

Universität für Bodenkultur Wien

University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna

Department für Nutzpflanzenwissenschaften

Abteilung Pflanzenzüchtung



Masterarbeit

**Analytische Erkennung von Weizen-Unterarten –
ein Beitrag zur Konsumentensicherheit**

eingereicht von

Magdalena BREUER

Betreuer: Ao.Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Heinrich Grausgruber

Mitbetreuer: Dipl.-Ing. Dr. Manfred Werteker

Wien, Juni 2014

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Masterarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt bzw. die wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

.....
Datum

.....
Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich bei den vielen Menschen bedanken, die zum Gelingen meiner Masterarbeit beigetragen haben.

Bei Dr. Heinrich Grausgruber und Dr. Manfred Werteker möchte ich mich für die Betreuung der Masterarbeit und allem voran für die Ermöglichung der Durchführung der Arbeit bedanken.

Weiters danke ich der Österreichischen Forschungsförderungsgesellschaft mbH (FFG), welche im Rahmen des FEMTECH-Programmes die Masterarbeit finanziell unterstützt hat.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Manfred Schwanninger, der leider viel zu früh während der Fertigstellung der Arbeit von uns gegangen ist, für die Hilfe beim Umgang mit dem Statistikprogramm Unscrambler® und Stefanie Huber, die während der gemeinsamen Zeit in der AGES stets ein offenes Ohr hatte.

Bei meinen FreundInnen möchte ich mich an dieser Stelle recht herzlich für ihre Zeit und Hilfe bedanken.

Meiner lieben Familie, meinen Eltern und Geschwistern und meinem Freund, danke ich von ganzem Herzen für die andauernde Unterstützung und die wertvollen Gespräche. Nicht nur während der Zeit der Diplomarbeit, sondern auch während meines gesamten Studiums habe ich auf euch zählen können.

Ein herzliches Dankeschön an euch alle!

Kurzzusammenfassung

In den letzten Jahren werden KonsumentInnen mit einer steigenden Anzahl von Backprodukten konfrontiert, die aus Dinkel hergestellt werden. Eine Unterscheidung von „reinem“ Dinkel und modernem Dinkel, in welchen Weichweizen eingekreuzt wurde, liegt im Interesse von ProduzentInnen und KonsumentInnen. Im Zuge dessen sind sichere analytische Methoden für die Unterscheidung von Dinkel und Weichweizen notwendig. So werden beide Gruppen vor falscher Deklaration geschützt. Unter dem Aspekt der zunehmend auftretenden, nicht Zöliakie-bedingten Weizenunverträglichkeit in der Bevölkerung, erhält die Unverfälschtheit des Rohmaterials auch eine gesundheitspolitische Dimension.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, die eine analytische Unterscheidung von Weizen und Dinkel basierend auf HPLC-Spektren der Proteinfractionen nach einer modifizierten Osborne-Fraktionierung erlaubt. Es wurden insgesamt 210 Proben analysiert. Die besten Resultate hinsichtlich der Differenzierbarkeit konnten durch eine standardisierte Hauptkomponentenanalyse erhalten werden. Dabei wird die absolute Größe der Chromatogramm-Peaks nicht berücksichtigt, sondern nur deren relative Variabilität. Alle Dinkel und Weichweizen konnten durch diese Methode korrekt getrennt werden, jedoch war der Nachweis von Dinkel- Weichweizenkreuzungen nicht möglich.

Abstract

In the last years, consumers have been confronted with an increasing number of baking products made from neglected wheat subspecies such as spelt wheat and their crossbreeds. In the interest of producers and consumers, reliable analytical methods for the distinction of these subspecies of common wheat are necessary. The consumer has to be protected against fraudulent use of common wheat in spelt wheat products and the producer needs protection against dishonest competitors. Considering the emerging non-celiac wheat intolerances in the population, the purity of raw material receives increased importance, also in the public health dimension. The purpose of this study is the development of a method for an analytical distinction of wheat subspecies based on HPLC-spectra of the protein fractions resulting from a modified Osborne-fractionation. Altogether 210 wheat samples have been analysed. The best results with respect to the differentiation have been obtained by the application of a standardised evaluation of the principal component analysis. Here, the absolute magnitude of the peaks is neglected and only their relative variability is important for the alignment of the principal components. In this way the influence of small peaks is enhanced and their importance for the distinction of subspecies may be recognized. All subspecies could be separated properly with this method, however, the detection of crossbreeds of spelt and wheat was not possible.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	9
1.1	Dinkel	9
1.1.1	Bedeutung und Verbreitung	9
1.1.2	Evolution und Domestikation	13
1.1.3	Zytogenetik	16
1.2	Getreideproteine	18
1.3	Unverträglichkeit	21
1.4	HPLC	23
1.5	Multivariate Datenanalyse	24
1.5.1	Hauptkomponentenanalyse - PCA (<i>principal component analysis</i>)	24
1.6	Aufgabenstellung	26
2	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1	Pflanzenmaterial	27
2.2	Probenvorbereitung und Lagerung	31
2.3	Analytische Arbeit	31
2.3.1	Geräte für die Vorbereitung der Extrakte	32
2.3.2	Chemikalien für die Vorbereitung der Extrakte - Lösungen	33
2.3.3	Vorbereitung der Lösungen für die Extraktion der Proteinfractionen	34
2.3.4	Vorbereitung der Extrakte und Extraktionsvorgang	34
2.3.5	Geräte zur Durchführung der chromatographischen Trennung	37
2.3.6	Chemikalien und Laufmittel für die HPLC	38
2.3.7	Arbeitsschritte am HPLC.....	40
2.3.8	Auswertung und Interpretation der Chromatogramme.....	40
2.4	Statistische Auswertung	41
2.4.1	Was macht die Hauptkomponentenanalyse - PCA (<i>principal component analysis</i>)?	43
2.4.2	Standardisierte Auswertung der PCA	43
2.4.3	PCA Algorithmen	44

3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	45
3.1	PCA - Ausschluss analytischer Einflüsse	45
3.2	PCA mit bereinigtem Probensatz (HPLC Säulen B-F)	49
3.2.1	Untersuchung des Standorteinflusses	49
3.2.2	Differenzierung der Subspezies <i>aestivum</i> , <i>spelta</i> , <i>macha</i> und deren Kreuzungen	49
3.2.3	Proben von den Versuchsstellen der AGES	53
4	ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG	58
5	LITERATURVERZEICHNIS	60
6	TABELLENVERZEICHNIS	68
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	69
8	ANHANG	71
8.1	Abbildungen	71
8.2	Publikation.....	72

Abkürzungen

AGES	Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
ALB	Albumine+Globuline
BOKU	Universität für Bodenkultur Wien
CE	<i>capillary electrophoresis</i>
GLI	Gliadine
GLU	Glutenine
GLI/GLU	Gliadin:Glutenin Verhältnis
He	Helium
HPCE	<i>high performance capillary electrophoresis</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HMW/HMW-GS	<i>high molecular weight glutenin subunits</i>
LC/MS	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LMW/LMW-GS	<i>low molecular weight glutenin subunits</i>
NIPALS	<i>non-linear iterative partial least squares</i>
NIR, NIRS	<i>near infrared spectroscopy</i>
PC	<i>principal component</i>
PCA	<i>principal component analysis</i>
RP-HPLC	<i>reversed phase-high performance liquid chromatography</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SVD	<i>singular value decomposition</i>

1 Einleitung

1.1 Dinkel

Die heilkundige Äbtissin Hildegard von Bingen schrieb im 12. Jahrhundert folgende Worte über Dinkel:

„Der Dinkel ist das beste Getreide, und er ist warm und fett und kräftig, und er ist milder als andere Getreidearten, und er bereitet dem der ihn ißt rechtes Fleisch und rechtes Blut, und er macht frohen Sinn und Freude im Gemüt des Menschen. Und wie auch immer die Menschen ihn essen, sei es in Brot, sei es in anderen Speisen, ist er gut und mild. Und wenn einer so krank ist, daß er vor Krankheit nicht essen kann, dann nimm die ganzen Körner des Dinkels und koche sie in Wasser, unter Beigabe von Fett oder Eidotter, so daß man ihn wegen des besseren Geschmacks gern essen kann, und gibt das dem Kranken zu essen, und es heilt ihn innerlich wie eine gute und gesunde Salbe“ (wiedergegeben nach Kling 1988).

1.1.1 Bedeutung und Verbreitung

In Österreich wurde im Jahr 2012 Dinkel (*Triticum aestivum* L. subsp. *spelta* (L.) Thell., kurz *T. spelta*) auf einer Fläche von 9062 ha angebaut, während Weichweizen (*Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum*, kurz *T. aestivum*) in der Winterform auf einer Fläche von 280 746 ha kultiviert wurde. Im Vergleich dazu lagen die Dinkelflächen 2006 bei 5855 ha und die des Weichweizens bei 256 436 ha (BMLFUW 2013). Innerhalb von sechs Jahren hat sich demzufolge die Anbaufläche von Dinkel um ca. 55% vergrößert, die Steigerung bei Weichweizen in der Winterform lag bei rund 10%. Das lässt auf eine steigende Bedeutung des Dinkels im Getreideanbau schließen. *T. spelta* wird fast ausschließlich als Winterdinkel angebaut und 80% bis 90% des Dinkels werden auf biologisch bewirtschafteten Betrieben kultiviert. In Österreich zählen Niederösterreich, Burgenland und Oberösterreich zu den Hauptanbauregionen des Dinkels (Miedaner & Longin 2012, AGES 2013).

Dinkel unterscheidet sich von Weichweizen anhand einiger Merkmale. Das Dinkelkorn ist bespelzt, es besitzt einen festen Spelzenschluss und eine Hüllspelze. Weichweizen hingegen ist freidreschend, das Erntegut (Korn) also frei von Spelz (Radic-Miele 2000, Rimbach et al. 2010).

Die fünf Dinkelsorten, welche derzeit in Österreich zum Anbau zugelassen sind, sind allesamt Bestandteil der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. Die Sorten Attergauer Dinkel, Ebners Rotkorn, Ostro und Steiners Roter Tiroler werden als traditionelle Sorten bezeichnet. Filderweiss ist als moderne Sorte gekennzeichnet, sprich ein Weizenelter wurde eingekreuzt und somit der Weichweizenanteil erhöht. Im Jahr 2012 wurde diese moderne Sorte österreichweit erstmals für den Anbau zugelassen (AGES 2013). Durch Kreuzungen mit *T. aestivum* sollen Standfestigkeit, Ertragspotential, sowie die backtechnischen Eigenschaften von *T. spelta* verbessert werden (Mayer et al. 2011). Vor allem in der Schweiz und in Österreich ist der Anbau von „reinen“ Dinkelsorten (ohne Einkreuzung von Weichweizen) zur Herstellung von Brot und Backwaren sehr gefragt (Miedaner & Longin 2012).

In den vergangenen 15 Jahren kam es bei Dinkel zu einer Wiederbelebung, da er zuvor schon beinahe gänzlich durch den Weichweizen verdrängt worden war (Wieser 2006, Mayer et al. 2011, AGES 2013).

Als Gründe für die Verdrängung nennen Wieser (2006), Mayer et al. (2011, 2012) und Lieberei et al. (2012) zum einen geringere Erträge, mangelnde Standfestigkeit (Wuchshöhe bis 1,60 m) und die dazugehörige Lageranfälligkeit des Dinkels. Zum anderen werden eine schwächere Backqualität aufgrund des höheren Gliadin/Glutenin-Verhältnisses und das Entspelzen, welches einen zusätzlichen Schritt in der Verarbeitung mit sich bringt, genannt.

