

Institut für Grünlandlehre der Technischen Universität München

Fruktosangehalt, -polymerisationsgrad und -struktur in verschiedenen Pflanzenteilen von Lieschgras (*Phleum pratense* L.)

Content, Degree of Polymerization and Structure of Fructosan
in Different Plant Parts of Timothy Grass (*Phleum pratense* L.)

W. KÜHBAUCH

Mit 3 Abbildungen

Eingegangen am 29. April 1974

Summary

1. Content, degree of polymerization, molecular weight and structure of fructosan were investigated in stem basis, rest of stem, leaf blades and the panicle of timothy, cultivar *Odenwälder*. Attention was given to take plants with full emerged panicle, which had not reached flowering stage. Fructosan contents of nearly 30 percent show, that the stem, particularly the stem basis, is the main organ of reserve carbohydrate deposition. 0.3 percent fructosan in the leaf blades was unexpected in this small amount. Probably there is a connexion with the near flowering, which consumes a lot of assimilates. Even though the isolated polysaccharide in the panicle was different to fructosan as well as starch, it proved to be a glucan.

2. The average molecular weight of fructosan reaches from about 5000 in the leaf blades to more than 18000 in the stem. In the stem basis fructosan shows a very narrow distribution of molecular weights, while the fructosan of the other plant parts belongs to a wide range. In this fact we see the readiness of the plant to make available reserve carbohydrates coming from leaf blades and the upper part of the stem. Results of molecular weights defined on *Sephadex* are in agreement with those obtained by the analysis of fructose and glucose in isolated fructosan. Thus in all probability fructosan of the stem base is exclusively built on sucrose. In this case the degree of polymerization can be simply calculated by the quotient fructose/glucose.

3. Infrared spectrometry showed the fructosan of the stem base, the upper part of the stem and the leaf blades to be fructosyl chains with 2–6 bonds. The structure of the panicle glucan was not investigated.

Zusammenfassung

Es wurden Gehalt, Polymerisationsgrad bzw. Molekulargewicht und Struktur von Fruktosan in der Stengelbasis, dem oberen Stengelteil und den Blättern von Lieschgras, Sorte *Odenwälder*, untersucht. Fruktosangehalte von nahezu 30 % weisen die Stengelbasis als

bevorzugtes Speicherorgan für Reservekohlenhydrate aus. Mit 0,3 % waren die Fruktosangehalte der Blätter unerwartet gering. Ein aus der Rispe isoliertes Polysaccharid erwies sich als Glucan, das jedoch nicht identisch war mit Stärke. Die durchschnittlichen Molekulargewichte der Fruktosane reichten von ca. 5000 in den Blättern bis über 18000 im Stengel. Die Stengelbasis zeichnet sich durch eine besonders enge begrenzte Molekulargewichtsverteilung und durch den ausschließlichen Aufbau der Polyfruktosane auf Saccharose aus. Alle aus Stengelbasis, oberem Stengelteil und Blättern isolierten Fruktosane erwiesen sich als 2-6-verknüpfte Fruktosylketten.

Einleitung

Fruktosan ist das wichtigste Reservekohlenhydrat in Gräsern des gemäßigten Klimabereiches (OJIMA und ISAWA, 1968). Das Regenerationswachstum der während einer Vegetationsperiode in der Regel mehrfach genutzten Gräser wird wesentlich zu Lasten dieser Stoffgruppe unterhalten (WAITE und BOYD, 1953; SHEARD, 1968). Darüber hinaus werden Futterwert und Konservierungseignung der Gräser vom Gehalt und dem Polymerisationsgrad der Fruktosane entscheidend mitbestimmt (SCHLUBACH und GASSMANN, 1955; NEHRING, 1968; KÜHBAUCH, 1974). Gemessen an ihrer Bedeutung ist jedoch über Verteilung, Polymerisationsgrad und Struktur dieser Verbindungen in Gräsern wenig bekannt. In dieser Arbeit soll daher in Lieschgras, einem der wichtigsten Futtergräser, eine differenzierte Beschreibung der Fruktosane versucht werden.

