode am Harz, Deutschland

Getreidemühle KoMo Fidibus 21

KoMo, Hopfgarten, Österreich

HPLC-DAD I 1200 Series

Degasser: G1322A, Quaternäre Pumpe: G1311A, Autosampler: G1329A, Säulenofen: G1316A, Thermostat G1330 B, DAD-Detektor: G1315D

Agilent, Santa Clara, USA

HPLC-DAD II 1200er Series

Degasser: G1379B, Binäre Pumpe G1312A, Autosampler G1329A, Thermostat G1330 B, Säulenofen G1316A, DAD-Detektor: G1315D

Agilent, Santa Clara, USA

HPLC-MS/MS I

- HPLC 1100 Series Degasser: G1322A, Quaternäre Pumpe: G1311A, Autosampler: G1387A, Säulenofen: G1316A, VWD-Detektor: G1314A

Agilent, Santa Clara, USA

- MS/MS: API 2000

AB Sciex, Framingham, USA

HPLC-MS/MS II

- HPLC 1200 Series Degasser: 1379B, Binäre Pumpe: G1312B SL, DAD-Detektor: G4212A, Säulenofen: G1316C, Autosampller: G1317C, Thermostateinheit: G1330B
Agilent, Santa Clara, USA
- MS/MS: API 3200
AB Sciex, Framingham, USA

HPLC-MS/MS III

- HPLC 1290 Infinity Degasser: 1379B, Binäre Pumpe: G4220A, DAD-Detektor: G1315C, Säulenofen: G1316B, Autosampller: G4226A, Thermostateinheit: G1330B
Agilent, Santa Clara, USA
- MS/MS: QTRAP 5500
AB Sciex, Framingham, USA

Kühlschrank-Gefrierkombinationen

Liebherr International, Bulle, Schweiz

Magnetrührer „MR 3001“

Heidolph, Schwabach, Deutschland

Magnetrührer „IKA“

VWR International, Radnor, USA

pH-Meter „pH 522“

WTW, Weilheim, Deutschland

pH-Meter

Hanna Instruments, Vöhringen, Deutschland

Pipetten

- Elektrische Mehrkanalpipette Xplorer 30–300 µL
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Elektrische Einkanalpipette Xplorer 0,5–10 µL, 100–1000 µL
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipetten „Research Plus“ 0,5–10 µL, 10–100 µL, 100–1000 µL, 1000–5000 µL
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipetten „Research Pro“ 0,5–10 µL, 10–100 µL, 100–1000 µL, 1000–5000 µL
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipetten 100–1000 µL, 1000–5000 µL
Sunlab von NeoLab, Heidelberg, Deutschland

Plattenlesegerät „Synergy 2“

Biotek, Berlin, Deutschland

Präparative HPLC 1200 Series

MWD-Detektor: G1365D, 2x präparative Pumpe: G1361A, Fraktionensammler G1364C

Agilent, Santa Clara, USA

Rotationsverdampfer

- Rotavapor "CVC 3000", "IKA RV 10 digital", "IKA HB 10 digital"
Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
- Büchi Rotavapor RE11
Büchi, Essen, Deutschland
- vacuubrand Membranpumpe, vacuubrand CVC24
Vacuubrand, Wertheim, Deutschland

Säulenpackungsmaterial Chromabond C18 EC (64 Å, 31 µm)

Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

SPE-Kammern

ASHCROFT Instruments, Baesweiler, Deutschland

Ultraschallbad „Sonorex Super AK 102 P“

Bandelin, Hagen, Deutschland

Ultraschallbad „Sonorex Super AK 106“

Bandelin, Hagen, Deutschland

Vakuumkonzentrator

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Vortexmischer

Heidolph, Schwabach, Deutschland und VWR International, Radnor, USA

Waagen

- Feinwaage „210 S“
Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Feinwaage „410 S“
Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Feinwaage „CP 244S“
Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Feinwaage „BP 410 S“
Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Ultrafeinwaage "XP6U Comparator"
Mettler Toledo, Gießen, Deutschland

Wasserbad

- Wasserbad „SW 20C“
Julabo, Seelbach, Deutschland
- Wasserbad „220 0,5 AMP-I“

Köttermann Labortechnik, Uetze, Deutschland

Zentrifugen

- Zentrifuge 5415 C
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge 5417 R
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge Multifuge 1 L-R
Heraeus, Hanau, Deutschland
- Zentrifuge „Rotanta 96 RS“
Hettich, Kirchlengern, Deutschland

8.1.3 Chemikalien

Aceton 99,5 % for analysis

VWR International, Radnor, USA

Acetonitril

- HiPerSolv CHROMANORM[®], for HPLC LC-MS grade
VWR International, Radnor, USA
- HiPerSolv CHROMANORM[®], super gradient grade HPLC
VWR International, Radnor, USA

Adenosinmonophosphat (AMP) > 99%

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Aluminiumchlorid 99,99 % wasserfrei (AlCl₃)

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Ameisensäure

- Ameisensäure p.A. ≥ 98%
Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ameisensäure p.A.
J.T.Baker Avantor, Radnor, USA
- Ameisensäure Optima LC-MS grade
Fisher chemicals, New Hampshire, USA

Azelainsäure ≥ 98%

Larodan, Solna, Schweden

(+)-Catechin ≥ 99 %

Extrasynthèse, Genay Cedex, Frankreich

p-Coumarsäure ≥ 98%

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

L-Cystein freie Base

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3,4-Dimethoxyzimtsäure 99%

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Dinatriumphosphat Monohydrat p.A. ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

Merck, Darmstadt, Deutschland

DMSO 99,9 % for spectroscopy

J&K Scientific, Pforzheim, Deutschland

EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat, $\geq 99\%$

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

(-)-Epicatechin $\geq 90\%$

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Ethanol absolute $\geq 99,5\%$

CHEMSOLUTE®, Th. Geyer Co. KG, Renningen, Deutschland

Ethylacetat

- Ethylacetat $\geq 99,8\%$, HiPerSolv Chromanorm®
VWR International, Radnor, USA
- Ethylacetat p.A.
Honeywell Fluka Fisher Scientific, New Hampshire, USA

Enzyme

- α -Glucosidase aus *Saccharomyces cerevisiae* (EC 3.2.1.20)
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- α -Amylase aus Schweinepankreas (EC 3.2.1.1)
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Human DPP IV (recombinant aus Hi5 Zellen) (EC 3.4.14.5)
Active Bioscience, Hamburg, Deutschland
- Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* (EC 1.1.1.49)
AlfaAesar, Kandel Deutschland
- Glykogenphosphorylase α (GP α) aus Hasenmuskel (EC 2.4.1.1)
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Phosphoglucomutase (PGM) aus Hasenmuskel (EC 5.4.2.2)
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Enzymlösungen

- Attenuzyme Core, 1600 AGU/g
Novozymes, Bagsvaerd, Dänemark
- FAN Boost 4 AU/g

Novozymes, Bagsvaerd, Dänemark

- Termamyl SCDS, 240 KNU

Novozymes, Bagsvaerd, Dänemark

Essigsäure 100 % p.A.

Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und J.T. Baker Avantor (Radnor, USA)

Folin-Ciocalteu-Reagenz

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Gallussäure 98 %

Alfa Aesar, Kandel, Deutschland

Gentisinsäure 99%

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Glucobay® 100 (Wirkstoff Acarbose)

Bayer Pharmaceuticals, Berlin, Deutschland

D-(+)-Glucose

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

β-Glycerophosphat Dinatriumsalz Pentahydrat

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Isopropanol ≥ 99,8 %, HiPerSolv Chromanorm®

VWR International, Radnor, USA

Isoxanthohumol 98,84 %

Phytolab, Vestenbergsgreuth, Deutschland

Januvia® 100 (Wirkstoff Sitagliptin)

MSD Sharp & Dohme GmbH, München, Deutschland

Kämpferol ≥ 99%

Extrasynthèse, Genay Cedex, Frankreich

Kaffeesäure ≥ 98%

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Kaliumdihydrogenphosphat p.A. (KH₂PO₄)

Merck, Darmstadt, Deutschland

Koffein

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Magnesiumsulfat Heptahydrat p.A. (Mg₂SO₄*7H₂O)

Merck, Darmstadt, Deutschland

Methanol ≥ 99,9 %, HiPerSolv Chromanorm®

VWR International, Radnor, USA

Moupinamid 99.39%

Phytolab, Vestenbergsgreuth, Deutschland

Natriumacetat p.A.

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Natriumchlorid p.A.

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Natriumcarbonat p.A.

Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumdihydrogenphosphat p.A. (NaH_2PO_4)

Riedel de Haen, Seelze, Deutschland

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Natriumnitrit $\geq 99\%$ (NaNO_2)

Sigma-Alrich, St. Louis, USA

Natriumsulfat p.A. wasserfrei (Na_2SO_4)

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Natronlauge 98% p.A. (NaOH)

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP)

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Procyanidine

- Procyanidin B1 $\geq 90\%$
Extrasynthèse, Genay Cedex, Frankreich
- Procyanidin B2 96.69 %
Phytolab, Vestenbergsgreuth, Deutschland
- Procyanidin B3 $\geq 95\%$
Extrasynthèse, Genay Cedex, Frankreich
- Procyanidin B4 $\geq 90\%$
Extrasynthèse, Genay Cedex, Frankreich

Quercetin $\geq 95\%$

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Rhamnazin 98.30 %

Extrasynthèse, Genay Cedex, Frankreich

Salzsäure (HCl)

CHEMSOLUTE®, Th. Geyer Co. KG, Renningen, Deutschland

Sebacinsäure $\geq 98\%$

Larodan, Solna, Schweden

Suberinsäure $\geq 98\%$

Larodan, Solna, Schweden

Substrate

- 2-Chloro-4-nitrophenyl- α -D-maltotriosid (CNPG3)
Apollo Scientific, Stockport, Großbritannien
- 4-Nitrophenyl- β -D-glucoopyranosid (pNPG)
Acros Organics, Geel, Belgien
- Glycyl-L-prolin 7-amido-4-methylcoumarin Hydrobromid (H-Gly-Pro-AMC)
Carbosynth, Staad, Schweiz
- Glykogen aus Auster
Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Syringasäure 98 % +

Alfa Aesar, Kandel, Deutschland

Tetrahydrofuran (THF) HPLC grade

VWR International, Radnor, USA

trans-Ferulasäure 99%

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

trans-Zimtsäure 99%

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tricin 98.77 %

Phytolab, Vestenbergsgreuth, Deutschland

(9,10,13)-Trihydroxyoctadecensäure > 99% (9,10,13-TriHOME)

Larodan, Solna, Schweden

(9,12,13)-Trihydroxyoctadecensäure > 99% (9,12,13-TriHOME)

Larodan, Solna, Schweden

TRIS Hydrochlorid (HCl) $\geq 99\%$

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tryptophan $\geq 98\%$

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Wasser, bidest.

Xanthohumol 99,76 %

Phytolab, Vestenbergsgreuth, Deutschland

8.2 Aufarbeitung und Charakterisierung der BSG

Folgende BSG wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet und vor Entfettung und/oder Extraktion zunächst gefriergetrocknet.

Tab. 11: Übersicht der verwendeten Treberchargen. BSG: Biertreber

| BSG/Code | Produktionsdatum | Produzent | Verwendetes Malz |
|------------|------------------|-------------------------|---|
| 1 / 180417 | 17.04.2018 | TUK, Lehrstuhl BioVT | Pilsner Malz (45,7 %) Weizenmalz (54,3 %) |
| 2 / 170711 | 11.07.2017 | TUK, Lehrstuhl BioVT | Wiener Malz (100 %) |
| 3 / 171215 | 15.12.2017 | Orval Brauerei, Belgien | Pilsner Malz (90%), Karamellmalz (9%), geschälte, geröstete Gerste (1%) |

8.2.1 BSG-Entfettung

Einzelne BSG-Proben wurden in Kooperation mit dem Projektpartner, der Arbeitsgruppe von Professor Thiel (TU Kaiserslautern) vor Extraktion entfettet. Die BSG-Proben (BSG 2 und BSG 3) wurden unter Rückfluss über Nacht im Verhältnis 300 g/3500 mL Isopropanol extrahiert. Die entfetteten Proben wurden getrocknet und ausgewogen.

8.2.2 Extrakterstellung Prozess 1 (A1–A3, HE1–HE3)

Gefriergetrockneter, zerkleinerter BSG wurde eingewogen (Tab. 12) und zweimal für je 30 min bei 60 °C im Wasserbad unter Rühren mit 60 %-igem Aceton im Verhältnis 1 g/20 mL extrahiert. Die beiden Extrakte wurden vereinigt, filtriert, das Lösungsmittel am Rotavapor bei 40 °C entfernt und die Extrakte in Wasser aufgenommen. Zur besseren Löslichkeit wurde das Gesamtvolumen mit ca. 10 % Anteil MeOH (MeOH; final 10 % MeOH-Anteil in Extraktlösung) versetzt. Der Rückstand der Extraktion wurde mit 4 M Natriumhydroxid (NaOH) im Verhältnis 1 g/27 mL über 90 min im Ultraschallbad hydrolysiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 2000 g) und der Überstand mit konzentrierter Salzsäure (HCl) auf $\text{pH} \leq 2$ angesäuert. Die Extrakte wurden erneut zentrifugiert (10 min, 2000 g) und anschließend dreimal mit je 200 mL EtOAc extrahiert (vgl. elektronischer Anhang Tab. 39 Seite G). Das Lösungsmittel wurde im Vakuum bei 40 °C entfernt, die Extrakte in Wasser aufgenommen (ca. 50 mL) und das Gesamtvolumen mit ca. 10 % Anteil MeOH versetzt. Alle Extrakte wurden mittels SPE (s. Kapitel 8.2.5) aufgereinigt.

Tab. 12: BSG-Einwaagen Extraktionsprozess 1 sowie Nomenklatur resultierender Extrakte. BSG: Biertreber

| BSG | Einwaage [g] | Resultierende Extrakte |
|-----|--------------|------------------------|
| 1 | 10,050 | A1 und HE1 |
| 2 | 15,518 | A2 und HE2 |
| 3 | 11,662 | A3 und HE3 |

8.2.3 Extrakterstellung Prozess 2 (HE4–HE6, HA1–HA3)

Gefriergetrockneter, zerkleinerter BSG wurde eingewogen (s. Tab. 13) und über 90 min im Ultraschallbad mit NaOH (4 M) im Verhältnis 1 g/10 mL hydrolysiert. Die Extrakte wurden filtriert, der Überstand mit konzentrierter HCl auf $\text{pH} \leq 2$ angesäuert und die Proben

zentrifugiert (10 min, 2000 g). Der erhaltene Überstand wurde je dreimal mit dem gleichen Volumen EtOAc wie zuvor NaOH extrahiert und abschließend das Lösungsmittel im Vakuum bei 40 °C entfernt. Die Extrakte wurden in Wasser aufgenommen (ca. 50 mL) und das Gesamtvolumen mit ca. 10 % Anteil MeOH (final 10 % MeOH-Anteil in Extraktlösung) versetzt. Der Rückstand des alkalischen Aufschlusses wurde zur SLE mit 60 %-igem Aceton (1 g/10 mL) verwendet. Die Präzipitate wurden hierfür mit 60 %-igem Aceton bei 60 °C über 30 min unter Rühren extrahiert (vgl. elektronischer Anhang Tab. 39 Seite G). Der Prozess wurde über Nacht wiederholt. Die vereinigten Acetonphasen wurden mit konzentrierter HCl auf $\text{pH} \leq 2$ angesäuert, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum bei 40 °C entfernt. Die Extrakte wurden in Wasser aufgenommen (ca. 50 mL) und das Gesamtvolumen mit ca. 10 % Anteil MeOH versetzt. Alle Extrakte wurden mittels SPE (s. Kapitel 8.2.5) aufgereinigt.

Tab. 13: BSG-Einwaagen Extraktionsprozess 2 sowie Nomenklatur resultierender Extrakte. BSG: Birtreber

| BSG | Einwaage [g] | Resultierende Extrakte |
|-------------|--------------|------------------------|
| 2 | 30,499 | HE4 und HA1 |
| 3 | 29,569 | HE5 und HA2 |
| 3 entfettet | 26,488 | HE6 und HA3 |

8.2.4 Extraktherstellung Prozess 3 (A4–A7)

Die gefriergetrockneten, zerkleinerten BSG wurden im Vorfeld mittels einer Getreidemühle sehr fein zu einem Pulver vermahlen. Extraktionsprozess 3 wurde im Rahmen eines Forschungspraktikums (Simone Beller, WS 18/19) durchgeführt. Die BSG wurden eingewogen und mit 60 %-igem Aceton zweimal bei 60 °C über 30 min unter Rühren extrahiert (Tab. 14). Die vereinigten Extrakte wurden filtriert, das Lösungsmittel am Rotavapor im Vakuum bei 40 °C entfernt und kontinuierlich in Wasser aufgenommen. Das Gesamtvolumen wurde am Ende mit 10 % Anteil MeOH versetzt. Die erhaltenen Extrakte wurden mittels SPE (s. Kapitel 8.2.5) aufgereinigt.

Tab. 14: BSG-Einwaagen und Lösungsmittelverhältnis Extraktionsprozess 2 sowie Nomenklatur resultierender Extrakte. BSG: Birtreber

| BSG | Einwaage [g] | Verhältnis BSG/60 %-igem Aceton | Resultierende Extrakte |
|-------------|--------------|---------------------------------|------------------------|
| 2 | 29,000 | 10,3 | A4 |
| 2 entfettet | 26,059 | 11,5 | A5 |
| 3 | 26,800 | 11,2 | A6 |
| 3 entfettet | 26,860 | 11,2 | A7 |

8.2.5 Aufreinigung der Extrakte

Alle erhaltenen Extrakte aus den drei Extraktionsprozessen (A1–A7, HE1–HE6, HA1–HA3) wurden mittels SPE aufgereinigt. Hierfür wurden die SPE-Kartuschen (Strata C18-E, 55 μm , 70 Å; 20 g/60 mL; Phenomenex) zunächst konditioniert mit 3 x 40 mL 1 %-iger Essigsäure in MeOH und anschließend mit 3 x 40 mL 1 %-iger Essigsäure in bidest. Wasser äquilibriert (pH 2,6). Die Probenaufgabe erfolgte in mehreren Schritten, abhängig von der Beladung des Adsorbentmaterials. Die Kartuschen wurden, abhängig von der Beladung, mit 5-9 x 40 mL 1 %-iger Essigsäure in bidest. Wasser gewaschen und abschließend mit 2 x 45 mL 1 %-iger

Essigsäure in MeOH eluiert. Die Eluate wurden in eingewogenen PP-Zentrifugenröhrchen an der Vakuumzentrifuge (20 mbar, 1400 rpm, RT) dreimal auf etwa 4-5 mL eingengt und jedes Mal mit bidest. Wasser auf ca. 12 mL aufgefüllt, um das Lösungsmittel vollständig zu entfernen. Die so erhaltenen Eluate wurden gefriergetrocknet, ausgewogen, gemörsernt und bis zur Verwendung lichtgeschützt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

8.2.6 Übersicht und Extrakt-nomenklatur

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Extrakte aus drei verschiedene BSG-Chargen mittels unterschiedlicher Extraktions- und Vorbehandlungsprozesse hergestellt (s. Abb. 55). So lieferten Extraktionsprozess 1 und 3 die Extrakte A1–A7 (Aceton), Prozess 1 und 2 die Extrakte HE1–HE6 (Hydrolyse und EtOAc-Extraktion) und Prozess 2 die HA1–HA3-Extrakte (Hydrolyse und Aceton-Extraktion, vgl. Tab. 15).

Tab. 15: Übersicht über die hergestellten Extrakte in Kombination mit BSG-Charge, Extraktionsprozess und –mittel sowie optionaler Vorbehandlung. BSG: Biertreber

| Name | BSG/Code | Prozess | „Vorbehandlung“ | Hauptextraktionsmittel |
|------|----------|---------|------------------------|-------------------------------|
| A1 | 1/180417 | 1 | - | 60 %-iges Aceton |
| A2 | 2/170711 | 1 | - | 60 %-iges Aceton |
| A3 | 3/171215 | 1 | - | 60 %-iges Aceton |
| HE1 | 1/180417 | 1 | 60 % Aceton | NaOH + EtOAc |
| HE2 | 2/170711 | 1 | 60 % Aceton | NaOH + EtOAc |
| HE3 | 3/171215 | 1 | 60 % Aceton | NaOH + EtOAc |
| HE4 | 2/170711 | 2 | - | NaOH + EtOAc |
| HE5 | 3/171215 | 2 | - | NaOH + EtOAc |
| HE6 | 3/171215 | 2 | Entfettung | NaOH + EtOAc |
| HA1 | 2/170711 | 2 | Hydrolyse | 60 %-iges Aceton |
| HA2 | 3/171215 | 2 | Hydrolyse | 60 %-iges Aceton |
| HA3 | 3/171215 | 2 | Entfettung + Hydrolyse | 60 %-iges Aceton |
| A4 | 2/170711 | 3 | - | 60 %-iges Aceton |
| A5 | 2/170711 | 3 | Entfettung | Entfettung + 60 %-iges Aceton |
| A6 | 3/171215 | 3 | - | 60 %-iges Aceton |
| A7 | 3/171215 | 3 | Entfettung | Entfettung + 60 %-iges Aceton |

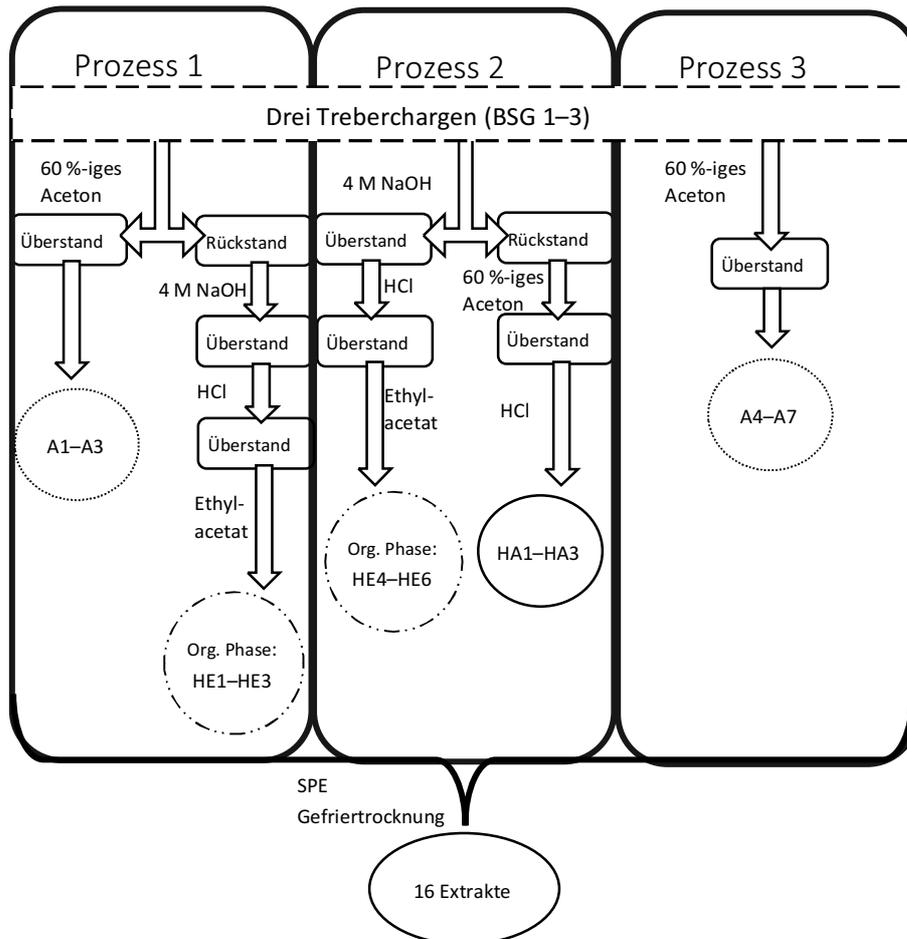


Abb. 55: Übersicht der durchgeführten Extraktionen. BSG: Biertreber, SPE: Festphasenextraktion

8.2.7 Bestimmung des *total phenolic content* (TPC) mittels Folin-Ciocalteu-Methode

Prinzip

Die Bestimmung des TPC nach Folin-Ciocalteu beruht auf der Redoxreaktion phenolischer Komponenten und anderer reduzierend wirkender Substanzen mit einer Lösung aus Molybdätophosphorsäure und Wolframatophosphorsäure (Folin-Reagenz, FC-Reagenz) in alkalischem Milieu. Dabei kommt es zur Bildung eines Komplexes, welcher bei 750 nm absorbiert und photometrisch bestimmt werden kann. Als Referenz dient Gallussäure, welche als externe Kalibrierung mitgeführt wird. Gesamtphenolgehalte werden demnach als GÄq ausgedrückt. Da neben phenolischen Komponenten andere reduzierende Substanzen wie bspw. Zucker erfasst werden, ist der Assay nicht spezifisch, findet jedoch trotzdem als einfache und schnelle Methode zur Abschätzung des Gesamtphenolgehaltes vielfach Anwendung [Ainsworth und Gillespie, 2007]. Die Untersuchung des TPC erfolgte modifiziert auf Grundlage vorangegangener Arbeiten im Arbeitskreis [Fuchs *et al.*, 2020].

Verwendete Chemikalien und Lösungen

- Folin-Reagenz (10 %) 1:10 mit bidest. Wasser verdünnen

- Natriumcarbonatlösung (100 g/L)
- Referenz Gallussäure:
 - 20–200 µg/mL in DMSO
- Probe: Extraktlösungen in DMSO (250–1000 µg/mL)

Durchführung

Zunächst wurden 10 µL Probe, Negativkontrolle (DMSO; NK) oder Standardlösung (Referenz Gallussäure) in eine 96 Well-Mikroplatte vorgelegt, mit 100 µL FC-Reagenz (10 %) versetzt und für 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert, wobei die Messungen in Triplikaten erfolgten. Danach wurden 80 µL Natriumcarbonatlösung zugegeben und erneut im Dunkeln bei RT für 2h inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 750 nm photometrisch vermessen. Über lineare Regression der Auftragung der Konzentration gegen die Absorption abzüglich des Blindwertes konnten die TPC der Proben bestimmt werden und wurden ausgedrückt als µg GÄq/ mg Extrakt.

8.2.8 Bestimmung des *total flavonoid content* (TFC) mittels AlCl₃-Methode

Prinzip

Die Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes erfolgt mittels einer modifizierten AlCl₃-Methode, welche einen Zwischenschritt der Nitrierung beinhaltet. Der einfache AlCl₃-Assay beruht auf der Bildung eines gelben Komplexes zwischen Flavonen und Flavonolen mit AlCl₃, welches mit der C4-Ketogruppe sowie einer C3 (R₁)- oder C5-Hydroxygruppe (R₅) wechselwirkt (s. Abb. 56 a). Zudem können säurelabile Komplexe mit den *ortho*-Dihydroxygruppen am A- und B-Ring von Flavonoiden gebildet werden. Natrium- bzw. Kaliumacetat dienen hierbei als schwache Basen zur Neutralisation der schwachen Säurewirkung des AlCl₃ [Chang *et al.*, 2002]. Im hier verwendeten modifizierten Assay wird am dritten oder vierten unsubstituierten Kohlenstoffatom eine Nitrierung (s. Abb. 56 b) durch Natriumnitrit eingebaut, wobei es zur Komplexbildung zwischen nitrierten Derivaten und Aluminiumchlorid kommt. Dieser gelbe Komplex wird durch Zugabe von Natriumhydroxid zu einem bei 510 nm absorbierenden Komplex umgesetzt und kann photometrisch bestimmt werden. Die Methode bietet gegenüber der Methode ohne Nitrierung den Vorteil, dass zusätzlich zu Flavonolen bspw. auch Catechin erfasst wird [Pękal und Pyrzyńska, 2014], welches als Referenzsubstanz verwendet wurde. Die Etablierung und Durchführung des modifizierten AlCl₃-Assays erfolgte im Rahmen eines Forschungspraktikums von Frau Carolina Corral Yélamos (SS 2019).

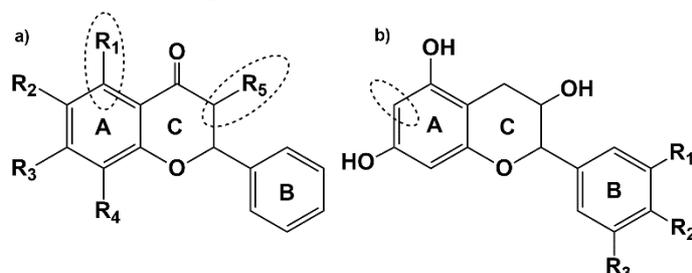


Abb. 56: a) Flavon mit Markierung der Komplexbildungsbereiche b) Catechin mit Markierung der Nitrierungsposition

Verwendete Chemikalien und Lösungen

- AlCl_3 -Lösung (2 %)
 - 1 g auf 50 mL bidest. Wasser
- Natriumhydroxidlösung (1 M)
 - 2 g auf 50 mL bidest. Wasser
- Natriumnitritlösung (3 %)
 - 1,5 g auf 50 mL bidest. Wasser
- Referenz Catechin
 - 20–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in DMSO
- Probe: Extraktlösungen in DMSO (250–2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Durchführung

Zunächst wurden 50 μL Probe, NK (DMSO) oder Standardlösung (Referenz Catechin) in eine 96 Well-Mikroplatte vorgelegt, mit 20 μL NaNO_2 -Lösung (3 %) versetzt und für 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert, wobei die Messungen in Triplikaten erfolgten. Danach wurden 20 μL AlCl_3 -Lösung (2 %) sowie 120 μL bidest. Wasser zugegeben und erneut im Dunkeln bei RT für 6 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 510 nm photometrisch vermessen, um die Blindwerte zu erfassen. Die Proben wurden mit 20 μL NaOH -Lösung (1 M) versetzt, 20 min im Dunkeln bei RT auf ein Mikroplattenshaker inkubiert und im Anschluss erneut bei 510 nm bei 40 °C am Platten-Photometer vermessen. Über lineare Regression der Auftragung der Konzentration gegen die Absorption abzüglich des Blindwertes wurden die TFC der Proben ausgedrückt als μg CÄq/mg Extrakt bestimmt.

8.2.9 Charakterisierung mittels HPLC-DAD

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei Methoden zur Charakterisierung der Extrakte entwickelt. So wurden Leitsubstanzen zunächst identifiziert und Quantifizierungen sowie Strukturaufklärungen zweier Substanzklassen mit je einer optimierten Methode durchgeführt.