Die eben erwähnte Renaissance des Dinkels, zum Teil als Nischenprodukt, könnte aufgrund der veränderten Wahrnehmung stattgefunden haben. Dinkel wird im Gegensatz zum modernen Weizen als gesünder, natürlicher und weniger züchterisch bearbeitet angesehen (Schober et al. 2006).

Wieser (2006) und Mayer et al. (2011) nennen weitere positive Eigenschaften des Dinkels wie hohes Stickstoffaneignungsvermögen, Anspruchslosigkeit und Robustheit. Das Vorhandensein vieler wertvoller Gene, wie zum Beispiel Resistenzgene gegenüber Krankheiten wie Gelbrost (*Puccinia striiformis*), Blattrost (*Puccinia recondita*) oder Gelbverzwergungsvirus (*Barley yellow dwarf virus*) machen den Dinkel auch als genetische Ressource interessant (Campbell 1997).

Die Bandbreite der Verwendung des Dinkels reicht von Flocken für Müsli über Backdinkel, die Teigwarenproduktion, die Biererzeugung (Dinkelmalz) und Grünkernproduktion bis hin zur Dinkelbrandherstellung, wobei der Backdinkel den größten Anteil einnimmt. Zur Herstellung von Grünkern wird der Dinkel von der späten Milchreife bis zur frühen Teigreife (40-50% Wassergehalt), sprich drei bis vier Wochen vor dem eigentlichen Erntetermin, geerntet. Danach werden die oliv-grün gefärbten Körner in Heißluftanlagen gedarrt und dann entspelzt. Produkte wie Suppen, Klöße oder Aufstriche können daraus hergestellt werden (Radic-Miehle 2000, AGES 2013).

Im Zuge des Aufschwungs von *T. spelta* wurde bei den KonsumentInnen auch das Interesse an alten Weizenprimitivformen wie Einkorn (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*, kurz *T. monococcum*) und Emmer (*Triticum turgidum* L. subsp. *dicoccum* (Schrank ex Schübler) Thell., kurz *T. dicoccum*) geweckt, da diese in modernen Züchtungsprogrammen nicht bearbeitet werden (Grausgruber et al. 2004a). Vor allem Dinkelbackwaren und andere Dinkel-Produkte (Dinkelreis, Zwieback, Flocken, Speisekleie) werden bei den VerbraucherInnen stets beliebter. Als Gründe dafür werden eine gute Bekömmlichkeit, Schmackhaftigkeit, eine gute Verträglichkeit bei Weizenallergien und somit auch ein erwarteter höherer gesundheitlicher Wert genannt (Schieberle et al. 2010, König et al. 2011 und Mayer et al. 2011).

Damit verbunden zeigen König et al. (2011) und Mayer et al. (2011) auf, dass für Dinkelprodukte, verglichen zum gleichen Weizen- oder Roggenprodukt, höhere Preise von den VerbraucherInnen in Kauf genommen werden. Deshalb ist die Möglichkeit zur genauen Unterscheidung der Produkte zum Schutz der KonsumentInnen wichtig, um Täuschungen zu vermeiden. Bedeutsam ist diese

Thematik auch für VerarbeiterInnen, zum Beispiel BäckerInnen, die sich vor falsch deklarierten Rohstoffen schützen können.

König et al. (2011) weisen auf Probleme in Deutschland hin, wo nicht die Weizeneinkreuzung, sondern die überhöhte Zumischung von Weizen zu Dinkel von Bedeutung ist. So nennt etwa Keil (2010) dazu ein Beispiel, wo Dinkelmehle offenbar undeklariert mit Weizenmehl gestreckt worden sind. Nach einer Marktsondierung zu Weizenbeimischungen in Dinkelmehlen wurden 25 Handelsproben getestet. Davon hatten 16 einen höheren Prozentsatz an Weizenmehl als in Deutschland erlaubt ist: maximaler Anteil von 10% Weizen und minimaler Anteil von 90% Dinkel (Münzing et al. 2009). Auch in Österreich werden Dinkelbackwaren meistens nicht aus reinem Dinkelmehl, sondern aus Mischmehlen von Dinkel und Weichweizen hergestellt. Im Österreichischen Lebensmittelbuch wird zum Beispiel von Dinkelbrot gesprochen, wenn das Dinkelmehl in der Mischung mindestens 60% des Gewichtes ausmacht (AGES 2013, BMG 2014). Auch werden ErzeugerInnen durch die Klarstellung der Dinkel- und Weizenanteile beeinflusst, da die höheren Herstellungskosten für die Produktion von Dinkelerzeugnissen durch die höheren Preise abgedeckt werden.

Auf die verschiedenen Inhaltsstoffe des Dinkels wird in diesem Absatz näher eingegangen. Ein hoher Gehalt an Asche, Kupfer, Eisen, Zink sowie Magnesium und Phosphor wurde in den Untersuchungen von Abdel-Aal et al. (1995), Grausgruber et al. (2004b) und Engert et al. (2011) in Dinkel analysiert, hingegen war der Gehalt an Folsäure bei Dinkel um 40% niedriger als bei Weizen. Grausgruber et al. (2004b) und Münzing et al. (2009) weisen darauf hin, dass Dinkel einen höheren Gelbpigmentgehalt als Weizen hat. Diese Pigmente stehen in Beziehung mit dem leicht nussigen, süßlichen Geschmack des Dinkels. Die gelbe Farbe ist im Kleber und in der Gebäckkrume zu erkennen und wird hauptsächlich durch das Carotinoid Lutein (Hauptpigment des Eidotters) gebildet. Dies ist ein sensibler sekundärer Pflanzenstoff, der eine antioxidative Wirkung besitzt. Deshalb ist eine schonende Verarbeitung von Bedeutung.

Den Carotinoiden (Carotine und Xanthophylle) werden diverse positive Wirkungen zugeschrieben: sie wirken als Antioxidantien, stimulieren die Immunabwehr, verringern die Häufigkeit lichtinduzierter Tumore, hemmen die Mutagenese und Tumorentwicklung und verhindern Zellkernschäden. α -, β -, γ -Carotin und Lycopin sind die wichtigsten Vertreter der Carotine. β -Cryptoxantin, Zeaxanthin, Violaxanthin und Lutein sind wichtige Vertreter der Xanthophylle (Jahn-Deesbach et al. 2004).

Abdel-Aal et al. (2007) und Kirchmaier et al. (2012) zeigten in ihren Untersuchungen, dass von den Weizenarten Einkorn die höchsten Gelbpigmentgehaltskonzentrationen besitzt. Bei Hartweizen wurden mittelhohe Gehalte und bei Brotweizen die niedrigsten Gehalte festgestellt. Somit ist *T. monococcum* eine wichtige genetische Ressource für Gelbpigmente.

1.1.2 Evolution und Domestikation

Laut Nesbitt & Samuel (1996) und Lev-Yadun et al. (2000) liegt die Wiege der Landwirtschaft aufgrund von botanischen, genetischen und archäologischen Beweisen zwischen den Flüssen Euphrat und Tigris. Diese Region wird als der „Fruchtbare Halbmond“ bezeichnet, der sich heute von Israel, Palästina, Libanon, Jordanien über das westliche Syrien, die südöstliche Türkei und den Irak bis zum westlichen Teil des Irans erstreckt (Sailer 2004) (Abbildung 1).

Die Entwicklung der Landwirtschaft begann nach der letzten Eiszeit vor ca. 12 000 bis 9500 Jahren. In der heutigen Südost-Türkei wurden Wildformen gefunden, die molekularbiologisch und zytogenetisch den sogenannten „Gründer-Pflanzen“ ähnlich sind (Kilian et al. 2009).

Diese Gründer-Pflanzen waren im Neolithikum gemeinsam im Areal des „Fruchtbaren Halbmondes“ vertreten und gelten als die ersten Pflanzen, die vom Menschen bewusst angebaut wurden (Tabelle 1). Noch heute kommen in diesem Gebiet natürliche Mischvegetationen vor, deren Bestand von Wildformen (Gerste und Weizen) gebildet wird (Geisler 1988, Zohary & Zopf 2012).

Aus archäologischen Funden ist zu schließen, dass der Spelzweizen in der späten Bronzezeit um 1000 v. Chr. in Mitteleuropa weit verbreitet war (Meyer 1993, Kling 2009). Dinkelreste in Deutschland, Polen und Dänemark sind aus der Kupfersteinzeit

und Bronzezeit (2500-1700 v. Chr.) dokumentiert (Konvalina & Grausgruber 2012) (Abbildung 2).

Dinkel war von der Bronzezeit bis zum Beginn des 20. Jahrhunderts in vielen Teilen Mitteleuropas von zentraler Bedeutung für die Landwirtschaft. Seine Vorteile gegenüber Weizen und Roggen in rauen Grenzlagen haben den Dinkel nicht ganz verschwinden lassen, obwohl er durch den ertragreicheren Weizen stark zurückgedrängt wurde. Verschiedene Eigenschaften wie Spätfrosttoleranz, Winterfestigkeit, Beständigkeit gegenüber Krankheiten und Schädlingen, geringere Ansprüche an Düngung und Bodenqualität, kann der Dinkel gegenüber Weizen und Roggen als Vorteil ausspielen (Körber-Grohne 1995, Miedaner & Longin 2012).

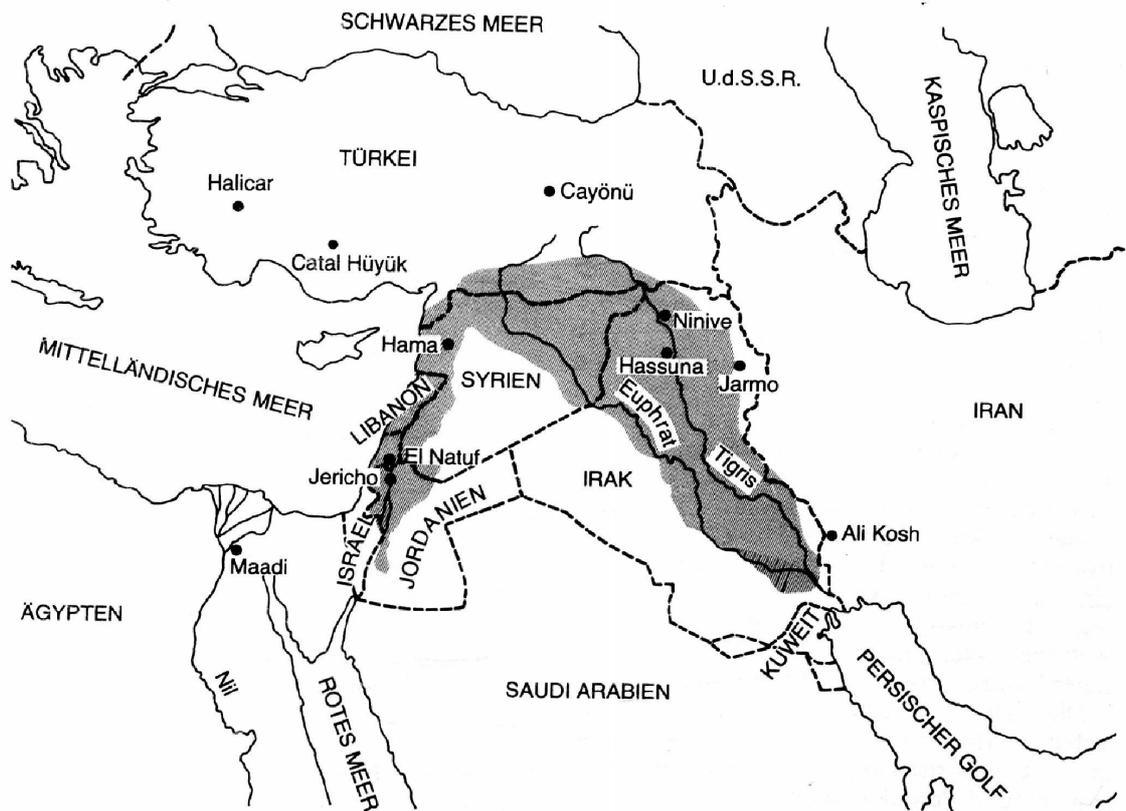


Abbildung 1: „Fruchtbarer Halbmond“ und Verbreitungsgebiete von Weizen-Wildarten im vorderasiatischen Raum (modifiziert nach Geisler 1988)