Material und Methoden

a) *Pflanzenmaterial*: Lieschgras der Sorte *Odenwälder* wurde am 27. Juni 1973 aus dem Sortiment des hiesigen Versuchsfeldes geerntet. Es wurden nur solche Pflanzen ausgewählt, die bis zur vollen Entfaltung der Rispen herangewachsen waren und das Blühstadium noch nicht erreicht hatten. Getrennt in Stengelbasis (= Hypokotyl und erstes Internodium), oberer Stengel (ab zweites Internodium und Blattscheiden), Blattspreiten («Blätter») und Rispen wurde die Pflanzensubstanz mit Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei minus 20 °C aufbewahrt.

b) *Isolierung von Fruktosan*: Die Isolierung der im Wasserextrakt gewonnenen Fruktosane erfolgte nach Entfernung der mit Bleiacetat fällbaren N-Verbindungen durch chromatographische Trennung an Sephadex G-50 in einer 1300×35-mm-Säule. Das Verfahren ist im einzelnen an anderer Stelle beschrieben (KÜHBAUCH, 1974). Wie in Abbildung 1 am Beispiel der Stengelbasis von Lieschgras gezeigt ist, laufen bei dieser Trennung die Polyfruktosane mit deutlichem Abstand vor den Mono- und Dissachariden.

Durch fortgesetzte Beobachtung der Zuckerqualität mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) und/oder die quantitative Beschreibung der Kohlenhydratabsorption ist eine sichere Isolierung der polymeren Fruktose zu erreichen. Die DC wurde nach einem Verfahren von VOMHOF und MELLON (1966), die Anfärbung der Kohlenhydrate mit Anilin-Diphenylamin-Phosphorsäure nach BUCHAN und SAVAGE (1952), die quantitative Kohlenhydratbestimmung mit Anthron nach MCCREADY et al. (1950) vorgenommen.

c) *Bestimmung des Polymerisationsgrades (DP) von Fruktosan*: DP und Molekulargewichte von Fruktosan wurden, ausgehend von der Voraussetzung, daß Lieschgrasfruktosan auf Saccharose aufbaut (GROTELUESCHEN und SMITH, 1968) einmal durch Bestimmung der Einzelbauteile Fruktose und Glukose und alternativ dazu am «Molekularsieb» Sephadex G-75