8.2.9.1 Methode A: Identifikation

Methode A wurde zur Identifikation der in den Extrakten enthaltenen Leitsubstanzen verwendet und als HPLC-Methodik zur massenspektrometrischen Charakterisierung eingesetzt. Die HPLC-Parameter sind in Tab. 16 zusammengefasst und weiterentwickelt nach einer im Arbeitskreis etablierten Methode [Fuchs *et al.*, 2020]. Extrakte (0,5–2 mg/mL) sowie zur Identifikation eingesetzte Standardsubstanzen wurden in 0,1 %-iger Ameisensäure in MeOH gelöst.

Tab. 16: HPLC-Parameter der Methode A zur Identifikation von Leitsubstanzen in BSG-Extrakten. ACN: Acetonitril, BSG: Biertreber, HPLC: *high pressure liquid chromatography*, DAD: *diodenarray detector*

| System | HPLC-DAD I und II Agilent Technologies 1200 Series (s. Kapitel 8.1.2) | | | | | | | | |
|----------------------|---|----|----|----|----|----|----|------|----|
| Software | ChemStation | | | | | | | | |
| Säule | Phenomenex Synergi 4u polar RP 80 Å, 250 x 4,6 mm | | | | | | | | |
| Injektionsvolumen | 10-20 µL | | | | | | | | |
| Flussrate | 800 µL/min | | | | | | | | |
| Fließmittel A | 0,1 %-ige Ameisensäure | | | | | | | | |
| Fließmittel B | ACN | | | | | | | | |
| Säulenofentemperatur | 30 °C | | | | | | | | |
| Wellenlängenbereich | 200–650 nm | | | | | | | | |
| | Gradient | | | | | | | | |
| Zeit (min) | 0 | 9 | 10 | 19 | 34 | 40 | 50 | 50,1 | 60 |
| Fließmittel A (%) | 90 | 90 | 75 | 75 | 50 | 2 | 2 | 90 | 90 |
| Fließmittel B (%) | 10 | 10 | 25 | 25 | 50 | 98 | 98 | 10 | 10 |

8.2.9.2 Methode B: Quantifizierung von Hydroxyzimtsäurederivaten

Zur Quantifizierung der verschiedenen Hydroxyzimtsäurederivate in Extrakten HE1–HE6 und HA1–HA3 wurde eine optimierte HPLC-Methode entwickelt. Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Kalibrierung von 2,5–75 µg/mL *pCA*, 2,5–150 µg/mL *trans-FA* und 2,5–25 µg/mL *CA*. In den Extrakten enthaltene Isomere der drei HCAs wurden je als *trans*-Isomer, DiFAs als FA-Äq quantifiziert. Zudem wurde als interner Standard *trans*-Zimtsäure in einer Konzentration von 20 µg/mL mitgeführt. Die Parameter sind in Tab. 17 dargestellt. Informationen zum Vorgehen zur Validierung der Methode sind in Kapitel 8.6.3 aufgeführt, Kalibriergeraden, Verdünnungsschema und Einwaagen sind dem Anhang (Tab. 34 und Abb. 61) sowie dem elektronischen Anhang (vgl. elektronischer Anhang, Tab. 39 Seite G) zu entnehmen. Extrakte (0,25–2 mg/mL) sowie die verwendeten Standardsubstanzen wurden in

0,1 %-iger Ameisensäure in MeOH gelöst. Mittels Kalibriergeraden wurden Korrekturfaktoren für *pCA*, FA und CA bestimmt (s. Kapitel 8.6.3).

Tab. 17: HPLC-Parameter und Validierung der Methode B zur Quantifizierung von Hydroxyzimtsäurederivaten in BSG-Extrakten: ACN: Acetonitril; bw: *band width*, BSG: Biertreber, CA: Kaffeesäure, FA: Ferulasäure, HPLC: *high pressure liquid chromatography*, *pCA*: *p*-Coumarsäure, V_k : Variationskoeffizient

| System | HPLC-DAD I Agilent Technologies 1200 Series (s. Kapitel 8.1.2) | | | | | | | |
|---|--|------|-------------------|------|------|--------------|------|----|
| Software | ChemStation | | | | | | | |
| Säule | Phenomenex Synergi 4u polar RP 80 Å, 250 x 4,6 mm | | | | | | | |
| Injektionsvolumen | 20 µL | | | | | | | |
| Flussrate | 800 µL/min | | | | | | | |
| Fließmittel A | 0,1 %-ige Ameisensäure | | | | | | | |
| Fließmittel B | ACN | | | | | | | |
| Säulenofentemperatur | 35 °C | | | | | | | |
| Wellenlänge | 300 nm (bw 8) Referenzwellenlänge 440 (bw 50) | | | | | | | |
| Gradient | | | | | | | | |
| Zeit (min) | 0 | 7 | 11 | 41 | 41.1 | 48 | 48,1 | 60 |
| Fließmittel A (%) | 85 | 74,9 | 74,9 | 65,5 | 2 | 2 | 85 | 85 |
| Fließmittel B (%) | 15 | 25,1 | 25,1 | 34,5 | 98 | 98 | 15 | 15 |
| Validierung | | | | | | | | |
| | <i>trans</i>-FA | | <i>pCA</i> | | | CA | | |
| LOD [µg/mL] | 0,7 ± 0,05 | | 0,7 ± 0,01 | | | 0,7 ± 0,07 | | |
| LOQ [µg/mL] | 2,6 ± 0,18 | | 2,4 ± 0,03 | | | 2,4 ± 0,14 | | |
| V_k (Lauf-zu-Lauf) [%] | 1,2 | | 1,4 | | | 2,2 | | |
| V_k (Tag-zu-Tag) [%] | 2,5 | | 3,2 | | | 2,4 | | |
| Kalibriervalidierung | | | | | | | | |
| | <i>trans</i>-FA | | <i>pCA</i> | | | CA | | |
| Reststandardabweichung (R-SD) | 0,17 ± 0,07 | | 0,09 ± 0,02 | | | 0,05 ± 0,01 | | |
| Verfahrensstandardabweichung (V-SD) | 0,22 ± 0,09 | | 0,08 ± 0,01 | | | 0,06 ± 0,005 | | |
| Verfahrensvariationskoeffizient (V- V_k) | 9,61 ± 4,66 | | 6,74 ± 0,91 | | | 11,62 ± 0,91 | | |
| Korrekturfaktoren | | | | | | | | |
| | <i>trans</i>-FA | | <i>pCA</i> | | | CA | | |
| | 1,301 | | 0,873 | | | 1,211 | | |

8.2.9.3 Methode C: Quantifizierung von Hordatinen als *pCA*-Äq

Zur Quantifizierung der Hordatine in Extrakten A1–A7 wurde eine optimierte HPLC-Methode entwickelt. Dabei wurden die Hordatine als *pCA*-Äq mittels externer Kalibrierung von 1–50 µg/mL *pCA* quantifiziert. Zudem wurde 3,4-Dimethoxyzimtsäure in einer Konzentration von 20 µg/mL als interner Standard mitgeführt. Die Parameter sind in Tab. 18 dargestellt. Informationen zum Vorgehen zur Validierung der Methode sind in Kapitel 8.6.3 aufgeführt, die Kalibriergeraden sind dem Anhang (Tab. 35 und Abb. 62) sowie dem elektronischen

Anhang (vgl. elektronischer Anhang, Tab. 39 Seite G) zu entnehmen. Extrakte (1,47–7,425 mg/mL) sowie die verwendeten Standardsubstanzen wurden in 0,1 %-iger Ameisensäure in MeOH gelöst.

Tab. 18: HPLC-Parameter und Validierung der Methode C zur Quantifizierung von Hordatinen in BSG-Extrakten. ACN: Acetonitril, bw: band width, BSG: Biertreber, HPLC: *high pressure liquid chromatography*, pCA: *p*-Coumarsäure, V_k : Variationskoeffizient

| System | HPLC-DAD I Agilent Technologies 1200 Series (s. Kapitel 8.1.2) | | | | | | | | | |
|--------------------------|--|-----|----|------|------|----|------|----|------|----|
| Software | ChemStation | | | | | | | | | |
| Säule | VDSpher C18- SE 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m | | | | | | | | | |
| Injektionsvolumen | 20 μ L | | | | | | | | | |
| Flussrate | 800 μ L/min | | | | | | | | | |
| Fließmittel A | 0,1 % Ameisensäure | | | | | | | | | |
| Fließmittel B | 0,1 % Ameisensäure in ACN | | | | | | | | | |
| Säulenofentemperatur | 35 °C | | | | | | | | | |
| Wellenlänge | 280 nm (bw 8) Referenzwellenlänge 360 (bw 100) | | | | | | | | | |
| | Gradient | | | | | | | | | |
| Zeit (min) | 0 | 4,9 | 5 | 25 | 25,1 | 35 | 35,1 | 45 | 45,1 | 55 |
| Fließmittel A (%) | 98 | 98 | 90 | 76,5 | 65 | 50 | 5 | 5 | 98 | 98 |
| Fließmittel B (%) | 2 | 2 | 10 | 23,5 | 35 | 50 | 95 | 95 | 2 | 2 |
| | Validierung | | | | | | | | | |
| | pCA | | | | | | | | | |
| LOD [μ g/mL] | 0,31 \pm 0,02 | | | | | | | | | |
| LOQ [μ g/mL] | 1,04 \pm 0,07 | | | | | | | | | |
| V_k (Lauf-zu-Lauf) [%] | 0,43 | | | | | | | | | |
| V_k (Tag-zu-Tag) [%] | 1,04 | | | | | | | | | |
| | Kalibriervalidierung | | | | | | | | | |
| | pCA | | | | | | | | | |
| R-SD | 0,1 \pm 0,08 | | | | | | | | | |
| V-SD | 0,04 \pm 0,03 | | | | | | | | | |
| V- V_k | 5,63 \pm 4,2 | | | | | | | | | |

8.2.10 Strukturaufklärung und Charakterisierung mittels HPLC-ESI-MS/MS

Zur Strukturaufklärung und Charakterisierung einzelner Inhaltsstoffe in den Extrakten wurden diese in einer Konzentration von 0,25–1 mg/mL in 0,1 %-iger Ameisensäure in MeOH gelöst und membranfiltriert. Die Vermessung erfolgte an drei Systemen (HPLC-MS/MS I/II/III s. Kapitel 8.1.2) sowohl im positiven als auch negativen Ionisierungsmodus und im *full scan* oder Produktionsenscan. Am System HPLC-MS/MS III für die Charakterisierung der Hordatine wurde mittels Ionenfalle (engl. *linear ion trap*, LIT) die Sensitivität gesteigert. Die Injektionsvolumina lagen je nach Konzentration der Inhaltsstoffe und erwarteter Konzentration des Analyten im Extrakt zwischen 5–50 μ L. Charakteristische, im *full scan*-Modus identifizierte *m/z* wurden im Anschluss mittels Tandem-Massenspektrometrie im MS²-Scan-Modus analysiert. Für die

Charakterisierung der Hordatine sowie der DiFAs in den Extrakten wurden optimierte HPLC-MS-Methoden angewandt.

8.2.10.1 Charakterisierung der BSG-Extrakte

Zur Charakterisierung der BSG-Extrakte wurden zunächst mittels *full scans* m/z identifiziert, welche im Anschluss mittels MS²-Experimenten analysiert wurden. Die HPLC-Methodik findet sich in Kapitel 8.2.9.1. Es wurden zwischen 5–50 µL der Extraktprobe (100–1000 µg/mL) injiziert. In Tab. 19 und Tab. 20 sind die entsprechenden MS-Parameter zusammengefasst, separiert nach eingesetztem System, wobei für identifizierte Komponenten eine Anpassung verschiedener Parameter zur Optimierung erfolgte, weshalb für viele Parameter ein Bereich angegeben ist. Die substanzspezifischen MS-Parameter sowie die jeweiligen m/z für einzelne Substanzen sind Tab. 36 zu entnehmen.

Tab. 19: MS-Geräteparameter der Strukturaufklärung und Charakterisierung der BSG-Extrakte mittels *full scan*-Modus. BSG: Biertreber, ESI: electrospray ionisation, HPLC: *high pressure liquid chromatography*, MS: *mass spectrometry*

| | ESI positiv | ESI negativ |
|-------------------------------|-------------|-------------|
| <i>full scan</i> HPLC-MS/MS I | | |
| Curtain Gas N ₂ | 20 | 20 |
| Ionisationsspannung (V) | 4700 | -4500 |
| Temperatur (°C) | 450 | 450 |
| Nebulizer Gas (psi) | 30 | 30 |
| Turbo Heater Gas (psi) | 30 | 30 |
| Interface Heater | On | On |
| Declustering potential (V) | 80, 100 | -100 |
| Focusing Potential (V) | 340 | -340 |
| Entrance Potential (V) | 8 | -10 |
| Cell entrance Potential (V) | 12, 32 | -20 |
| Scanbereich (Da) | 100–1000 | 100–1000 |

Tab. 20: MS-Geräteparameter der Strukturaufklärung und Charakterisierung der BSG-Extrakte mittels MS²-Scan-Modus. BSG: Biertreber, ESI: electrospray ionisation, HPLC: *high pressure liquid chromatography*, MS: *mass spectrometry*

| | ESI positiv | ESI negativ |
|--|-----------------|---------------|
| MS² HPLC-MS/MS I | | |
| Curtain Gas N ₂ | 20 | 20 |
| Ionisationsspannung (V) | 4500; 4700 | -4500 |
| Temperatur (°C) | 450 | 450 |
| Nebulizer Gas (psi) | 30 | 30–50 |
| Turbo Heater Gas (psi) | 30 | 30–40 |
| Interface Heater | On | On |
| Declustering potential (V) | 51; 100 | -21 bis -100 |
| Focusing Potential (V) | 340; 370 | -160 bis -340 |
| Entrance Potential (V) | 8; 11,5 | -8 bis -10.5 |
| Collision-activated Dissociation Gas (units) | 2 | 2;6 |
| Collision Cell entrance Potential (V) | 8; 32 | -12 bis -38.4 |
| Collision Energy (V) | 12-20 | -6 bis -50 |
| Collision Cell exit Potential (V) | 50 | -2 bis -50 |
| MS² HPLC-MS/MS II | | |
| Curtain Gas N ₂ | nicht vermessen | 10 |
| Ionisationsspannung (V) | | -4500 |
| Temperatur (°C) | | 450 |
| Nebulizer Gas (psi) | | 30, 50 |
| Turbo Heater Gas (psi) | | 40, 30 |
| Interface Heater | | On |
| Declustering potential (V) | | -65 bis -100 |
| Entrance Potential (V) | | -9; -10,5 |
| Collision-activated Dissociation Gas (units) | | 2–6 |
| Collision Cell entrance Potential (V) | | -20; -38,5 |
| Collision Cell exit Potential (V) | | -2; -15 |
| Collision Energy (V) | | -20 bis -50 |

8.2.10.2 Strukturaufklärung von DiFAs sowie Charakterisierung von Oxylipinen in Extrakten

Zur Strukturaufklärung der enthaltenen DiFAs wurde die HPLC-Methode B (s. Kapitel 8.2.9.2) mit modifiziertem Gradienten verwendet. Die Injektionsvolumina variierten zwischen 5–20 µL Extraktprobe (250 µg/mL). Neben DiFAs wurden verschiedene TriHOME- und TriHODA-Isomere, zu den Oxylipinen gehörend, identifiziert. Die entsprechenden MS-Geräteparameter sowie der modifizierte Fließmittelgradient sind in Tab. 21 zusammengefasst. Die substanzspezifischen MS-Parameter für jedes Derivat sowie die jeweiligen *m/z* sind Tab. 37 a zu entnehmen.

Tab. 21: MS-Geräteparameter und zugehöriger HPLC-Gradient der Strukturaufklärung und Charakterisierung der DiFAs und Oxylipine in BSG-Extrakten. ACN: Acetonitril, BSG: Biertreber, DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, ESI: electrospray ionisation, HPLC: *high pressure liquid chromatography*, MS: *mass spectrometry*

HPLC-ESI(-)-MS/MS II

| Zeit (min) | Gradient | | | | | | |
|--|-----------------|------|------|------|----|------|------|
| | 0 | 11 | 41 | 41,1 | 48 | 48,1 | 60 |
| Fließmittel A (0,1 % Ameisensäure) (%) | 74,9 | 74,9 | 65,5 | 2 | 2 | 74,9 | 74,9 |
| Fließmittel B (ACN) (%) | 25,1 | 25,1 | 34,5 | 98 | 98 | 25,1 | 25,1 |
| full scan HPLC-ESI(-)-MS/MS II | | | | | | | |
| Curtain Gas N ₂ | 20 | | | | | | |
| Ionisationsspannung (V) | -4500 | | | | | | |
| Temperatur (°C) | 450 | | | | | | |
| Nebulizer Gas (psi) | 30 | | | | | | |
| Turbo Heater Gas (psi) | 30 | | | | | | |
| Interface Heater | On | | | | | | |
| Declustering potential (V) | -100 | | | | | | |
| Entrance Potential (V) | -10 | | | | | | |
| Cell entrance Potential (V) | -25,6 bis -44,5 | | | | | | |
| Scanbereich (Da) | 100–800 | | | | | | |
| MS² HPLC-MS/MS II | | | | | | | |
| Curtain Gas N ₂ | 10–20 | | | | | | |
| Ionisationsspannung (V) | -4500 | | | | | | |
| Temperatur (°C) | 450 | | | | | | |
| Nebulizer Gas (psi) | 30 | | | | | | |
| Turbo Heater Gas (psi) | 30 | | | | | | |
| Interface Heater | On | | | | | | |
| Declustering potential (V) | -45 bis -100 | | | | | | |
| Entrance Potential (V) | -10; -10,5 | | | | | | |
| Collision-activated Dissociation Gas (units) | 5 - 6 | | | | | | |
| Collision Cell entrance Potential (V) | -17 bis -31,8 | | | | | | |
| Collision Cell exit Potential (V) | -2 bis -4 | | | | | | |
| Collision Energy (V) | -20 bis -35 | | | | | | |

Zusätzlich wurden zur Identifikation der DiFAs *full scans* im negativen Modus mit der HPLC-Methode B (s. Kapitel 8.2.9.2) am HPLC-MS/MS I - System durchgeführt, da diese an der HPLC-UV aufgrund nicht vorhandener Referenzsubstanzen nicht mittels R_t bestimmt werden konnten. Das Injektionsvolumen lag bei 5 μ l der Extraktlösungen von 250–1000 μ g/mL. Die Parameter sind in Tab. 22 dargestellt.

Tab. 22: MS-Geräteparameter der Charakterisierung der DiFAs in BSG-Extrakten. BSG: Biertreber, DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, ESI: electrospray ionisation, HPLC: *high pressure liquid chromatography*, MS: *mass spectrometry*

| full scan HPLC-ESI(-)-MS/MS I | |
|--------------------------------------|--------------|
| Curtain Gas N ₂ | 20 |
| Ionisationsspannung (V) | -4500 |
| Temperatur (°C) | 450 |
| Nebulizer Gas (psi) | 30 |
| Turbo Heater Gas (psi) | 30 |
| Interface Heater | On |
| Declustering potential (V) | -100 |
| Focusing Potential (V) | -340 |
| Entrance Potential (V) | -10 |
| Cell entrance Potential (V) | -8,7 bis -30 |
| Scanbereich (Da) | 100-800 |

8.2.10.3 Strukturaufklärung der Hordatine in Extrakten

Zur Strukturaufklärung der enthaltenen Hordatine wurde die HPLC-Methode A (s. Kapitel 8.2.9.1) mit modifiziertem Gradienten verwendet. Die Strukturaufklärung erfolgte an zwei HPLC-MS/MS-Systemen (HPLC-MS/MS I und III), sowie unter Anwendung der LIT. Als Injektionsvolumen wurden zwischen 5–20 µL der Extraktlösung injiziert. Die Konzentrationen waren abhängig vom verwendeten HPLC-MS-System. An System I wurden Konzentrationen zwischen 500–1000 µg/mL eingesetzt, an System III hingegen aufgrund der deutlich gesteigerten Sensitivität zwischen 5–20 µg/mL. Die entsprechenden HPLC-MS-Geräteparameter sind, separiert nach eingesetztem System, in folgender Tabelle zusammengefasst (s. Tab. 23). Die substanzspezifischen MS-Parameter sowie die jeweiligen *m/z* sind in Tab. 38 zusammengefasst.

Tab. 23: MS-Geräteparameter der Charakterisierung der Hordatine in BSG-Extrakten mittels positivem *full scan*-Modus. ACN: Acetonitril, BSG: Biertreber, ESI: electrospray ionisation, HPLC: *high pressure liquid chromatography*, MS: *mass spectrometry*

HPLC-ESI-(+)-MS/MS I

| Zeit (min) | Gradient | | | | | | | |
|--|----------|----|----|----|------|----|------|----|
| | 0 | 9 | 10 | 19 | 19,1 | 29 | 29,1 | 39 |
| Fließmittel A (0,1 %-ige Ameisensäure) (%) | 90 | 90 | 75 | 75 | 2 | 2 | 90 | 90 |
| Fließmittel B (ACN) (%) | 10 | 10 | 25 | 25 | 98 | 98 | 10 | 10 |

MS² Scan-Modus

| | |
|--|-------------|
| Curtain Gas N ₂ | 20 |
| Ionisationsspannung (V) | 4700 |
| Temperatur (°C) | 450 |
| Nebulizer Gas (psi) | 30 |
| Turbo Heater Gas (psi) | 30 |
| Interface Heater | On |
| Declustering potential (V) | 100 |
| Focusing potential (V) | 340 |
| Entrance Potential (V) | 10,5 |
| Collision-activated Dissociation Gas (units) | 2 |
| Collision Cell entrance Potential (V) | 14,5 bis 20 |
| Collision Cell exit Potential (V) | 50 |
| Collision Energy (V) | 35 |

HPLC-ESI-(+)-MS/MS IIIH

ESI (+) -Enhanced product ion (EPI) scans

| | |
|---|------|
| Curtain Gas N ₂ | 20 |
| Ionisationsspannung (V) | 4700 |
| Temperatur (°C) | 450 |
| Nebulizer Gas (psi) | 30 |
| Turbo Heater Gas (psi) | 30 |
| Interface Heater | On |
| Declustering potential (V) | 100 |
| Entrance Potential (V) | 8 |
| Collision-activated Dissociation Gas (unit) | -3 |
| Collision Energy (V) | 40 |
| Collisional Energy Spread (V) | 20 |

LIT Parameter

| | |
|------------------------------|---------------------|
| Scanrate (Da/s) | 1000 |
| LIT fill time (msec) | 1 |
| Dynamic fill time | on |
| Q3 Entry Barrier (V) | 8 |
| Auxiliary AC (AF3) (V) | 0,14–0,91 |
| Exit lense voltage (EXB) (V) | -158.88 bis -133,54 |

Zusätzlich wurden *full scans* im positiven Modus mit der HPLC-Methode C (s. Kapitel 8.2.9.3) durchgeführt zur Identifikation der einzelnen Hordatine. Diese konnten nicht an der HPLC-UV mittels R_t bestimmt werden, da keine Referenzsubstanzen vorhanden waren. Das Injektionsvolumen lag bei 5 μL der Extraktlösung (1470 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Die Parameter sind in Tab. 24 dargestellt.

Tab. 24: MS-Geräteparameter der Charakterisierung der Hordatine in BSG-Extrakten mittels positivem *full scan* Modus. BSG: Biertreber, ESI: electrospray ionisation, HPLC: *high pressure liquid chromatography*, MS: *mass spectrometry*

| HPLC-ESI-(+)-MS/MS I <i>full scan</i> | |
|--|-------------|
| Curtain Gas N_2 | 20 |
| Ionisationsspannung (V) | 4700 |
| Temperatur ($^{\circ}\text{C}$) | 450 |
| Nebulizer Gas (psi) | 30 |
| Turbo Heater Gas (psi) | 30 |
| Interface Heater | On |
| Declustering potential (V) | 100 |
| Focusing Potential (V) | 340 |
| Entrance Potential (V) | 10.5 |
| Cell entrance Potential (V) | 10,2 bis 24 |
| Scanbereich (Da) | 150–600 |

8.3 In vitro-Enzyminhibitionsassay

Der Einfluss der Extrakte, Fraktionen und ausgewählter Reinsubstanzen auf den Glucosestoffwechsel wurde anhand von vier Enzymen (α -Amylase, α -Glucosidase, DPP IV und GP α) mittels *in vitro*-Enzyminhibitionsassays untersucht. Die Assays beruhen auf der enzymatischen Freisetzung eines chromogenen oder fluorogenen Produktes bzw. der Generierung eines chromogenen Cofaktors. Zur Abschätzung der Inhibitionsstärke wird der IC_{50} -Wert berechnet. Dieser entspricht der Konzentration an Testsubstanz, bei welcher 50 % des Enzyms inhibiert ist [Offermanns und Rosenthal, 2008]. Zur Validierung der Assays wurde bei jeder Durchführung die jeweilige PK (Acarbose, Sitagliptin und Koffein) mitgeführt und das *overall minimum significant ratio* (MSR) bestimmt, welches < 3 sein sollte [Iversen *et al.*, 2021]. Die Bestimmung des MSR erfolgte nach Kapitel 8.6.1, die Daten sind dem elektronischen Anhang zu entnehmen (vgl. Tab. 39 Seite G). Die maximal eingesetzten Konzentrationen lagen bei 10 mg/mL für die Extrakte (\cong 1052 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für α -Glucosidase und α -Amylase bzw. 952 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für GP α und 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für DPP IV), 2 mg/mL für H- und F-Fraktionen (\cong 211 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für α -Glucosidase und α -Amylase bzw. 174 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für GP α und 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für DPP IV) sowie 2 mM für Reinsubstanzen (\cong 211 μM für α -Glucosidase und α -Amylase bzw. 174 μM für GP α und 200 μM für DPP IV).

8.3.1 α -Amylase-Inhibitionsassay

Prinzip

Der α -Amylase-Inhibitionsassay wurde analog vorangegangener Arbeiten durchgeführt [Berger *et al.*, 2020]. Er beruht auf der Spaltung der glykosidischen Bindung im Substrat CNPG3 durch das Enzym α -Amylase zu 2-Chloro-4-nitrophenol, welches bei 405 nm absorbiert und photometrisch bestimmt werden kann (Abb. 57). Die Absorptionshöhe ist proportional zur Umsatzrate und ermöglicht so Rückschlüsse auf die Enzymaktivität.

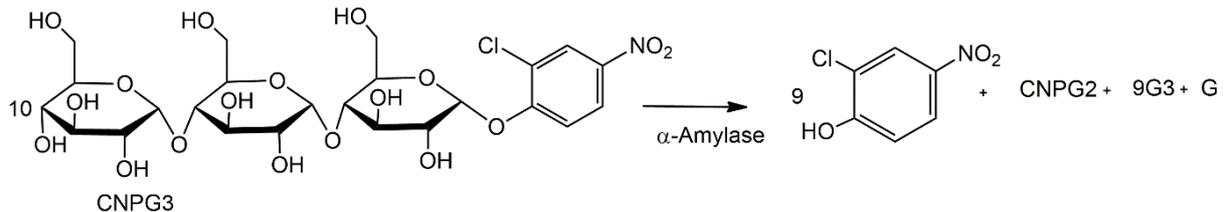


Abb. 57: Prinzip des α -Amylase-Inhibitionsassays. CNPG3: 2-Chloro-4-nitrophenyl- α -maltotriosid, CNPG2: 2-Chloro-4-nitrophenyl-diglucosid, G3: Maltotriose, G: Glucose

Verwendete Chemikalien und Lösungen

- Phosphatgepufferte Lösung (PBS)-Puffer (40 mM) pH 6,9
 - Lösung 1: 100 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (907,8 mg KH_2PO_4 in 100 mL bidest. Wasser lösen)
 - Lösung 2: 100 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (1,1376 g Na_2HPO_4 in 100 mL bidest. Wasser lösen)
 - 55,2 mL Lösung 2 mit Lösung 1 auf 100 mL auffüllen und 1:2,5 mit bidest. Wasser verdünnen
- Enzymlösung 30 U/mL
 - Enzym-Charge (LOT#BCBP1968V): 60 U/mg
 - 3,5 mg in 7 mL 40 mM PBS lösen
 - 1 Tag bei -20°C lagerbar
- Substratlösung 4 mM
 - 26,30 mg CNPG3 in 10 mL 40 mM PBS lösen
 - 1 Tag bei -20°C lagerbar
- PK Acarbose
 - 2 Tabletten Glucobay[®] 100 in 10 mL bidest. Wasser lösen und filtrieren zu einer Stammlösung von 10 mg/mL (bei 4°C 2 Wochen lagerbar)
 - Verdünnungen von 0,15–0,55 mg/mL in bidest. Wasser als Messlösungen ansetzen
- Extrakte und Reinsubstanzen
 - Extrakte in 10 mg/mL in DMSO lösen (\equiv 1,05 mg/mL als höchste getestete Konzentration)
 - Reinsubstanzen in DMSO (2 mM) lösen (\equiv 210 μM als höchste getestete Konzentration)
 - 5 Verdünnungen in DMSO abhängig von der Inhibitionsstärke

Durchführung

Zur Bestimmung der α -Amylaseinhibition wurden zunächst 20 μL der Probe, PK (Acarbose 0,15–0,55 mg/mL) oder NK (bidest. Wasser für Acarbose und DMSO für Extrakte und Reinsubstanzen) in einer 96-Well-Mikroplatte vorgelegt. Die Messung erfolgte in Triplikaten. Zudem wurde aufgrund der Eigenfärbung der Proben pro Konzentration ein Blindwert mitgeführt. Anschließend wurden 70 μL Enzymlösung zugegeben und es folgte eine Vorinkubation über 10 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μL Substratlösung gestartet. Nach 8 min Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption bei 405 nm photometrisch bestimmt. Zur Ermittlung der prozentualen Inhibition wurde jeweils der Blindwert subtrahiert und alle Proben wurden auf die jeweilige NK bezogen (s. Formel 1). Mittels linearer Regression der Auftragung der Konzentration gegen die prozentuale Inhibition wurde der IC_{50} -Wert berechnet, welcher sich auf im Well vorliegende Konzentration bezieht. Der IC_{50} -Wert der PK Acarbose liegt bei $35,5 \pm 4,4 \mu\text{g/mL}$ ($\equiv 55 \pm 6,9 \mu\text{M}$) und weist ein MSR von 1,4 auf.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{Absorption (NK)} - \text{Absorption (Testsubstanz)}}{\text{Absorption (Kontrolle)}} * 100$$

Formel 1: Berechnung der prozentualen Inhibition bei Absorptionsmessung

8.3.2 α -Glucosidase-Inhibitionsassay

Prinzip

Dem α -Glucosidase-Inhibitionsassay liegt die Spaltung der glykosidischen Bindung im Substrat pNPG durch das Enzym α -Glucosidase zum bei 405 nm absorbierenden Produkt p-Nitrophenol als Prinzip zugrunde (Abb. 58). Die Durchführung beruht auf vorangegangenen Arbeiten [Berger *et al.*, 2020]. Wie zuvor beim α -Amylase-Inhibitionsassay ist die Absorptionsintensität proportional zur Umsatzrate und ermöglicht demnach Rückschlüsse auf die Enzymaktivität.