Tabelle 1: Die „Gründer-Pflanzen“ der neolithischen Revolution und deren Wildformen (modifiziert nach Kilian et al. 2009)

Name	Wildform	Domestizierte Form
Einkorn	<i>Triticum boeoticum</i>	<i>T. monococcum</i>
Emmer	<i>Triticum dicoccoides</i>	<i>T. dicoccum</i>
Roggen	<i>Secale vavilovii</i>	<i>S. cereale</i>
Gerste	<i>Hordeum spontaneum</i>	<i>H. vulgare</i>
Linse	<i>Lens orientalis</i>	<i>L. culinaris</i>
Erbse	<i>Pisum humile</i>	<i>P. sativum</i>
Kichererbse	<i>Cicer reticulatum</i>	<i>C. arietinum</i>
Linswicke	<i>Vicia ervilia</i>	<i>V. ervilia</i>
Flachs	<i>Linum bienne</i>	<i>L. usitatissimum</i>

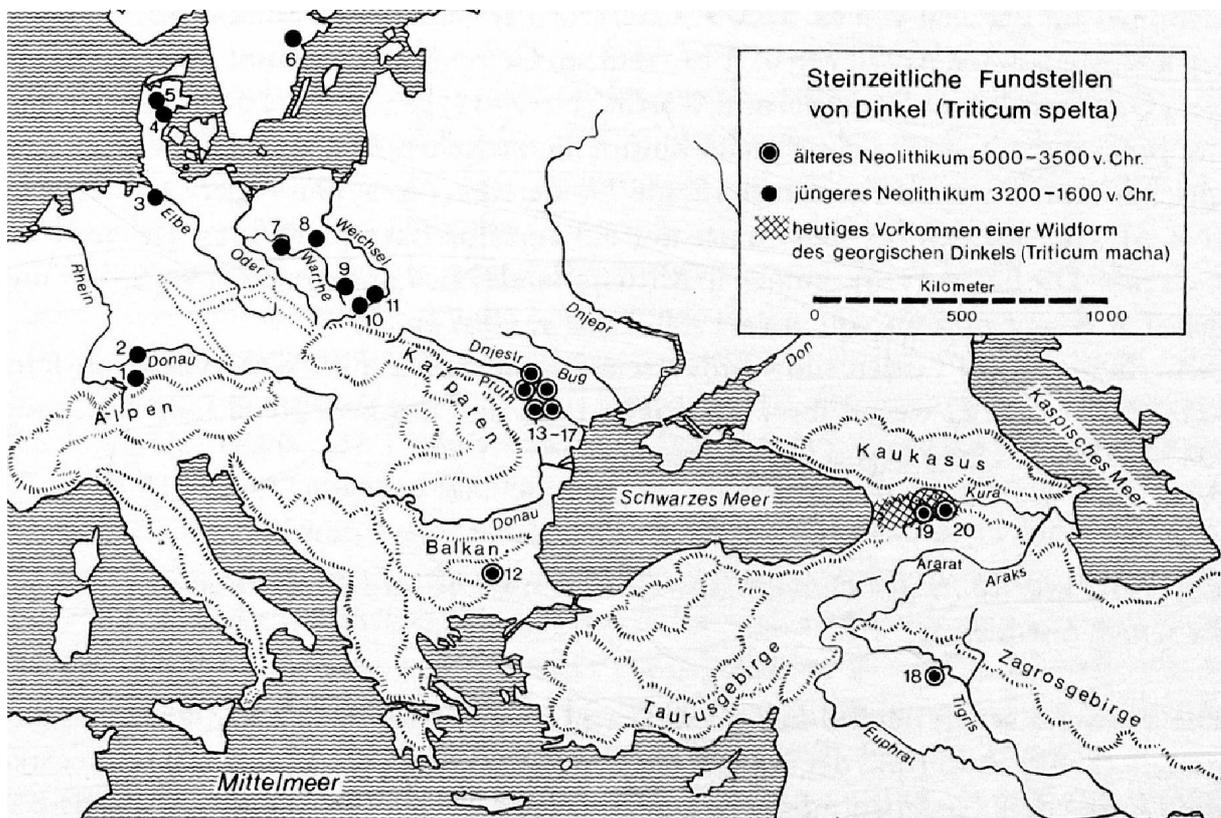


Abbildung 2: Älteste Fundstellen von Dinkel (*T. spelta*) aus der Jungsteinzeit in Europa und Asien (1-3 und 6 wurden als „wahrscheinlich Dinkel“ bezeichnet) (modifiziert nach Körber-Grohne 1995)

1.1.3 Zytogenetik

Die von Wildformen abstammenden Getreidearten gehören zur Familie der Gräser (*Poaceae*) (Belitz et al. 2008). Dinkel (*T. spelta*) und Weichweizen (*T. aestivum*) gehören zur Gattung *Triticum* (Abbildung 3).

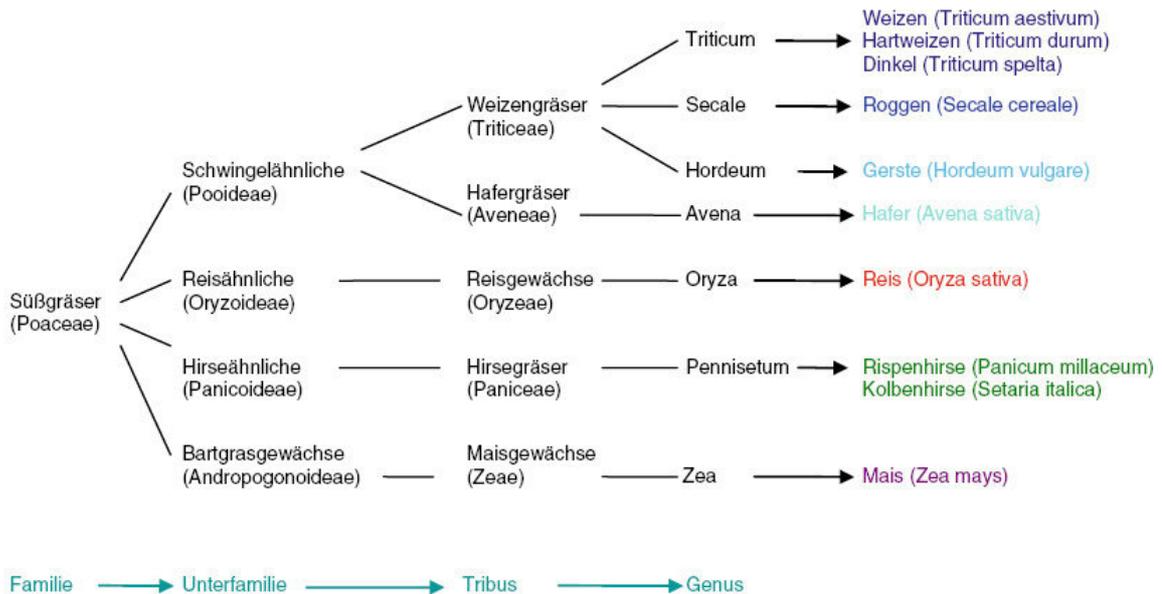


Abbildung 3: Phylogenie der Getreidearten und botanische Bezeichnung (nach Rimbach et al. 2010)

Aufgrund der Anzahl an Chromosomen können drei Hauptgruppen von *Triticum* unterschieden werden: diploid, tetraploid und hexaploid mit sieben, 14 und 21 Chromosomenpaaren (McFadden 1946).

Die Einkorn-Reihe (*T. monococcum*) ist diploid (AA) ($2n = 2x = 14$), die Emmer-Reihe (*T. dicoccum*) ist tetraploid (AABB) ($2n = 4x = 28$) und die Dinkel-Reihe (*T. spelta*) ist hexaploid (AABBDD) ($2n = 6x = 42$). Zur hexaploiden Form zählt auch der Weichweizen (*T. aestivum*) (Breiman & Graur 1995, Rimbach et al. 2010 und Miedaner & Longin 2012).

Bei den drei Getreidearten Dinkel, Einkorn und Emmer handelt es sich um Spelzgetreide, welche im Englischen als *hulled wheats* bezeichnet werden. Caballero et al. (2007) bezeichnen damit wilde oder kultivierte *Triticum* Spezies mit dem

Charakteristikum, dass nach dem Dreschen die Spelzen geschlossen am Korn anliegen. Beim Dreschvorgang zerbrechen die Ährenspindeln, die gesamte Ähre zerfällt in die einzelnen Ährchen. Die sich darin befindenden Körner sind mit den Spelzen ummantelt (Vesen), die eine gute Schutzfunktion für das Korn am Feld und bei der Lagerung haben (Nesbitt & Samuel 1996, Küster et al. 1999).

Zur Weiterverarbeitung werden die Vesen in den Mühlen durch einen sogenannten Gerbgang entspelzt (Körber & Grohne 1995, Münzing et al. 2009).

Konvalina & Grausgruber (2012) geben an, dass eine lange, lose Ähre typisch für den Dinkel ist. Die einzelnen Ährchen besitzen drei bis fünf Blütchen, welche später zwei bis drei Körner bilden. Bei den Dinkelsorten lassen sich begrannte und unbegrannte Formen unterscheiden, wobei Letzere häufiger auftreten (Abbildung 4).



Abbildung 4: Unbegrannte (links) und begrannte Form (rechts) von *T. spelta* (Virtueller Sortengarten Getreide, Institut für Pflanzenwissenschaften, ETH Zürich)

Eine bis jetzt noch ungeklärte Frage ist die Herkunft des hexaploiden *T. spelta* (McFadden 1946, Kilian et al. 2009). Dvorak et al. (1993) vermuten, dass die hexaploiden Sorten keine wilden Vorfahren haben. Generell werden Landsorten von

Dinkel in zwei Gruppen (europäische und asiatische) eingeteilt (Konvalina & Grausgruber 2012).

Blatter et al. (2002; 2004) nennen für den Ursprung des europäischen Dinkels zwei Hypothesen: (i) Der Dinkel entstand aus einer Kreuzung zwischen dem tetraploiden Emmer und einem nackten, hexaploiden Weizen; (ii) der europäische Dinkel ging aus einer Kreuzung (Hybridisierung) eines tetraploiden Weizens (*T. dicoccum* AABB) mit einem wilden *Ae. tauschii* (DD) hervor. Eine aktuellere Studie von Dvorak et al. (2012) bestätigt, dass europäischer Dinkel durch Hybridisierung von freidreschendem, hexaploidem Weizen mit tetraploidem Emmer entstanden ist. Die Abstammung des asiatischen Dinkels bleibt hingegen ungeklärt. Der georgische Spelzweizen (*T. aestivum* L. subsp. *macha* (Dekapr. & Menabde) MacKey, kurz *T. macha*) ist in Georgien heimisch und soll sich nach Dvorak & Luo (2001) aus der Segregation zwischen Weichweizen und wildem Emmer entwickelt haben.