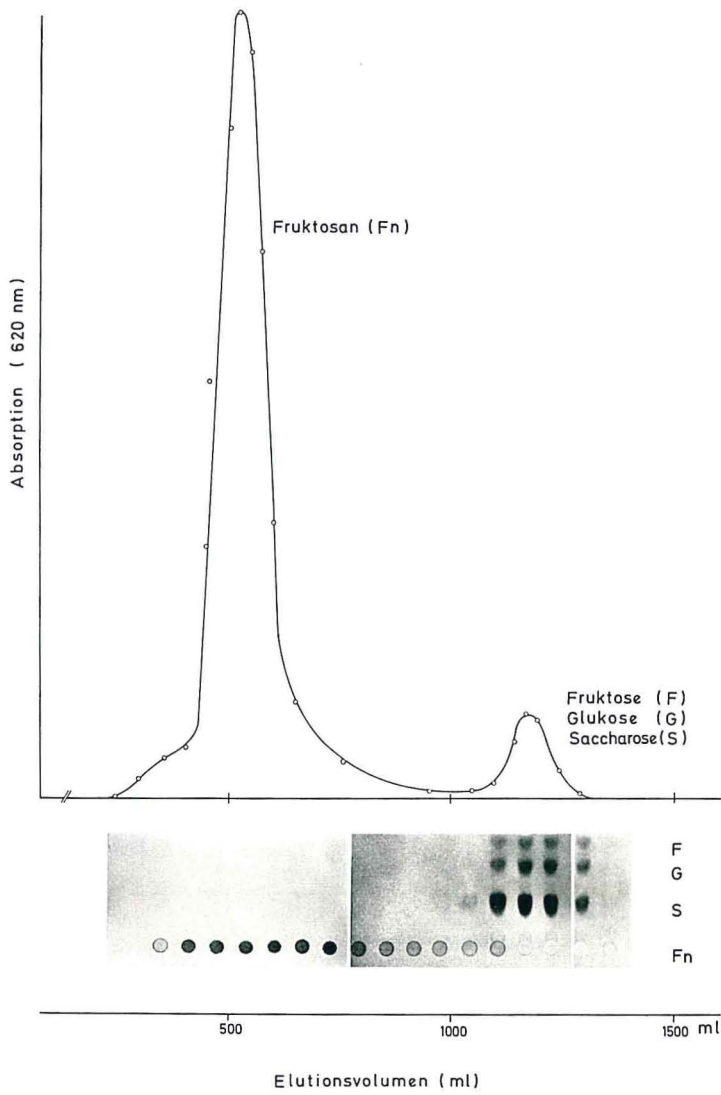


Abb. 1: Elutionsdiagramm von Fruktosan, Mono- und Disacchariden aus der Stengelbasis von Lieschgras.

Fig. 1: Elution diagram of fructosan, mono- and disaccharides from stem basis of timothy grass.

«superfine» mit Dextran 10 und Dextran 20 als Vergleichspräparaten, wie an anderer Stelle beschrieben, ermittelt (KÜHBAUCH, 1974).

d) *IR-Spektrometrie*: 1–2 mg des isolierten und durch Umfällung in Äthanol und Wasser nachgereinigten Fruktosans wurde mit 300 mg Kaliumbromid im Achatmörser vermengt und aus dem völlig homogenen Fruktosan-KBr-Gemisch ein Preßling hergestellt. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte an einem Gerät des Typs Perkin Elmer IR-257.

Ergebnisse und Diskussion

a) *Fruktosegehalt*: In Tab. 1 sind die aus 50 g frischer Pflanzensubstanz erhaltenen Fruktosanmengen und die damit errechneten Fruktosangehalte der verschiedenen Pflanzenteile angegeben. Der Stengel, insbesondere aber die Stengelbasis mit dem zwiebförmig verdickten Hypokotyl erweist sich als Haupteinlagerungsorgan für Fruktosan. Mit 27,5 % Fruktosan in der Stengelbasis und noch 5 % im übrigen Stengel wird die Bedeutung des Halms (einschließlich der Blattscheiden) für den Reservestoffwechsel bzw. das Regenerationswachstum mehrfach genutzter Gräser unterstrichen. Auch das Zuchtziel «Stengel» könnte unter diesem Gesichtspunkt durch die Futterpflanzenzüchtung eine günstigere Bewertung erfahren, als das bislang der Fall war. Das Mengenverhältnis zwischen Mono- und Disacchariden einerseits und Fruktosan andererseits, wie es für die Stengelbasis in Abb. 1 dargestellt ist, zeigt schließlich den hohen Spezialisierungsgrad dieses Organs zur Einlagerung von Reservekohlenhydraten.

Tab. 1: Fruktosangehalt in Stengelbasis, oberem Stengelteil und Blättern von Lieschgras der Sorte *Odenwälder* am 27. Juni 1973.

Table 1: Content of fructosan in stem basis, rest of stem, leaf blades and inflorescence of timothy grass, cultivar *Odenwälder*; 27. 6. 1973.

Pflanzenteil	mg Fruktosan in 50 g Frischsubstanz	% Fruktosan i. Trm.
Stengelbasis Hypokotyl und 1. Internodium	6643	27,5
Stengel ab 2. Internodium und Blattscheiden	938	5,3
Blätter	48	0,3
Rispe	—	—