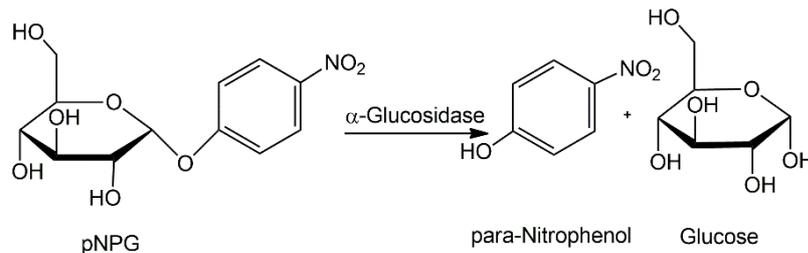


Abb. 58: Prinzip des α -Glucosidase-Inhibitionsassays. pNPG: 4-Nitrophenyl β -D-glucopyranosid

Verwendete Chemikalien und Lösungen

- Phosphatgepufferte Lösung (PBS)-Puffer (100 mM) pH 6,8
 - Lösung 1: 100 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (907,8 mg KH_2PO_4 in 100 mL bidest. Wasser lösen)
 - Lösung 2: 100 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (1,1376 g Na_2HPO_4 in 100 mL bidest. Wasser lösen)
 - 492 mL Lösung 2 mit Lösung 1 auf 1 L auffüllen
- Enzymlösung 1 U/mL

- 7 U (Menge je nach Charge) in 7 mL 100 mM PBS lösen
- 1 Tag bei -20 °C lagerbar
- Substratlösung 4 mM
 - 12,05 mg pNPG in 10 mL 100 mM PBS lösen
 - 1 Tag bei -20 °C lagerbar
- PK Acarbose
 - 2 Tabletten Glucobay[®] 100 in 10 mL bidest. Wasser lösen und filtrieren zu einer Stammlösung von 10 mg/mL (bei 4 °C 2 Wochen lagerbar)
 - Verdünnungen von 0,4–2 mg/mL in bidest. Wasser als Messlösungen ansetzen
- Extrakte und Reinsubstanzen
 - Extrakte in 10 mg/mL in DMSO lösen (\equiv 1,05 mg/mL als höchste getestete Konzentration)
 - Fraktionen in 2 mg/mL in DMSO lösen (\equiv 210 μ g/mL als höchste getestete Konzentration)
 - Reinsubstanzen in DMSO (2 mM) lösen (\equiv 210 μ M als höchste getestete Konzentration)
 - 5 Verdünnungen in DMSO abhängig von der Inhibitionsstärke

Durchführung

Zur Bestimmung der α -Glucosidase-Inhibition wurden zunächst 20 μ L der Probe, PK oder NK (bidest. Wasser für Acarbose und DMSO für Extrakte und Reinsubstanzen) in einer 96-Well-Mikroplatte vorgelegt, wobei die Messung in Triplikaten erfolgte. Aufgrund der Eigenfärbung der Proben wurde pro Konzentration ein Blindwert mitgeführt. Anschließend wurden 70 μ L Enzymlösung zugegeben und es folgte eine Vorinkubation über 10 min bei 25 °C. Anschließend wurden 100 μ L Substratlösung zugegeben und nach 5 min Inkubation bei 25 °C wurde die Absorption bei 405 nm photometrisch bestimmt. Zur Ermittlung der prozentualen Inhibition wurde jeweils der Blindwert subtrahiert und alle Proben wurden auf die jeweilige NK bezogen (s. Formel 1, Kapitel 8.3.1). Mittels linearer Regression der Auftragung der Konzentration gegen die prozentuale Inhibition wurde der IC_{50} -Wert berechnet, welcher sich auf im Well vorliegende Konzentration bezieht. Der IC_{50} -Wert der PK Acarbose liegt bei $156,8 \pm 37,3 \mu\text{g/mL}$ ($\equiv 242,8 \pm 57,8 \mu\text{M}$) und weist ein MSR von 2,4 auf.

8.3.3 Dipeptidylpeptidase IV-Inhibitionsassay

Prinzip

Das Enzym DPP IV spaltet Amidbindungen, was im hier eingesetzten Inhibitionsassay genutzt wird. Das verwendete Substrat Glycyl-L-Prolin-7-Amido-4-Methylcoumarin-Hydrobromid (H-Gly-Pro-AMC) wird zwischen Prolin und 7-Amido-4-Methylcoumarin (AMC) gespalten. Das entstandene fluorogene AMC wird bei Extinktionswellenlänge 360/40 und Emissionswellenlänge 460/40 vermessen (Abb. 59). Die Fluoreszenz ist proportional zur Umsatzrate und ermöglicht demnach Rückschlüsse auf die Enzymaktivität. Der Assay beruht auf einer modifizierten Durchführung [Connolly *et al.*, 2014] und wurde im Rahmen eines Forschungspraktikums (Vanessa Daub, SS 2018) im Arbeitskreis etabliert.

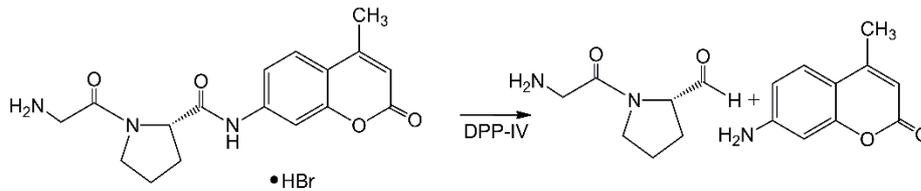


Abb. 59: Prinzip des DPP IV-Inhibitionsassays. DPP IV: Dipeptidylpeptidase IV

Verwendete Chemikalien und Lösungen

- TRIS-HCl- Puffer 20 mM, pH 8
 - 2,4 g TRIS-HCl; 5,8 g Natriumchlorid; 0,29 g EDTA auf 1 L bidest. Wasser
 - mit 1 M HCl auf pH 8 ansäuern
- Enzymlösung 6 mU/mL
 - 0,6 µL aus Stammlösung (200 U/mg; 0,5 mg/mL) in 9999,4 µL TRIS-HCl-Puffer lösen
 - in Aliquots bei -20 °C wegfrieren
- Substratlösung 0,2 mM
 - 0,821 H-Gly-Pro-AMC in 10 mL TRIS-HCl-Puffer lösen
- PK Sitagliptin
 - 1 Tablette Januvia® 100 in 50 mL TRIS-HCl-Puffer lösen (entspricht Stammlösung von 1 mg/mL)
 - Verdünnungen von 10–60 ng/mL in TRIS-HCl als Messlösungen ansetzen
- Extrakte und Reinsubstanzen
 - Extrakte in 10 mg/mL in DMSO lösen (≡ 1 mg/mL als höchste getestete Konzentration)
 - Reinsubstanzen in DMSO (2 mM) lösen (≡ 200 µM als höchste getestete Konzentration)
 - 5 Verdünnungen in DMSO abhängig von der Inhibitionsstärke

Durchführung

Zunächst wurden 20 µL Probe, PK oder NK gemeinsam mit je 60 µL Tris-HCl-Puffer in eine schwarze für Fluoreszenzmessungen geeignete 96-Well-Mikroplatte vorgelegt. Die Messung erfolgte in Triplikaten, wobei je ein Blindwert pro Konzentration zusätzlich mitgeführt wurde. Nachfolgend wurden je 100 µL Substrat- und 20 µL Enzymlösung zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C erfolgte die Fluoreszenzmessung bei Extinktionswellenlänge 360/40 und Emissionswellenlänge 460/40. Die prozentuale Inhibition wurde nach Abzug der Blindwerte und in Relation zur NK mittels Formel 2 berechnet. Durch lineare Regression der Auftragung der Konzentration gegen die prozentuale Inhibition wurde der IC₅₀-Wert berechnet, welcher sich auf im Well vorliegende Konzentration bezieht. Der IC₅₀-Wert der PK Sitagliptin liegt bei 5,6 ± 1 ng/mL (≡ 13,8 ± 2,6 nM) und weist ein MSR von 1,8 auf.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{Fluoreszenz (NK)} - \text{Fluoreszenz (Testsubstanz)}}{\text{Fluoreszenz (NK)}} * 100$$

Formel 2: Berechnung der prozentualen Inhibition bei Fluoreszenzmessung

8.3.4 GP α -Inhibitionsassay

Prinzip

Der hier angewandte GP α -Inhibitionsassay beruht auf der Bestimmung der Enzymaktivität in Richtung der Glykogenolyse. Das Enzym katalysiert dabei den Abbau des Glykogens, wobei Glucose-1-phosphat freigesetzt wird. Dieses wird durch die Phosphoglucomutase (PGM) in Glucose-6-phosphat überführt, welches im Anschluss von der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase unter Reduktion von NADP⁺ zu NADPH+H⁺ zu D-Glucon-1,5-lacton-6-phosphat oxidiert wird (Abb. 60). Da NADPH+H⁺ ein zweites Absorptionsmaximum bei 340 nm besitzt, kann die Reaktion photometrisch verfolgt werden. Die Zunahme der Absorption ist proportional der GP α -Aktivität und ermöglicht so Rückschlüsse auf die Inhibitionsstärken der untersuchten Testsubstanzen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Assay auf 96-Well-Mikroplatten übertragen von Vorgängerarbeiten [Jakobs *et al.*, 2006] und anschließend im Rahmen einer im Arbeitskreis durchgeführten Masterarbeit (Masterarbeit Marcel Hensel, WS 20/21) etabliert. Eine Modifikation erfolgte schlussendlich hinsichtlich der Substratmenge.

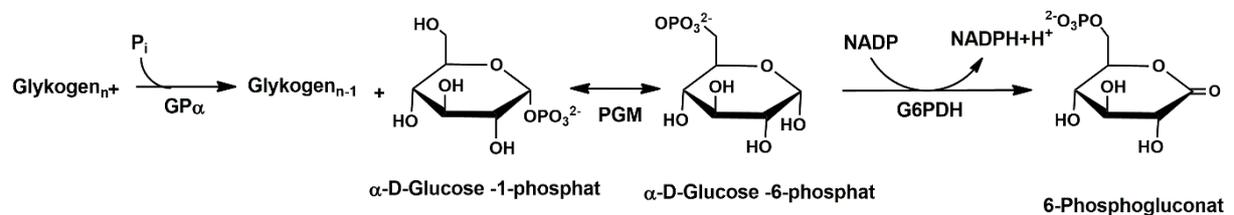


Abb. 60: Prinzip des GP α -Inhibitionsassays. GP α : Glykogenphosphorylase α , G6PDH: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, NADP: Nicotinamadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form), NADPH+H⁺: Nicotinamadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form), P_i: anorganisches Phosphat, PGM: Phosphoglucomutase

- Puffer A (Aufbewahrungspuffer für Enzym) 40 mM β -Glycerophosphatpuffer, pH 6,8
 - 612,3 mg β -Glycerophosphat Dinatriumsalz (\equiv 40 mM) und 48,5 mg L-Cystein freie Base (\equiv 8 mM) in 50 mL bidest. Wasser lösen
 - pH-Wert auf 6,8 einstellen
 - vor Lösen des Enzyms im Puffer zusätzlich 1,042 mg/mL AMP (\equiv 3 mM) zugeben
 - bei 4°C lagerbar, nicht mehr verwendbar sobald sich ein Niederschlag bildet
- Puffer B (Assay Puffer) PBS-Puffer 20 mM
 - 2,7598 g/l Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (\equiv 20 mM) und 0,4923 g/l Magnesiumsulfat Heptahydrat (\equiv 2 mM) in 1 L bidest. Wasser lösen
 - auf pH 7,2 einstellen
- Puffer B-Arbeitslösung
 - Puffer B 1:2 mit bidest. Wasser verdünnen
- Glucose-Lösung 500 mM
 - 4,5039 g Glucose in 50 mL bidest. Wasser lösen
- Enzym-Stammlösungen
 - PGM 500 U/mL in bidest. Wasser (Aliquots bei -80 °C)
 - G6PDH 500 U/mL in bidest. Wasser (Aliquots bei -80 °C)

- GP α 5 U/mL in Puffer A (Aliquots bei -80°C)
- NADP-Stammlösung: 31,38 mg/mL NADP in Puffer B-Arbeitslösung
- GP α -Arbeitslösung
- 120 μL GP α -Stammlösung ($\equiv 93,75$ mU/mL) und 1280 μL Glucose-Stammlösung ($\equiv 100$ mM) mit Puffer B-Arbeitslösung auf 6300 μL auffüllen
- Substratlösung: 2 mg/mL Glykogen in Puffer B-Arbeitslösung lösen
- Assay-Medium
- 51 μL G6PDH-Stammlösung ($\equiv 5$ U/mL), 122,4 μL PGM-Stammlösung ($\equiv 12$ U/mL) und 510 μL NADP-Stammlösung ($\equiv 3,148$ mg/mL) mit Puffer B – Arbeitslösung auf 5100 μL auffüllen
- PK Koffein
- Messlösungen im Konzentrationsbereich 0,5–2 mg/mL in bidest. Wasser
- Extrakte und Reinsubstanzen
- Reinsubstanzen in DMSO (2 mM) lösen ($\equiv 174$ μM als höchste getestete Konzentration)
- Fraktionen in 2 mg/mL in DMSO lösen ($\equiv 174$ $\mu\text{g/mL}$ als höchste getestete Konzentration)
- Extrakte in DMSO (Angaben in Masterarbeit von Marcel Hensel)
- 5 Verdünnungen in DMSO abhängig von der Inhibitionsstärke

Durchführung

Zu Beginn wurden je 20 μL der PK, Probe oder NK in einer 96-Well-Mikroplatte vorgelegt, wobei die Vermessung in Triplikaten erfolgte. Aufgrund der Eigenfärbung wurde je ein Blindwert pro Konzentration mitgeführt. Danach wurden je 50 μL Assay-Medium und 80 μL Substratlösung zugegeben. Die Umsetzung wurde durch Zugabe von 80 μL GP α -Arbeitslösung gestartet. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Proben photometrisch bei 340 nm vermessen. Nach Abzug der Blindwerte und Bezug auf die NK (bidest. Wasser für PK Koffein, DMSO für Fraktionen und Reinsubstanzen) konnte die prozentuale Inhibition bestimmt werden (s. Formel 1, Kapitel 8.3.1). Über lineare Regression der Auftragung von Konzentration gegen prozentuale Inhibition konnte der IC_{50} -Wert bestimmt werden, der sich auf die im Well vorliegende Konzentration bezieht. Der IC_{50} -Wert der PK Koffein liegt bei $119,1 \pm 11,3$ $\mu\text{g/mL}$ und weist ein MSR von 1,3 auf.

8.4 Isolierung von FA-Derivate aus BSG

FA-Oligomere sind kommerziell nicht erwerblich und müssen daher synthetisiert oder mittels Isolierung aus dem Naturprodukt gewonnen werden. Da BSG in ausreichender Menge vorhanden war und somit gewährleistet werden konnte, dass die im Extrakt vorkommenden FA-Derivate gewonnen werden, wurde die Isolierung gewählt. Hierbei wurde ein mehrstufiger Prozess aus alkalischer Hydrolyse (vgl. elektronischer Anhang Tab. 39 Seite G), GPC und präparativer HPLC-Aufreinigung modifiziert nach Methoden von Waterstraat und Bunzel gewählt [Waterstraat und Bunzel, 2019; Waterstraat *et al.*, 2016].

8.4.1 Vorbehandlung des BSGs

Gefriergetrockneter BSG der Brauerei Orval (3/171215) wurde mittels Getreidemühle (KoMo Fidibus 219) zu einem feinen Pulver vermahlen und anschließend mit Aceton über Nacht mittels Soxhlet-Extraktion im Verhältnis 1 g BSG pro 16 mL Lösungsmittel entfettet (durchgeführt vom Projektpartner AK Thiel, TU Kaiserslautern, Ranja Saynisch). 100 g des entfetteten, getrockneten BSGs wurden in 1 L PBS (80 mM, pH 5,4) aufgeschlämmt, im Wasserbad auf 85 °C erwärmt und mit 3 mL α -Amylase-Enzymlösung (Termamyl SCDS, 240 KNU, Novozymes) versetzt. Die Suspension wurde unter Rühren für 20 min inkubiert. Der pH-Wert wurde mittels verdünnter Natronlauge auf 6,2 eingestellt und die Suspension auf 70 °C temperiert. Es erfolgte die Zugabe von 1,8 mL Alcalase-Enzymlösung (FAN Boost 4 AU/g, Novozymes) und eine 30-minütige Inkubation unter Rühren. Die Suspension wurde mittels verdünnter Salzsäure auf pH 4,5 eingestellt und auf 60 °C temperiert, bevor die Zugabe von 0,66 mL Amyloglucosidase-Enzymlösung (Attenuzyme Core, 1600 AGU/g, Novozymes) erfolgte. Erneut wurde für 30 min inkubiert. Die Suspension wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert. Abschließend wurde der Rückstand nacheinander mit 2 x je 500 mL bidest. Wasser (60 °C), 2 x 500 mL 95 %-igem Ethanol (Ethanol/Wasser; 95/5; v/v) und 2 x 500 mL Aceton gewaschen. Der Rückstand wurde über Nacht im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet und die Auswaage bestimmt.

8.4.2 Gewinnung mittels alkalischen Aufschlusses

Zur Durchführung der alkalischen Hydrolyse wurden ca. 20 g des getrockneten, vorbehandelten BSGs (s. Kapitel 8.4.1) unter Stickstoff-Atmosphäre mit 400 mL Natronlauge (4 M) versetzt und lichtgeschützt über Nacht gerührt. Der Aufschluss wurde anschließend auf $\text{pH} \leq 2$ mit konzentrierter Salzsäure eingestellt und filtriert. Die erhaltene Lösung wurde 3 x im Volumen-Verhältnis 1:1 mit EtOAc extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, filtriert und am Rotationsverdampfer auf ca. 190 mL reduziert. Das eingeeengte Filtrat wurde 3 x mit Natriumhydrogencarbonatlösung (5 %) extrahiert und die vereinigten wässrigen Phasen mit konzentrierter Salzsäure auf $\text{pH} \leq 2$ eingestellt. Die Lösung wurde 4 x mit je 200 mL EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Die Lösung wurde erneut am Rotationsverdampfer bei 40 °C eingeeengt, bis ein dickflüssiger, ölig, brauner Rückstand erhalten wurde. Die Ausbeute des Rohisolates wurde bestimmt.

8.4.3 Präparative Aufreinigung

Die präparative Aufreinigung des Rohisolates erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde eine Grobfractionierung mittels GPC durchgeführt. Die erhaltenen fünf Fraktionen wurden im Anschluss mittels semi-präparativer HPLC weiter fraktioniert. Alle Fraktionen wurden via LC-MS vermessen und bei Signalen mit gleicher R_t und gleichem m/z vereinigt. Die so erhaltenen Fraktionen wurden abschließend gefriergetrocknet und die jeweilige Ausbeute bestimmt.

8.4.3.1 GPC

Zur Durchführung der semi-präparativen GPC wurde das Rohisolat in Tetrahydrofuran in einer Konzentration von 35 mg/mL aufgenommen. Die Parameter der Methode sind in Tab. 25 aufgeführt.

Tab. 25: HPLC-Parameter der semi-präparativen GPC. bw: band width, DAD: diodenarray detector, GPC: Größenausschlusschromatographie, HPLC: *high pressure liquid chromatography*

| System | HPLC-DAD I Agilent Technologies 1200 Series (s. Kapitel 8.1.2) | | | | | |
|----------------------|--|------------|------------|------------|------------|-------|
| Software | ChemStation | | | | | |
| Säule | TSKgel G1000HXL, 5 µm, 7.8x300 mm (Tosoh Bioscience) | | | | | |
| Injektionsvolumen | 25 µL | | | | | |
| Flussrate | 750 µL/min | | | | | |
| Fließmittel A | Tetrahydrofuran (THF) | | | | | |
| Gradient | isokratisch | | | | | |
| Säulenofentemperatur | 35 °C | | | | | |
| Wellenlänge | 355 nm (bw 16) | | | | | |
| | Fraktionensammler | | | | | |
| Zeit (min) | 0 | 6,25 | 8,5 | 9 | 10 | 13,75 |
| Slices (min) | - | 0,75 | 0,5 | 0,5 | 0,75 | - |
| Modus | off | time-based | time-based | time-based | time-based | off |

Die elf erhaltenen Fraktionen (6,25–13,75 min) wurden anhand der Inhaltsstoffe, welche mittels HPLC-MS analysiert wurden, in fünf Fraktionen (FI–FV) vereinigt (Tab. 26).

Tab. 26: Übersicht über die erhaltenen GPC-Fraktionen vor und nach finaler Vereinigung. GPC: Größenausschlusschromatographie

| Retentionszeitbereich [min] | erhaltene GPC-Fraktion | finale vereinigte Fraktion |
|-----------------------------|------------------------|----------------------------|
| 6,25–7 | F_1 | FI |
| 7–7,75 | F_2 | FI |
| 7,75–8,5 | F_3 | FII |
| 8,5–9 | F_4 | FIII |
| 9–9,5 | F_5 | FIII |
| 9,5–10 | F_6 | FIV |
| 10–10,75 | F_7 | FIV |
| 10,75–11,5 | F_8 | FIV |
| 11,5–12,25 | F_9 | FIV |
| 12,25–13 | F_10 | FV |
| 13–13,75 | F_11 | FV |

8.4.3.2 Semi-präparative HPLC

Die erhaltenen Fraktionen FI–FV wurden zur Auftrennung der einzelnen FA-Derivate semi-präparativ getrennt. Die Parameter zur HPLC-Methodik sind in Tab. 27 dargestellt.

Tab. 27: HPLC-Parameter zu semi-präparativen Auftrennung der Isolate F I–FV. ACN: Acetonitril, bw: band width, DAD: diodenarray detector, HPLC: *high pressure liquid chromatography*

| System | HPLC-DAD I Agilent Technologies 1200 Series (s. Kapitel 8.1.2) | | | | | | |
|--------------------------|---|------------|------------|-------|-------|-------|------|
| Software | ChemStation | | | | | | |
| Säule | Phenomenex Synergi 4u polar RP 80 Å, 250 x 10 mm | | | | | | |
| Injektionsvolumen | 25-100 µL | | | | | | |
| Flussrate | 5 mL/min | | | | | | |
| Fließmittel A | 0,1 %-ige Ameisensäure | | | | | | |
| Fließmittel B | ACN | | | | | | |
| Säulenofentemperatur | 35 °C | | | | | | |
| Wellenlänge | 320 und 355 nm (bw 16) Referenzwellenlänge 400 (bw 100) | | | | | | |
| Gradient | | | | | | | |
| Zeit (min) | 0 | 9,29 | 31,97 | 32,05 | 35,75 | 35,83 | 43,5 |
| Fließmittel A (%) | 74,9 | 74,9 | 65,5 | 2 | 2 | 74,9 | 74,9 |
| Fließmittel B (%) | 25,1 | 25,1 | 34,5 | 98 | 98 | 25,1 | 25,1 |
| Fraktionensammler | | | | | | | |
| Zeit (min) | 0 | 6 | 31,5 | 32 | | | |
| Slices (min) | - | 0,5 | 0,5 | - | | | |
| Modus | off | time-based | time-based | off | | | |

Die pro GPC-Fraktion FI–FV erhaltenen 52 Fraktionen wurden anhand der Inhaltsstoffe, welche mittels HPLC-MS analysiert wurden, in insgesamt 37 Fraktionen (F1–F37) vereinigt (Tab. 28). Die erhaltenen Fraktionen wurden lyophilisiert und deren Ausbeute bestimmt (vgl. Anhang Tab. 32). Zur Vermessung in den Enzyminhibitionsassays sowie den analytischen Untersuchungen wurden die Fraktionen in einer Stammlösung von 2 mg/mL in DMSO gelöst.

Tab. 28: Übersicht über die finalen Fraktionen der FA-Oligomer-Isolierung aus Vereinigungen der präparativ aufgereinigten GPC-Fraktionen. FA: Ferulasäure, GPC: Größenausschlusschromatographie

| finale Fraktion | enthaltene Fraktionen aus präparativer Aufreinigung* | finale Fraktion | enthaltene Fraktionen aus präparativer Aufreinigung* |
|-----------------|--|-----------------|--|
| F1 | FIV (3), FV (3) | F20 | FII (18–20) |
| F2 | FIV (4+5), FV (4+5), FII (5+6) | F21 | FII (2) |
| F3 | FIV (6+7), FV (6+7) | F22 | FII (3+4) |
| F4 | FIV (8–10), FV (8–10), FII (7–9) | F23 | FII (27–29) |
| F5 | FIV (11–14), FV (11–14), FII (10–14) | F24 | FII 2x präparativ aufgereinigt aufgrund Fehler (27–30) |
| F6 | FIV (15–17), FV (15–17), FII (15–17) | F25 | FII 2x präparativ aufgereinigt aufgrund Fehler (34–37) |
| F7 | FIV (18–20), FV (18–20), FII (19+20) | F26 | FII (35–38) |
| F8 | FIV (21–23), FV (21–23), FII (21–24) | F27 | FIII (7–12) |
| F9 | FIV (24+25), FV (24+25), FII (25+26) | F28 | FIII (13–16) |
| F10 | FIV (26–28), FV (26–28) | F29 | FIII (17–20) |
| F11 | FIV (29–31), FV (29–31) | F30 | FIII (22–26) |
| F12 | FIV (32–34), FV (32–34) | F31 | FIII (29–32) |
| F13 | FIV (35–38), FV (35–38) | F32 | FIII (33–35) |
| F14 | FIV (39–42), FV (39–42), FII (39–42) | F33 | FIII (36–40) |
| F15 | FIV (48+49), FV (48+49) | F34 | FIII (41–44) |
| F16 | FIV (50–52), FV (50–52), FII (48–52) | F35 | FIII (45–52) |
| F17 | FII (1) | F36 | FIII (1–3) |
| F18 | FII (30–34) | F37 | FIII (4–6) |
| F19 | FIV (43–47), FV (43–47), FII (43–47) | | |

* GPC-Fraktion FI–FV; in Klammer Fraktionsnummer aus präparativem Lauf

8.4.4 Strukturaufklärung und Charakterisierung mittels HPLC-ESI-MS/MS

Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels negativem *full scans* sowie MS²Experimenten untersucht und strukturell charakterisiert. Zur Strukturaufklärung der F-Fraktionen wurde eine nach Methode B (s. Kapitel 8.2.9.2) modifizierte HPLC-Methode verwendet, die bei der Strukturaufklärung der DiFAs in Extrakten Anwendung fand (s. Kapitel 8.2.10.2 in Tab. 21). Neben FA-Oligomeren wurden verschiedene TriHOMes und TriHODAs identifiziert. Die Untersuchungen wurden an drei HPLC-MS/MS-Systemen (HPLC MS/MS I, II und III) durchgeführt. An System II und III erfolgte die Charakterisierung und Strukturaufklärung, wobei Konzentrationen zwischen 40–200 µg/mL (System II) und 2,5–4 µg/mL (System III) sowie Injektionsvolumina zwischen 5–20 µl eingesetzt wurden. Die Stammlösungen der Fraktionen von 2000 µg/mL in DMSO wurden in ACN/0,1 %-ige Ameisensäure (70/30; v/v) verdünnt. Die HPLC-MS-Parameter sind in Tab. 29 dargestellt, wobei die substanzspezifischen MS-Parameter sowie die jeweiligen *m/z* Tab. 37 zu entnehmen sind.

Tab. 29: MS-Geräteparameter der Charakterisierung der FA-Oligomere und Oxylipinen in F-Fractionen mittels negativem *full scan* sowie negativen Produktionenscans. ACN: Acetonitril, ESI: electrospray ionisation, FA: Ferulasäure, HPLC: *high pressure liquid chromatography*, MS: *mass spectrometry*

HPLC-ESI(-)-MS/MS II und III

| | | | | | | | |
|--|-----------------|------|------|------|----|------|----|
| Zeit (min) | 0 | 11 | 41 | 41.1 | 48 | 48,1 | 60 |
| Fließmittel A (0,1 % Ameisensäure) (%) | 74,9 | 74,9 | 65,5 | 2 | 2 | 85 | 85 |
| Fließmittel B (ACN) (%) | 15 | 25,1 | 34,5 | 98 | 98 | 15 | 15 |
| full scan HPLC-ESI(-)-MS/MS II | | | | | | | |
| Curtain Gas N ₂ | 20 | | | | | | |
| Ionisationsspannung (V) | -4500 | | | | | | |
| Temperatur (°C) | 450 | | | | | | |
| Nebulizer Gas (psi) | 30 | | | | | | |
| Turbo Heater Gas (psi) | 30 | | | | | | |
| Interface Heater | On | | | | | | |
| Declustering potential (V) | -100 | | | | | | |
| Entrance Potential (V) | -10 | | | | | | |
| Cell entrance Potential (V) | -25,6 bis -44.5 | | | | | | |
| Scanbereich (Da) | 100–800 | | | | | | |
| MS² HPLC-ESI(-)-MS/MS II | | | | | | | |
| Curtain Gas N ₂ | 10–20 | | | | | | |
| Ionisationsspannung (V) | -4500 | | | | | | |
| Temperatur (°C) | 450 | | | | | | |
| Nebulizer Gas (psi) | 30 | | | | | | |
| Turbo Heater Gas (psi) | 30 | | | | | | |
| Declustering potential (V) | -65 bis -100 | | | | | | |
| Entrance Potential (V) | -4,5 bis -10,5 | | | | | | |
| Collision-activated Dissociation Gas (units) | 2–6 | | | | | | |
| Collision Cell entrance Potential (V) | -17 bis -31,8 | | | | | | |
| Collision Cell exit Potential (V) | 0 bis -15 | | | | | | |
| Collision Energy (V) | -20 bis -50 | | | | | | |
| MS² HPLC-ESI(-)-MS/MS III | | | | | | | |
| Curtain Gas N ₂ | 20 | | | | | | |
| Ionisationsspannung (V) | -4500 | | | | | | |
| Temperatur (°C) | 400 | | | | | | |
| Nebulizer Gas (psi) | 30 | | | | | | |
| Turbo Heater Gas (psi) | 30 | | | | | | |
| Interface Heater | On | | | | | | |
| Declustering potential (V) | -40 bis -100 | | | | | | |
| Entrance Potential (V) | -10 | | | | | | |
| Collision-activated Dissociation Gas (units) | -2 | | | | | | |
| Collision Energy (V) | -20 bis -50 | | | | | | |
| Collision Cell exit Potential (V) | -10 bis -17 | | | | | | |

8.5 Isolierung von Hordatinen aus BSG

Hordatine, eine große Gruppe phenolischer Amide, sind natürliche, in Gerste vorkommende, sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und kommerziell nicht erhältlich. Demnach müssen sie synthetisiert oder aus dem natürlichen Rohstoff isoliert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Isolierung aus BSG gewählt, da so gewährleistet werden konnte, dass die in den Extrakten vorkommenden Hordatine gewonnen werden. Die Gewinnung aus BSG erfolgte hierbei nach einem eigenen Prozess, jedoch in Anlehnung an Kohyama und Ono [Kohyama und Ono, 2013] über SLE mit 60 %-igem Aceton (Aceton/Wasser; 60/40; v/v), Säulung über C18ec-Adsorbermaterial und anschließender Aufreinigung an der präparativen HPLC (s. Kapitel 8.1.2.). Die Isolierung wurde im Rahmen eines Forschungspraktikums von Frau Sandra Permann (WS 2020/2021) durchgeführt.