1.2 Getreideproteine

Das Wort „Getreide“ kommt aus dem Mittelhochdeutschen (gitregidi) und bedeutet wörtlich „das, was getragen wird“. Damit gemeint sind die Körnerfrüchte von Gräsern. Zu den sieben Grundgetreidearten zählen: Weizen, Gerste, Roggen, Hafer, Reis, Mais und verschiedene Hirsen (Rimbach et al. 2010, Kluge & Mitzka 1960).

Die Qualität des Getreides wird zum Großteil durch den Genotyp (Sorte) und die Anbaubedingungen (Boden, Klima, Düngung) beeinflusst (Wieser & Kieffer 2001).

Das Getreidekorn, bestehend aus Nährgewebe (Endosperm) und Keimling (Embryo) wird von Frucht- und Samenschale umschlossen. Das Endosperm gliedert sich in den Mehlkörper (70-80%) und die Aleuronschicht. Letztere enthält Proteine, Fett, Enzyme und Vitamine (Belitz et al. 2008). Im Mehlkörper werden Stärkekörner, welche den Hauptanteil des Korns ausmachen, und Reserveproteine in Zellen gespeichert (Cheftel et al. 1992, Guzmán et al. 2010).

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Proteingruppen, welche von Thomas Burr Osborne, einem amerikanischen Biochemiker (1859-1929), nach ihrer Löslichkeit eingeteilt wurden (Rimbach et al. 2010).

Tabelle 2: Klassifizierung der Getreideproteine bei Weizen (modifiziert nach Cheftel et al. 1992)

Proteinfraktion	Weizenfraktion	Löslichkeitsmerkmale
Albumine		löslich in Salzlösungen, bleiben auch bei Dialyse gegen Wasser in Lösung
Globuline		löslich in Salzlösungen, fallen bei Dialyse gegen Wasser aus
Prolamine	Gliadin	löslich in wässrig-ethanolischen Lösungen mit hohem Ethanolgehalt (ca. 70%)
Gluteline	Glutenin	löslich in verdünnten Säuren (Essigsäure), Basen oder dissoziierenden Agenzien (Seifen, Harnstoff, Guanidin)
Hochmolekulare Gluteline		unlöslich in den vorherigen Lösungsmitteln

Die Proteingruppen **Albumine+Globuline** weisen oft enzymatische Aktivitäten auf und werden beim Backprozess denaturiert sowie aggregiert und sind für die Krumenbeschaffenheit verantwortlich (Cheftel et al. 1992). Albumin kommt in vielen Lebensmitteln wie Ei, Milch oder Getreide vor und ist mengenmäßig auch das Hauptprotein des Blutserums. Globuline hingegen sind in Pflanzen und Tieren sehr verbreitet (zum Beispiel Immunglobuline) und stellen wichtige Proteine für die Bewegung von Muskeln dar (Ebermann & Elmadfa 2011).

Viele Getreidearten tragen die Reserveproteine im Mehlkörper des Korns. 75-95% des Gesamtproteins des Weizens bestehen aus Gliadinen und Gluteninen, welche auch unter dem Begriff „**Gluten**“ zusammengefasst werden. Gluten (Kleber) ist eine kohäsive, viskoelastische Lipoproteinmatrix, frei von Stärke und entsteht eigentlich als Nebenprodukt bei der Isolation von Stärke aus Weizenmehl (Batey 2004). Kleber besteht aus ca. 90% Proteinen, 8% Lipiden und 2% Kohlenhydraten. In frisch isoliertem Kleber sind auch Enzyme vorhanden (Belitz et al. 2008). Rimbach et al. (2010) geben an, dass das Klebereiweiß im Endosperm überwiegend aus Gliadin (geringe Elastizität, hohe Dehnbarkeit) und Glutenin (hohe Elastizität, geringe Dehnbarkeit) gebildet wird und diese wiederum die Backfähigkeit des Mehls durch Quellvermögen und Zähigkeit beeinflussen.

Traditionell werden die Glutenproteine aufgrund ihrer Löslichkeit in Alkohol-Wasser-Lösungen (e.g. 60% Ethanol) in zwei Gruppen eingeteilt, die löslichen Gliadine und die unlöslichen Glutenine (Wieser 2000; 2007).

Gliadine sind für Viskosität und Dehnbarkeit des Teiges wichtig (Cheftel et al. 1992, Wieser 2007). Sie bestehen überwiegend aus monomeren Proteinen und unterteilen sich aufgrund ihres Molekulargewichts und ihrer Primärstruktur in α -, β -, γ - und ω - Gliadine (D'Ovidio & Masci 2004).

Glutenine sind elastisch und kohäsiv und somit für die Teigstabilität und Elastizität verantwortlich (Wieser 2007). Sie werden weitgehend über Disulfidbrücken polymerisiert, bilden im nativen Kleber ein unlösliches, quellbares Gerüst und bestehen aus mehreren Untereinheiten (Rimbach et al. 2010).

Glutenine, eingeteilt in hoch- (HMW-GS) und niedermolekulare Untereinheiten (LMW-GS), treten beim Weizen als Polymere auf. Durch Schwefelverbindungen zwischen den Polymeren werden diese Ketten stabilisiert (Shewry & Tatham 1997, Wieser et al. 1998). Reis, Mais und Hirse weisen keine Glutenine auf, jedoch sind diese bei Gerste und Roggen durchaus in kleineren Mengen vorhanden (Cheftel et al. 1992).

Im reifen Weizenkorn sind die HMW-Glutenine und γ -Gliadine in den inneren Schichten des Endosperms zu finden, während die LMW-Glutenine und ω - und α -Gliadine in der Subaleuronschicht vorkommen (Tosi et al. 2011).

Beide Fraktionen, Gliadine und Glutenine, sind für die rheologischen Eigenschaften des Teiges wichtig, ihre Funktionen sind jedoch verschieden. Ein ausgeglichenes Verhältnis beider Gruppen ist für die Qualität des Endproduktes ausschlaggebend (Wieser 2007). Das Kleberprotein ist plastisch-elastisch und kann bis zum Dreifachen seines Gewichtes an Wasser aufnehmen und ist deshalb für die Teigbildung essentiell (Körber-Grohne 1995). So sind sehr elastische Teige aus Weizenmehl für die Brotherstellung geeignet und dehnbare Teige werden für die Produktion von Kuchen und Keksen herangezogen (Shewry et al. 2002). Schober & Kuhn (1999) beschreiben, dass ein Großteil der alten Dinkelsorten einen besonders weichen und unelastischen Kleber beinhalten, deren Teige viskos und schmierig werden. Durch Weichweizeneinkreuzung soll diese Eigenschaft minimiert werden.

Die Kleberproteine des Weizens enthalten sehr wenig Lysin (ca. 1%) (Cheftel et al. 1992). Albumine+Globuline haben bei den essentiellen Aminosäuren Lysin und Methionin geringere bzw. höhere Prozentanteile.

Ranhotra et al. (1996) zeigen, dass ihre untersuchten Dinkelmehle unterschiedliche Werte der ersten limitierenden Aminosäure Lysin aufweisen. Diese reichen von 1,96 bis 3,96 g pro 100 g Protein. Durchschnittlich liegen sie mit 2,83 g Lysin über den Werten von Weichweizen.

1.3 Unverträglichkeit

Kasarda (2013) und Gilissen et al. (2014) weisen auf einen Anstieg der Allergien, Intoleranzen und Sensitivitäten gegenüber Getreide, besonders Weichweizen, in den letzten Jahren hin. Becker et al. (2008) und Belitz et al. (2008) geben eine kurze Zusammenfassung über die Unverträglichkeitsdefinitionen:

Weizenallergie: klassische Nahrungsmittelallergie (Typ I), ca. 50 auslösende Proteine sind bekannt. Auch „Bäckerasthma“ genannt.

Zöliakie: (syn. Glutenunverträglichkeit; glutensensitive Enteropathie; einheimische Sprue, *celiac disease*). Es kommt zu einer Autoimmunreaktion beim Genuss von Getreideproteinen (Gliadine). Diese kommen in Getreidearten wie Weizen, Dinkel, Emmer, Einkorn, Roggen und Gerste vor. Hier kommt es zu einem Gewebeschwund der Schleimhaut im Dünndarmbereich und in Folge zu einer schlechteren Absorption der aufgenommenen Nahrung. Symptome äußern sich durch Fettstuhl und chronischen Durchfall.

Weizenunverträglichkeit: allergieähnliche, meist verzögerte Intoleranzsymptome beim Genuss von Weizenprodukten. Diese können auch bei Dinkelprodukten auftreten, jedoch ist dies nicht medizinisch nachgewiesen. Die Betroffenen schildern keine oder schwächere Symptome beim Dinkelverzehr. Diesbezüglich fehlen derzeit wissenschaftliche Studien.

Schober (2001) weist darauf hin, dass der Begriff Weizenmehlallergie klar von Zöliakie, der Glutenintoleranz, unterschieden werden muss. Er berichtet weiter von Beispielen aus dem persönlichen Umfeld, wo es bei den betroffenen Personen durch den Austausch von Weizenmehl gegen Dinkelmehl zu einer Besserung der

Symptome der Weizenmehlallergie kommt. Jedoch wird der Dinkel keinesfalls immer vertragen, wenn eine Allergie gegen Weizen existiert.

Forssell & Wieser (1995) und Kasarda & D'Ovidio (1999) hingegen geben an, dass bei Zöliakie oder Weizenallergie der Dinkel generell keinen Ersatz für Weizenmehl darstellt, obwohl keine Untersuchungen über die Wirkung auf Personen mit Zöliakie vorliegen.

Vincentini et al. (2007) zeigen an menschlichen Zellkulturen von Dickdarm- und Krebszellen, dass bei Zöliakie-Erkrankten die Prolamine des Dinkels gesundheitsschädliche Folgen verursachen. Einkorn und Emmer zeigten keinen negativen Effekt auf die untersuchten Zellen.

In diesem Zusammenhang wird deutlich, wie weitreichend die gesundheitlichen Aspekte einer Einkreuzung von Weichweizen in Dinkel sein können. Als „reine“ Dinkel werden vor allem alte Sorten bezeichnet, da man hier von einer geringen Einkreuzung von Weichweizen ausgeht (Münzing et al. 2009).

In der Schweiz gibt es seit 2004 ein Klassifizierungssystem, in dem „reine“ Dinkel als Klasse A, „nicht reine“ Dinkel (Weizeneinkreuzung vorhanden) in Klasse B zugeordnet werden (Becker et al. 2008). Grund dafür ist die Absicherung der KonsumentInnen, die sich von den alten Dinkelsorten qualitativ und gesundheitlich bessere Eigenschaften erwarten.

Andere Getreidearten wie Reis, Mais oder Hirse können ohne Probleme konsumiert werden, da diese frei von Prolaminen, besonders den α -Gliadinen, sind (Forssell & Wieser 1995, Belitz et al. 2008). Als weitere alternative Getreideart wird Hafer von Gilissen et al. (2014) als guter Ersatz für Weizen, Roggen und Gerste angeführt, da dieser von empfindlichen Personen besser vertragen wird.

Rimbach et al. (2010) fassen zusammen, dass Dinkel wegen der guten Verträglichkeit teilweise von WeizenallergikerInnen konsumiert werden kann, wegen des Glutengehaltes aber für Zöliakieerkrankte nicht geeignet ist.

1.4 HPLC

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC, *high performance liquid chromatography*) handelt es sich um eine physikalisch-chemische Trennmethode. Chromatographisch bedeutet, dass es sich um ein mehrstufiges Trennsystem aus stationärer und mobiler Phase handelt (Schwedt 1995).