Aus früheren Untersuchungen an Knaulgras war bekannt (KÜHBAUCH, 1973), daß auch in Blättern der Gräser größere Mengen Fruktosan synthetisiert und eingelagert werden können. Die erstaunlich geringe Menge Fruktosan in Blättern von Lieschgras wird also wohl damit zusammenhängen, daß aufgrund der stetigen Verfügbarkeit im Stoffwechsel (SCHLUBACH und LÜBBERS, 1956) diese in der Pflanzenzelle kolloidal gelösten Substrate (RICHTER, 1969) entweder zur Einlagerung in der Sten-

gelbasis abtransportiert oder für die bevorstehende Blütenbildung im Halm bereitgestellt werden konnten. In der Rispe taucht allerdings zu diesem Zeitpunkt keinerlei Fruktosan auf. Statt dessen wurden an *Sephadex* geringe Mengen eines Glukans gewonnen, das sich im Vergleich zu Fruktosan als schwer hydrolysierbar erwies und nicht identisch war mit Stärke.

b) *Molekulargewicht bzw. Polymerisationsgrad von Fruktosan:* In Abb. 2 und Tab. 2 sind die Verteilung der Fruktosane nach Gelfiltration an *Sephadex* bzw. die daraus berechneten Polymerisationsgrade (DP) und die Zahlenmittel der Molekulargewichte (\bar{M}_n) angegeben.

Tab. 2: Zahlenmittel der Molekulargewichte (\bar{M}_n) und durchschnittliche Polymerisationsgrade (DP) von Fruktosan der Stengelbasis, des oberen Stengelteils und der Blätter von Lieschgras der Sorte *Odenwälder* am 27. Juni 1973. – Vergleichssubstanzen: Dextran 10 und Dextran 20.

Table 2: Average of molecular weight (\bar{M}_n) and degree of polymerization (DP) of fructosan in stem basis, rest of stem and leaf blades of timothy grass, cultivar *Odenwälder*; 27.6.1973. Reference substance: Dextran 10 and Dextran 20.

Pflanzenteil bzw. Vergleichssubstanz	nach Gelfiltration an Sephadex		nach Quotient Fruktose : Glukose	
	\bar{M}_n	(DP) ¹⁾	DP ²⁾	(\bar{M}_n) ³⁾
Stengelbasis Hypokotyl und 1. Internodium	15 800	(97,5)	95,1	(15 400)
Stengel ab 2. Internodium und Blattscheiden	18 600	(114,8)	60,1	(9 740)
Blätter	15 000	(92,6)	–	–
	12 400	(76,5)	–	–
	10 800	(66,7)	33,7	(5 460)
Dextran 10	5 200	(32,1)	–	–
Dextran 20	5 700	(35,1)	–	–
Dextran 20	15 000	(92,5)	–	–

1) Aus \bar{M}_n berechnet.

2) Glukoserest nicht enthalten.

3) Aus DP berechnet; Glukoserest nicht enthalten.

Vor den anderen Fruktosanen zeichnet sich das der Stengelbasis dadurch aus, daß es einen sehr engen Molekulargewichtsbereich umfaßt (s. auch Abb. 1), der sich wesentlich schärfer eingrenzen läßt, als das etwa bei Fruktosanen aus dem oberen Stengelteil oder den Blättern von Lieschgras und selbst bei den Vergleichspräparaten Dextran 10 und Dextran 20 der Fall ist; es ergibt sich ein \bar{M}_n von 15800. Auch in der Stengelbasis von Knaulgras konnte keine dermaßen enge Verteilung von \bar{M}_n beobachtet werden (KÜHBAUCH, 1974). Die vergleichende Gelfiltration und die DP-Ermittlung durch Bestimmung der Einzelbauteile Fruktose und Glukose bzw.