8.5.1 Gewinnung mittels Fest-Flüssig-Extraktion (SLE)

Gefriergetrockneter BSG der Brauerei Orval (2/171215) wurde mittels Getreidemühle (KoMo Fidibus 219) zu einem feinen Pulver vermahlen. Dieses wurde im Anschluss mittels Soxhlet-Extraktion im Verhältnis 1 g BSG pro 16 mL Aceton über Nacht entfettet (durchgeführt vom Projektpartner AK Thiel, TU Kaiserslautern, Ranja Saynisch). 145 g des entfetteten, getrockneten (Abdampfen des Lösungsmittels) BSGs wurden zweimal mit je dem 5fachen Volumen 60%-igem Aceton (Aceton/Wasser; 60/40; v/v) bei 60 °C im Wasserbad unter Rühren für 30 min extrahiert. Die erhaltenen organischen Phasen wurden filtriert, vereinigt und am Rotationsverdampfer bei 40 °C auf etwa 500 mL verdampft.

8.5.2 Aufreinigung mittels Säulung

Das Rohisolat wurde an einer C18ec-Säule (Chromabond, endcapped C18ec, Macherey-Nagel; 2 Säulen, Bettvolumen je 90 mL) aufgereinigt. Aufgrund des Probenvolumens wurden zwei Säulen parallel verwendet. Das Adsorbermaterial wurde zu Beginn mit je 450 mL 0,1 %-iger Ameisensäure in MeOH konditioniert und anschließend mit 900 mL 0,1 % Ameisensäure äquilibriert. Nach Aufgabe der Probe, 250 mL des Rohisolats pro Säule, wurde mit 720 mL 0,1 %-iger Ameisensäure gewaschen. Die Elution erfolgte mit 320 mL MeOH. Die aufgereinigten Isolate (H-Isolat) der beiden Säulen wurden vereinigt und im Vakuum auf ca. 80 mL eines dickflüssigen, braunen Rückstands eingeeengt.

8.5.3 Präparative HPLC

Das mittels Säulung aufgereinigte Isolat wurde zur Trennung der Hordatine via präparativer HPLC weiter fraktioniert. Die Parameter zur HPLC-Methodik sind in Tab. 30 dargestellt. Die erhaltenen Fraktionen wurden anhand der Inhaltsstoffe, welche mittels LC-MS analysiert wurden, in Fraktionen (H1–H10) vereinigt, wobei zusätzlich unzureichend präparativ aufgetrennte „Fraktionen“ erhalten wurden. Alle erhaltenen Fraktionen wurden lyophilisiert und deren Ausbeute bestimmt. Zur Vermessung in den Enzyminhibitionsassays sowie zu weiteren analytischen Untersuchungen (HPLC-MS und HPLC-DAD) wurden die Fraktionen in einer Stammlösung von 2 mg/mL in DMSO gelöst.

Tab. 30: HPLC-Parameter zur präparativen Auftrennung des Isolates. ACN: Acetonitril, bw: band width, HPLC: high pressure liquid chromatography

| System | Präparative HPLC 1200 Series (s. Kapitel 8.1.2) | | | | | | | |
|-------------------|---|------------|------------|------------|-----|----|----|----|
| Software | ChemStation | | | | | | | |
| Säule | VDSpher PUR C18-SE (5 µm, 250 x 20 mm; VDS optilab) | | | | | | | |
| Injektionsvolumen | 25–100 µL | | | | | | | |
| Flussrate | 15 mL/min | | | | | | | |
| Fließmittel A | 0,1 %-ige Ameisensäure | | | | | | | |
| Fließmittel B | ACN | | | | | | | |
| Wellenlänge | 320 und 355 nm (bw 16) Referenzwellenlänge 400 (bw 100) | | | | | | | |
| | Gradient | | | | | | | |
| Zeit (min) | 0 | 7 | 8 | 36 | 37 | 46 | 47 | 59 |
| Fließmittel A (%) | 98 | 98 | 90 | 70 | 5 | 5 | 98 | 98 |
| Fließmittel B (%) | 2 | 2 | 10 | 30 | 95 | 95 | 2 | 2 |
| | Fraktionensammler | | | | | | | |
| Zeit (min) | 0 | 4 | 16 | 26 | 30 | | | |
| Slices (min) | - | 2 | 0,5 | 2 | - | | | |
| Modus | | time-based | time-based | time-based | off | | | |

8.5.4 Strukturaufklärung und Charakterisierung mittels HPLC-ESI-MS/MS

Zur Strukturaufklärung der enthaltenen Hordatine wurde die HPLC-Methode C (s. Kapitel 8.2.9.3) an zwei HPLC-MS/MS-Systemen (HPLC MS/MS I und III) sowie unter Anwendung der Ionenfalle (LIT) verwendet. Es wurden zwischen 5–20 µL der Fraktionsmesslösungen injiziert. Die Konzentrationen waren abhängig vom verwendeten HPLC-MS-System. An System I wurden die Präkursorionen der einzelnen Hordatine anhand der *full scans* bestimmt, um diese mit den HPLC-Daten der Quantifizierung abgleichen zu können (s. Kapitel 8.5.5). Hierbei wurde eine Konzentration von 250 µg/mL eingesetzt. An System III erfolgte die eigentliche Strukturaufklärung mittels ESI-(+)-*enhanced* MS-Scans (EMS) sowie ESI-(+)-EPI scans. Es wurden Konzentrationen von 5–25 µg/mL vermessen. Die entsprechenden HPLC-MS-Geräteparameter sind, getrennt nach eingesetztem System, in Tab. 31 zusammengefasst. Die optimierten MS-Parameter für die einzelnen Hordatine sowie die jeweiligen *m/z* sind in Tab. 38 zusammengefasst.

Tab. 31: MS-Geräteparameter der Charakterisierung der Hordatine in H-Fractionen. EPI: enhanced product ion scans, ESI: electrospray ionisation, HPLC: *high pressure liquid chromatography*, LIT: Ionenfalle, MS: *mass spectrometry*

| HPLC-ESI(+)-MS/MS I | |
|--|---------------------|
| full scan HPLC-ESI(+)-MS/MS I | |
| Curtain Gas N ₂ | 20 |
| Ionisationsspannung (V) | 4700 |
| Temperatur (°C) | 450 |
| Nebulizer Gas (psi) | 30 |
| Turbo Heater Gas (psi) | 30 |
| Interface Heater | On |
| Declustering potential (V) | 100 |
| Focusing Potential (V) | 340 |
| Entrance Potential (V) | 10.5 |
| Cell entrance Potential (V) | 10,2–24 |
| Scanbereich (Da) | 150–600 |
| HPLC-ESI(+)-MS/MS III | |
| ESI(+)-EPI scans | |
| Curtain Gas N ₂ | 20 |
| Ionisationsspannung (V) | 4700 |
| Temperatur (°C) | 450 |
| Nebulizer Gas (psi) | 30 |
| Turbo Heater Gas (psi) | 30 |
| Interface Heater | On |
| Declustering potential (V) | 75–100 |
| Entrance Potential (V) | 8 |
| Collision-activated Dissociation Gas (units) | –3 |
| Collision Energy (V) | 30–40 |
| Collisional Energy Spread (V) | 20 |
| LIT-Parameter | |
| Scanrate (Da/s) | 1000 |
| LIT fill time (msec) | 1 |
| Dynamic fill time | on |
| Q3 Entry Barrier (V) | 8 |
| Auxiliary AC (AF3) (V) | 0,21–1,15 |
| Exit lense voltage (EXB) (V) | –155,98 bis –127,45 |
| ESI(+)-EMS scans | |
| Curtain Gas N ₂ | 20 |
| Ionisationsspannung (V) | 4500 |
| Temperatur (°C) | 400 |
| Nebulizer Gas (psi) | 30 |
| Turbo Heater Gas (psi) | 30 |
| Interface Heater | On |

| | |
|--|----------------------|
| Declustering potential (V) | 65 |
| Entrance Potential (V) | 10 |
| Collision-activated Dissociation Gas (units) | -2 |
| Collision Energy (V) | 10 |
| Collisional Energy Spread (V) | 0 |
| Scanbereich (Da) | 250–600 und 600–1000 |
| LIT-Parameter | |
| Scanrate (Da/s) | 1000 |
| LIT fill time (msec) | 0,05 |
| Dynamic fill time | On |
| Q3 Entry Barrier (V) | 8 |

8.5.5 Quantifizierung der Hordatine mittels HPLC-DAD

Der Gesamtgehalt an Hordatinen in den aus dem Isolat gewonnenen H-Fractionen (H1–H10) wurde als *p*CA-Äq mittels HPLC-DAD bestimmt. Die Isolate wurden in einer Konzentration von 250 µg/mL (DMSO/0,1 %-ige Ameisensäure in MeOH; 12,5/87,5; v/v), versetzt mit 20 µg/mL 3,4-Dimethoxyzimtsäure als interner Standard zur Quantifizierung verwendet. Mittels externer Kalibrierung von 1–50 µg/mL *p*CA in 0,1 %-iger Ameisensäure in MeOH wurde analog der Hordatinquantifizierung in den Extrakten nach Methode C (s. Kapitel 8.2.9.3) vermessen. Die Retentionszeiten der Hordatine wurden, wie bei den A-Extrakten zuvor, den MS-Messungen entnommen (s. Kapitel 8.5.4), da aufgrund kommerziell nicht erhältlicher Hordatine anhand der HPLC-DAD-Methodik eine Zuordnung nicht direkt möglich war.

8.6 Deskriptive Statistik und Berechnungen

8.6.1 Bestimmung des *minimum significant ratios* (MSR)

Die Validierung der *in vitro*-Enzyminhibitionsassays erfolgte über die Bestimmung des MSR für die jeweiligen PKs. Es beschreibt die Reproduzierbarkeit von Standard-Potenzschätzungen, wie dem IC₅₀-Wert, aus Konzentrations-Wirkungsassays. Der MSR berechnet sich über $10^{2\sqrt{2}s}$, wobei *s* der Standardabweichung der logarithmischen IC₅₀-Werte über alle betrachteten Experimente entspricht (vgl. elektronischer Anhang, Tab. 39 Seite G) [Haas *et al.*, 2004].

8.6.2 Untersuchung der Unterschiede auf Signifikanz

8.6.2.1 Untersuchung der Varianzhomogenität

Die Varianzanalyse erfolgte mittels einseitigem Zwei-Stichproben Fisher-Test (F-Test), wobei bei $p < 0,05$ von unterschiedlichen Varianzen zwischen den untersuchten Proben ausgegangen wurde.

8.6.2.2 Prüfung auf Normalverteilung

Mittels Anderson-Darling-Test für die *in vitro*-Enzyminhibitionsassays und die Bestimmung des TPC und TFC sowie mittels Test nach David für die Kalibriergeraden zur Quantifizierung der HCAs und der Hordatine mittels HPLC-DAD wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft.

8.6.2.3 Einseitiger Zwei-Stichproben t-Test

Bei vorliegender Normalverteilung der Daten wurde zur Signifikanzanalyse mittels des einseitigen Zwei-Stichproben t-Tests (*student's t-test*) getestet. Bei der Analyse der *in vitro*-Daten wurde sowohl signifikante Unterschiede zur PK sowie zwischen unterschiedlichen Extraktionsprozessen oder BSG-Proben untersucht, was jeweils den Abbildungen im Ergebnisteil (Kapitel 4) zu entnehmen ist. Die Signifikanzniveaus wurden folgendermaßen definiert: $p < 0,05$: * (signifikant unterschiedlich); $p < 0,01$: ** (hoch signifikant unterschiedlich); $p < 0,001$: *** (höchst signifikant unterschiedlich).

8.6.3 Validierungen der HPLC-DAD-Quantifizierungen

Zur Methodvalidierung wurde die Messpräzision mittels Lauf-zu-Lauf- und Tag-zu-Tag-Variabilität bestimmt. Hierfür wurde für beide Quantifizierungen (Kapitel 8.2.9.2 und 8.2.9.3) eine Standard-Lösung von 25 µg/mL mit 20 µg/mL IS versetzt verwendet, welche an einem Tag in fünf aufeinanderfolgenden Läufen (Tag-zu-Tag-Variabilität) sowie an fünf aufeinanderfolgenden Tagen (Lauf-zu-Lauf-Variabilität) vermessen wurde. Zur Validierung der Hordatin-Quantifizierung (8.2.9.3) wurden eine Messlösung von 25 µg/mL *p*CA mit 20 µg/mL 3,4-Dimethoxyzimtsäure (IS) eingesetzt. Die Messpräzision zur Hydroxyzimtsäure-Quantifizierung (8.2.9.2) wurde mit je einer Messlösung von 25 µg/mL *trans*-FA, *p*CA und CA mit je 20 µg/mL *trans*-Zimtsäure als IS bestimmt. Die Variationskoeffizienten ergeben sich aus $SD/MW \cdot 100$ und sind in Tab. 17 bzw. Tab. 18 dargestellt.

Die Sensitivität der Methoden wurde durch Ermittlung des LOD und LOQ bestimmt. Die Bestimmung erfolgte anhand einer Kalibrierung in niedrigem Konzentrationsbereich [European Commission. Joint Research Centre. Robouch, P., Stroka, J., Haedrich, J., 2016]. Es wurden mindestens fünf Konzentrationen sowie eine Leerprobe ($n=2$, je in Triplikaten) vermessen. Für Methode B (8.2.9.2) wurden sechs Konzentrationen (0.25–5 µg/mL) *p*CA- und *trans*-FA sowie sechs Konzentrationen (0.25–2.5 µg/mL) CA analysiert, für Methode C (8.2.9.3) fünf Konzentrationen (0.25–2.5 µg/mL) *p*CA. Die Bestimmung des LOD erfolgte anhand Formel 3. Der LOQ entspricht dem 3,3-fachen LOD-Wert. Die jeweiligen LOD- und LOQ-Werte sind Tab. 17 und Tab. 18 zu entnehmen.

$$x_{(L O D)} = 3.8 * \frac{S_{y,x}}{b} \sqrt{1.1 + \frac{(\bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Formel 3: Berechnung des LOD; $S_{y,x}$ =SD der Residuen, b = Steigung, \bar{x} = mittleres Kalibrierungslevel, x_i =Wert des Analyten beim Kalibrierungslevel i

Die Präzision der Kalibrierung wurde mittels weiterer Kennzahlen überprüft. Unter Anwendung der Formel 4 wurde die Rest (R-SD)- sowie die Verfahrensstandardabweichung (V-SD) bestimmt. Aus letzterer wurde der Verfahrensvariationskoeffizient (V-V_k) ermittelt, welcher ein relatives Maß für die Präzision ist.

$$(1) R - SD = \sqrt{\left(\frac{1}{n-2}\right) * Res^2} \quad (2) V - SD = \frac{R-SD}{b} \quad (3) V - V_k = \frac{V-SD}{MW} * 100$$

Formel 4: Formeln zur Bestimmung der Kalibrierpräzision; (1): R-SD, Res= Residuen, n = Anzahl der Kalibrierkonzentrationen; (2): V-SD, b = Steigung; (3) V-V_k

Aufgrund unterschiedlicher UV-Absorptionen der Analyten im Vergleich zum IS wurden, sofern möglich, Korrekturfaktoren bestimmt. Diese ergeben sich aus der Steigung der Auftragung der beiden Verhältnisse c_{IS}/AUC_{Analyt} gegen c_{Analyt}/AUC_{IS} [Dobberstein und Bunzel, 2010]. Die ermittelten Analytgehalte wurden mit dem jeweiligen Korrekturfaktor multipliziert, welche mittels Kalibriergeraden bestimmt wurden ($n=2$ im Triplikat vermessen). Sie wurden für pCA, CA und FA bestimmt und sind in Tab. 17 dargestellt.

Zusätzlich wurde mittels zweier Methoden der Einfluss der Extraktmatrix untersucht. Da für die Hordatine keine Referenzsubstanzen erhältlich waren, erfolgte die Berücksichtigung des Matrixeffektes zur Hordatin-Quantifizierung mittels des mitgeführten IS (3,4-Dimethoxyzimtsäure). Hierfür wurden die gemittelten AUCs des IS in Extraktproben ($n=2$ im Triplikat von insgesamt sieben Extraktproben A1–A7) verglichen mit den Mittelwerten der AUCs in den Standardlösungen in 0,1%-iger Ameisensäure in MeOH ($n=2$ im Triplikat von insgesamt sechs Kalibrierlösungen). Die prozentuale Abweichung der beiden Werte wurde ermittelt und lag signifikant ($p < 0.05$) bei 5,8 %, was lediglich auf leichte Matrixeffekte hinwies.

Zur Untersuchung des Matrixeffektes bei der Hydroxyzimtsäure-Quantifizierung wurde die Methode der indirekten Regression über Standardaddition der drei Referenzsubstanzen pCA, FA und CA genutzt [Wellnitz und Gluschke, 2004]. Hierfür wurden die Extraktproben (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HA1–HA3 und 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HE1–HE6) mit jeweils drei verschiedenen Konzentrationen der drei analytischen Standards versetzt. Jede Extraktprobe wurde sowohl „gespiket“ (plus Referenzsubstanz) als „ungespiket“ (ohne Referenzsubstanz) vermessen. Zusätzlich wurden die analytischen Standards in jeder Konzentration in reinem Lösungsmittel (0,1 %-ige Ameisensäure in MeOH) vermessen. Für die HE-Extrakte lagen die Konzentrationen für pCA bei 20, 25 und 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für FA bei 50, 75 und 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und für CA bei 2,5; 5; 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Bei den HA-Extrakten wurden niedrigere Konzentrationen für pCA von 5; 7,5 und 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sowie für FA von 10; 17,5 und 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingesetzt. Als Kriterium für Matrixeffekte wurde der b -Wert, welcher die Proben in Extraktmatrix und Lösungsmittel ins Verhältnis setzt, wie folgt berechnet (s. Formel 5):

$$b = \frac{x_3 - x_1}{x_+}$$

Formel 5: Berechnung des b -Wertes mit x_3 = AUC pCA, CA oder FA des „gespiketen“ Extraktes, x_1 = AUC pCA, CA oder FA des reinen Extraktes und x_+ =AUC pCA, CA oder FA in reinem Lösungsmittel

Die b -Werte wurden mit $n=2$ im Duplikat bestimmt, wobei jedes Replikat aus drei verschiedenen Referenzkonzentrationen bestimmt wurde. Anschließend wurden die Werte auf signifikante Unterschiede zum theoretisch optimalen b -Wert von 1 untersucht. Hierbei konnte für keine der drei Substanzen signifikante Unterschiede beobachtet werden, weshalb Matrixeffekte ausgeschlossen wurden.

8.6.4 Korrelation

8.6.4.1 Rangkorrelation nach Kendall

Zur Untersuchung der Korrelation zwischen Gehalten verschiedener Inhaltsstoffe in Extrakten und Fraktionen (z.B. Gesamthordatingehalt oder Gehalt an HCAs) und Inhibitionsstärke wurden die Daten mittels Rangkorrelation nach Kendall [Eid *et al.*, 2017] untersucht. Die

Methode beruht auf einem vollständigen Paarvergleich hinsichtlich der Rangplatzierung und eignet sich für Untersuchungen mit kleiner Stichprobenzahl $4 \leq n \leq 40$. Die Gehalte (Merkmal 1 = X) sowie die IC₅₀-Werte (Merkmal 2 = Y) wurden in absteigender Reihenfolge sortiert und ein Rang wurde entsprechend zugeordnet. Insgesamt ergeben sich $n \cdot (n-1) / 2$ Paarvergleiche bei zwei Merkmalsträgern (A und B), welche im Hinblick auf ihre Konkordanz (beide Merkmale höher oder niedriger bei Merkmalsträger A) oder Diskordanz (Merkmal Y oder X einmal höher und einmal niedriger) untersucht werden. Die Differenz der Anzahl konkordanter (n_k) und diskordanter (n_d) Paare findet sich im Zähler des Korrelationskoeffizienten τ :

$$\tau = \frac{(n_k - n_d)}{n \cdot (n - 1)}$$

Formel 6: Berechnung des Korrelationskoeffizienten τ

Bei Rangbindungen, bspw. wenn bei mehreren Extrakten oder Fraktionen kein IC₅₀-Wert bestimmt werden konnte, kann eine Korrektur durch Bestimmung der betroffenen Paare für die beiden Merkmale X und Y erfolgen. Ihre Anzahl ($n_{B(X)}$ und $n_{B(Y)}$) fließt folgendermaßen in die Berechnung für τ_B ein:

$$\tau_B = \frac{n_k - n_d}{\sqrt{(n_k + n_d + n_{B(X)}) \cdot (n_k + n_d + n_{B(Y)})}}$$

Formel 7: Berechnung des ranggebundenen Korrelationskoeffizienten τ_B

Im Falle eines perfekt positiven Zusammenhangs liegt der Wert bei +1 bzw. bei -1, wenn ein perfekt negativer Zusammenhang vorliegt. Nach Cohen *et al.* liegt eine schwache Korrelation bis zum Absolutwert $\leq 0,3$, eine mittlere von $0,3-0,5$ sowie eine starke Korrelation $> 0,5$ vor [Cohen, 2013]. Die empirisch ermittelten Werte können mit kritischen Werten für die Nullhypothese $H_0: n_k - n_d = 0$ auf ihre statistische Signifikanz überprüft werden, was jedoch nur für τ nicht aber τ_B möglich ist.

8.6.5 Ausreißertest nach Nalimov

Innerhalb der *in vitro*-Enzyminhibitionsassays, den Untersuchungen zum TPC bzw. TFC sowie den Kalibrierungen zur Quantifizierung einzelner Inhaltsstoffe in den Extrakten und Isolaten wurden die Werte auf Ausreißer nach Nalimov untersucht. Unterschritt die Testgröße q_1 die kritische Grenze $q_{crit.}$ beim Signifikanzniveau $\alpha=0,05$, wurde der Wert nicht in die Berechnung mit einbezogen.

A. Anhang

Tab. 32: Ausbeuten der F-Fractionen 1–37 aus Isolierung der FA-Oligomere (s. Kapitel 8.4) nach GPC, semipräparativer Aufreinigung und Lyophilisierung (vgl. elektronischer Anhang, Tab. 39 Seite G). FA: Ferulasäure

| Fraktion | Ausbeute [mg] | Fraktion | Ausbeute [mg] |
|----------|---------------|----------|---------------|
| F1 | 4,691 | F19 | 2,281 |
| F2 | 7,446 | F20 | 0,364 |
| F3 | 4,562 | F21 | n.b. |
| F4 | 3,425 | F22 | 0,819 |
| F5 | 2,519 | F23 | 0,334 |
| F6 | 1,51 | F24 | 0,091 |
| F7 | 1,043 | F25 | n.b. |
| F8 | 1,401 | F26 | 0,926 |
| F9 | 0,973 | F27 | 2,089 |
| F10 | 1,106 | F28 | 1,056 |
| F11 | 0,567 | F29 | 0,764 |
| F12 | 0,699 | F30 | 2,104 |
| F13 | 0,547 | F31 | 1,443 |
| F14 | 1,615 | F32 | 0,511 |
| F15 | 0,1 | F33 | 1,356 |
| F16 | 1,511 | F34 | 0,561 |
| F17 | n.b. | F35 | 1,156 |
| F18 | 0,501 | F36 | 2,851 |
| Gesamt | 55,469 | F37 | 2,543 |

n.b. = nicht bestimmbar

Tab. 33: Übersicht der Retentionszeiten, charakteristischen Fragmente und Literaturvergleichen der Referenzsubstanzen zur Charakterisierung der Inhaltsstoffe in F-Fractionen (Kapitel 4.4.2). DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, FA: Ferulasäure, m/z : Masser-zu-Ladungsverhältnis, p CA: p -Coumarsäure, TriHOME: Trihydroxyoctadecensäure

| Referenzsubstanz | Retentionszeit | $[M-H]^-$ | m/z Fragmente | Literaturvergleich |
|--------------------------------|----------------|-----------|--|--|
| trans- p CA | 10,3 | 162,7 | 119, 93, 117, 91, 163 | [Yin <i>et al.</i> , 2017] |
| trans-FA | 11,1 | 192,5 | 134, 178, 149, 117 | [Sinosaki <i>et al.</i> , 2020] |
| Azelainsäure (Nonandisäure) | 10,7 | 187,1 | 125, 97, 187, 123, 169, 143 | [Steimer <i>et al.</i> , 2017] |
| (9,12,13)-TriHOME | 27,6 | 329 | 229, 211, 329, 183, 171, 193, 99, 125, 293, 311 | [Martin-Arjol <i>et al.</i> , 2010] |
| (9,10,13)-TriHOME | 28,3 | 329, 3 | 171, 139, 329, 139, 127, 157, 99, 201, 293, 311 | [Martin-Arjol <i>et al.</i> , 2010] |
| 5-5'-DiFA | 23,3 | 385,2 | 385, 326, 341, 282, 267, 253, 249, 293 | [Callipo <i>et al.</i> , 2010; Bunzel <i>et al.</i> , 2004] |
| 8-5'-DiFA (zyklisch) | 25,7 | 385,2 | 341, 326, 311, 267, 282, 297, 239 | [Callipo <i>et al.</i> , 2010; Bunzel <i>et al.</i> , 2004] |
| 8-O-4'-DiFA | 25,9 | 385,2 | 193, 178, 149, 134 | [Callipo <i>et al.</i> , 2010; Bunzel <i>et al.</i> , 2004] |

Tab. 34: (a) AUCs* der Referenzsubstanzen FA, pCA und CA sowie des IS zur Erstellung der Kalibriergeraden 1 (1) zur Bestimmung von pCA, FA, CA und DiFA in BSG-Extrakten HE und HA (Methode B; 8.2.9.2) (b) auf IS bezogene Messwerte zur Kalibriergeraden 1 (1) zur Bestimmung von pCA, FA, CA und DiFA in BSG-Extrakten HE und HA (Methode B; 8.2.9.2) (c) Übersicht über alle Kalibriergeraden inklusive R²; Verdünnungsschema, Einwaagen und Gesamtauswertung sind dem elektronischen Anhang zu entnehmen (vgl. elektronischer Anhang, Tab. 39 Seite G); AUC: *area under curve*, BSG: Biertreber, CA: Kaffeesäure, c: Konzentration, FA: Ferulasäure, IS: interner Standard, pCA: p-Coumarsäure

(a)

| c [µg/mL] | IS (<i>trans</i> -Zimtsäure) | | Analyt | | | | | |
|-----------|-------------------------------|-----------|--------|-----------|----------|-----------|--------|-----------|
| | | | FA | | pCA | | CA | |
| | AUC | c [µg/mL] | AUC | c [µg/mL] | AUC | c [µg/mL] | AUC | c [µg/mL] |
| 20 | 2076,7 | 2,5 | 123,8 | 2,5 | 189,1 | 2,5 | 63,4 | |
| 20 | 1985,5 | 5 | 302,3 | 5 | 385,7 | 5 | 144,7 | |
| 20 | 1796,5 | 7,5 | 455,5 | 7,5 | 652,8 | 7,5 | 256,3 | |
| 20 | 1811,4 | 10 | 588,8 | 10 | 3383,2** | 10 | 496,5 | |
| 20 | 1777,9 | 25 | 1735,5 | 25 | 981,0 | 25 | 1704,3 | |
| 20 | 1957,9 | 50 | 3135,4 | 50 | 5876,1 | | | |
| 20 | 2004,0 | 75 | 5264,5 | 75 | 8885,2 | | | |
| 20 | 1734,0 | 100 | 6678,9 | 100 | 14313,5 | | | |

(b)

| C _{FA} /C _{IS} | pCA | | CA | | |
|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| | AUC _{FA} /AUC _{IS} | c _{p-CA} /c _{IS} | AUC _{pCA} /AUC _{IS} | C _{CA} /c _{IS} | AUC _{CA} /AUC _{IS} |
| 0,125 | 0,060 | 0,125 | 0,091 | 0,125 | 0,031 |
| 0,25 | 0,152 | 0,25 | 0,194 | 0,25 | 0,073 |
| 0,375 | 0,254 | 0,375 | 0,363 | 0,375 | 0,143 |
| 0,5 | 0,325 | 0,5 | 0,542 | 0,5 | 0,274 |
| 1,25 | 0,976 | 1,25 | 1,903* | 1,25 | 0,959 |
| 2,5 | 1,601 | 2,5 | 3,001 | | |
| 3,75 | 2,627 | 3,75 | 4,434 | | |
| 5 | 3,852 | 5 | 8,255 | | |