Das HPLC-Gerät umfasst vier Hauptteile (Pumpe, Einspritzsystem, Trennsäule und den Detektor mit Auswertesystem). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Umkehrphasen (RP, *reversed-phase*) HPLC eingesetzt. Dieses System unterscheidet sich von anderen Trennsystemen dadurch, dass die stationäre Phase unpolar (hydrophob) und die mobile Phase polar (hydrophil) ist. Die Proteine werden nach ihrer Polarität (=Wasserlöslichkeit) aufgetrennt und als Peaks („Bergspitzen“) dargestellt und entsprechend der Polarität ihrer Oberfläche aus der Säule eluiert. Durch die gute Trennleistung wird die RP-HPLC in der Praxis am häufigsten verwendet (Schwedt 1995).

Wie oben erwähnt, wurde bereits in den 1980er Jahren Weichweizen in Dinkelsorten eingekreuzt, um den noch nicht so intensiv züchterisch bearbeiteten Dinkel hinsichtlich Ertrag und Backeignung auf ein höheres Niveau zu bringen. Diese Zuchtformen können laut Belitz et al. (2008) und König et al. (2011) mittels HPLC-Verfahrens durch ein unterschiedliches Gliadinmuster erkannt werden. Auch Belitz et al. (1989) und Wieser (2000) beschreiben die RP-HPLC und SDS-PAGE als effiziente Methode um die Charakteristiken der Glutenproteintypen verschiedener Weizenarten zu unterscheiden.

Schober & Kuhn (2003) untersuchten die Gliadine von 27 europäischen Dinkeln mittels Kapillaronenelektrophorese (CE). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Kreuzung von Weizen mit Dinkel stattgefunden hat, es aber nicht zwangsläufig in den Gliadin-Grafiken dargestellt werden kann. Wrigley (2004) beschreibt die CE und RP-HPLC als Alternativen zur Gelelektrophorese, da die RP-HPLC es ermöglicht, die Fraktionen der Getreideproteine zu trennen und für die Sortenidentifizierung zu verwenden.

1.5 Multivariate Datenanalyse

Die multivariate Statistik wird verwendet, wenn an einem Objekt mehrere Messzahlen bestimmt werden. Durch eine gemeinsame Auswertung werden die Messzahlen (Variablen, Merkmale) gleichzeitig in die Berechnung miteinbezogen. Dies hat zur Folge, dass Kombinationseffekte wirksam werden und es zu einer besseren Trennung der Gruppen kommt, als wenn jede Variable einzeln analysiert wird (Linder & Berchtold 1982).

1.5.1 Hauptkomponentenanalyse - PCA (*principal component analysis*)

Die PCA ist ein multivariates Verfahren, mit welchem mehr als zwei Merkmale gleichzeitig untersucht werden können (Eckey et al. 2002).

Die PCA berechnet aus den Ausgangsdaten (Variablen) neue sogenannte „latente Variable“ oder Faktorenwerte in einem neuen Koordinatensystem, dessen Achsen - die sogenannten Hauptkomponenten (PC, *principal components*) oder Faktoren - sich nach der Richtung der stärksten Variabilität der Variablen ausrichten. Mathematisch gesehen sind diese Faktorenwerte eine Linearkombination der ursprünglichen Variablen. Die Faktorenladungen stellen den Bezug zwischen den ursprünglichen Variablen und den latenten Variablen bzw. Faktorenwerten her (Eckey et al. 2002, Kessler 2007).

Je mehr sich der Betrag der Faktorenladungen dem Wert 1 nähert, desto höher ist ihr Beitrag zur Erklärung der Gesamtstreuung. Der Bezug zwischen den ursprünglichen Variablen und den latenten Variablen kann auch durch die korrelierten Faktorenladungen (engl. *correlation loadings*) ausgedrückt werden. Hierbei wird die Korrelation zwischen diesen beiden Variablen berechnet. Die korrelierten Faktorenladungen werden weniger durch die Absolutwerte der betreffenden Variablen beeinflusst als die Faktorenladungen (engl. *loadings*). Die Faktorenwerte (engl. *scores*) sind die Koordinaten des Faktorenraums (Kessler 2007).

Die Aussagen, die man aus den Grafiken (*Plots*) von Faktorenladungen und korrelierten Faktorenladungen ziehen kann, ähneln sich zum Großteil sehr. Die Veranschaulichung ist in den Abbildungen der korrelierten Faktorenladungen höher, besonders wenn viele Originalvariable vorliegen. Bei den Faktorenladungen werden

die Korrelationen aufgrund der Darstellung oft nicht so deutlich hervorgehoben, sondern liegen eher versteckt. Deshalb ist es wichtig, beide Plot-Varianten zu vergleichen um festzustellen, ob dieselbe Interpretation erhalten wird (Kessler 2007).

Die Darstellung der Hauptkomponentenanalyse als Biplot ist eine der gängigsten Methoden, um die Daten darzustellen. Die PCA ordnet die Hauptkomponenten entsprechend des Informationsgehaltes, ausgedrückt durch die Variabilität der entsprechenden Komponente. Die Darstellung der beiden ersten Hauptkomponenten in der Ebene enthält auf diese Weise wesentlich mehr Information als jede weitere Hauptkomponente. Diese Methode ermöglicht es, wesentliche von unwesentlichen Variablen zu trennen und hilft Gruppierungen in den Daten zu erkennen (Linder & Berchtold 1982). Der Abstand zweier Punkte im Faktorenwert-Diagramm ist ein Maß für die Unterscheidbarkeit von zwei Proben in den beiden abgebildeten Hauptkomponenten (Manfred Werteker, persönliche Mitteilung).

Um Faktoren zu berechnen werden verschiedene Algorithmen zur Eigenwertberechnung der Hauptkomponenten beschrieben (Kessler 2007).

Der erste Algorithmus NIPALS steht für *non-linear iterative partial least squares algorithm*, der zweite Algorithmus, SVD, bedeutet *singular value decomposition* (Wold et al. 1987, Kessler 2007).

Für spektroskopische Daten wird vor allem der SVD Algorithmus verwendet (NIR-Spektren). Der NIPALS Algorithmus ist ein Näherungsverfahren zum Auffinden der ersten Eigenwerte der Kovarianzmatrix. Das Verfahren beginnt mit einer zufälligen Lösung und optimiert Schritt für Schritt, bis eine vorgegebene tolerierte Fehlerschwelle erreicht ist (Kessler 2007).

Wold et al. (1987) beschreiben den SVD Algorithmus als effizienter, wenn alle Hauptkomponenten (PCs) betrachtet werden, hingegen ist der NIPALS besser geeignet, wenn die ersten PCs in die Berechnung miteinbezogen werden.

Das erhaltene PCA Model wird mit der Rotationsmatrix R gedreht, um die Faktorenwerte und Faktorenladungen besser interpretieren zu können (Wold et al. 1987). Die Rotation ist von Bedeutung, da auf der X-Achse und der Y-Achse die Faktorenladungen aufgetragen werden. Die maximale erklärte Varianz (PC1) der zu

untersuchenden Variablen wird auf der X-Achse dargestellt, die Y-Achse (PC2) zeigt die durch Faktor 1 noch nicht erklärte Restvarianz (Eckey et al. 2002).

Als Gegenstück zur Rotation wurde die Varimax Methode herangezogen. Eckey et al. (2002) und Eckey & Kosfeld (2004) beschreiben die Varimax Methode als analytisches Verfahren, welche den Rotationswinkel bestimmt, um die Varianz der Ladungen zu maximieren und alle Variablen mit gleichem Gewicht zu analysieren. Dieses Verfahren tendiert dazu, Gruppenfaktoren zu erstellen, die mit bestimmten manifesten Variablen übereinstimmen.

Kurz zusammengefasst bedeutet das, dass „Varimax“ angegeben wird, wenn eine Drehung durchgeführt wird. Wenn keine Rotation stattfindet, wird „None“ angegeben.

1.6 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Methode zur Unterscheidung von Proben der Spezies *T. aestivum* und deren Subspezies – *spelta*, *macha* und *aestivum* – anhand ihrer Protein-Spektren zu entwickeln. Damit soll die Eignung der Methode zur Erkennung von:

- verschiedenen Weizenspezies
- Kreuzungen zwischen den genannten Subspezies

geprüft werden.

Die Proteinspektren der Proben werden durch Einsatz der HPLC analysiert, wobei alle löslichen Proteinfractionen Albumine+Globuline, Gliadine und Glutenine in die Untersuchung miteinbezogen und hinsichtlich ihres Beitrages zur Differenzierung der Subspezies beurteilt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenmaterial

Das verwendete Probenmaterial beinhaltete 121 Proben von unterschiedlichen Standorten und Erntejahren (Tabelle 3).

Die Getreideproben, welche von der AGES (Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH) bezogen wurden, sind von Herrn Dr. Werteker aus den Sortenwertprüfungen 2011 und 2012 ausgewählt worden. Es handelt sich dabei um zwei Standorte aus dem Erntejahr 2012 mit insgesamt 29 *T. aestivum* Sorten und fünf Versuchsstandorten aus dem Erntejahr 2011 mit je drei *T. aestivum* und sechs *T. spelta* Sorten (davon zwei Sorten mit bekannten *T. aestivum* Einkreuzungen).

Bei den weiteren Getreideproben handelt es sich um Dinkelproben und diverse Kreuzungen, die aus den Erntejahren 2006 bis 2012 stammen. Diese wurden von der Universität für Bodenkultur (BOKU), Abteilung Pflanzenzüchtung, zur Verfügung gestellt. Der Großteil der Proben wuchs auf den Feldern der Versuchswirtschaft Groß-Enzersdorf in Raasdorf (16°35'E, 48°13'N). Weiteres Untersuchungsmaterial aus Deutschland, der Schweiz und Italien wurde von Züchtern zur Verfügung gestellt und in die Analysen miteinbezogen, um möglichst viel verschiedenes genetisches Material abzudecken.