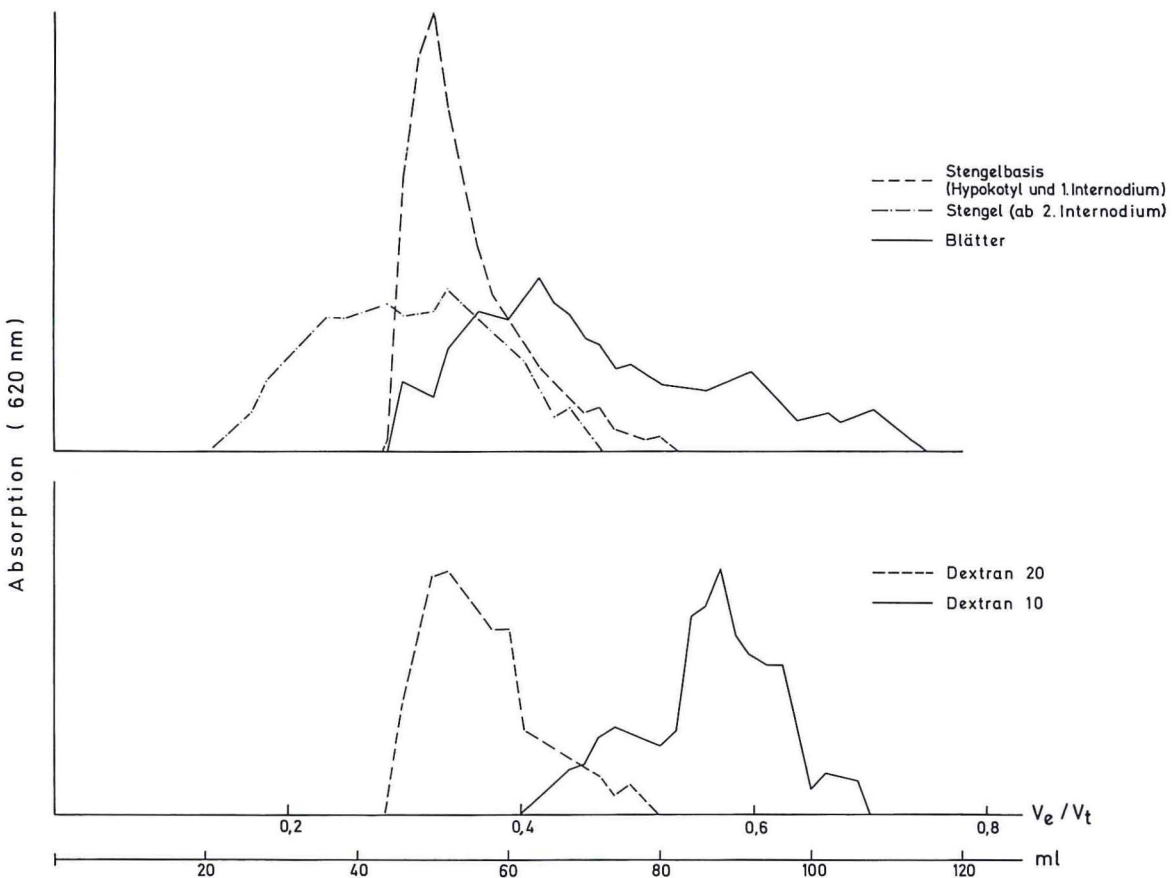


Abb. 2: Molekulargewichtsverteilung von Fruktosan der Stengelbasis, des oberen Stengelteils und der Blätter von Lieschgras nach Trennung an Sephadex G-75. – Vergleichssubstanzen: Dextran 10 und Dextran 20.

Fig. 2: Distribution of molecular weight of fructosan from stem basis, rest of stem and leaf blades of timothy grass separated on Sephadex G-75. – Reference substance: Dextran 10 and Dextran 20.

der Quotient aus beiden Zuckern führen außerdem im Stengelbasisfruktosan zu übereinstimmenden Ergebnissen. Daraus geht hervor, daß dieses Fruktosan wohl ausschließlich auf Saccharose aufbaut. Unter dieser Voraussetzung und mit relativ enger Molekulargewichtsverteilung könnten Fruktosane als Vergleichs- oder Eichpräparate