(c)

| Kalibrierreihe | FA | pCA | CA |
|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | y = mx+b R ² | y = mx+b R ² | y = mx+b R ² |
| 1 (1) | y = 0,7470x-0,0531 0,9925 | y = 1,1993x-0,0722 0,9997 | y = 0,8594x-0,1340 0,9894 |
| 1 (2) | y = 0,7209x-0,0586 0,9964 | y = 1,1744x-0,0644 0,9992 | y = 0,8600x-0,1451 0,9879 |
| 1 (3) | y = 0,7229x-0,0614 0,9977 | y = 1,1846x-0,0733 0,9999 | y = 0,8853x-0,1549 0,9868 |
| 2 (1) | y = 0,7922x-0,0643 0,997 | y = 1,0647x-0,0021 0,9991 | y = 0,7368x-0,1549 0,9868 |
| 2 (2) | y = 0,7983x-0,0372 0,9989 | y = 1,0990x-0,0006 0,999 | y = 0,7488x-0,0993 0,9904 |
| 2 (3) | y = 0,7877x-0,0379 0,9990 | y = 1,1328x-0,0272 0,9994 | y = 0,7772x-0,1245 0,9836 |

* AUCs in tabellarischer Übersicht gerundet auf eine Dezimalstelle, in Excel (vgl. elektronischer Anhang, Tab. 39 Seite G) berechnet ohne gerundete Werte

** Ausreißer nach Nalimov

B

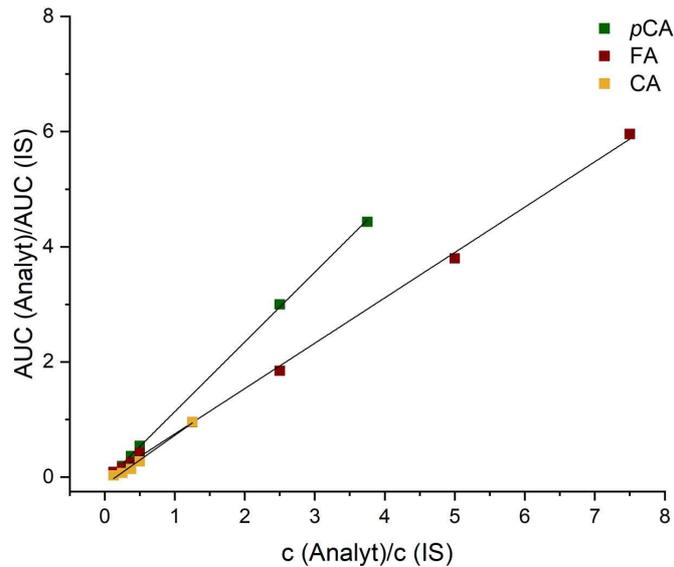


Abb. 61: Kalibriergerade 1 (1) zur Bestimmung der HCAs in BSG-Extrakten HA und HE, Geradengleichungen sind Tab. 34 (c) zu entnehmen. BSG: Biertreber, CA: Kaffeesäure, FA: Ferulasäure, HCA: Hydroxyzimtsäure, IS: interner Standard, *pCA*: *p*-Coumarsäure

Tab. 35: (a) AUCs der Referenzsubstanz *pCA* sowie des IS zur Erstellung der Kalibriergeraden 1 zur Bestimmung von Hordatinen in BSG Extrakten A sowie H-Fractionen (Methode C; 8.2.9.3) (b) Übersicht über alle Kalibriergeraden inklusive R^2 ; Verdünnungsschema, Einwaagen und Gesamtauswertung sind dem elektronischen Anhang zu entnehmen (vgl. elektronischer Anhang, Tab. 39 Seite G); AUC: *area under curve*, BSG: Biertreber, *c*: Konzentration, IS: interner Standard, *pCA*: *p*-Coumarsäure

(a)

| <i>pCA</i> <i>c</i> [µg/mL] | IS (3,4-Dimethoxyzimtsäure) | | <i>pCA</i> /IS | | |
|--------------------------------|-----------------------------|------------------|----------------|----------|-------|
| | AUC | <i>c</i> [µg/mL] | AUC | <i>c</i> | AUC |
| 1 | 59,483 | 20 | 669,4 | 0,05 | 0,089 |
| 2.5 | 123,652 | 20 | 671,6 | 0,125 | 0,184 |
| 5 | 307,207 | 20 | 702,8 | 0,25 | 0,437 |
| 10 | 640,200 | 20 | 697,2 | 0,5 | 0,918 |
| 25 | 1588,100 | 20 | 618,5 | 1,25 | 2,568 |
| 50 | 3859,300 | 20 | 651,9 | 2,5 | 5,920 |

(b)

| Kalibrierreihe | Kalibriergerade $y = mx + b$ | Bestimmtheitsmaß R^2 |
|----------------|------------------------------|------------------------|
| 1 (1) | $y = 2,3827x - 0,1705$ | 0,9957 |
| 1 (2) | $y = 2,4175x - 0,1392$ | 0,9985 |
| 1 (3) | $y = 2,4581x - 0,1988$ | 0,9935 |
| 1 (4) | $y = 2,3712x - 0,1404$ | 0,9989 |
| 2 (1) | $y = 2,1303x - 0,0801$ | 1,0000 |
| 2 (2) | $y = 2,1226x - 0,0607$ | 0,9998 |
| 2 (3) | $y = 2,1349x - 0,0658$ | 0,9999 |

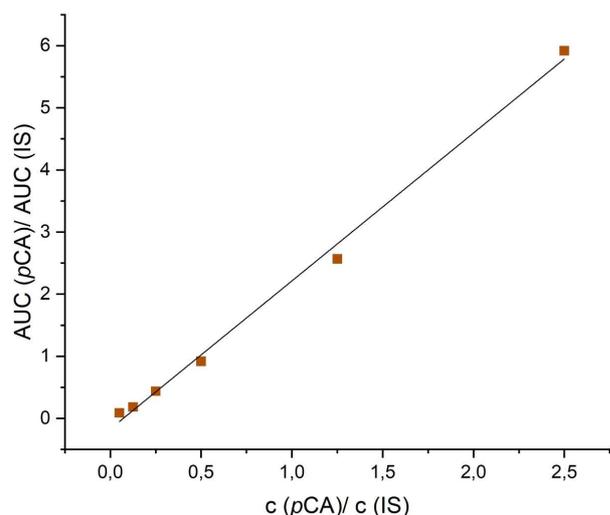


Abb. 62: Kalibriergerade 1 (1) zur Bestimmung der Hordatine in BSG-Extrakten A und H-Fractionen, Geradengleichungen sind Tab. 35 (b) zu entnehmen. BSG: Biertreber, IS: interner Standard, pCA: *p*-Coumarsäure

Tab. 36: MS-Parameter zur Charakterisierung der BSG-Extrakte mittels MS/MS-Experimenten zu Kapitel 8.2.10.1. BSG: Biertreber, CA: Kaffeesäure, CE: collision energy, CEP: cell entrance potential, CXP: cell exit potential, DP: declustering potential, EP: entrance potential, FA: Ferulasäure, *m/z*: Masse-zu-Ladungsverhältnis, pCA: *p*-Coumarsäure, *R_t*: Retentionszeit

| Substanz | <i>R_t</i> (min)* | <i>m/z</i> | Ionisierung | DP (V) | EP (V) | CEP (V) | CXP (V) | CE (V) |
|---|-----------------------------|------------|-------------|--------|--------|---------|---------|---------|
| pCA (<i>cis</i> und <i>trans</i> Isomer) | 19,3 und 20,4 | 163 | negativ | -100 | -8 | -12 | -15 | -20 |
| FA (<i>cis</i> und <i>trans</i> Isomer) | 20,5 und 21 | 193 | negativ | -100 | -8 | -12 | -15 | -20 |
| CA (<i>cis</i> und <i>trans</i> Isomer) | 16,4 und 17,8 | 179 | negativ | -100 | -8 | -12 | -15 | -20 |
| (+)-Catechin | 16,1 | 289 | negativ | -65 | -9 | -20 | -2 | -35/-50 |
| (-)-Epicatechin | 17,3 | 289 | negativ | -65 | -9 | -20 | -2 | -35/-50 |
| Azelainsäure | 19,6 | 187 | negativ | -21 | -10,5 | -12 | -6 | -20 |
| Suberinsäure | 16,9 | 173 | negativ | -100 | -8 | -10,95 | -15 | -20 |
| Sebacinsäure | 27,3 | 201 | negativ | -26 | -8,5 | -11,8 | -50 | -26 |
| (L)-Tryptophan | 10,1 | 205 | positiv | 100 | 8 | 32 | 50 | 15/20 |
| Procyanidin B ₁ | 19 | 577 | negativ | -100 | -10 | -31,77 | -15 | -30/-50 |
| Procyanidin B ₂ | 16,2 | 577 | negativ | -100 | -10 | -38,4 | -50 | -30/-50 |
| Procyanidin B ₃ | 16 | 577 | negativ | -100 | -10 | -38,4 | -50 | -30/-50 |
| Procyanidin B ₄ | 16,3 | 577 | negativ | -100 | -10 | -38,4 | -50 | -30/-50 |
| Hydroxy-sebacinsäure | 18 | 217 | negativ | -100 | -8 | -12 | -15 | -20 |
| Phosphatidylethanolamin (18:2/0:0) | 37,9 und 39,3 | 478 | positiv | 100 | 8 | 32 | 15 | 20 |
| Lyso-phosphatidylethanolamin (16:0) | 40,1 | 453 | positiv | 100 | 8 | 19,55 | 15 | 35 |

*Schwankungen von bis zu 0,5 min aufgrund von Reparaturen und Wechsel der HPLC-Geräte oder Säulen; Verschiebung der Retentionszeit durch verkürzte Kanülen etc.

Tab. 37: MS-Parameter zur Charakterisierung der FA-Oligomere und Oxylipine in BSG-Extrakten und F-Fractionen mittels ESI(-)-MS/MS-Experimenten zu Kapitel 8.2.10.2 und 8.4.4. BSG: Biertreber, CE: collision energy, CEP: cell entrance potential, CXP: cell exit potential, DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, DP: declustering potential, EP: entrance potential, FA: Ferulasäure, *m/z*: Masse-zu-Ladungsverhältnis, *pCA*: *p*-Coumarsäure, *R_t*: Retentionszeit, TriHODA: Trihydroxyoctadecansäure, TriHOME: Trihydroxyoctadecensäure

| Substanz | <i>R_t</i> (min) | <i>m/z</i> | DP (V) | CEP (V) | CXP (V) | CE (V) | CAD (units) | EP (V) |
|----------------------|----------------------------|------------|----------|---------|---------|---------|-------------|--------|
| <i>trans</i> -FA | 11,2 | 193 | -50 | -28 | 0 | -25 | 6 | -4,5 |
| <i>cis</i> -FA | 10,5 | 193 | -50 | -28 | 0 | -25 | 6 | -4,5 |
| <i>trans-pCA</i> | 10,2 | 163 | -45 | -27,25 | 0 | -35 | 6 | -4,5 |
| <i>cis-pCA</i> | 9,6 | 163 | -45 | -27,25 | 0 | -35 | 6 | -4,5 |
| Azelainsäure | 10,5 | 187 | -50 | -28 | -2 | -30 | 6 | -5 |
| DiFA | 10,7–11 | 385 | -45 | -20 | -2 | -30 | 6 | -10,5 |
| DiFA | 11,4–11,8 | 385 | -45 | -20 | -2 | -30 | 6 | -10,5 |
| DiFA | 14 | 385 | -175 | -20 | -4 | -20/-40 | 6 | -10,5 |
| DiFA | 15,5 | 385 | -175/-35 | -20 | -4 | -30/-50 | 6 | -10,5 |
| DiFA | 18 | 385 | -175/-35 | -20 | -4 | -30/-50 | 6 | -10,5 |
| DiFA (5-5'-Isomer) | 23,5 | 385 | -35 | -20 | -4 | -50/-35 | 6 | -10 |
| DiFA | 24,9 | 385 | -35 | -20 | -4 | -50 | 6 | -10 |
| DiFA (8-O-4'-Isomer) | 26,6 | 385 | -35 | -20 | -4 | -35 | 6 | -10 |
| DiFA | 28,5 | 385 | -65 | | -15 | -30/-50 | 2 | -10 |
| DiFA | 30,8 | 385 | -65 | -20 | -4/-15 | -30/-35 | 2 | -10 |
| DiFA | 39,5 | 385 | -90 | -17 | -4 | -20/-35 | 6 | -10 |
| DiFA | 40,5 | 385 | -90 | -17 | -4 | -20/-35 | 6 | -10 |
| DiFA | 41 | 385 | -90 | -17 | -4 | -20/-35 | 6 | -10 |
| DiFA | 45 | 385 | -90 | -17 | -4 | -20/-35 | 6 | -10 |
| TriFA | 35,2 | 577 | -105 | -30 | -4 | -40 | 6 | -10 |
| TriFA | 40,5 | 577 | -100 | - | -15 | -30 | 2 | -10 |
| TriFA | 20,0 | 577 | -45 | - | -15 | -25 | 2 | -10 |
| TriFA | 15 | 577 | -45 | - | -15 | -25 | 2 | -10 |
| TriFA | 21,7 | 577 | -85 | - | -17 | -20/-40 | 2 | -10 |
| TriFA | 23,6 | 577 | -85 | - | -17 | -20 | 2 | -10 |
| TriFA | 26,6 | 577 | -85 | - | -17 | -20 | 2 | -10 |
| TriHOME | 28 | 329 | -100 | -31.77 | -4 | -30 | 5 | -10,5 |
| TriHOME | 29 | 329 | -100 | -31.77 | -4 | -30 | 5 | -10,5 |
| TriHOME | 32,8 | 329 | -100 | -31.77 | -4 | -30 | 5 | -10,5 |
| TriHOME | 34 | 329 | -100 | -31.77 | -4 | -30 | 5 | -10,5 |
| TriHOME | 35,7 | 329 | -100 | -31.77 | -4 | -30 | 5 | -10,5 |
| TriHOME | 37 | 329 | -100 | -31.77 | -4 | -30 | 5 | -10,5 |
| TriHOME | 39 | 329 | -100 | -31.77 | -4 | -30 | 5 | -10,5 |
| TriHOME | 40 | 329 | -100 | -31.77 | -4 | -30 | 5 | -10,5 |
| TriHODA | 28,7 | 331 | -100 | -31.82 | -4 | -30 | 6 | -10,5 |
| TriHODA | 39 | 331 | -100 | -31.82 | -4 | -30 | 6 | -10,5 |

Tab. 38: MS-Parameter zu Charakterisierung der Hordatine in BSG-Extrakten und H-Fractionen mittels MS/MS-Experimenten zu Kapitel 8.5.4. AF3: auxiliary AC, BSG: Biertreber, CE: collision energy, CEP: cell entrance potential, CES: collisional energy spread, CXP: cell exit potential, DP: declustering potential, ESI: electrospray ionisation, EP: entrance potential, EXB: exit lense voltage, FP: focusing potential, HPLC: *high pressure liquid chromatography*, MS: *mass spectrometry*, *m/z*: Masse-zu-Ladungsverhältnis

HPLC-ESI(+)-MS/MS System III

| Hordatin | <i>m/z</i> [M+2H] ²⁺ | DP (V) | CES (V) | CE (V) | CAD (units) | EP (V) | AF3 (V) | EXB (V) |
|--------------|------------------------------------|-----------|------------|-----------|----------------|-----------|-----------|---------------------|
| A | 276,5 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,69 | -155,98 bis-141,17 |
| B | 291,4 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,72 | -155,98 bis-140,25 |
| C | 306,6 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,75 | -155,98 bis-139,32 |
| D | 321,6 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,79 | -155,98 bis-138,24 |
| A1 | 284,5 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,71 | -155,98 bis-140,71 |
| B1 | 299,6 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,74 | -155,98 bis-139,63 |
| C1 | 314,6 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,78 | -155,98 bis-138,71 |
| D1 | 329,6 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,81 | -155,98 bis-137,63 |
| A2 | 291,7 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,72 | -155,98 bis-140,25 |
| B2 | 307,4 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,75 | -155,98 bis-136,08 |
| C2 | 322,3 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,79 | -155,98 bis-138,24 |
| A-Hexosid | 357,6 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,86 | -155,98 bis-134,23 |
| B-Hexosid | 372,5 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,89 | -155,98 bis-135,16 |
| C-Hexosid | 387,6 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,92 | -155,98 bis-134,23 |
| A1- Hexosid | 365,7 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,88 | -155,98 bis-135,47 |
| B1- Hexosid | 380,5 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,91 | -155,98 bis-134,85 |
| C1- Hexosid | 395,5 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,94 | -155,98 bis-133,77 |
| A-Dihexosid | 438,5 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-0,91 | -155,98 bis-134,54 |
| B-Dihexosid | 453,2 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-1,05 | -155,98 bis-130,22 |
| C-Dihexosid | 468,8 | 100 | 40 | 20 | -3 | 8 | 0,21-1,08 | -155,98 bis-129,30 |
| A-Trihexosid | 519,2 | 75 | 30 | 20 | -3 | 8 | 0,21-1,15 | -155,98 bis -127,45 |
| B-Trihexosid | 534,3 | 75 | 30 | 20 | -3 | 8 | 0,21-1,15 | -155,98 bis -127,45 |
| C-Trihexosid | 549,2 | 75 | 30 | 20 | -3 | 8 | 0,21-1,15 | -155,98 bis -127,45 |

HPLC-ESI(+)-MS/MS System I

| Hordatin | <i>m/z</i> [M+2H] ²⁺ | DP (V) | CEP (V) | CXP (V) | CE (V) | CAD (units) | EP (V) | FP (V) |
|-----------|------------------------------------|-----------|---------|------------|--------|----------------|--------|--------|
| A | 276,5 | 100 | 32 | 15 | 20 | 2 | 8 | 340 |
| B | 291,6 | 100 | 32 | 15 | 20 | 2 | 8 | 340 |
| C | 306,2 | 100 | 15,0 | 50 | 35 | 2 | 10,5 | 340 |
| A1 | 284,1 | 100 | 14,3/32 | 50/15 | 35/20 | 2 | 10,5/8 | 340 |
| B1 | 299,3 | 100 | 32 | 15 | 20-30 | 2 | 8 | 340 |
| C1 | 314,1 | 100 | 15,3 | 50 | 35 | 2 | 10,5 | 340 |
| A2 | 292,0 | 100 | 14,6 | 50 | 35 | 2 | 10,5 | 340 |
| B2 | 307,1 | 100 | 15,05 | 50 | 35 | 2 | 10,5 | 340 |
| C2 | 322,1 | 100 | 15,5 | 50 | 35 | 2 | 10,5 | 340 |
| A-Hexosid | 357,7 | 100 | 32 | 15 | 20-30 | 2 | 8 | 340 |
| B-Hexosid | 372,6 | 100 | 32 | 15 | 20-30 | 2 | 8 | 340 |

| | | | | | | | | |
|-------------|-------|-----|---------|-------|-------|---|--------|-----|
| C-Hexosid | 387,2 | 100 | 17,5 | 50 | 35 | 2 | 10,5 | 340 |
| A1-Hexosid | 365,1 | 100 | 16,8 | 50 | 35 | 2 | 10,5 | 340 |
| B1-Hexosid | 380,1 | 100 | 17,3 | 50 | 35 | 2 | 10,5 | 340 |
| C1-Hexosid | 395,1 | 100 | 17,8/32 | 50/15 | 35/20 | 2 | 10,5/8 | 340 |
| A-Dihexosid | 438,2 | 100 | 32 | 15 | 20 | 2 | 8 | 340 |
| B-Dihexosid | 453,6 | 100 | 32 | 15 | 20 | 2 | 8 | 340 |
| C-Dihexosid | 468,7 | 100 | 20/32 | 50/15 | 35/20 | 2 | 10,5/8 | 340 |

Tab. 39: detaillierte Verweise auf den elektronischen Anhang

| Kapitel | Inhalt | Dateiname und Pfad |
|-----------------------|--|--|
| 2.1.3.3 | Umrechnung der Einheiten aus Literaturdaten | eigene Daten/Umrechnung Literaturdaten_Kapitel 2.1.3.3 (Excel) |
| 5.4 | <i>Full scans</i> und <i>extracted ion chromatograms</i> der Extrakte HE2-HE6 | eigene Daten/MS-Messungen/Extrakte (PNGs) |
| 8.2.9.2 und Anhang A | Verdünnungsschema und Einwaagen zur Quantifizierung der HCA-Derivate sowie Datenauswertung | eigene Daten/HPLC-Messungen/Quantifizierung Hydroxyzimtsäurederivate/ Quantifizierung Hydroxyzimtsäurederivate (Excel) |
| 8.2.9.3 und Anhang A | Verdünnungsschema und Einwaagen zur Quantifizierung der Hordatine sowie Datenauswertung | eigene Daten/HPLC-Messungen/Quantifizierung Hordatine/ Hordatine_Quantifizierung (Excel) |
| Anhang A Tab. 32 | Ausbeutebestimmung und Nomenklatur der F-Fractionen | eigene Daten/Extraktionen und Isolierungen/Ausbeuteübersicht und Nomenklatur DiFA-Isolierung (Excel) |
| Kapitel 8.3 und 8.6.1 | Auswertungsübersicht zur Bestimmung des MSR | eigene Daten/Enzymassays/Auswertungen/MSR |
| Kapitel 8.2.2 | Fotos der Extraktion | eigene Daten/Extraktionen und Isolierungen/Extraktherstellung Prozess 1 |
| Kapitel 8.2.3 | Fotos der Extraktion | eigene Daten/Extraktionen und Isolierungen/Extraktherstellung Prozess 2 |
| Kapitel 8.4 | Fotos der Isolierung | eigene Daten/Extraktionen und Isolierungen/Isolierung Ferulasäureoligomere |

B. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tab. 1: Zusammensetzung verschiedener BSG. | 20 |
| Tab. 2: Gehalte verschiedener phenolischer Säuren in BSG bestimmt nach unterschiedlichen Extraktionsmethodiken | 29 |
| Tab. 3: Gehalte ausgewählter Flavonoide in BSG bestimmt nach unterschiedlichen Extraktionsmethodiken | 32 |
| Tab. 4: Übersicht der in den F-Fractionen detektierten und zugeordneten Substanzen bzw. <i>m/z</i> mit zugehöriger Retentionszeit und Fragmentierung sowie den sie enthaltenden F-Fractionen. Kennzeichnung der mittels Referenzsubstanz identifizierten Komponenten (#). DiFA: Ferulasäure Dehydrodimer, FA: Ferulasäure, TriFA: Ferulasäure Dehydrotrimer, <i>m/z</i> : Masse-zu-Ladungsverhältnis, TriHODA: Trihydroxyoctadecensäure, TriHOME: Trihydroxyoctadecensäure | 133 |
| Tab. 5: F-Fractionen im α -Glucosidase-Inhibitionsassay kategorisiert nach ihrer prozentualen Inhibition in höchster untersuchter Konzentration von 210 $\mu\text{g/mL}$ | 159 |
| Tab. 6: F-Fractionen im GP α - Inhibitionsassay kategorisiert nach ihrer prozentualen Inhibition in höchster untersuchter Konzentration von 174 bzw. 87 $\mu\text{g/mL}$ | 160 |
| Tab. 7: Ausgewählte Reinsubstanzen im α -Glucosidase- und GP α - Inhibitionsassay kategorisiert nach ihrer prozentualen Inhibition in höchster untersuchter Konzentration von 210 bzw. 200 μM . GP α : Glykogenphosphorylase α | 162 |
| Tab. 8: Hordatingehalte und Ergebnisse der GP α - und α -Glucosidaseinhibition im Vergleich sowie zugehöriger Rangkorrelationskoeffizient nach Kendall der Extrakte (A1–A7). GP α : Glykogenphosphorylase α . IC ₅₀ : inhibitory concentration 50 %, SD: standard deviation, <i>pCA</i> -Äq: <i>p</i> -Coumarsäure-Äquivalente | 165 |
| Tab. 9: In den Enzyminhibitionsassays untersuchte Konzentrationen der drei HCAs FA, CA und <i>pCA</i> berechnet in der maximal vermessenen Extraktkonzentration oder am IC ₅₀ -Wert sowie im Vergleich zu den einzeln untersuchten Reinsubstanzen. CA: Kaffeesäure, FA: Ferulasäure, GP α : Glykogenphosphorylase α , HCA: Hydroxyzimtsäure, IC ₅₀ : inhibitory concentration 50 %, <i>pCA</i> : <i>p</i> -Coumarsäure..... | 168 |
| Tab. 10: Übersicht der Gehalte an FA, <i>pCA</i> , CA und DiFAs in HE- und HA-Extrakten bezogen auf 100 g BSG Trockengewicht; FA= Ferulasäure, <i>pCA</i> = <i>p</i> -Coumarsäure, CA= Kaffeesäure, DiFA= Ferulasäure-Dehydrodimer..... | 173 |
| Tab. 11: Übersicht der verwendeten Treberchargen. BSG: Biertreber..... | 193 |
| Tab. 12: BSG-Einwaagen Extraktionsprozess 1 sowie Nomenklatur resultierender Extrakte. BSG: Biertreber..... | 193 |

| | |
|---|-----|
| Tab. 13: BSG-Einwaagen Extraktionsprozess 2 sowie Nomenklatur resultierender Extrakte. BSG: Biertreber..... | 194 |
| Tab. 14: BSG-Einwaagen und Lösungsmittelverhältnis Extraktionsprozess 2 sowie Nomenklatur resultierender Extrakte. BSG: Biertreber | 194 |
| Tab. 15: Übersicht über die hergestellten Extrakte in Kombination mit BSG-Charge, Extraktionsprozess und – mittel sowie optionaler Vorbehandlung. BSG: Biertreber..... | 195 |
| Tab. 16: HPLC-Parameter der Methode A zur Identifikation von Leitsubstanzen in BSG-Extrakten. ACN: Acetonitril, BSG: Biertreber, HPLC: <i>high pressure liquid chromatography</i> , DAD: <i>diodenarray detector</i> | 199 |
| Tab. 17: HPLC-Parameter und Validierung der Methode B zur Quantifizierung von Hydroxymizinsäurederivaten in BSG-Extrakten: ACN: Acetonitril; bw: <i>band width</i> , BSG: Biertreber, CA: Kaffeesäure, FA: Ferulasäure, HPLC: <i>high pressure liquid chromatography</i> , pCA: <i>p-Coumarsäure</i> , V_k : Variationskoeffizient | 200 |
| Tab. 18: HPLC-Parameter und Validierung der Methode C zur Quantifizierung von Hordatinen in BSG-Extrakten. ACN: Acetonitril, bw: <i>band width</i> , BSG: Biertreber, HPLC: <i>high pressure liquid chromatography</i> , pCA: <i>p-Coumarsäure</i> , V_k : Variationskoeffizient | 201 |
| Tab. 19: MS-Geräteparameter der Strukturaufklärung und Charakterisierung der BSG-Extrakte mittels <i>full scan</i> -Modus. BSG: Biertreber, ESI: <i>electrospray ionisation</i> , HPLC: <i>high pressure liquid chromatography</i> , MS: <i>mass spectrometry</i> | 202 |
| Tab. 20: MS-Geräteparameter der Strukturaufklärung und Charakterisierung der BSG-Extrakte mittels MS^2 -Scan-Modus. BSG: Biertreber, ESI: <i>electrospray ionisation</i> , HPLC: <i>high pressure liquid chromatography</i> , MS: <i>mass spectrometry</i> | 203 |
| Tab. 21: MS-Geräteparameter und zugehöriger HPLC-Gradient der Strukturaufklärung und Charakterisierung der DiFAs und Oxylipine in BSG-Extrakten. ACN: Acetonitril, BSG: Biertreber, DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, ESI: <i>electrospray ionisation</i> , HPLC: <i>high pressure liquid chromatography</i> , MS: <i>mass spectrometry</i> | 204 |
| Tab. 22: MS-Geräteparameter der Charakterisierung der DiFAs in BSG-Extrakten. BSG: Biertreber, DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, ESI: <i>electrospray ionisation</i> , HPLC: <i>high pressure liquid chromatography</i> , MS: <i>mass spectrometry</i> | 205 |
| Tab. 23: MS-Geräteparameter der Charakterisierung der Hordatine in BSG-Extrakten mittels positivem <i>full scan</i> -Modus. ACN: Acetonitril, BSG: Biertreber, ESI: <i>electrospray ionisation</i> , HPLC: <i>high pressure liquid chromatography</i> , MS: <i>mass spectrometry</i> | 206 |
| Tab. 24: MS-Geräteparameter der Charakterisierung der Hordatine in BSG-Extrakten mittels positivem <i>full scan</i> Modus. BSG: Biertreber, ESI: <i>electrospray ionisation</i> , HPLC: <i>high pressure liquid chromatography</i> , MS: <i>mass spectrometry</i> | 207 |

| | |
|---|-----|
| Tab. 25: HPLC-Parameter der semi-präparativen GPC. bw: band width, DAD: diodenarray detector, GPC: Größenausschlusschromatographie, HPLC: <i>high pressure liquid chromatography</i> | 215 |
| Tab. 26: Übersicht über die erhaltenen GPC-Fraktionen vor und nach finaler Vereinigung. GPC: Größenausschlusschromatographie..... | 215 |
| Tab. 27: HPLC-Paramater zu semi-präparativen Auftrennung der Isolate F I–FV. ACN: Acetonitril, bw: band width, DAD: diodenarray detector, HPLC: <i>high pressure liquid chromatography</i> | 216 |
| Tab. 28: Übersicht über die finalen Fraktionen der FA-Oligomer-Isolierung aus Vereinigungen der präparativ aufgereinigten GPC-Fraktionen. FA: Ferulasäure, GPC: Größenausschlusschromatographie..... | 217 |
| Tab. 29: MS-Geräteparameter der Charakterisierung der FA-Oligomere und Oxylipinen in F-Fraktionen mittels negativem <i>full scan</i> sowie negativen Produktionenscans. ACN: Acetonitril, ESI: electrospray ionisation, FA: Ferulasäure, HPLC: <i>high pressure liquid chromatography</i> , MS: <i>mass spectrometry</i> | 218 |
| Tab. 30: HPLC-Parameter zur präparativen Auftrennung des Isolates. ACN: Acetonitril, bw: band width, HPLC: <i>high pressure liquid chromatography</i> | 220 |
| Tab. 31: MS-Geräteparameter der Charakterisierung der Hordatine in H-Fraktionen. EPI: enhanced product ion scans, ESI: electrospray ionisation, HPLC: <i>high pressure liquid chromatography</i> , LIT: Ionenfalle, MS: <i>mass spectrometry</i> | 221 |
| Tab. 32: Ausbeuten der F-Fraktionen 1–37 aus Isolierung der FA-Oligomere (s. Kapitel 8.4) nach GPC, semipräparativer Aufreinigung und Lyophilisierung (vgl. elektronischer Anhang, Tab. 39 Seite G). FA: Ferulasäure | A |
| Tab. 33: Übersicht der Retentionszeiten, charakteristischen Fragmente und Litertaturvergleichen der Referenzsubstanzen zur Charakterisierung der Inhaltsstoffe in F-Fraktionen (Kapitel 4.4.2). DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, FA: Ferulasäure, <i>m/z</i> : Masser- zu-Ladungsverhältnis, <i>pCA</i> : <i>p</i> -Coumarsäure, TriHOME: Trihydroxyoctadecensäure | A |
| Tab. 34: (a) AUCs* der Referenzsubstanzen FA, <i>pCA</i> und CA sowie des IS zur Erstellung der Kalibriergeraden 1 (1) zur Bestimmung von <i>pCA</i> , FA, CA und DiFA in BSG-Extrakten HE und HA (Methode B; 8.2.9.2) (b) auf IS bezogene Messwerte zur Kalibriergeraden 1 (1) zur Bestimmung von <i>pCA</i> , FA, CA und DiFA in BSG-Extrakten HE und HA (Methode B; 8.2.9.2) (c) Übersicht über alle Kalibriergeraden inklusive R ² ; Verdünnungsschema, Einwaagen und Gesamtauswertung sind dem elektronischen Anhang zu entnehmen (vgl. elektronischer Anhang, Tab. 39 Seite G); AUC: <i>area under curve</i> , BSG: Birtreber, CA: Kaffeesäure, c: Konzentration, FA: Ferulasäure, IS: interner Standard, <i>pCA</i> : <i>p</i> -Coumarsäure | B |
| Tab. 35: (a) AUCs der Referenzsubstanz <i>pCA</i> sowie des IS zur Erstellung der Kalibriergeraden 1 zur Bestimmung von Hordatinen in BSG Extrakten A sowie H-Fraktionen (Methode C; 8.2.9.3) | |