Die Arbeit im Zeitraum von September 2012 bis Februar 2013 gliederte sich in folgende Aufgaben:

- Vorbereitung der Proben durch Entspelzen und Reinigen
- Untersuchung der Getreideproben mittels HPLC
- Aufbereitung der analysierten Daten
- Statistische Analyse und Auswertung mittels Hauptkomponentenanalyse

Tabelle 3: Herkunft, Ernte und Artzugehörigkeit der Proben

No	Genotyp	Spezies ¹	Standort ²	Herkunft ³	Ernte
1	ENERGO	A	SCH, ZW	AGES(K)	2011
2	ARNOLD	A	SCH, ZW	AGES(K)	2011
3	CAPO	A	SCH, ZW	AGES(K)	2011
4	EBNERS ROTKORN	S	SCH, ZW	AGES(K)	2011
5	OSTRO	S	SCH, ZW	AGES(K)	2011
6	FILDERSTOLZ	SX	SCH, ZW	AGES(K)	2011
7	FILDERWEISS	SX	SCH, ZW	AGES(K)	2011
8	STEINERS ROTER TIROLER	S	SCH, ZW	AGES(K)	2011
9	ATTERGAUER DINKEL	S	SCH, ZW	AGES(K)	2011
10	ENERGO	A	SIT, HL	AGES(B)	2011
11	ARNOLD	A	SIT, HL	AGES(B)	2011
12	CAPO	A	SIT, HL	AGES(B)	2011
13	EBNERS ROTKORN	S	SIT, HL	AGES(B)	2011
14	OSTRO	S	SIT, HL	AGES(B)	2011
15	FILDERSTOLZ	SX	SIT, HL	AGES(B)	2011
16	FILDERWEISS	SX	SIT, HL	AGES(B)	2011
17	ATTERGAUER DINKEL	S	SIT, HL	AGES(B)	2011
18	STEINERS ROTER TIROLER	S	SIT, HL	AGES(B)	2011
19	ENERGO	A	STR, UU	AGES(B)	2011
20	ARNOLD	A	STR, UU	AGES(B)	2011
21	CAPO	A	STR, UU	AGES(B)	2011
22	EBNERS ROTKORN	S	STR, UU	AGES(B)	2011
23	OSTRO	S	STR, UU	AGES(B)	2011
24	FILDERSTOLZ	SX	STR, UU	AGES(B)	2011
25	FILDERWEISS	SX	STR, UU	AGES(B)	2011
26	STEINERS ROTER TIROLER	S	STR, UU	AGES(B)	2011
27	ATTERGAUER DINKEL	S	STR, UU	AGES(B)	2011
28	ENERGO	A	FR, FR	AGES(K)	2011
29	ARNOLD	A	FR, FR	AGES(K)	2011
30	CAPO	A	FR, FR	AGES(K)	2011
31	EBNERS ROTKORN	S	FR, FR	AGES(K)	2011
32	OSTRO	S	FR, FR	AGES(K)	2011
33	FILDERSTOLZ	SX	FR, FR	AGES(K)	2011
34	FILDERWEISS	SX	FR, FR	AGES(K)	2011
35	STEINERS ROTER TIROLER	S	FR, FR	AGES(K)	2011
36	ATTERGAUER DINKEL	S	FR, FR	AGES(K)	2011
37	ENERGO	A	LDF, MI	AGES(B)	2011
38	ARNOLD	A	LDF, MI	AGES(B)	2011
39	CAPO	A	LDF, MI	AGES(B)	2011
40	EBNERS ROTKORN	S	LDF, MI	AGES(B)	2011
41	OSTRO	S	LDF, MI	AGES(B)	2011

Tabelle 3: Fortsetzung

No	Genotyp	Spezies ¹	Standort ²	Herkunft ³	Ernte
42	FILDERSTOLZ	SX	LDF, MI	AGES(B)	2011
43	FILDERWEISS	SX	LDF, MI	AGES(B)	2011
44	STEINERS ROTER TIROLER	S	LDF, MI	AGES(B)	2011
45	ATTERGAUER DINKEL	S	LDF, MI	AGES(B)	2011
46	OTE/WDI	SX	RAO, GF	BOKU	2011
47	SKO/URD	S	RAO, GF	BOKU	2011
48	FRANCKENKORN	SX	PZO, DE	BOKU	2012
49	OTE/SKO	SX	RAO, GF	BOKU	2011
50	SCHWABENKORN	S	RAO, GF	BOKU	2006
51	BABENHAUSER ZUCHTVESEN	S	RAO, GF	BOKU	2012
52	OST/W27	SM	RAO, GF	BOKU	2012
53	SKO/W25	SM	RAO, GF	BOKU	2012
54	W27	M	RAO, GF	BOKU	2011
55	SRT/W26	SM	RAO, GF	BOKU	2011
56	URD/TRI1704	S	RAO, GF	BOKU	2011
57	OBERKULMER	S	RAO, GF	BOKU	2012
58	OST/W25	SM	RAO, GF	BOKU	2012
59	EBNERS SOMMERSPELZ	S	RAO, GF	BOKU	2012
60	SRT/W26	SM	RAO, GF	BOKU	2012
61	URD/TRI1704	S	RAO, GF	BOKU	2012
62	SRT/PI572912	SM	RAO, GF	BOKU	2012
63	SKO/URD	S	RAO, GF	BOKU	2012
64	ALKOR	SX	GZPK, CH	BOKU	2012
65	ZÜRCHER OBERLÄNDER ROTKORN	SX	GZPK, CH	BOKU	2012
66	TITAN	S	GZPK, CH	BOKU	2012
67	TAURO	S	GZPK, CH	BOKU	2012
68	SAMIR	SX	GZPK, CH	BOKU	2012
69	DIVIMAR	SX	SDF, DE	BOKU	2012
70	W31	M	Wien, W	BOKU	2009
71	ZOLLERN SPELZ	SX	SU, DE	BOKU	2012
72	GUISEPPE	SX	FOGGIA, IT	BOKU	2012
73	BENEDETTO	SX	FOGGIA, IT	BOKU	2012
74	W26	M	Wien, W	BOKU	2008
75	SCHWABENKORN	S	PZO, DE	BOKU	2012
76	BADENGOLD	SX	ZG RFS, DE	BOKU	2012
77	PIETRO	SX	FOGGIA, IT	BOKU	2012
78	BADENKRONE	SX	PZO, DE	BOKU	2012
79	BADENSTERN	SX	PZO, DE	BOKU	2012
80	ALTGOLD	S	RAO, GF	BOKU	2012
81	TRI 1704	S	RAO, GF	BOKU	2012
82	ERK/W27	SM	RAO, GF	BOKU	2012

Tabelle 3: Fortsetzung

No	Genotyp	Spezies ¹	Standort ²	Herkunft ³	Ernte
83	ORK/PI572912	SM	RAO, GF	BOKU	2012
84	FILDERSTOLZ	SX	PZO, DE	BOKU	2012
85	BADENKRONE	SX	PZO, DE	BOKU	2012
86	EPEAUTRE NOIR	S	RAO, GF	BOKU	2012
87	ERK/W25	SM	RAO, GF	BOKU	2012
88	URDINKEL	S	RAO, GF	BOKU	2012
89	PI572910	M	RAO, GF	BOKU	2010
90	SKO/W25	SM	RAO, GF	BOKU	2011
91	ORK/PI572912	SM	RAO, GF	BOKU	2011
92	W25	M	RAO, GF	BOKU	2011
93	ENERGO	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
94	INDIGO	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
95	SZD 5201	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
96	ANTONIUS	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
97	ARNOLD	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
98	CAPO	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
99	LUKULLUS	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
100	PIRENEO	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
101	SZD8640	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
102	SZD1397	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
103	SZD9708	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
104	SZD8035	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
105	SZD9797	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
106	SZD375	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
107	SE770/09 WW	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
108	DONNATO	A	LAM, WL	AGES(B)	2012
109	ENERGO	A	OSB, GF	AGES(B)	2012
110	INDIGO	A	OSB, GF	AGES(B)	2012
111	SZD5021	A	OSB, GF	AGES(B)	2012
112	ANTONIUS	A	OSB, GF	AGES(B)	2012
113	ARNOLD	A	OSB, GF	AGES(B)	2012
114	CAPO	A	OSB, GF	AGES(B)	2012
115	LUKULLUS	A	OSB, GF	AGES(B)	2012
116	PIRENEO	A	OSB, GF	AGES(B)	2012
117	SZD8640	A	OSB, GF	AGES(B)	2012
118	SZD9708	A	OSB, GF	AGES(B)	2012
119	SZD9797	A	OSB, GF	AGES(B)	2012
120	SE770/09WW	A	OSB, GF	AGES(B)	2012
121	DONNATO	A	OSB, GF	AGES(B)	2012

¹ A, *T. aestivum*; M, *T. macha*; S, *T. spelta*; SM, Kreuzung *T. spelta* × *T. macha*; SX, *T. spelta* mit bekannten Weichweizen-Einkreuzungen

² Bezirke: WL, Wels-Land; ZW, Zwettl; HL, Hollabrunn; FR, Freistadt; MI, Mistelbach; GF, Gänserndorf; UU, Urfahr Umgebung; Orte: RAO, Raasdorf Bio; PZO, Pflanzenzucht Oberlumpurg; LDF, Loosdorf; OSB, Obersiebenbrunn; LAM, Lambach; SCH, Schönfeld; STR, Steyregg; SIT, Sitzendorf; SU, Saatenunion Deutschland; SDF, Schöndorf; W, Wien; Land: IT, Italien; CH, Schweiz; DE, Deutschland

³ K, konventioneller Anbau; B, biologischer Anbau

2.2 Probenvorbereitung und Lagerung

Die zum Teil noch bespelzten Proben wurden für die weiteren Untersuchungen vorbereitet. Die Proben wurden mit einem Fliehkraftschäler (Heger GmbH & Co. KG, Herrenberg, Deutschland) entspelzt und in einem weiteren Schritt mit dem Saugluft-Stufensichter Pelz T3 (Baumann Saatzuchtbedarf, Waldenburg, Deutschland) von loser Spelze und Bruchgetreide gesäubert.

Die Siebmaschine Röber S Typ Mini Petkus (Baumann Saatzuchtbedarf, Waldenburg, Deutschland) trennte die Proben durch zwei Schlitzlochsiebe (Schlitzbreite: 3,5 mm und 1,8 mm) und anschließenden Trieur in die Fraktionen bespelzte Körner, Bruchgetreide und ganze Körner (Abbildung 5). Letztere wurden in Säcke gefüllt, nummeriert und beschriftet.

Die Proben der AGES stammen aus der Wertprüfung und wurden bereits im entspelzten und gereinigten Zustand zur Verfügung gestellt. Die fertigen Proben wurden in Papiersäcken bei 10°C und 50% relativer Luftfeuchtigkeit in den Kühlräumen der AGES gelagert.

2.3 Analytische Arbeit

Die drei verschiedenen Osborne-Fraktionen (Albumine+Globuline als Sammelfraktion, Gliadine und Glutenine) wurden nacheinander aus den Weizen- und Dinkelmehlen nach einer modifizierten Methode von Wieser et al. (1998) extrahiert.

Da diese Proteinfractionen unterschiedliche Löslichkeitseigenschaften aufweisen, konnten sie mit drei definierten Lösungsmitteln aus dem Schrot abgetrennt werden. Im Labor wurden die Extrakte nach der Vorschrift von Wieser et al. (1998) hergestellt, um danach für die Analyse mittels HPLC zur Verfügung zu stehen.



Abbildung 5: Saugluft-Stufensichter zur Trennung von Korn und Spreu (links), Siebmaschine zur Fraktionierung nach Korngröße (rechts)

2.3.1 Geräte für die Vorbereitung der Extrakte

- Analysenwaage AT 200, Unterteilung 0,0001 g (Mettler Toledo, Wien, Österreich)
- Kaffeemühle MKM 6000, Typ: KM 13 (Bosch, Stuttgart, Deutschland)
- Magnetrührer MINI-MR (Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Deutschland)
- Membranfilter 0,45 µm Chromafil® PET-45/15 MS (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland)
- Minishaker VXA, IKA-VIBRAX-VXR (Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Deutschland) mit VXA-Aufsatz Typ VX2 (Janke & Kunkel GmbH, Staufen, Deutschland)
- pH-Meter, pH 330, (WTW, Weilheim, Deutschland)
- Pipetten, diverse verstellbare Pipetten (Eppendorfer, Hamburg, Deutschland)
- Samplerfläschchen 2 ml (Part Number 5181-3375, Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Trockenschrank 1811530000202 (WTB binder, Tuttlingen, Deutschland)

- Verschiedene Bechergläser, Spritzen, Pipetten, Epruvetten, Messkolben und Zentrifugenröhrchen
- Vortex Ultraturax MS1-Minishaker (IKA Works, Staufen, Deutschland)
- Wasseraufbereitungssystem Milli-Q Advantage A10 (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)
- Zentrifuge Megafuge 2.0 (Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland)

2.3.2 Chemikalien für die Vorbereitung der Extrakte - Lösungen

- DL-Dithioerythritol - DTE (Ultra PureGrade, Best. Nr. 0425-5G, Amresco®, Ohio, USA)
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Best. Nr. 1.06579.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol - $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (Best. Nr. 1.00983.2500, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Harnstoff - $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (Best. Nr. 1.08487.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Kaliumdihydrogenphosphat - KH_2PO_4 (Best. Nr. 1.04873.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumchlorid - NaCl (Best. Nr. 1.06404.5000, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumhydroxid Plätzchen - NaOH (Best. Nr. 6498 500g, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Salzsäure 25% - HCl (Best. Nr. 1.00316.2500, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Stärke löslich (Best. Nr. 1.01252 250, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Stickstoff ECD - N_2 (UN 1066, Einecs Nr. 231-783-9, CASNr 07727-37-9, Messer Austria, Gumpoldskirchen, Österreich)
- Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan - $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ (Best. Nr. 1.08382.0500, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 1-Propanol - $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ (Best. Nr. 1.00997.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.3.3 Vorbereitung der Lösungen für die Extraktion der Proteinfractionen

Lösung A:

0,4 mol/L NaCl + 0,067 mol/L HKNaPO₄ (pH 7,6)

0,067 mol Na₂HPO₄/l entsprechen 23,995 g/L

0,067 mol KH₂PO₄/l entsprechen 9,118 g/L

0,4 mol NaCl/l entsprechen 23,376 g/L

Herstellung der HKNaPO₄ Lösung:

23,995 g Na₂HPO₄ und 9,118 g KH₂PO₄ wurden in bidestilliertem Wasser aufgelöst. Danach erfolgte eine langsame Zugabe von 2 N NaOH, bis der pH-Wert 7,6 erreicht wurde.