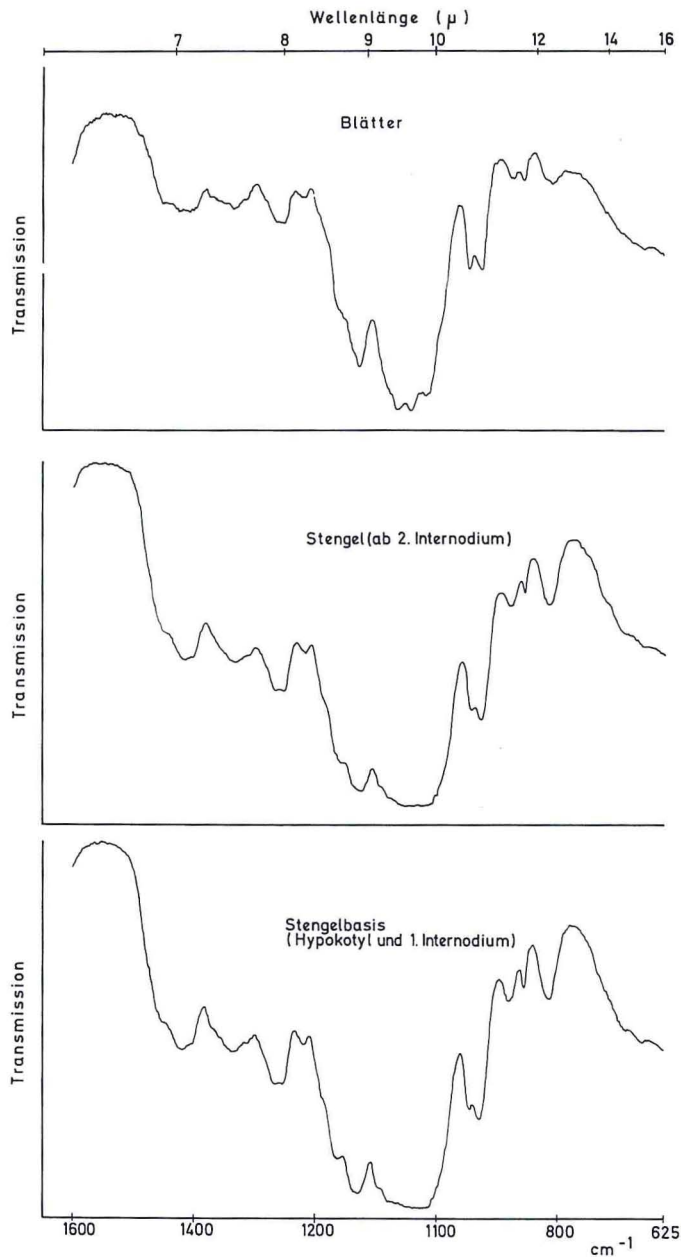


Abb. 3: Infrarotspektren von Fruktosan der Stengelbasis, des oberen Stengelteils und der Blätter von Lieschgras.

Fig. 3: Infrared spectra of fructosan of stem basis, rest of stem and leaf blades in timothy grass.

möglicherweise besser geeignet sein als die üblicherweise zur Beschreibung kettenförmiger Kohlenhydrate verwendeten Dextrane; um so mehr, als sich der Quotient Fruktose : Glukose rasch und treffsicher bestimmen läßt (KÜHBAUCH, 1974). Die Verteilung von Fruktosanen des oberen Stengelteils und der Blätter ist wesentlich breiter und setzt sich aus deutlich verschiedenen Molekulargewichtsbereichen zusammen (Abb. 2).

Eine Häufung der Fruktosane tritt auf bei Molekulargewichten um 18600 und 15000 im oberen Stengelteil bzw. 12400, 10800 und 5200 in den Blättern. Im Gegensatz zum Fruktosan der Stengelbasis liegen die aus dem Molekulargewicht berechneten DP auch wesentlich höher als die mittels Quotient Fruktose : Glukose bestimmten. Der bisher angenommene überwiegende Aufbau der Lieschgrasfruktosane auf Saccharose (GROTELUESCHEN und SMITH, 1968) ist also nicht in allen Pflanzenorganen gegeben. Womöglich dokumentiert sich in der verhältnismäßig breiten \bar{M}_n -Verteilung von Fruktosan in den «oberen» Pflanzenteilen auch schon die Teilmobilisierung für den Stoffwechsel der Pflanze bzw. der Blütenbildung, was zu diesem Zeitpunkt nicht im selben Maße für die Reservekohlenhydrate der Stengelbasis gilt.