(b) Übersicht über alle Kalibriergeraden inklusive R^2 ; Verdünnungsschema, Einwaagen und Gesamtauswertung sind dem elektronischen Anhang zu entnehmen (vgl. elektronischer Anhang, Tab. 39 Seite G); AUC: *area under curve*, BSG: Biertreber, c: Konzentration, IS: interner Standard, *pCA*: *p*-Coumarsäure..... C

Tab. 36: MS-Parameter zur Charakterisierung der BSG-Extrakte mittels MS/MS-Experimenten zu Kapitel 8.2.10.1. BSG: Biertreber, CA: Kaffeesäure, CE: collision energy, CEP: cell entrance potential, CXP: cell exit potential, DP: declustering potential, EP: entrance potential, FA: Ferulasäure, *m/z*: Masse-zu-Ladungsverhältnis, *pCA*: *p*-Coumarsäure, R_t : Retentionszeit D

Tab. 37: MS-Parameter zur Charakterisierung der FA-Oligomere und Oxylipine in BSG-Extrakten und F-Fractionen mittels ESI(-)-MS/MS-Experimenten zu Kapitel 8.2.10.2 und 8.4.4. BSG: Biertreber, CE: collision energy, CEP: cell entrance potential, CXP: cell exit potential, DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, DP: declustering potential, EP: entrance potential, FA: Ferulasäure, *m/z*: Masse-zu-Ladungsverhältnis, *pCA*: *p*-Coumarsäure, R_t : Retentionszeit, TriHODA: Trihydroxyoctadecensäure, TriHOME: Trihydroxyoctadecensäure E

Tab. 38: MS-Parameter zur Charakterisierung der Hordatine in BSG-Extrakten und H-Fractionen mittels MS/MS-Experimenten zu Kapitel 8.5.4. AF3: auxiliary AC, BSG: Biertreber, CE: collision energy, CEP: cell entrance potential, CES: collisional energy spread, CXP: cell exit potential, DP: declustering potential, ESI: electrospray ionisation, EP: entrance potential, EXB: exit lense voltage, FP: focusing potential, HPLC: *high pressure liquid chromatography*, MS: *mass spectrometry*, *m/z*: Masse-zu-Ladungsverhältnis F

Tab. 39: detaillierte Verweise auf den elektronischen Anhang..... G

C. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1: Herstellungsprozess von Bier gegliedert in Mälzerei, Würzebereitung und Gärung. (Modifiziert nach Belitz <i>et al.</i> 2007). | 17 |
| Abb. 2: Struktur der AX; β -D-(1 \rightarrow 4) -verknüpften -Xylopyranosyle mit α 1 \rightarrow 3 verknüpften Arabinofuranosen und veresterter FA an C(4) der Arabinofuranose. (Modifiziert nach Reis <i>et al.</i> , 2015 und Lynch <i>et al.</i> , 2016). AX: Arabinoxylan, FA: Ferulasäure..... | 21 |
| Abb. 3: Monolignole: (a) Coniferylalkohol; (b) Sinapylalkohol; (c) <i>p</i> -Coumarylalkohol; (d) G- und S-Einheit über β -O-4-Verbindung verknüpft. (Modifiziert nach Niemi <i>et al.</i> , 2013 und Vanholme <i>et al.</i> , 2010). | 24 |
| Abb. 4: Ausgewählte Strukturen und Hauptinhaltsstoffe der Lipidfraktionen aus BSG: (a) Linolsäure; (b) Glycerin, Pfeile markieren die Veresterungspositionen mit Fettsäuren; (c) Grundstruktur der 5-n-Alkylresorcinole; (d) β -Sitosterin als Hauptvertreter der freien Sterole; (e) 9,12,13-Trihydroxy-10-octadecensäure. | 25 |
| Abb. 5: Struktur der monomeren phenolischen Säuren | 27 |
| Abb. 6: Strukturen der im BSG und Getreide identifizierten DiFAs und TriFAs; (1) 8-8'-Aryltetralin-DiFA, (2) 8-8' lineare DiFA, (3) 8-5'-DiFA, (4) 5-5'-DiFA, (5) 8-5'-Benzofuran-DiFA, (6) 8-O-4'-DiFA, (7) 8-5'-decarboxylierte DiFA, (8) 5-5' / 8'-O-4''-TriFA. (Modifiziert nach Moreira <i>et al.</i> , 2012 und Callipo <i>et al.</i> , 2010). DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer | 28 |
| Abb. 7: Ausgewählte Strukturen der Flavonoide in BSG; (1) Grundstruktur der Catechine, (2) Quercetin, (3) Chrysoeriol, (4) Procyanidin B ₂ , (5) Xanthohumol..... | 31 |
| Abb. 8: Ausgewählte Phenolamide in Getreide; (1) Hordatine, Glykosylierung an Hydroxygruppe des Phenylrings (markiert mit Pfeil) mit bis zu neun Hexoseeinheiten; (2) Hordatin-Vorläufer HCA-Agmatine; (3) HCA-Spermidine modifiziert nach Pihlava <i>et al.</i> , Gorzolka <i>et al.</i> , Bento-Silva <i>et al.</i> FA: Ferulasäure, HCA: Hydroxyzimtsäure, <i>p</i> CA: <i>p</i> -Coumarsäure..... | 34 |
| Abb. 9: Verdauungsvorgänge der Kohlenhydrate und Transportwege der Monosaccharide in intestinalen Epithelzellen über die Portalvene (nach Rehner und Daniel, 2010)..... | 36 |
| Abb. 10: Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase durch die Gegenspieler Insulin und Glucagon (nach Müller-Esterl, 2018). GLUT: Glucosetransporter | 38 |
| Abb. 11: Ribbon-Darstellung der humanen Pankreas- α -Amylase im Komplex mit Acarbose als Ligand (erstellt mit PyMOL nach PDB ID: 1B2Y) [Nahoum und Payan, 2000] Acarbose (pink), katalytische Aminosäuren (Asp 197, Glu 233 und Asp 300; orange). a) Darstellung der gesamten Struktur und b) Darstellung des aktiven Zentrums und Wechselwirkung des Liganden Acarbose mit katalytischen Aminosäureresten. Asp: Asparaginsäure, Glu: Glutaminsäure | 40 |

Abb. 12: Ribbon-Darstellung der C-terminalen Domäne der intestinalen humanen Maltase-Glucoamylase (MGAM) im Komplex mit Acarbose als Ligand (erstellt mit PyMOL nach PDB ID: 3TOP) [Ren *et al.*, 2011]; Acarbose (pink), WIDMNE-Sequenz (Aminosäuren 1418–1423; grün), Säure-Base-Katalysator (orange). a) Darstellung der gesamten Struktur aus Kette A und B und b) Darstellung des aktiven Zentrums und Wechselwirkung des Liganden Acarbose mit Asp 1526 und weiteren Aminosäureresten. Asp: Asparaginsäure41

Abb. 13: Ribbon-Darstellung der humanen extrazellulären Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) im Komplex mit Diprotin A (pink) als Ligand (erstellt mit PyMOL nach PDB ID: 1WCY) [Thoma *et al.*, 2003], Glykosylierungen (grün), katalytische Triade (Ser 630, Asp 708, His 740; orange), Glu-Sequenz (Glu 204–206; rot) a) Darstellung der gesamten Struktur aus Kette A und B und b) Darstellung des aktiven Zentrums und Wechselwirkung des Liganden Diprotin A mit aktivem Zentrum. Asp: Asparaginsäure, His: Histidin, Glu: Glutaminsäure, Ser: Serin43

Abb. 14: Ribbon-Darstellung der humanen Leber-GP im inaktiven T-state im Komplex mit CP403,700 (pink) an Arg 60, Val 64, Lys 191, Koffein an Phe 285 und Tyr 613 sowie an Trp 174 (rot), N-Acetyl-Glucopyranosylsamin (gelb), Pyridoxalphosphat an Lys 680 (hellgrün); AMP-Bindungsstelle (lila), Glykogen-Bindungsstelle (grün), *tower helices* (orange), *380' loop* (beige) (erstellt mit PyMOL nach PDB ID: 1L5Q) [Ekstrom *et al.*, 2002a]. AMP: Adenosinmonophosphat, Arg: Arginin, Lys: Lysin, Phe: Phenylalanin, Trp: Tryptophan, Tyr: Tyrosin, Val: Valin44

Abb. 15: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F2 mit Ionenspur m/z 385; identifiziert als DiFA; Hauptsignale eluierten bei $R_t = 11,2$; $11,8$ und $36,3$ min. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer136

Abb. 16: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei $R_t = 11,2$ min; anhand der Literaturdaten und der Fragmente identifiziert als 8-8'-Aryltetralin-DiFA [Callipo *et al.* 2010]. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis136

Abb. 17: Postuliertes Fragmentierungsmuster der 8-8'-Aryltetralin-DiFA (nach Callipo *et al.*, 2010). DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer137

Abb. 18: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei $R_t = 11,8$ min; anhand der Literaturdaten und der Fragmente identifiziert als 8-8'-DiFA [Callipo *et al.*, 2010]. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis137

Abb. 19: Postuliertes Fragmentierungsmuster der 8-8'-DiFA (nach Callipo *et al.*, 2010). DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer138

Abb. 20: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei $R_t = 36,3$ min; identifiziert als DiFA. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis 138

Abb. 21: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F27 mit Ionenspur m/z 385; identifiziert als DiFA; Signal bei $R_t = 13,1$ und $14,5$ min (Retentionszeitverschiebung von HPLC-MS II auf HPLC-MS III; $13,1$ min entspricht 14 min $14,5$ min entspricht $15,3$ min bei HPLC-MS II). DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer139

- Abb. 22: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei $R_t = 13,1$ min; anhand der Literaturdaten und der Fragmente identifiziert als 8-5'-DiFA [Callipo *et al.*, 2010]. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis.....139
- Abb. 23: Postuliertes Fragmentierungsmuster der 8-5'-DiFA; Mechanismus der Ringbildung von m/z 267 zu m/z 239 dargestellt (nach Callipo *et al.*, 2010). DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer140
- Abb. 24: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei $R_t = 14,5$ min; anhand der Literaturdaten und der Fragmente identifiziert als 8-5'-DiFA [Callipo *et al.*, 2010]. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis.....140
- Abb. 25: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F8 mit Ionenspur m/z 385; identifiziert als DiFA; Signal bei $R_t = 23,6$ min. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer141
- Abb. 26: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei $R_t = 23,6$ min (a) sowie der Referenzsubstanz (b); anhand der Literaturdaten und der Fragmente sowie ferner mittels Referenzsubstanz identifiziert als 5-5'-DiFA [Callipo *et al.*, 2010]. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis142
- Abb. 27: Postuliertes Fragmentierungsmuster der 5-5'-DiFA (nach Callipo *et al.*, 2010). DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer142
- Abb. 28: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F9 mit Ionenspur m/z 385; identifiziert als DiFA; Signal bei $R_t = 23,5$; 24,7 und 26,5 min. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer143
- Abb. 29: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385; identifiziert als DiFA; Signals bei $R_t = 24,7$ min. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis143
- Abb. 30: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F10 mit Ionenspur m/z 385; identifiziert als DiFA; Signale bei $R_t = 23,5$; 24,9 und 26,6 min. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis, R_t : Retentionszeit144
- Abb. 31: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei $R_t = 26,6$ (a) sowie der Referenzsubstanz (b) min anhand der Literaturdaten und der Fragmente sowie ferner mittels Referenzsubstanz identifiziert als 8-O-4'-DiFA [Callipo *et al.*, 2010]. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis144
- Abb. 32: Postuliertes Fragmentierungsmuster der 8-O-4'-DiFA (nach Callipo *et al.*, 2010). DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer145
- Abb. 33: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F12 mit Ionenspur m/z 385; Signal bei $R_t = 23,5$; 24,7; 26,7; 28,5 und 30,9 min DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer146
- Abb. 34: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 385 des Signals bei $R_t = 30,9$ min; aufgrund des Fragmentions bei m/z 193 als offene DiFA angenommen. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis146

- Abb. 35: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F16 mit Ionenspur m/z 385; Signal bei $R_t = 14, 23,7, 26,7$ und $32,5$ min. DiFA: Ferulasäure-Dehydrodimer.....147
- Abb. 36: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F27 mit Ionenspur m/z 577; identifiziert als TriFA; Signal bei $R_t = 14,1, 15,3, 20,0$ und $40,5$ min. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer.....149
- Abb. 37: ESI⁻-MS²-Spektrum (*enhanced product ion scan*) des Präkursorions mit m/z 577 des Signals bei $R_t = 14,1$ min; anhand der Literaturdaten identifiziert als 5-5'/8'-8'' (Aryltetralin)-TriFA; dargestellt sind die vermuteten Hauptfragmente [Bento-Silva *et al.*, 2020; Bunzel und Jilek, 2013; Waterstraat und Bunzel, 2018]. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis.....150
- Abb. 38: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 577 des Signals bei $R_t = 15,3$ min; anhand der Literaturdaten identifiziert als 5-5'/8'-8'' (Aryltetralin)-TriFA [Bento-Silva *et al.*, 2020; Bunzel und Jilek, 2013; Waterstraat und Bunzel, 2018]. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis.....150
- Abb. 39: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 577 des Signals bei $R_t = 20,0$ min; anhand der Literaturdaten identifiziert als 5-5'/8'-8''-TriFA [Bento-Silva *et al.*, 2020; Bunzel und Jilek, 2013; Waterstraat und Bunzel, 2018]. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis.....151
- Abb. 40: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F7 mit Ionenspur m/z 577; identifiziert als TriFA; Signal bei $R_t = 21,7$ min. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer151
- Abb. 41: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 577 des Signals bei $R_t = 21,7$ min; anhand der Literaturdaten als 8-8' (Aryltetralin)/4'-O-8''-TriFA angenommen; dargestellt sind die charakteristische Spaltung der C-O-Bindung mit Folgefragmenten [Waterstraat und Bunzel, 2018; Bunzel und Jilek, 2013; Bento-Silva *et al.*, 2020]. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis.....152
- Abb. 42: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F28 mit Ionenspur m/z 577; identifiziert als TriFA; Signal bei $R_t = 21,7$ und $23,6$ min. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer152
- Abb. 43: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 577 des Signals bei $R_t = 23,6$ min, angenommen als TriFA. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis153
- Abb. 44: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F14 mit Ionenspur m/z 577; identifiziert als TriFA; Signal bei $R_t = 35,1$ min. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer153
- Abb. 45: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 577 des Signals bei $R_t = 35,1$ min; anhand der Literaturdaten als 5-5'/4'-O-8''-TriFA angenommen [Waterstraat und Bunzel, 2018; Bunzel und Jilek, 2013; Bento-Silva *et al.*, 2020]. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis.....154

- Abb. 46: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F16 mit Ionenspur m/z 577; identifiziert als TriFA; Signal bei $R_t= 40,5$ min. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer154
- Abb. 47: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 577 des Signals bei $R_t= 40,5$ min; anhand der Literaturdaten als 8-O-4' /8' -O-4''-TriFA angenommen; charakteristische Spaltung der C-O-Bindung an zwei Positionen möglich [Waterstraat und Bunzel, 2018; Bunzel und Jilek, 2013; Bento-Silva *et al.*, 2020]. TriFA: Ferulasäure-Dehydrotrimer, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis.....155
- Abb. 48: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F16 mit Ionenspur m/z 329; identifiziert als TriHOME; Signale bei $R_t= 28,0; 29,1; 32,9; 34,0; 35,1; 35,7; 36,5; 37,0$ und $39,1$ min. TriHOME: Trihydroxyoctadecensäure155
- Abb. 49: ESI⁻-MS²-Spektrum vom Präkursorion mit m/z 329 des Signals bei $R_t= 28,0$ min. m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis.....156
- Abb. 50: ESI⁻-MS²-Spektrum vom Präkursorion mit m/z 329 des Signals bei $R_t= 36,9$ min. m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis.....156
- Abb. 51: HPLC-ESI⁻-MS-Chromatogramm der Fraktion F19 zur Differenzierung der TriHOME-Isomere; MRM-Modus: Übergang m/z 329/127 und m/z 329/129. TriHOME: Trihydroxyoctadecensäure, m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis, MRM: *multiple reaction monitoring*.....157
- Abb. 52: HPLC-ESI⁻-MS/MS-Chromatogramm der Fraktion F16 mit Ionenspur m/z 331; identifiziert als TriHODA; Signal bei $R_t= 28,7$ min. TriHODA: Trihydroxyoctadecensäure158
- Abb. 53: ESI⁻-MS²-Spektrum des Präkursorions mit m/z 331 des Signals bei $R_t= 28,7$ min. m/z : Masse-zu-Ladungsverhältnis.....158
- Abb. 54: IC₅₀-Werte der F-Fractionen mit zunehmender Inhibitionsstärke sowie der PK Koffein im GP α -Inhibitionsassay; Werte dargestellt als Mittelwert aus zwei–drei Experimenten ($n=2-3$) für die F-Fractionen \pm SD oder \pm SE bzw. 23 Experimenten für Koffein \pm SD. GP α : Glykogenphosphorylase α , IC₅₀: inhibitory concentration 50 %, PK: Positivkontrolle, SD: standard deviation161
- Abb. 55: Übersicht der durchgeführten Extraktionen. BSG: Biertreber, SPE: Festphasenextraktion196
- Abb. 56: a) Flavon mit Markierung der Komplexbildungsbereiche b) Catechin mit Markierung der Nitrierungsposition.....197
- Abb. 57: Prinzip des α -Amylase-Inhibitionsassays.CNPG3: 2-Chloro-4-nitrophenyl- α -maltotriosid, CNPG2: 2-Chloro-4-nitrophenyl-diglucosid, G3: Maltorose, G: Glucose.....208
- Abb. 58: Prinzip des α -Glucosidase-Inhibitionsassays. pNPG: 4-Nitrophenyl β -D-glucopyranosid209

| | |
|---|-----|
| Abb. 59: Prinzip des DPP IV-Inhibitionsassays. DPP IV: Dipeptidylpeptidase IV..... | 211 |
| Abb. 60: Prinzip des GP α -Inhibitionsassays. GP α : Glykogenphosphorylase α , G6PDH: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, NADP: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form), NADPH+H ⁺ : Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form), P _i : anorganisches Phosphat, PGM: Phosphoglucomutase | 212 |
| Abb. 61: Kalibriergerade 1 (1) zur Bestimmung der HCAs in BSG-Extrakten HA und HE, Geradengleichungen sind Tab. 34 (c) zu entnehmen. BSG: Biertreber, CA: Kaffeesäure, FA: Ferulasäure, HCA: Hydroxyzimtsäure, IS: interner Standard, <i>p</i> CA: <i>p</i> -Coumarsäure | C |
| Abb. 62: Kalibriergerade 1 (1) zur Bestimmung der Hordatine in BSG-Extrakten A und H-Fractionen, Geradengleichungen sind Tab. 35 (b) zu entnehmen. BSG: Biertreber, IS: interner Standard, <i>p</i> CA: <i>p</i> -Coumarsäure | D |

D. Dankeschön

Zum Schluss will ich allen danken, die mich fachlich wie auch persönlich auf der langen Reise der Promotion unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich *Frau Professor Dr. Elke Richling* für die Möglichkeit dieses spannende Thema in Ihrem Arbeitskreis bearbeiten zu dürfen sowie für anregende Diskussionen und vor allem das entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Professor Dr. Werner Thiel danke ich herzlich für die Übernahme der Zweitkorrektur und die gute Kooperation im Rahmen des BioVAL-Projektes.

Weiterhin will ich mich bei *Frau apl. Professor Dr. Gabriele Hornung* bedanken. Liebe *Gabi*, vielen Dank für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes aber auch dafür, dass ich während meiner Anstellung bei Dir immer genügend Zeit gefunden habe an meiner Dissertation zu schreiben.

Herrn Professor Dr. Mirko Bunzel will ich danken, für die Bereitstellung verschiedener Standardsubstanzen, welche mir die Identifikation in meinen eigenen Proben deutlich erleichterten.

Ein weiteres Dankeschön gilt allen *Partnern des BioVAL-Projektes* für zielführende Diskussionen im Zuge der scientific meetings. Allen voran jedoch *Herrn Professor Dr. Roland Ulber, Alex und Jens* für HPLC-Messungen und Bereitstellung von Treberproben sowie *Ranja und Pascal* für Soxleth-Extraktionen der Treberproben.

Ein großer Dank gebührt ebenfalls meinen Studenten *Simone, Sandra, Carolina, Vanessa und Marcel*, welche im Rahmen von Forschungspraktika und Masterarbeiten meine Dissertation zielführend ergänzen konnten.

Liebe *Arbeitsgruppe*, danke für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den immer guten Austausch im Kaffeezimmer. *Simone*, danke für deine Unterstützung in allen MS-Fragen, die Durchsicht meiner Manuskripte und dein offenes Ohr. *Tamara*, danke, dass du mit mir gemeinsam mit meinen Enzymen und der biologischen Aktivität gekämpft hast. *Ingrid*, vielen Dank, dass du immer alle organisatorischen Fragen mit mir klären konntest und alles reibungslos lief. *Jonathan, Kirsten, Christine* - LPG 56, danke fürs „Zeigen wie der Hase läuft“, Hilfe und schöne Abende. *Doro*, schön, dass du in unseren Arbeitskreis gefunden hast und ich dich mittlerweile zu meinen engen Freunden zählen darf. *Verena*, du warst nicht nur meine BioVAL-Partnerin sondern auch die standhafteste Begleiterin auf dieser Reise. Danke für die tolle Zeit, die Durchsicht meiner Arbeit und jedes Gespräch, wenn es notwendig war. Ich bin froh, dass du meine Reisebegleitung warst. Nicht zu vergessen sind meine ehemaligen Kollegen:innen *Janina, Rabea, Rainer, Eva, Celina, Daniel, Nadine, Tobias, Hanna, Julia, Lan, Lukas* und *Ruth*. Auch hier mein Dank für gute Gespräche, Hilfe im Labor oder einfach ein Witz, wenn er nötig war. Danke auch an *Eugen* und *Gerhard*, für die Unterstützung bei den Fotos.

Zu Guter Letzt ein riesiges Danke (!) an meine Familie und Freunde. *Cathi, Caro, Kevin* - danke für euer stets offenes Ohr und jede warme Umarmung. *Mama, Sebastian, Laura* - danke, dass euch dieses Thema nach so vielen Jahren nicht aus den Ohren rauskam, ihr als Fachfremde in meine Manuskripte geschaut habt. Ich verdanke euch viel! *Andreas*, danke, dass du mir nie übel genommen hast, wenn es im Labor mal nicht lief und du mich mit ruhiger Art und wohligem Gefühl durch diese ereignisreiche Reise manövriert hast. Ohne dich wäre es nicht gegangen!

E. Literaturverzeichnis

Abdel-Ghaf O, Hegab A, Rayan E. Evaluation of Antioxidative Effect of Green Tea Catechins Against Isoniazid-induced Biochemical Alterations in Rats. *International J. of Pharmacology* 7 (2019) 777–789. DOI: 10.3923/ijp.2019.777.789.

Abdul-Ghani M und DeFronzo R. Inhibition of renal glucose reabsorption: a novel strategy for achieving glucose control in type 2 diabetes mellitus. *Endocrine practice: official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* 6 (2008) 782–790. DOI: 10.4158/EP.14.6.782.

Adisakwattana S. Cinnamic acid and its derivatives: Mechanisms for prevention and management of diabetes and its complications. *Nutrients* 2 (2017) 163. DOI: 10.3390/nu9020163.

Adisakwattana S, Chantarasinlapin P, Thammarat H, Yibchok-Anun S. A series of cinnamic acid derivatives and their inhibitory activity on intestinal alpha-glucosidase. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 5 (2009) 1194–1200. DOI: 10.1080/14756360902779326.

Ainsworth E und Gillespie K. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature protocols* 4 (2007) 875–877. DOI: 10.1038/nprot.2007.102.

Akermann A, Weiermüller J, Christmann J, Guirande L, Glaser G, Knaus A, Ulber R. Brewers' spent grain liquor as a feedstock for lactate production with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Eng. Life Sci.* 5-6 (2020) 168–180. DOI: 10.1002/elsc.201900143.

Alam S, Sarker M, Sultana T, Chowdhury M, Rashid M, Chaity N, Zhao C, Xiao J, Hafez E, Khan S, Mohamed I. Antidiabetic Phytochemicals From Medicinal Plants: Prospective Candidates for New Drug Discovery and Development. *Frontiers in endocrinology* (2022) 800714. DOI: 10.3389/fendo.2022.800714.

Alonso-Riaño P, Sanz Diez M, Blanco B, Beltrán S, Trigueros E, Benito-Román O. Water ultrasound-assisted extraction of polyphenol compounds from brewer's spent grain: kinetic study, extract characterization, and concentration. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 3 (2020) 265. DOI: 10.3390/antiox9030265.

Amoriello T, Mellara F, Galli V, Amoriello M, Ciccoritti R. Technological Properties and Consumer Acceptability of Bakery Products Enriched with Brewers' Spent Grains. *Foods (Basel, Switzerland)* 10 (2020) 1492. DOI: 10.3390/foods9101492.

Anderson J, Baird P, Davis R, Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, Waters V, Williams C. Health benefits of dietary fiber. *Nutrition reviews* 4 (2009) 188–205. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x.

Andreasen M, Christensen L, Meyer A, Hansen Å. Ferulic Acid Dehydrodimers in Rye (*Secale cereale* L.). *Journal of Cereal Science* 3 (2000) 303–307. DOI: 10.1006/jcrs.1999.0296.

Andres A, Petron M, Lopez A, Timon M. Optimization of Extraction Conditions to Improve Phenolic Content and In Vitro Antioxidant Activity in Craft Brewers' Spent Grain Using Response Surface Methodology (RSM). *Foods (Basel, Switzerland)* 10 (2020) 1398. DOI: 10.3390/foods9101398.

- Anness B und Reud R. Lipids in wort. *J. Inst. Brew.* 5 (1985) 313–317. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1985.tb04349.x.
- Antony A und Farid M. Effect of Temperatures on Polyphenols during Extraction. *Applied Sciences* 4 (2022) 2107. DOI: 10.3390/app12042107.
- Arts M, Grun C, Jong R de, Voss H-P, Bast A, Mueller M, Haenen G. Oxidative degradation of lipids during mashing. *J. Agric. Food Chem.* 17 (2007) 7010–7014. DOI: 10.1021/jf070505+.
- Assefa S, Yang E-Y, Asamenew G, Kim H-W, Cho M-C, Lee J. Identification of α -glucosidase inhibitors from leaf extract of pepper (capsicum spp.) through metabolomic analysis. *Metabolites* 10 (2021) 649. DOI: 10.3390/metabo11100649.
- Baker D, Timmons J, Greenhaff P. Glycogen Phosphorylase Inhibition in Type 2 Diabetes Therapy: A Systematic Evaluation of Metabolic and Functional Effects in Rat Skeletal Muscle. *Diabetes* 8 (2005) 2453–2459. DOI: 10.2337/diabetes.54.8.2453.
- Bamforth C. Beer: Tap into the Art and Science of Brewing. 1. New York, Oxford University Press 2009.
- Barapatre A, Aadil K, Tiwary B, Jha H. In vitro antioxidant and antidiabetic activities of biomodified lignin from *Acacia nilotica* wood. *International journal of biological macromolecules* (2015) 81–89. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.01.012.
- Bartolom B und Gmez-Cordovs C. Barley spent grain. *Journal of the science of food and agriculture* 3 (1999) 435–439. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<435::AID-JSFA272>3.0.CO;2-S.
- Bartolomé B, Santos M, Jiménez J, del Nozal M, Gómez-Cordovés C. Pentoses and hydroxycinnamic acids in brewer's spent grain. *Journal of Cereal Science* 1 (2002) 51–58. DOI: 10.1006/jcfs.2002.0442.
- Basarová G. The Comprehensive Guide to Brewing. From Raw Material to Packaging Nürnberg, Fachverlag Hans Carl 2020.
- Bassard J-E, Ullmann P, Bernier F, Werck-Reichhart D. Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry* 16 (2010) 1808–1824. DOI: 10.1016/j.phytochem.2010.08.003.
- Becker D, Bakuradze T, Hensel M, Beller S, Yélamos C, Richling E. Influence of brewer's spent grain compounds on glucose metabolism enzymes. *Nutrients* 8 (2021) 2696. DOI: 10.3390/nu13082696.
- Becker D, Permann S, Bakuradze T, Stegmüller S, Richling E. Isolation and Characterisation of Hordatine-Rich Fractions from Brewer's Spent Grain and Their Biological Activity on α -Glucosidase and Glycogen Phosphorylase α . *Sustainability* 14 (2022a) 8421. DOI: 10.3390/su14148421.
- Becker D, Stegmüller S, Richling E. Characterization of brewer's spent grain extracts by tandem mass spectrometry and HPLC-DAD : Ferulic acid dehydrodimers, phenolamides, and oxylipins. *Food Science & Nutrition* (2022b). DOI: 10.1002/fsn3.3178.