Als letzten Schritt wurde 23,376 g NaCl in der HKNaPO₄ Lösung aufgelöst und mit entionisiertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Lösung B:

60% (v/v) Ethanol

400 ml bidestilliertes Wasser wurden mit 600 ml 99,9%iger Ethanollösung vermischt.

Lösung C:

25 ml bidestilliertes Wasser wurden mit 12,012 g Harnstoff und 0,6057 g TRIS - Tris(hydroxymethyl)aminomethan vermischt. Durch die Zugabe von HCl (12%) wurde ein pH-Wert von 7,5 erreicht. Nach dem Beifügen von 50 ml 1-Propanol wurde die Lösung mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Durch die Lösung wurde 15 min lang Stickstoff geleitet und 1 g DTE (Dithioerythritol) zugegeben und aufgelöst.

Die drei Lösungen wurden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.3.4 Vorbereitung der Extrakte und Extraktionsvorgang

Die Getreideproben wurden aus den Probensäcken im Lager gezogen und einzeln kontrolliert. Verunreinigungen durch Spelzen oder Fremdkörper (Steine, Unkrautsamen) wurden von Hand entfernt und die gesamte Probe danach nochmals visuell geprüft. Im nächsten Schritt wurden die Körner für eine Minute mit der

Kaffeemühle (Abbildung 6) vermahlen. Das Mehl wurde in Metallschälchen gegeben und mit einem Deckel verschlossen.

Jede der 121 Proben wurde in Doppelbestimmung eingewogen und analysiert (Abbildung 6). Aus den Parallelbestimmungen wurde der Mittelwert errechnet, dieser wurde für die weitere Berechnung verwendet.



Abbildung 6: Kaffeemühle mit der zu vermahlenden Probe (links), sowie Waage mit Probenröhrchen und Mehlschalen (rechts)

Mit einem Spatel wurde vom Mehl eine Einwaage von 0,09 g bis 0,11 g in eine Epruvette überführt. In jedes Röhrchen wurde in etwa dieselbe Menge an löslicher Stärke eingewogen. Dieser Schritt wich von der ursprünglichen Beschreibung (Wieser et al. 1998) ab und hatte den Zweck, den im Mehl enthaltenen Kleber löslicher zu machen. Damit sollte einer Bildung von Kleberballen in den Epruvetten entgegen gewirkt werden.

Die Extraktion der Proteinfractionen aus den Mehlproben wurde, wie folgt, der Reihe nach durchgeführt:

1. **Albumine+Globuline:** Dem Probenröhrchen wurde 1 ml der Lösung A zugegeben, mit dem Vortex Ultraturax bei 2200 U/min für 15 s geschüttelt, weiter mit dem Minishaker VXA (1400 U/min) für 10 min geschüttelt und anschließend mit der Megafuge 2.0 bei 6000 U/min für 15 min zentrifugiert. Die klare Flüssigkeit über den Rückständen wurde in ein anderes Röhrchen transferiert und der gesamte Vorgang zweimal wiederholt. Die klaren

Überstände der Probe wurden gesammelt und mit einem 0,45 µm Polyester-Membranfilter in die Samplerfläschchen filtriert.

2. **Gliadine:** Die Niederschläge im Röhrchen wurden in 0,5 ml Lösung B bei 2200 U/min für 15 s auf dem Vortex Ultraturax suspendiert. Danach mit dem Minishaker VXA (1400 U/min) für 10 min geschüttelt und für 20 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt und die klaren Überstände in ein Röhrchen dekantiert. Danach wurden weitere 0,5 ml von Lösung B zugegeben und über den bereits genannten Membranfilter in die Probenfläschchen filtriert.

3. **Glutenine:** Die Rückstände in den Epruvetten wurden mit 1 ml Lösung C versetzt und mit einem Glasstab aufgelockert. Für 30 s wurde Stickstoff eingeleitet um den Sauerstoff aus der Probe zu entfernen. Die mit Aluminiumfolie verschlossenen Röhrchen wurden im Vortex Ultraturax bei 2200 U/min für 10 s geschüttelt und später auf den Minishaker VXA (1400 U/min) gegeben. Der gesamte Shaker wurde in den Trockenschrank gestellt und dort für 20 min bei 60°C belassen. Darauffolgend wurden die Epruvetten 20 min lang in der Megafuge bei 6000 U/min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt, bevor alle klaren Überstände gesammelt durch einen 0,45 µm Polyester-Membranfilter geklärt in die Probenfläschchen überführt wurden (Abbildung 7).

Die in den Fläschchen gesammelten Extrakte wurden nun für die chromatographische Trennung in die RP-HPLC gegeben.

Dieser beschriebene Ablauf, vom Vermahlen der Proben bis zur Analyse in der HPLC, dauerte etwa sechs Stunden und 30 min. In diesem Zeitraum konnten vier Getreideproben zu je zwei Wiederholungen in den Fraktionen Albumin+Globulin, Gliadin und Glutenin analysiert werden.

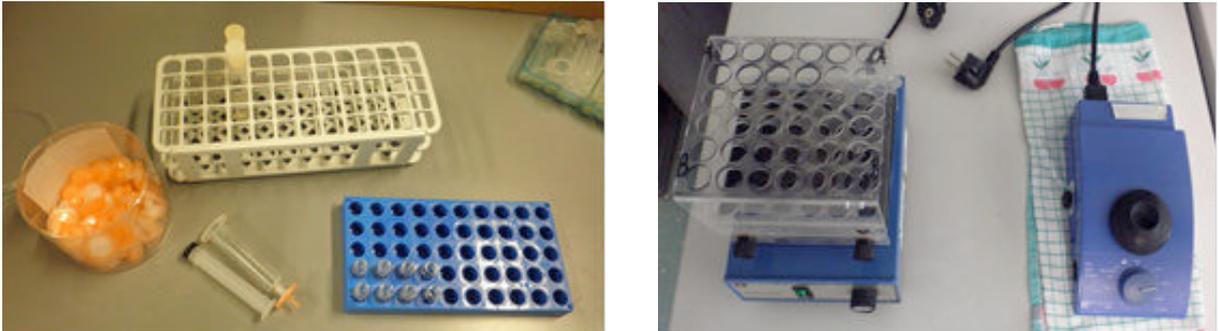


Abbildung 7: Membranfilter, blaues Rack mit Samplerfläschchen (links), Minishaker VXA und Vortex Ultraturax zum Vermischen der Proben (rechts)

2.3.5 Geräte zur Durchführung der chromatographischen Trennung

Neben der HPLC sind weitere Geräte für die Durchführung und Auswertung notwendig:

- Wasseraufbereitungssystem Milli-Q Advantage A10 (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)
- PC Compaq Deskpro XL 466 (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) mit der Computersoftware D-7000 HSM
- Bildschirm Acer 1715 (Acer Inc., Taipei, Taiwan)
- Drucker HP 1600C Deskjet (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA)

Die im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellte RP-HPLC ist ein La Chrom Chromatographie System (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) bestehend aus folgenden Teilen:

- D-7000 Interface
- Degasser (Unit No. 655-0568, Serial No. 0616-008)
- L-7400 UV Detector
- L-7300 Column Oven
- L-7250 Autosampler
- L-7100 Pump
- Säule: HPLC Trennsäule - EC 250/4 Nucleosil 300-5 C8 (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland)
- Vorsäule: CC 8/4 Nucleosil 300-5 C8 (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)

Tabelle 4 zeigt die verwendeten Vorsäulen und Säulen, die während der Arbeit an der HPLC genutzt wurden. Säule A war zu Beginn der Arbeit bereits im Gerät, die genaue Anzahl der Proben, welche vor Beginn der Arbeit analysiert wurden, ist nicht bekannt. In weiterer Folge wurden die Säulen gewechselt, sobald die Referenzpeaks nicht mehr eindeutig getrennt wurden.

Unter der Spalte „Proben“ ist die Anzahl der Getreideproben, die jeweils auf Albumine+Globuline, Gliadine und Glutenine untersucht wurden, angeführt. Die Spalte „Gesamte Anzahl“ bezeichnet die Anzahl der daraus resultierenden Geräteläufe.

Tabelle 4: Lebensdauer und Probenanzahl der Säulen

HPLC Säule	Verweildauer Säule	Proben	Gesamte Anzahl
A	bis 3.10.2012	16	96
B	04.10. - 12.11.2012	39	234
C	13.11. - 23.11.2012	17	102
D	27.11. - 10.12.2012	22	132
E	11.12. - 15.01.2013	19	114
F	16.01. - 21.01.2013	8	48
Summe		121	726

2.3.6 Chemikalien und Laufmittel für die HPLC

- Acetonitril - C_2H_3N (Best. Nr. 1.00030.2500, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Bidestilliertes Wasser
- Helium - He (UN 1046, Einecs Nr. 231-168-5, CASNr 07440-59-7, Messer Austria, Gumpoldskirchen, Österreich)
- Methanol - CH_4O - *gradient grade for liquid chromatography* (Best. Nr. 1.06007.2500, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Trifluoressigsäure - $C_2HF_3O_2$ - *TFA for protein sequence analysis* (Best. Nr. 91700, Sigma Aldrich, Wien, Österreich)

Laufmittel A: 0,1%v/v Trifluoressigsäure in bidestilliertem Wasser

Herstellung: zu 2 l bidestilliertem Wasser wurden 2 ml Trifluoressigsäure gegeben und gut vermischt.

Laufmittel B: 0,1%v/v Trifluoressigsäure in Acetonitril

Herstellung: 2,5 ml TFA wurden zu 2,5 l Acetonitril pipettiert und geschüttelt.

In Tabelle 5 wird die Einspritzmenge angezeigt, die aus dem Samplerfläschchen mit der zu prüfenden Lösung entnommen wurde. Dieses Volumen wurde in der HPLC unter vorheriger Reinigung der Probengeberschleife analysiert. Vor und nach jeder Probenentnahme aus den Fläschchen wurden aus Laufmittel B (0,1% TFA) 500 µL entnommen, um die Trennschärfe zu erhöhen.