c) Struktur von Lieschgrasfruktosan: Zur Beschreibung des Bindungstyps der Polyfruktosane des Lieschgrases wurde die IR-Spektrometrie herangezogen. In Abb. 3 ist ein Ausschnitt des Spektrums gezeigt, der den charakteristischen Bereich für diese Ketoseverbindungen enthält. In allen 3 fruktosanhaltigen Pflanzenteilen konnten praktisch identisch Absorptionsmaxima beobachtet werden, und zwar für die Stengelbasis bei 815, 855, 880, 929 und 945 cm^{-1} ; für den übrigen Stengel bei 815, 855, 879, 930 und 944 cm^{-1} ; für die Blätter bei 809, 855, 875, 925 und 946 cm^{-1} .

VERSTRAETEN (1964) und SUZUKI (1968) beschreiben die Banden 855 und 930 cm^{-1} mit einer Standardabweichung von $\pm 15 \text{ cm}^{-1}$ als die typische Absorption von 2-6-verknüpften Fruktosylverbindungen, während der Absorptionsbereich um 815, 880 und 945 cm^{-1} gleichermaßen den 1-2-verknüpften «Inulintyp» geradkettiger Polyfruktosane auszeichnet. Mit dem Wellenlängenbereich um 945 cm^{-1} wird nach Beobachtungen an Inulin (VERSTRAETEN, 1964; BARKER und STEPHENS, 1954) die Ringfibration des Moleküls erfaßt, während die Absorptionsbanden um 815 und 880 cm^{-1} die Kettenformation der Ketosereste beschreiben. Unter Beachtung einer Standardabweichung von $\pm 15 \text{ cm}^{-1}$ und einer hinzukommenden Gerätetoleranz von $\pm 10 \text{ cm}^{-1}$ stimmen diese Beobachtungen mit Untersuchungen von Lieschgrasfruktosan durch SUZUKI (1968) und Knaulgrasfruktosan von KÜHBAUCH (1974) überein.

Literatur

- BARKER, S. A., and R. STEPHENS: J. chem. Soc. 4550 (1954); zit. n. L. M. J. VERSTRAETEN.
 BUCHAN, H. L., and R. J. SAVAGE: Analyst 77, 401 (1952) zit. n. STAHL, E.: Dünnschichtchromatographie, Verlag Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1967).
 GROTELUESCHEN, R. D., and D. SMITH: Crop Sci. 8, 210-212 (1968).
 KÜHBAUCH, W.: Landw. Forschg. 26, 173-181 (1973).
 - Z. Acker- und Pflanzenbau 139, 85-96 (1974).

- MCCREADY, R. M., J. GUGGOLZ, V. SILVIERA, and H. S. OWENS: *Anal. Chem.* 22, 1156–1158 (1950).
- NEHRING, K.: *Sitzungsber. dt. Akad. Landwirtschaftswiss.* 17, 101–118 (1968).
- OJIMA, K., and T. ISAWA: *Canad. J. Bot.* 46, 1507–1511 (1968).
- RICHTER, G.: *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*. Verlag Georg Thieme, Stuttgart (1969).
- SCHLUBACH, H. H., und L. GASSMANN: *Liebigs Ann. Chem.* 594, 33–41 (1955).
- SCHLUBACH, H. H., und H. LÜBBERS: *Liebigs Ann. Chem.* 598, 225–235 (1956).
- SHEARD, R. W.: *Crop Sci.* 8, 55–60 (1968).
- SUZUKI, M.: *Canad. J. Bot.* 46, 1201–1206 (1968).
- VERSTRAETEN, L. M. J.: *Anal. Chem.* 36, 1040–1044 (1964).
- VOMHOF, D. W., and M. G. MELLON: *J. Chromatog.* 21, 335–337 (1966).
- WAITE, R., and J. BOYD: *J. Sci. Food Agric.* 4, 197–204 (1953).

Dr. W. KÜHBAUCH, Institut für Grünlandlehre der Techn. Universität D-8050 Freising-Weihenstephan.