Bedő S, Rozbach M, Nagy L, Fehér A, Fehér C. Optimised Fractionation of Brewer's Spent Grain for a Biorefinery Producing Sugars, Oligosaccharides, and Bioethanol. *Processes* 2 (2021) 366. DOI: 10.3390/pr9020366.

Ben-Othman S, Jöudu I, Bhat R. Bioactives From Agri-Food Wastes: Present Insights and Future Challenges. *Molecules (Basel, Switzerland)* 3 (2020) 510. DOI: 10.3390/molecules25030510.

Bento-Silva A, Duarte N, Mecha E, Belo M, Vaz Patto M, Bronze M. Hydroxycinnamic acids and their derivatives in broa, a traditional ethnic maize bread. *Foods (Basel, Switzerland)* 10 (2020) 1471. DOI: 10.3390/foods9101471.

Berg J, Tymoczko J, Gatto G, Stryer L. *Stryer Biochemie*. 8. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg 2018.

Berger K, Ostberg-Potthoff J, Bakuradze T, Winterhalter P, Richling E. Carbohydrate Hydrolase-Inhibitory Activity of Juice-Based Phenolic Extracts in Correlation to Their Anthocyanin/Copigment Profile. *Molecules (Basel, Switzerland)* 22 (2020) 5224. DOI: 10.3390/molecules25225224.

Bhunja R, Showman L, Jose A, Nikolau B. Combined use of cutinase and high-resolution mass-spectrometry to query the molecular architecture of cutin. *Plant methods* (2018) 117. DOI: 10.1186/s13007-018-0384-6.

Bianco A, Budroni M, Zara S, Mannazzu I, Fancello F, Zara G. The role of microorganisms on biotransformation of brewers' spent grain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 20 (2020) 8661–8678. DOI: 10.1007/s00253-020-10843-1.

Birsan R, Wilde P, Waldron K, Rai D. Recovery of polyphenols from brewer's spent grains. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 9 (2019) 380. DOI: 10.3390/antiox8090380.

Bompard-Gilles C, Rousseau P, Rougé P, Payan F. Substrate mimicry in the active center of a mammalian α amylase: structural analysis of an enzyme–inhibitor complex. *Structure* 12 (1996) 1441–1452. DOI: 10.1016/s0969-2126(96)00151-7.

Bonifácio-Lopes T, Vilas Boas A, Coscueta E, Costa E, Silva S, Campos D, Teixeira J, Pintado M. Bioactive extracts from brewer's spent grain. *Food & function* 10 (2020) 8963–8977. DOI: 10.1039/d0fo01426e.

Bonin A von, Hühn J, Fleischer B. Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 on T cells: analysis of an alternative T-cell activation pathway. *Immunological reviews* (1998) 43–53. DOI: 10.1111/j.1600-065x.1998.tb01570.x.

Boubakri H, Jdey A, Taamalli A, Taamalli W, Jebara M, Brini F, Riciputi Y, Pasini F, Christian M, Verardo V. Phenolic composition as measured by liquid chromatography/mass spectrometry and biological properties of Tunisian barley. *International Journal of Food Properties* (2017) 1–15. DOI: 10.1080/10942912.2017.1359186.

Brahmachari G. *Discovery and Development of Anti-Breast Cancer Agents from Natural Products*. 1. Amsterdam, Elsevier 2021.

- Brás N, Santos-Martins D, Fernandes P, Ramos M. Mechanistic Pathway on Human α -Glucosidase Maltase-Glucoamylase Unveiled by QM/MM Calculations. *The journal of physical chemistry. B* 14 (2018) 3889–3899. DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b01321.
- Bräunlich M, Slimestad R, Wangensteen H, Brede C, Malterud K, Barsett H. Extracts, anthocyanins and procyanidins from *Aronia melanocarpa* as radical scavengers and enzyme inhibitors. *Nutrients* 3 (2013) 663–678. DOI: 10.3390/nu5030663.
- Bravi E, Francesco G de, Sileoni V, Perretti G, Galgano F, Marconi O. Brewing by-product upcycling potential: nutritionally valuable compounds and antioxidant activity evaluation. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2 (2021) 165. DOI: 10.3390/antiox10020165.
- Brayer G, Luo Y, Withers S. The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. *Protein science: a publication of the Protein Society* 9 (1995) 1730–1742. DOI: 10.1002/pro.5560040908.
- Brennan C und Cleary L. The potential use of cereal (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)- β -d-glucans as functional food ingredients. *Journal of Cereal Science* 1 (2005) 1–13. DOI: 10.1016/j.jcs.2005.01.002.
- Bull H und Breese K. Denaturation of proteins by fatty acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2 (1967) 309–315. DOI: 10.1016/0003-9861(67)90244-5.
- Bunzel M, Funk C, Steinhart H. Semipreparative isolation of dehydrodiferulic and dehydrotriferulic acids as standard substances from maize bran. *J. Sep. Science* 13 (2004) 1080–1086. DOI: 10.1002/jssc.200301703.
- Bunzel M und Jilek M. Dehydrotriferulic and Dehydrodiferulic Acid Profiles of Cereal and Pseudocereal Flours. *Cereal Chem* 5 (2013) 507–517. DOI: 10.1094/CCHEM-11-12-0144-R.
- Bunzel M, Ralph J, Funk C, Steinhart H. Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Letters* 35 (2005) 5845–5850. DOI: 10.1016/j.tetlet.2005.06.140.
- Cai X, Yu J, Xu L, Liu R, Yang J. The mechanism study in the interactions of sorghum procyanidins trimer with porcine pancreatic α -amylase. *Food chemistry* (2015) 291–298. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.10.131.
- Calder P und Geddes R. Acarbose is a competitive inhibitor of mammalian lysosomal acid α -d-glucosidases. *Carbohydrate Research* 1 (1989) 71–78. DOI: 10.1016/0008-6215(89)85047-5.
- Callipo L, Cavaliere C, Fuscoletti V, Gubbio R, Samperi R, Laganà A. Phenylpropanoate identification in young wheat plants by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 9 (2010) 1026–1040. DOI: 10.1002/jms.1800.
- Carvalho F, Duarte L, Lopes S, Parajó J, Pereira H, Gírio F. Supplementation requirements of brewery's spent grain hydrolysate for biomass and xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 8 (2006) 646–654. DOI: 10.1007/s10295-006-0101-8.
- Carvalho F, Duarte L, Lopes S, Parajó J, Pereira H, Gírio F. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Process Biochemistry* 3-4 (2005) 1215–1223. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.04.015.

- Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis* Vol 10 No 3 (2002) 178–182.
- Chassaing B, Compher C, Bonhomme B, Liu Q, Tian Y, Walters W, Nessel L, Delaroque C, Hao F, Gershuni V, Chau L, Ni J, Bewtra M, Albenberg L, Bretin A, McKeever L, Ley R, Patterson A, Wu G, Gewirtz A, Lewis J. Randomized Controlled-Feeding Study of Dietary Emulsifier Carboxymethylcellulose Reveals Detrimental Impacts on the Gut Microbiota and Metabolome. *Gastroenterology* 3 (2022) 743–756. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.11.006.
- Chaudhury A, Duvoor C, Reddy Dendi V, Kraleti S, Chada A, Ravilla R, Marco A, Shekhawat N, Montales M, Kuriakose K, Sasapu A, Beebe A, Patil N, Musham C, Lohani G, Mirza W. Clinical Review of Antidiabetic Drugs. *Frontiers in endocrinology* (2017) 6. DOI: 10.3389/fendo.2017.00006.
- Chen R-D, Huang C-F, Hsu S. Composites of waterborne polyurethane and cellulose nanofibers for 3D printing and bioapplications. *Carbohydrate polymers* (2019) 75–88. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.02.025.
- Chen Y, Liang N, Curtis J, Gänzle M. Characterization of Linoleate 10-Hydratase of *Lactobacillus plantarum* and Novel Antifungal Metabolites. *Frontiers in microbiology* (2016) 1561. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01561.
- Chiou S-Y, Sung J-M, Huang P-W, Lin S-D. Antioxidant, Antidiabetic, and Antihypertensive Properties of *Echinacea purpurea* Flower Extract and Caffeic Acid Derivatives Using In Vitro Models. *Journal of medicinal food* 2 (2017) 171–179. DOI: 10.1089/jmf.2016.3790.
- Cho S. Handbook of Dietary Fiber. New York, Marcel Dekker 2001.
- Clauss W und Clauss C. Humanbiologie kompakt. 2. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg 2018.
- Coelho E, Rocha M, Moreira A, Domingues M, Coimbra M. Revisiting the structural features of arabinoxylans from brewers' spent grain. *Carbohydrate polymers* (2016) 167–176. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.12.006.
- Coelho E, Rocha M, Saraiva J, Coimbra M. Microwave superheated water and dilute alkali extraction of brewers' spent grain arabinoxylans and arabinoxylo-oligosaccharides. *Carbohydrate polymers* (2014) 415–422. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.09.003.
- Cohen J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. 2. Hoboken, Taylor and Francis 2013.
- Connolly A, Piggott C, FitzGerald R. In vitro α -glucosidase, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory properties of brewers' spent grain protein hydrolysates. *Food Research International* (2014) 100–107. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.12.021.
- Cooray S und Chen W. Valorization of brewer's spent grain using fungi solid-state fermentation to enhance nutritional value. *Journal of Functional Foods* (2018) 85–94. DOI: 10.1016/j.jff.2017.12.027.

Coronado M, Montero G, Montes D, Valdez-Salas B, Ayala J, Gardía C, Carrillo M, León J, Moreno A. Physicochemical Characterization and SEM-EDX Analysis of Brewer's Spent Grain from the Craft Brewery Industry. *Sustainability* 18 (2020) 7744. DOI: 10.3390/su12187744.

Cunningham D und O'Connor B. Proline specific peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 2 (1997) 160–186. DOI: 10.1016/s0167-4838(97)00134-9.

Da Cunha F, Duma D, Assreuy J, Buzzi F, Niero R, Campos M, Calixto J. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties. *Free radical research* 11 (2004) 1241–1253. DOI: 10.1080/10715760400016139.

Dahab M, Hegazy M, Abbass H. Hordatines as a potential inhibitor of COVID-19 main protease and RNA polymerase: an in-silico approach. *Natural products and bioprospecting* 6 (2020) 453–462. DOI: 10.1007/s13659-020-00275-9.

DiNicolantonio J, Bhutani J, O'Keefe J. Acarbose: safe and effective for lowering postprandial hyperglycaemia and improving cardiovascular outcomes. *Open Heart* 1 (2015) e000327. DOI: 10.1136/openhrt-2015-000327.

Dobberstein D und Bunzel M. Separation and detection of cell wall-bound ferulic acid dehydrodimers and dehydrotrimers in cereals and other plant materials by reversed phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of agricultural and food chemistry* 16 (2010) 8927–8935. DOI: 10.1021/jf101514j.

Dong X, Gao Y, Chen W, Wang W, Gong L, Liu X, Luo J. Spatiotemporal distribution of phenolamides and the genetics of natural variation of hydroxycinnamoyl spermidine in rice. *Mol. Plant* 1 (2015) 111–121. DOI: 10.1016/j.molp.2014.11.003.

Donkor O, Stojanovska L, Ginn P, Ashton J, Vasiljevic T. Germinated grains--sources of bioactive compounds. *Food chemistry* 3 (2012) 950–959. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.05.058.

Doria E. Extraction and Evaluation of Nutraceutical Molecules in Wastes of Fruit and Vegetables. *IJFNS* 2 (2017) 74–80. DOI: 10.15436/2377-0619.17.1539.

dos Santos D, Bukzem A, Ascheri D, Signini R, Aquino G de. Microwave-assisted carboxymethylation of cellulose extracted from brewer's spent grain. *Carbohydrate polymers* (2015) 125–133. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.05.051.

Dvořáková M, Guido L, Dostálek P, Skulilová Z, Moreira M, Barros A. Antioxidant Properties of Free, Soluble Ester and Insoluble-Bound Phenolic Compounds in Different Barley Varieties and Corresponding Malts. *J. Inst. Brew.* 1 (2008) 27–33. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2008.tb00302.x.

Eastwood M, Kirkpatrick J, Mitchell W, Bone A, Hamilton T. Effects of dietary supplements of wheat bran and cellulose on faeces and bowel function. *British medical journal* 5889 (1973) 392–394. DOI: 10.1136/bmj.4.5889.392.

EFSA. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to barley beta-glucans and lowering of blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to

Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 12 (2011a) 2470. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2470.

EFSA. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to arabinoxylan produced from wheat endosperm and reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 830) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 6 (2011b) 2205. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2205.

Eid M, Gollwitzer M, Schmitt M. Statistik und Forschungsmethoden. Lehrbuch. Mit Online-Material5. Weinheim, Beltz 2017.

Ekici O, Paetzel M, Dalbey R. Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration. *Protein science : a publication of the Protein Society* 12 (2008) 2023–2037. DOI: 10.1110/ps.035436.108.

Ekstrom J, Pauly T, Carty M, Soeller W, Culp J, Danley D, Hoover D, Treadway J, Gibbs E, Fletterick R, Day Y, Myszk D, Rath V. Human liver glycogen phosphorylase a complexed with caffeine, N-Acetyl-beta-D-glucopyranosylamine, and CP-403700. *Chemistry & Biology* 915-924 (2002a). DOI: 10.2210/pdb1l5q/pdb.

Ekstrom J, Pauly T, Carty M, Soeller W, Culp J, Danley D, Hoover D, Treadway J, Gibbs E, Fletterick R, Day Y, Myszk D, Rath V. Structure-Activity Analysis of the Purine Binding Site of Human Liver Glycogen Phosphorylase. *Chemistry & Biology* 8 (2002b) 915–924. DOI: 10.1016/s1074-5521(02)00186-2.

Ernst H, Lo Leggio L, Willemoës M, Leonard G, Blum P, Larsen S. Structure of the *Sulfolobus solfataricus* alpha-glucosidase: implications for domain conservation and substrate recognition in GH31. *Journal of molecular biology* 4 (2006) 1106–1124. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.02.056.

Esterbauer H und Schauenstein E. Isomere Trihydroxyoctadecensäuren in Bier: Beweise für ihr Vorkommen und ihre quantitative Bestimmung. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* (1977) 255–259.

Eun C-S, Hwang E-Y, Lee S-O, Yang S-A, Yu M-H. Anti-oxidant and Anti-inflammatory Activities of Barley Sprout Extract. *Journal of Life Science* 5 (2016) 537–544. DOI: 10.5352/JLS.2016.26.5.537.

European Commission. Joint Research Centre. Robouch, P., Stroka, J., Haedrich, J. Guidance document on the estimation of LOD and LOQ for measurements in the field of contaminants in feed and food (2016). DOI: 10.2787/8931.

Faulds C, Robertson J, Waldron K. Effect of pH on the solubilization of brewers' spent grain by microbial carbohydrases and proteases. *Journal of agricultural and food chemistry* 16 (2008) 7038–7043. DOI: 10.1021/jf800433c.

Faulds C, Sancho A, Bartolomé B. Mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 4 (2002) 489–494. DOI: 10.1007/s00253-002-1140-3.

Fernández de Córdoba M und Medina A. Analytical Methods for Determination of Polyphenols in Beer (2014) 289–299. DOI: 10.1016/B978-0-12-404738-9.00029-5.

- Ferrazzano G, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2 (2011) 1486–1507. DOI: 10.3390/molecules16021486.
- Fischer M und Glomb M. *Moderne Lebensmittelchemie*. 1. Hamburg, Behr 2015.
- Flatt P. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) and related molecules in type 2 diabetes. *Front Biosci* 13 (2008) 3648. DOI: 10.2741/2956.
- Franco R, Valenzuela A, Lluís C, Blanco J. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunological reviews* (1998) 27–42. DOI: 10.1111/j.1600-065x.1998.tb01569.x.
- Fuchs C, Bakuradze T, Steinke R, Grewal R, Eckert G, Richling E. Polyphenolic composition of extracts from winery by-products and effects on cellular cytotoxicity and mitochondrial functions in HepG2 cells. *Journal of Functional Foods* (2020) 103988. DOI: 10.1016/j.jff.2020.103988.
- Gao J, Wang C, Zhang A, Liu J. A new trihydroxy fatty acid from the ascomycete, Chinese truffle *Tuber indicum*. *Lipids* 12 (2001) 1365–1370. DOI: 10.1007/s11745-001-0853-y.
- Garbe L-A, Hübke H, Tressl R. Enantioselective formation pathway of a trihydroxy fatty acid during mashing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 4 (2005) 157–162. DOI: 10.1094/ASBCJ-63-0157.
- Garcia-Conesa M, Plumb G, Kroon P, Wallace G, Williamson G. Antioxidant properties of ferulic acid dimers. *Redox Report* 4 (1997) 239–244. DOI: 10.1080/13510002.1997.11747116.
- Gómez C, Navarro A, Manzanares P, Horta A, Carbonell J. Physical and structural properties of barley (1 → 3),(1 → 4)-β-d-glucan. Part II. Viscosity, chain stiffness and macromolecular dimensions. *Carbohydrate polymers* 1 (1997) 17–22. DOI: 10.1016/S0144-8617(96)00127-0.
- Gorzolka K, Bednarz H, Niehaus K. Detection and localization of novel hordatine-like compounds and glycosylated derivatives of hordatines by imaging mass spectrometry of barley seeds. *Planta* 6 (2014) 1321–1335. DOI: 10.1007/s00425-014-2061-y.
- Gorzolka K, Kölling J, Nattkemper T, Niehaus K. Spatio-temporal metabolite profiling of the barley germination process by MALDI MS imaging. *PLoS one* 3 (2016) e0150208. DOI: 10.1371/journal.pone.0150208.
- Grienenberger E, Besseau S, Geoffroy P, Debayle D, Heintz D, Lapierre C, Pollet B, Heitz T, Legrand M. A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of Arabidopsis anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2 (2009) 246–259. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03773.x.
- Grzesik M, Naparło K, Bartosz G, Sadowska-Bartosz I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. *Food chemistry* (2018) 480–492. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.08.117.
- Gülçin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Neuroendocrinol. Lett.* 2-3 (2006) 213–220. DOI: 10.1016/j.tox.2005.09.011.

Haas J, Eastwood B, Iversen P, Devanarayan V, Weidner J. Assay Guidance Manual. Minimum Significant Ratio – A Statistic to Assess Assay Variability¹. Bethesda (MD), Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences **2004**.

Hamberg M. Trihydroxyoctadecenoic acids in beer: qualitative and quantitative analysis. *J. Agric. Food Chem.* 9 (**1991**) 1568–1572. DOI: 10.1021/jf00009a006.

Harmjanz F. Biochemie - Energiestoffwechsel. 1. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg **2021**.

Hayes J, Kantsadi A, Leonidas D. Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes. *Phytochem. Rev.* 2 (**2014**) 471–498. DOI: 10.1007/s11101-014-9360-6.

Hernanz D, Nuñez V, Sancho A, Faulds C, Williamson G, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C. Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley. *J. Agric. Food Chem.* 10 (**2001**) 4884–4888. DOI: 10.1021/jf010530u.

Höjje A, Gröndahl M, Tømmeraas K, Gatenholm P. Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks. *Carbohydrate polymers* 3 (**2005**) 266–275. DOI: 10.1016/j.carbpol.2005.02.009.

Holst J und Deacon C. Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as a treatment for type 2 diabetes. *Diabetes* 11 (**1998**) 1663–1670. DOI: 10.2337/diabetes.47.11.1663.

Huang D-W, Kuo Y-H, Lin F-Y, Lin Y-L, Chiang W. Effect of Adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) Testa and its phenolic components on Cu²⁺-treated low-density lipoprotein (LDL) oxidation and lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in RAW 264.7 macrophages. *Interdisc. Toxicol.* 6 (**2009**) 2259–2266. DOI: 10.1021/jf803255p.

Hunter R, Hughey C, Lantier L, Sundelin E, Peggie M, Zeqiraj E, Sicheri F, Jessen N, Wasserman D, Sakamoto K. Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1-6-bisphosphatase. *Nature medicine* 9 (**2018**) 1395–1406. DOI: 10.1038/s41591-018-0159-7.

Hussein A und El-Ansary A. Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants (**2019**) 23–39. DOI: 10.5772/intechopen.76139.

Ideia P, Sousa-Ferreira I, Castilho P. A novel and simpler alkaline hydrolysis methodology for extraction of ferulic acid from brewer's spent grain and its (partial) purification through adsorption in a synthetic resin. *Foods (Basel, Switzerland)* 5 (**2020**) 600. DOI: 10.3390/foods9050600.

Ikram S, Zhang H, Ming H, Wang J. Recovery of major phenolic acids and antioxidant activity of highland barley brewer's spent grains extracts. *J Food Process Preserv* 1 (**2020**) e14308. DOI: 10.1111/jfpp.14308.

Irakli M, Samanidou V, Biliaderis C, Papadoyannis I. Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction. *Food chemistry* 3 (**2012**) 1624–1632. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.03.046.

Iversen P, Beck B, Chen Y-F, Dere W, Devanarayan V, Eastwood B, Farmen M, Iturria S, Montrose C, Moore R, Weidner J, Sittampalam G. Assay Guidance Manual. 1. Bethesda,

Marryland, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences **2021**.

Jakobs S, Fridrich D, Hofem S, Pahlke G, Eisenbrand G. Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. *Molecular nutrition & food research* 1 (**2006**) 52–57. DOI: 10.1002/mnfr.200500163.

Jay A, Parker M, Faulks R, Husband F, Wilde P, Smith A, Faulds C, Waldron K. A systematic micro-dissection of brewers' spent grain. *Journal of Cereal Science* 2 (**2008**) 357–364. DOI: 10.1016/j.jcs.2007.05.006.

Jeong E-Y, Cho K-S, Lee H-S. α -amylase and α -glucosidase inhibitors isolated from *Triticum aestivum* L. sprouts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 1 (**2012**) 47–51. DOI: 10.1007/s13765-012-0008-1.

Jiang S. Glucosidase. *RCSB PDB* (**2019**). DOI: 10.2210/rcsb_pdb/GH/DM/drugs/gi/glucosidase.

Johnson L. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6 (**1992**) 2274–2282. DOI: 10.1096/fasebj.6.6.1544539.

Kamiyama O, Sanae F, Ikeda K, Higashi Y, Minami Y, Asano N, Adachi I, Kato A. In vitro inhibition of α -glucosidases and glycogen phosphorylase by catechin gallates in green tea. *Food chemistry* 4 (**2010**) 1061–1066. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.03.075.

Kanauchi O und Agata K. Protein, and dietary fiber-rich new foodstuff from brewer's spent grain increased excretion of feces and jejunum mucosal protein content in rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 1 (**1997**) 29–33. DOI: 10.1271/bbb.61.29.

Kantsadi A, Parmenopoulou V, Bakalov D, Snelgrove L, Stravodimos G, Chatzileontiadou D, Manta S, Panagiotopoulou A, Hayes J, Komiotis D, Leonidas D. Glycogen phosphorylase as a target for type 2 diabetes: synthetic, biochemical, structural and computational evaluation of novel N-acyl-N'-(β -D-glucopyranosyl) urea inhibitors. *Current topics in medicinal chemistry* 23 (**2015**) 2373–2389. DOI: 10.2174/1568026615666150619142253.

Kempegowda P, Zameer F, Kumar Murari S. Delineating antidiabetic proficiency of catechin from *Withania somnifera* and its Inhibitory action on dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4). *biomedicalresearch* 16 (**2018**) 922. DOI: 10.4066/biomedicalresearch.29-18-922.

Khakimov B, Jespersen B, Engelsen S. Comprehensive and Comparative Metabolomic Profiling of Wheat, Barley, Oat and Rye Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Advanced Chemometrics. *Foods (Basel, Switzerland)* 4 (**2014**) 569–585. DOI: 10.3390/foods3040569.

Kim T, Choi H, Eom S-H, Lee J, Kim T. Potential α -glucosidase inhibitors from thermal transformation of (+)-catechin. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 6 (**2014**) 1621–1624. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.01.027.

Kirjoranta S, Tenkanen M, Jouppila K. Effects of process parameters on the properties of barley containing snacks enriched with brewer's spent grain. *Journal of Food Science and Technology* 1 (**2016**) 775–783. DOI: 10.1007/s13197-015-2079-6.

- Kohyama N und Ono H. Hordatine A β -D-glucopyranoside from ungerminated barley grains. *Journal of agricultural and food chemistry* 5 (2013) 1112–1116. DOI: 10.1021/jf304453c.
- Koistinen V, Tuomainen M, Lehtinen P, Peltola P, Auriola S, Jonsson K, Hanhineva K. Side-stream products of malting: a neglected source of phytochemicals. *npj Sci Food* 1 (2020) 21. DOI: 10.1038/s41538-020-00081-0.
- Ktenioudaki A, Chaurin V, Reis S, Gallagher E. Brewers spent grain as a functional ingredient for breadsticks. *International Journal of Food Science & Technology* 8 (2012) 1765–1771. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03032.x.
- Lambeir A-M, Scharpé S, Meester I de. DPP4 inhibitors for diabetes--what next? *Biochemical pharmacology* 12 (2008) 1637–1643. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.07.029.
- Larsen E, Andreasen M, Christensen L. Regioselective dimerization of ferulic acid in a micellar solution. *J. Agric. Food Chem.* 7 (2001) 3471–3475. DOI: 10.1021/jf0014617.
- Lee Y-T, Hsieh Y-L, Yeh Y-H, Huang C-Y. Synthesis of phenolic amides and evaluation of their antioxidant and anti-inflammatory activity in vitro and in vivo. *RSC Adv.* 104 (2015) 85806–85815. DOI: 10.1039/C5RA14137K.
- Leitao C, Marchioni E, Bergaentzlé M, Zhao M, Didierjean L, Miesch L, Holder E, Miesch M, Ennahar S. Fate of polyphenols and antioxidant activity of barley throughout malting and brewing. *Journal of Cereal Science* 3 (2012) 318–322. DOI: 10.1016/j.jcs.2012.01.002.
- Li Z, Zhao C, Zhao X, Xia Y, Sun X, Xie W, Ye Y, Lu X, Xu G. Deep Annotation of Hydroxycinnamic Acid Amides in Plants Based on Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry and Its In Silico Database. *Analytical chemistry* 24 (2018) 14321–14330. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b03654.
- Liguori R, Soccol C, Porto de Souza Vandenberghe L, Woiciechowski A, Faraco V. Second Generation Ethanol Production from Brewers' Spent Grain. *Energies* 4 (2015) 2575–2586. DOI: 10.3390/en8042575.
- Liu L, Kerr W, Kong F, Dee D, Lin M. Influence of nano-fibrillated cellulose (NFC) on starch digestion and glucose absorption. *Carbohydrate polymers* (2018) 146–153. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.04.116.
- Liu M, Hu B, Zhang H, Zhang Y, Wang L, Qian H, Qi X. Inhibition study of red rice polyphenols on pancreatic α -amylase activity by kinetic analysis and molecular docking. *Journal of Cereal Science* (2017) 186–192. DOI: 10.1016/J.JCS.2017.04.011.
- Liu M, Yin H, Liu G, Dong J, Qian Z, Miao J. Xanthohumol, a prenylated chalcone from beer hops, acts as an α -glucosidase inhibitor in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry* 24 (2014) 5548–5554. DOI: 10.1021/jf500426z.
- Liu X, Luo J, Kong L. Phenylethyl cinnamides as potential alpha-glucosidase inhibitors from the roots of *Solanum melongena*. *Natural product communications* 6 (2011) 851–853. DOI: 10.1177/1934578X1100600623.

- Liu Z-H und Li B. Procyanidin B1 and p-Coumaric Acid from Highland Barley Grain Showed Synergistic Effect on Modulating Glucose Metabolism via IRS-1/PI3K/Akt Pathway. *Molecular nutrition & food research* 18 (2021) e2100454. DOI: 10.1002/mnfr.202100454.
- Llorach R, Espín J, Tomás-Barberán F, Ferreres F. Artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts as a potential source of health-promoting antioxidant phenolics. *J. Agric. Food Chem.* 12 (2002) 3458–3464. DOI: 10.1021/jf0200570.
- Loow Y-L, Wu T, Md. Jahim J, Mohammad A, Teoh W. Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. *Cellulose* 3 (2016) 1491–1520. DOI: 10.1007/s10570-016-0936-8.
- Lynch K, Steffen E, Arendt E. Brewers' spent grain: a review with an emphasis on food and health. *J. Inst. Brew.* 4 (2016) 553–568. DOI: 10.1002/jib.363.
- Lynch K, Strain C, Johnson C, Patangia D, Stanton C, Koc F, Gil-Martinez J, O'Riordan P, Sahin A, Ross R, Arendt E. Extraction and characterisation of arabinoxylan from brewers spent grain and investigation of microbiome modulation potential. *European journal of nutrition* 8 (2021) 4393–4411. DOI: 10.1007/s00394-021-02570-8.
- Magliano D und Boyko E. IDF diabetes atlas. 10. Brussels, International Diabetes Federation 2021.
- Malunga L, Izydorczyk M, Beta T. Effect of water-extractable arabinoxylans from wheat aleurone and bran on lipid peroxidation and factors influencing their antioxidant capacity. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* (2017) 20–26. DOI: 10.1016/j.bcdf.2017.05.001.
- Mandalari G, Faulds C, Sancho A, Saija A, Bisignano G, LoCurto R, Waldron K. Fractionation and characterisation of arabinoxylans from brewers' spent grain and wheat bran. *Journal of Cereal Science* 2 (2005) 205–212. DOI: 10.1016/j.jcs.2005.03.001.
- Mani J, Johnson J, Hosking H, Hoyos B, Walsh K, Neilsen P, Naiker M. Bioassay Guided Fractionation Protocol for Determining Novel Active Compounds in Selected Australian Flora. *Plants (Basel, Switzerland)* 21 (2022) 2886. DOI: 10.3390/plants11212886.
- Martin-Arjol I, Bassas-Galia M, Bermudo E, Garcia F, Manresa A. Identification of oxylipins with antifungal activity by LC-MS/MS from the supernatant of *Pseudomonas* 42A2. *Chemistry and Physics of Lipids* 4-5 (2010) 341–346. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2010.02.003.
- Martínez-Encinas E, Carvajal-Millán E, La Calderón de Barca A, Rascón-Chu A, Martínez-Porchas M, Márquez-Escalante J, Islas-Rubio A. Extraction and characterization of arabinoxylans obtained from nixtamalized brewers' spent grains. *Food science and technology international = Ciencia y tecnología de los alimentos internacional* (2021) 1-10. DOI: 10.1177/10820132211060609.
- Martín-García B, Pasini F, Verardo V, Díaz-de-Cerio E, Tylewicz U, Gómez-Caravaca A, Caboni M. Optimization of sonotrode ultrasonic-assisted extraction of proanthocyanidins from brewers' spent grains. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 8 (2019) 282. DOI: 10.3390/antiox8080282.

Mathieu C, Dupret J-M, Rodrigues Lima F. The structure of brain glycogen phosphorylase—from allosteric regulation mechanisms to clinical perspectives. *The FEBS journal* 4 (2017) 546–554. DOI: 10.1111/febs.13937.

Meneses N, Martins S, Teixeira J, Mussatto S. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology* (2013) 152–158. DOI: 10.1016/j.seppur.2013.02.015.

Merten D, Erman L, Marabelli G, Leners B, Ney Y, Nasim M, Jacob C, Tchoumtchoua J, Cajot S, Bohn T. Potential health effects of brewers' spent grain as a functional food ingredient assessed by markers of oxidative stress and inflammation following gastro-intestinal digestion and in a cell model of the small intestine. *Food & function* 9 (2022) 5327–5342. DOI: 10.1039/D1FO03090F.

Michalkiewicz A, Biesaga M, Pyrzynska K. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of chromatography. A* 1-2 (2008) 18–24. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.02.001.

Mir S, Ravuri H, Pradhan R, Narra S, Kumar J, Kuncha M, Kanjilal S, Sistla R. Ferulic acid protects lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by suppressing inflammatory events and upregulating antioxidant defenses in Balb/c mice. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* (2018) 304–315. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.01.169.

Mishra P, Gregor T, Wimmer R. Utilising Brewer's Spent Grain as a Source of Cellulose Nanofibres Following Separation of Protein-based Biomass. *BioResources* 1 (2016) 107–116. DOI: 10.15376/biores.12.1.107-116.

Moradi-Afrapoli F, Asghari B, Saeidnia S, Ajani Y, Mirjani M, Malmir M, Dolatabadi Bazaz R, Hadjiakhoondi A, Salehi P, Hamburger M, Yassa N. In vitro α -glucosidase inhibitory activity of phenolic constituents from aerial parts of *Polygonum hyrcanicum*. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences* 1 (2012) 37. DOI: 10.1186/2008-2231-20-37.

Moreira M, Morais S, Barros A, Delerue-Matos C, Guido L. A novel application of microwave-assisted extraction of polyphenols from brewer's spent grain with HPLC-DAD-MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 4 (2012) 1019–1029. DOI: 10.1007/s00216-011-5703-y.

Moreira M, Morais S, Carvalho D, Barros A, Delerue-Matos C, Guido L. Brewer's spent grain from different types of malt: evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds. *Food Research International* 1 (2013a) 382–388. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.07.023.

Moreira M, Morais S, Carvalho D, Barros A, Delerue-Matos C, Guido L. Brewer's spent grain from different types of malt: Evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds. *Food Research International* 1 (2013b) 382–388. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.07.023.

Moure A, Cruz J, Franco D, Domínguez J, Sineiro J, Domínguez H, José Núñez M, Parajó J. Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry* 2 (2001) 145–171. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00223-5.

- Muegge I und Rarey M. Small Molecule Docking and Scoring (2001) 1–60. DOI: 10.1002/0471224413.ch1.
- Müller-Esterl W. Biochemie. 1. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg 2018.
- Mussatto S. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the science of food and agriculture* 7 (2014) 1264–1275. DOI: 10.1002/jsfa.6486.
- Mussatto S, Dragone G, Roberto I. Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products* 2 (2007a) 231–237. DOI: 10.1016/j.indcrop.2006.11.001.
- Mussatto S, Fernandes M, Dragone G, Mancilha I, Roberto I. Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnology Letters* 12 (2007b) 1973–1976. DOI: 10.1007/s10529-007-9494-3.
- Mussatto S, Fernandes M, Roberto I. Lignin recovery from brewer's spent grain black liquor. *Carbohydrate polymers* 2 (2007c) 218–223. DOI: 10.1016/j.carbpol.2007.03.021.
- Mussatto S und Roberto I. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 3 (2006) 268–274. DOI: 10.1002/jctb.1374.
- Nadeem M, Mumtaz M, Danish M, Rashid U, Mukhtar H, Irfan A, Anwar F, Saari N. UHPLC-QTOF-MS/MS metabolites profiling and antioxidant/antidiabetic attributes of *Cuscuta reflexa* grown on *Casearia tomentosa* : exploring phytochemicals role via molecular docking. *International Journal of Food Properties* 1 (2020) 918–940. DOI: 10.1080/10942912.2020.1764578.
- Nagy L, Béke F, Juhász L, Kovács T, Juhász-Tóth É, Docsa T, Tóth A, Gergely P, Somsák L, Bai P. Glycogen phosphorylase inhibitor, 2,3-bis(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enamido butanedioic acid (BF142), improves baseline insulin secretion of MIN6 insulinoma cells. *PLoS one* 9 (2020) e0236081. DOI: 10.1371/journal.pone.0236081.
- Nagy L, Docsa T, Szántó M, Brunyánszki A, Hegedűs C, Márton J, Kónya B, Virág L, Somsák L, Gergely P, Bai P. Glycogen phosphorylase inhibitor N-(3,5-dimethyl-Benzoyl)-N'-(β-D-glucopyranosyl)urea improves glucose tolerance under normoglycemic and diabetic conditions and rearranges hepatic metabolism. *PLoS one* 7 (2013) e69420. DOI: 10.1371/journal.pone.0069420.
- Nahoum V und Payan F. STRUCTURE OF HUMAN PANCREATIC ALPHA-AMYLASE IN COMPLEX WITH THE CARBOHYDRATE INHIBITOR ACARBOSE. *Biochem J* 1 (2000) 201–208. DOI: 10.2210/pdb1b2y/pdb.
- Naibaho J und Korzeniowska M. The variability of physico-chemical properties of brewery spent grain from 8 different breweries. *Heliyon* 3 (2021) e06583. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e06583.
- Narasimhan A, Chinnaiyan M, Karundevi B. Ferulic acid exerts its antidiabetic effect by modulating insulin-signalling molecules in the liver of high-fat diet and fructose-induced type-2 diabetic adult male rat. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 8 (2015a) 769–781. DOI: 10.1139/apnm-2015-0002.

- Narasimhan A, Chinnaiyan M, Karundevi B. Ferulic acid regulates hepatic GLUT2 gene expression in high fat and fructose-induced type-2 diabetic adult male rat. *European journal of pharmacology* (2015b) 391–397. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.04.043.
- Niemi P, Aura A-M, Maukonen J, Smeds A, Mattila I, Niemelä K, Tamminen T, Faulds C, Buchert J, Poutanen K. Interactions of a lignin-rich fraction from brewer's spent grain with gut microbiota in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry* 27 (2013) 6754–6762. DOI: 10.1021/jf401738x.
- Niemi P, Tamminen T, Smeds A, Viljanen K, Ohra-aho T, Holopainen-Mantila U, Faulds C, Poutanen K, Buchert J. Characterization of lipids and lignans in brewer's spent grain and its enzymatically extracted fraction. *Journal of agricultural and food chemistry* 39 (2012) 9910–9917. DOI: 10.1021/jf302684x.
- Nocente F, Taddei F, Galassi E, Gazza L. Upcycling of brewers' spent grain by production of dry pasta with higher nutritional potential. *LWT - Food Science and Technology* (2019) 108421. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108421.
- Nomura T, Sue M, Horikoshi R, Tebayashi S, Ishihara A, Endo T, Iwamura H. Occurrence of hordatines, the barley antifungal compounds, in a wheat-barley chromosome addition line. *Genes & genetic systems* 3 (1999) 99–103. DOI: 10.1266/ggs.74.99.
- Offermanns S und Rosenthal W. *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. 2. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg 2008.
- Ohra-aho T, Niemi P, Aura A-M, Orlandi M, Poutanen K, Buchert J, Tamminen T. Structure of Brewer's Spent Grain Lignin and Its Interactions with Gut Microbiota in Vitro. *J. Agric. Food Chem.* 4 (2016) 812–820. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b05535.
- Ostberg-Potthoff J, Berger K, Richling E, Winterhalter P. Activity-Guided Fractionation of Red Fruit Extracts for the Identification of Compounds Influencing Glucose Metabolism. *Nutrients* 5 (2019) 1166. DOI: 10.3390/nu11051166.
- Palma M, Piñeiro Z, Barroso C. Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. *Journal of Chromatography A* 2 (2001) 169–174. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)00882-2.
- Parchami M, Ferreira J, Taherzadeh M. Starch and protein recovery from brewer's spent grain using hydrothermal pretreatment and their conversion to edible filamentous fungi - A brewery biorefinery concept. *Bioresource technology* (2021) 125409. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125409.
- Paul S, Hou C, Kang S. alpha-Glucosidase inhibitory activities of 10-hydroxy-8(E)-octadecenoic acid: an intermediate of bioconversion of oleic acid to 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid. *New biotechnology* 4 (2010) 419–423. DOI: 10.1016/j.nbt.2010.04.002.
- Pękal A und Pyszynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods* 9 (2014) 1776–1782. DOI: 10.1007/s12161-014-9814-x.

- Péroval C, Debeaufort F, Despré D, Voilley A. Edible arabinoxylan-based films. 1. Effects of lipid type on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. *J. Agric. Food Chem.* 14 (2002) 3977–3983. DOI: 10.1021/jf0116449.
- Pihlava J-M. Identification of hordatines and other phenolamides in barley (*Hordeum vulgare*) and beer by UPLC-QTOF-MS. *J. Cereal Sci.* 3 (2014) 645–652. DOI: 10.1016/j.jcs.2014.07.002.
- Pihlava J-M, Kurtelius T, Hurme T. Total hordatine content in different types of beers. *J. Inst. Brew.* 2 (2016) 212–217. DOI: 10.1002/jib.311.
- Pratap Singh A, Mandal R, Shojaei M, Singh A, Kowalczewski P, Ligaj M, Pawlicz J, Jarzębski M. Novel Drying Methods for Sustainable Upcycling of Brewers' Spent Grains as a Plant Protein Source. *Sustainability* 9 (2020) 3660. DOI: 10.3390/su12093660.
- Preedy V, Watson R, Patel V. Flour and breads and their fortification in health and disease prevention. 1. Amsterdam Boston, Elsevier/Academic Press 2011.
- Qian M, Haser R, Buisson G, Duée E, Payan F. The active center of a mammalian alpha-amylase. Structure of the complex of a pancreatic alpha-amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-Å resolution. *Biochemistry* 20 (1994) 6284–6294. DOI: 10.1021/bi00186a031.
- Ralph J, Quideau S, Grabber J, Hatfield R. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 23 (1994) 3485. DOI: 10.1039/p19940003485.
- Ramakrishna R, Sarkar D, Schwarz P, Shetty K. Phenolic linked anti-hyperglycemic bioactives of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars as nutraceuticals targeting type 2 diabetes. *Industrial Crops and Products* (2017) 509–517. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.03.033.
- Rath V, Ammirati M, Danley D, Ekstrom J, Gibbs E, Hynes T, Mathiowetz A, McPherson R, Olson T, Treadway J, Hoover D. Human liver glycogen phosphorylase inhibitors bind at a new allosteric site. *Chemistry & Biology* 9 (2000a) 677–682. DOI: 10.1016/S1074-5521(00)00004-1.
- Rath V, Ammirati M, LeMotte P, Fennell K, Mansour M, Danley D, Hynes T, Schulte G, Wasilko D, Pandit J. Activation of Human Liver Glycogen Phosphorylase by Alteration of the Secondary Structure and Packing of the Catalytic Core. *Molecular Cell* 1 (2000b) 139–148. DOI: 10.1016/S1097-2765(05)00006-7.
- Rehner G und Daniel H. Biochemie der Ernährung. 3. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag 2010.
- Reis S und Abu-Ghannam N. Antioxidant capacity, arabinoxylans content and in? *LWT - Food Science and Technology* 1 (2014) 269–277. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.09.004.
- Reis S, Coelho E, Coimbra M, Abu-Ghannam N. Improved efficiency of brewer's spent grain arabinoxylans by ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics sonochemistry* (2015) 155–164. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2014.10.010.
- Ren L, Qin X, Cao X, Wang L, Bai F, Bai G, Shen Y. Structural insight into substrate specificity of human intestinal maltase-glucoamylase. *Protein & cell* 10 (2011) 827–836. DOI: 10.1007/s13238-011-1105-3.

- RKI. Prävalenz, Inzidenz und Mortalität von Diabetes mellitus bei Erwachsenen in Deutschland. *Journal of Health Monitoring* 3 (2017). DOI: 10.17886/RKI-GBE-2017-050.
- Robert Koch-Institut. 12-Monats-Prävalenz des bekannten Diabetes mellitus in Deutschland. *Journal of Health Monitoring* 1 (2017). DOI: 10.17886/RKI-GBE-2017-008.
- Roberts V, Fendt S, Lemonidou A, Li X, Lercher J. Influence of alkali carbonates on benzyl phenyl ether cleavage pathways in superheated water. *Applied Catalysis B: Environmental* 1-2 (2010) 71–77. DOI: 10.1016/j.apcatb.2009.12.010.
- Robertson J, l'Anson K, Treimo J, Faulds C, Brocklehurst T, Eijsink V, Waldron K. Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT - Food Science and Technology* 6 (2010) 890–896. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.01.019.
- Röpenack E von, Parr A, Schulze-Lefert P. Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *The Journal of biological chemistry* 15 (1998) 9013–9022. DOI: 10.1074/jbc.273.15.9013.
- Sabater C, Ruiz L, Delgado S, Ruas-Madiedo P, Margolles A. Valorization of Vegetable Food Waste and By-Products Through Fermentation Processes. *Frontiers in microbiology* (2020) 581997. DOI: 10.3389/fmicb.2020.581997.
- Sahin A, Hardiman K, Atzler J, Vogelsang-O'Dwyer M, Valdeperez D, Münch S, Cattaneo G, O'Riordan P, Arendt E. Rejuvenated brewer's spent grain: the impact of two BSG-derived ingredients on techno-functional and nutritional characteristics of fibre-enriched pasta. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* (2021) 102633. DOI: 10.1016/j.ifset.2021.102633.
- Schultz J. Carboxymethylcellulose as a colloid laxative. *The American journal of digestive diseases* 9 (1949) 319–322. DOI: 10.1007/BF03002733.
- Shen Y, Song X, Li L, Sun J, Jaiswal Y, Huang J, Liu C, Yang W, Williams L, Zhang H, Guan Y. Protective effects of p-coumaric acid against oxidant and hyperlipidemia-an in vitro and in vivo evaluation. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* (2019) 579–587. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.12.074.
- Shen Y, Zhang H, Cheng L, Wang L, Qian H, Qi X. In vitro and in vivo antioxidant activity of polyphenols extracted from black highland barley. *Food chemistry* (2016) 1003–1012. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.08.083.
- Shindo S und Tachibana T. Production of L-Lactic Acid from Spent Grain, a By-Product of Beer Production. *J. Inst. Brew.* 4 (2004) 347–351. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2004.tb00631.x.
- Singh P, Jha S, Irchhaiya R. Antidiabetic and antioxidant activity of hydroxycinnamic acids from *Calamintha Officinalis* Moench. *Med Chem Res* 8 (2012) 1717–1721. DOI: 10.1007/s00044-011-9690-5.
- Sinosaki N, Tonin A, Ribeiro M, Poliseli C, Roberto S, da Silveira R, Visentainer J, Santos O, Meurer E. Structural Study of Phenolic Acids by Triple Quadrupole Mass Spectrometry with Electrospray Ionization in Negative Mode and H/D Isotopic Exchange. *J. Braz. Chem. Soc.* (2020). DOI: 10.21577/0103-5053.20190197.

- Slavin J und Marlett J. Influence of refined cellulose on human bowel function and calcium and magnesium balance. *The American journal of clinical nutrition* 9 (1980) 1932–1939. DOI: 10.1093/ajcn/33.9.1932.
- Spinelli S, Conte A, Lecce L, Padalino L, Del Nobile M. Supercritical carbon dioxide extraction of brewer's spent grain. *The Journal of Supercritical Fluids* (2016) 69–74. DOI: 10.1016/j.supflu.2015.08.017.
- Spreng S und Hofmann T. Activity-guided identification of in vitro antioxidants in beer. *Journal of agricultural and food chemistry* 3 (2018) 720–731. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b05674.
- Stefanello F, Dos Santos C, Bochi V, Fruet A, Soquetta M, Dörr A, Nörnberg J. Analysis of polyphenols in brewer's spent grain and its comparison with corn silage and cereal brans commonly used for animal nutrition. *Food chemistry* 239 (2018) 385–401. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.06.130.
- Steimer S, Kourtchev I, Kalberer M. Mass Spectrometry Characterization of Peroxycarboxylic Acids as Proxies for Reactive Oxygen Species and Highly Oxygenated Molecules in Atmospheric Aerosols. *Analytical chemistry* 5 (2017) 2873–2879. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04127.
- Steiner J, Procopio S, Becker T. Brewer's spent grain: source of value-added polysaccharides for the food industry in reference to the health claims. *Eur. Food Res. Technol.* 3 (2015) 303–315. DOI: 10.1007/s00217-015-2461-7.
- Szaja A, Montusiewicz A, Lebiocka M, Bis M. The effect of brewery spent grain application on biogas yields and kinetics in co-digestion with sewage sludge. *PeerJ* (2020) e10590. DOI: 10.7717/peerj.10590.
- Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *Journal of nutritional science and vitaminology* 2 (2006) 149–153. DOI: 10.3177/jnsv.52.149.
- Tan M. Bones, Joints, and Hormones Ser. Diabetes Mellitus. Impact on Bone, Dental and Musculoskeletal Health1. San Diego, Elsevier Science & Technology 2020.
- Teoh E. Secondary Metabolites of Plants (2016) 59–73. DOI: 10.1007/978-3-319-24274-3_5.
- Thoma R, Löffler B, Stihle M, Huber W, Ruf A, Hennig M. Structural Basis of Proline-Specific Exopeptidase Activity as Observed in Human Dipeptidyl Peptidase-IV. *Structure* 8 (2003) 947–959. DOI: 10.1016/S0969-2126(03)00160-6.
- Treimo J, Westereng B, Horn S, Forssell P, Robertson J, Faulds C, Waldron K, Buchert J, Eijsink V. Enzymatic solubilization of brewers' spent grain by combined action of carbohydrases and peptidases. *Journal of agricultural and food chemistry* 8 (2009) 3316–3324. DOI: 10.1021/jf803310f.
- Truchado P, Hernandez-Sanabria E, Salden B, van den Abbeele P, Vilchez-Vargas R, Jauregui R, Pieper D, Possemiers S, van de Wiele T. Long chain arabinoxylans shift the mucosa-associated microbiota in the proximal colon of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (M-SHIME). *Journal of Functional Foods* (2017) 226–237. DOI: 10.1016/j.jff.2017.02.004.

- Ube N, Harada D, Katsuyama Y, Osaki-Oka K, Tonooka T, Ueno K, Taketa S, Ishihara A. Identification of phenylamide phytoalexins and characterization of inducible phenylamide metabolism in wheat. *Phytochemistry* (2019) 112098. DOI: 10.1016/j.phytochem.2019.112098.
- Vallon V. Glucose transporters in the kidney in health and disease. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 9 (2020) 1345–1370. DOI: 10.1007/s00424-020-02361-w.
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W. Lignin biosynthesis and structure. *Plant physiology* 3 (2010) 895–905. DOI: 10.1104/pp.110.155119.
- Verni M, Pontonio E, Krona A, Jacob S, Pinto D, Rinaldi F, Verardo V, Díaz-de-Cerio E, Coda R, Rizzello C. Bioprocessing of brewers' spent grain enhances its antioxidant activity: characterization of phenolic compounds and bioactive peptides. *Frontiers in microbiology* (2020) 1831. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01831.
- Vogt T. Unusual spermine-conjugated hydroxycinnamic acids on pollen: function and evolutionary advantage. *Journal of Experimental Botany* 22 (2018) 5311–5315. DOI: 10.1093/jxb/ery359.
- Wannenmacher J, Gastl M, Becker T. Phenolic Substances in Beer: Structural Diversity, Reactive Potential and Relevance for Brewing Process and Beer Quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 4 (2018) 953–988. DOI: 10.1111/1541-4337.12352.
- Waterstraat M, Bunzel D, Bunzel M. Identification of 8-O-4/8-5(Cyclic)- and 8-8(Cyclic)/5-5-Coupled Dehydrotriferulic Acids, Naturally Occurring in Cell Walls of Mono- and Dicotyledonous Plants. *Journal of agricultural and food chemistry* 38 (2016) 7244–7250. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b02720.
- Waterstraat M und Bunzel M. A Multi-Step Chromatographic Approach to Purify Radically Generated Ferulate Oligomers Reveals Naturally Occurring 5-5/8-8(Cyclic)-, 8-8(Noncyclic)/8-O-4-, and 5-5/8-8(Noncyclic)-Coupled Dehydrotriferulic Acids. *Front. Chem.* (2018) 190. DOI: 10.3389/fchem.2018.00190.
- Waterstraat M und Bunzel M. A stable isotope dilution approach to analyze ferulic acid oligomers in plant cell walls using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 20 (2019) 5047–5062. DOI: 10.1007/s00216-019-01924-w.
- Weichert H, Stenzel I, Berndt E, Wasternack C, Feussner I. Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves - preferential induction of the reductase pathway by salicylate 1. *FEBS letters* 3 (1999) 133–137. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)01697-X.
- Wellmitz J und Gluschke M. Texte. Leitlinie zur Methodvalidierung. 1. Berlin, Umweltbundesamt 2004.
- Williams B, Mikkelsen D, Flanagan B, Gidley M. "Dietary fibre": moving beyond the "soluble/insoluble" classification for monogastric nutrition, with an emphasis on humans and pigs. *Journal of animal science and biotechnology* (2019) 45. DOI: 10.1186/s40104-019-0350-9.
- World Health Organization. Global report on diabetes. 1. Geneva, WHO Press World Health Organization 2016.

- Wrick K, Robertson J, van Soest P, Lewis B, Rivers J, Roe D, Hackler L. The influence of dietary fiber source on human intestinal transit and stool output. *The Journal of nutrition* 8 (1983) 1464–1479. DOI: 10.1093/jn/113.8.1464.
- Xie F, Gong S, Zhang W, Wu J, Wang Z. Potential of lignin from *Canna edulis* ker residue in the inhibition of α -d-glucosidase. *International journal of biological macromolecules* (2017) 592–602. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.100.
- Xiong Y, Ng K, Zhang P, Warner R, Shen S, Tang H-Y, Liang Z, Fang Z. In Vitro α -Glucosidase and α -Amylase Inhibitory Activities of Free and Bound Phenolic Extracts from the Bran and Kernel Fractions of Five Sorghum Grain Genotypes. *Foods (Basel, Switzerland)* 9 (2020) 1301. DOI: 10.3390/foods9091301.
- Xiros C, Topakas E, Katapodis P, Christakopoulos P. Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresource technology* 13 (2008) 5427–5435. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.11.010.
- Yamaji N, Yokoo Y, Iwashita T, Nemoto A, Koike M, Suwa Y, Wakimoto T, Tsuji K, Nukaya H. Structural determination of two active compounds that bind to the muscarinic M3 receptor in beer. *Alcoholism Clin Exp Res* 1 Suppl (2007) S9-14. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2006.00280.x.
- Yamazaki Y, Kawano Y, Uebayasi M. Induction of adiponectin by natural and synthetic phenolamides in mouse and human preadipocytes and its enhancement by docosahexaenoic acid. *Life sciences* 5-6 (2008) 290–300. DOI: 10.1016/j.lfs.2007.11.016.
- Ye C, Zhang R, Dong L, Chi J, Huang F, Dong L, Zhang M, Jia X. α -Glucosidase inhibitors from brown rice bound phenolics extracts (BRBPE): Identification and mechanism. *Food chemistry* (2022) 131306. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131306.
- Yin Z, Zhang W, Feng F, Zhang Y, Kang W. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness* 3-4 (2014) 136–174. DOI: 10.1016/j.fshw.2014.11.003.
- Yin Z-H, Sun C-H, Fang H-Z. Fragmentation characteristics of hydroxycinnamic acids in ESI-MSⁿ by density functional theory. *Journal of Mass Spectrometry* 7 (2017) 427–433. DOI: 10.1002/jms.3945.
- You Q, Chen F, Wang X, Jiang Y, Lin S. Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. *LWT - Food Science and Technology* 1 (2012) 164–168. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.10.011.
- Zacarés L, López-Gresa M, Fayos J, Primo J, Bellés J, Conejero V. Induction of p-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 11 (2007) 1439–1448. DOI: 10.1094/MPMI-20-11-1439.
- Zduńska K, Dana A, Kolodziejczak A, Rotsztein H. Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin pharmacology and physiology* 6 (2018) 332–336. DOI: 10.1159/000491755.
- Zhu H, Liang Q-H, Xiong X-G, Wang Y, Zhang Z-H, Sun M-J, Lu X, Wu D. Anti-Inflammatory Effects of p-Coumaric Acid, a Natural Compound of *Oldenlandia diffusa*, on Arthritis Model LL

Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2018) 5198594. DOI: 10.1155/2018/5198594.

Zielke C, Teixeira C, Ding H, Cui S, Nyman M, Nilsson L. Analysis of β -glucan molar mass from barley malt and brewer's spent grain with asymmetric flow field-flow fractionation (AF4) and their association to proteins. *Carbohydrate polymers* (2017) 541–549. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.045.

F. Lebenslauf

Akademischer Lebenslauf**Diplom-Lebensmittelchemikerin Daniela Becker**

Persönliche Daten

Name Daniela Becker
E-Mail d_becker@chemie.uni-kl.de

Akademischer und beruflicher Werdegang

- seit 04/2021** wissenschaftliche Mitarbeiterin an der TU Kaiserslautern im Fachbereich Chemie/Fachdidaktik
- 04/2022–11/2022** TU Kaiserslautern, Fachbereich Chemie/ Lebensmittelchemie und Toxikologie
wissenschaftliche Hilfskraft
- seit 09/2019** DGPT–Weiterbildungsprogramm zum Fachtoxikologen
- 09/2019: Lebensmitteltoxikologie
 - 03/2020: Molekulare Zelltoxikologie
 - 04/2021: Basic Principles in Toxicology
 - 08/2021: Xenobiotic metabolism/toxicokinetics
 - 09/2021: Analytische Toxikologie
 - 02/2022: Organtoxikologie I
 - 06/2022: Organtoxikologie II
- 04/2017–03/2021** Doktorandin an der TU Kaiserslautern, Fachbereich Chemie/ Lebensmittelchemie und Toxikologie, 67663 Kaiserslautern
Beendigung des praktischen Laborteils der Promotion
- 10/2013–03/2017** TU Kaiserslautern, Fachbereich Maschinenbau, Lehrstuhl für Thermodynamik
studentische wissenschaftliche Hilfskraft im Bereich Analytik
- 10/2011–03/2017** Studium der Lebensmittelchemie an der Technischen Universität, 67663 Kaiserslautern
Diplomarbeit zum Thema „Untersuchungen zur biologischen Wirkung eines anthocyanreichen Aronia-Präparates auf den Menschen“ (Note 1,0)
unter Verleihung des Steinhofer-Preises für herausragende Leistungen
-

04/2011–02/2016 Müller Ltd. und Co KG,
Pirmasens: Aushilfe für Kassiertätigkeiten

08/2002–03/2011 Leibniz Gymnasium Pirmasens
Abschluss Abitur (Note 1,6)

Mitgliedschaften

seit 02/2021 Gesellschaft für Toxikologie (GT) e.V.
seit 09/2017 Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) e.V.
VAA-Führungskräfte Chemie

Besondere Kenntnisse

Sprachkenntnisse

Deutsch Muttersprache
Englisch verhandlungssicher (TELC C1)
Französisch erweiterte Grundkenntnisse

EDV-Kenntnisse

**MS Word, Excel und
PowerPoint** sehr gut
Origin gut
PyMOL, AutoDock gut

G. Veröffentlichungen

Posterbeiträge

Becker, D; Bakuradze, T; Zaiter, A; Chaimbault, P; Richling, E; Biological active compounds in brewer's spent grain. Trends in brewing in Belgien - Löwen, 17.-20.10.2021

Publikationen

Bakuradze, T; **Becker, D;** Reischmann, J; Meiser, P, Galan, J; Richling, E (2019). Protection from DNA Damage by Use of an Aronia Food Supplement—Results from a Pilot Human Intervention Study. *Current Pharmacology Reports*, 5 (Suppl. 1), 188-195

Becker, D; Bakuradze, T; Hensel, M; Beller, S; Yélamos, CC; Richling, E (2021) Influence of Brewer's Spent Grain Compounds on Glucose Metabolism Enzymes. *Nutrients* 13 (8), 2696

Becker, D; Permann, S; Bakuradze, T; Stegmüller, S; Richling, E (2022) Isolation and Characterisation of Hordatine-Rich Fractions from Brewer's Spent Grain and Their Biological Activity on α -Glucosidase and Glycogen Phosphorylase α . *Sustainability* 14 (14), 8421

Becker, D; Stegmüller, S; Richling, E (2022) Characterization of brewer's spent grain extracts by tandem mass spectrometry and HPLC-DAD: Ferulic acid dehydrodimers, phenolamides, and oxylipins. *Food Science and Nutrition*

Messen

Becker, D; Kirsch, V; Akermann, A; Weiermüller, J; Weingart, P; Saynisch, R; Thiel, W; Ulber, R; Richling, E; Bioval - Valorization of Brewer's spent grain.ACHEMA 2018 - Frankfurt am Main, 14.-18.06.2018

H. Eidstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Daniela Becker, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „*In vitro* Untersuchungen zum Einfluss von Biotreber-Inhaltsstoffen auf Enzyme des Glucosestoffwechsels“ selbstständig verfasst und nur die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmitteln genutzt habe.

Bestandteile dieser kumulativen Arbeit wurden vor der Erstellung dieser Dissertation bereits auf Tagungen und in Printmedien veröffentlicht (siehe Veröffentlichungen).

Die vorliegende Dissertation habe ich weder im Ganzen noch in Teilen als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht und kein anderes Promotionsverfahren bei einer anderen Hochschule beantragt oder eröffnet. Die geltende Promotionsordnung des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern vom 25. März 2014 ist mir bekannt.

Kaiserslautern, den

(Daniela Becker)