Vor jedem Wechsel auf eine der drei Proteingruppen (Albumine+Globuline, Gliadine, Glutenine) wurde ein Gradient gefahren.

Tabelle 5: HPLC Einstellungen zur Analyse der verschiedenen Proteine

	Albumine+Globuline	Gliadine	Glutenine
Injektionsvolumen	200 µL	80 µL	150 µL
Laufzeit	35 min	45 min	45 min
Durchflussrate	1 mL/min		
Ofentemperatur	50°C		
Probengeberschleife	2 ml		
Detektor	210 nm		
Binärer Gradient (Albumine+Globuline)	Linearer Verlauf 0-20 min 0 min: 20% Lösungsmittel B, 80% Lösungsmittel A 20 min: 60% Lösungsmittel B, 40% Lösungsmittel A 20-25 min: 90% Lösungsmittel B, 10% Lösungsmittel A 25-35 min: 20% Lösungsmittel B, 80% Lösungsmittel A		
Binärer Gradient (Gliadine, Glutenine)	Linearer Verlauf 0-30 min 0 min: 28% Lösungsmittel B, 72% Lösungsmittel A 30 min: 56% Lösungsmittel B, 44% Lösungsmittel A 30-35 min: 90% Lösungsmittel B, 10% Lösungsmittel A 35-45 min: 28% Lösungsmittel B, 72% Lösungsmittel A		

2.3.7 Arbeitsschritte am HPLC

Die Laufmittel A, B und Methanol wurden an die HPLC-Anlage angeschlossen. Für 20 min wurde He in die Vorratsflaschen eingeleitet, um die Laufmittel zu entgasen, bevor die Reinigung der Pumpe, der Leitungen und der Trennsäule erfolgte. Bei diesem Arbeitsschritt wurden die Luftbläschen aus dem System entfernt, damit es zu keinen Problemen bei der chromatographischen Trennung kommt. Als nächstes wurden Rechner und Gerätesoftware gestartet und die entsprechende Methode geladen. Die Probenamen wurden in den *sample table* eingetragen und die Fläschchen in ein Rack gestellt (Abbildung 8). Vor der Analyse der Proben im Autosampler wurde mindestens ein Gradient im Leerlauf mit dem System gefahren.

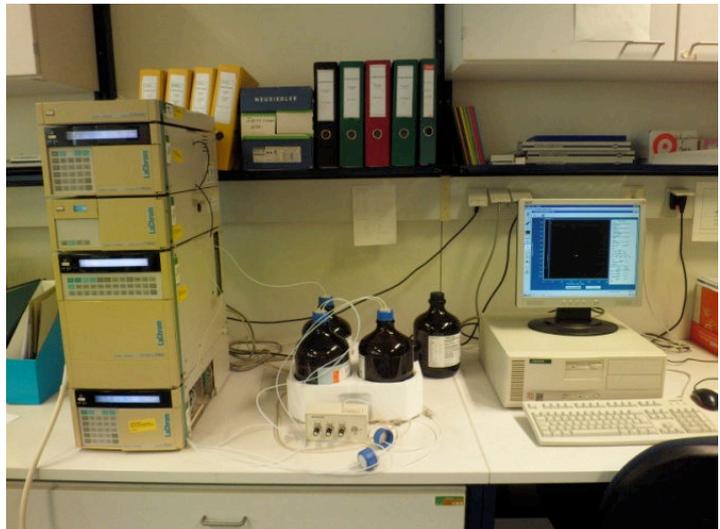
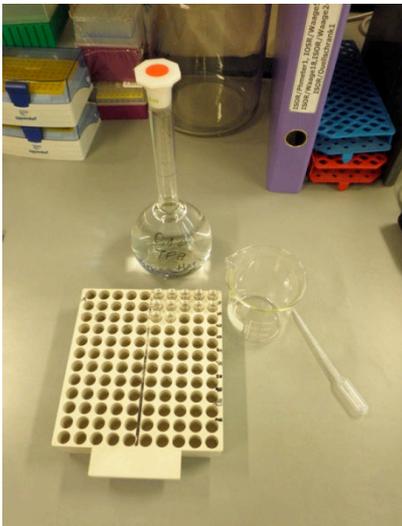


Abbildung 8: Rack für Probenfläschchen (links), HPLC Station mit PC (rechts)

2.3.8 Auswertung und Interpretation der Chromatogramme

Die Chromatogramme wurden nach der Korrektur der Basislinie ausgedruckt. Die Basislinie wurde manuell als durchgehende Gerade zwischen definierten Punkten nach dem Lösungsmittel-Peak und nach dem letzten auswertbaren Peak gezogen. Die Peaks jeder Fraktion (Albumine+Globuline, Gliadine und Glutenine) wurden ab dem ersten reproduzierbar darstellbaren Peak durchnummeriert. War die Zuordnung von Peaks z.B. durch geringfügige Laufzeitunterschiede oder mangelhafte Auflösung an den Peak-Flanken zweifelhaft, wurde auf die nächst gelegenen, durch Größe oder

Lage besonders charakteristischen Peaks, die in allen Chromatogrammen der Fraktion zu finden waren, Bezug genommen.

Bei den Albuminen+Globulinen wurden 15 Peaks, bei den Gliadinen 34 und bei den Gluteninen 33 Peaks ausgewertet.

Die drei folgenden Chromatogramme (Abbildung 9) weisen alle in den untersuchten Proben gefundenen Peaks auf und dienen durch Anzeige der Nummerierung der auffälligsten Peaks der Orientierung bezüglich der Zuordnung der Peaks in den Auswertungen. Weitere Peaks, die in die Berechnung miteinbezogen wurden, sind zur Erhöhung der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Die Zugehörigkeit zu den Fraktionen wurde durch entsprechende Präfixe (ALB für Albumin+Globulin, GLI für Gliadin und GLU für Glutenin) in den statistischen Auswertungen und Grafiken gekennzeichnet.

Die in Abbildung 9 dargestellten Chromatogramme stammen von No. 22 aus Tabelle 3 (Ebners Rotkorn, Standort Steyregg, Oberösterreich).

2.4 Statistische Auswertung

Verwendete Programme:

- MS Excel 2010
- Unscrambler® Version 10.2 (Camo, Oslo, Norwegen)

Die Messzahlen der vorliegenden Untersuchungen mittels HPLC waren die in den Chromatogrammen gemessenen relativen Flächen (*area*) unterhalb der Peaks. Diese wurden als Zahl dargestellt. Die *area* wurde händisch in ein Excel-File unter der entsprechenden Peaknummer eingetragen. Unter der Peaknummer wurde auch die durchschnittliche Laufzeit vermerkt.

Die Flächen der auszuwertenden Peaks wurden aufsummiert und die einzelnen Flächen als Prozent der Gesamtfläche ausgedrückt. Dadurch war ein Einfluss der extrahierten Proteinmenge auf die peak-spezifische Auswertung ausgeschlossen. Die Absolutwerte wurden nur zur Berechnung des Gliadin/Glutenin-Verhältnisses herangezogen.

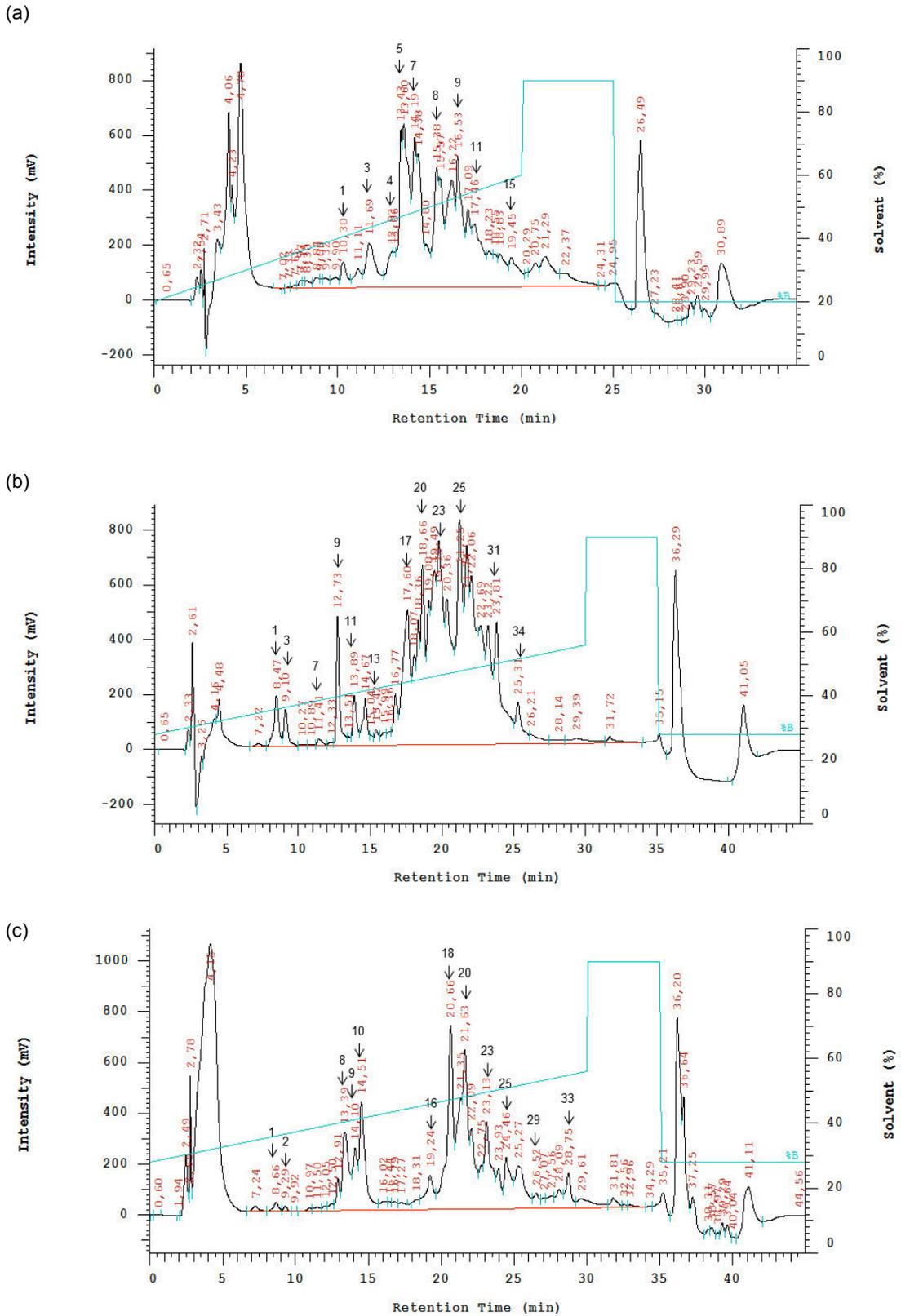


Abbildung 9: Chromatogramme von Ebners Rotkorn für die Fraktionen Albumine+Globuline (a), Gliadine (b) und Glutenine (c)

Alle Auswertungen erfolgten anhand von Mittelwerten, die durch Doppelbestimmungen ermittelt wurden. Die so ermittelten Zahlen wurden als Excel-Tabellen in das Programm Unscrambler® eingespielt, um für die Datenverarbeitung zur Verfügung zu stehen.

2.4.1 Was macht die Hauptkomponentenanalyse - PCA (*principal component analysis*)?

Die Verringerung der Datenmenge ist ein wichtiges Ziel, wobei die beobachteten Variablen zu wenigen Hauptkomponenten zusammengefasst wurden. Die Beschreibung der Objekte erfolgte durch die Hauptkomponenten (Kessler 2007). Die Variablen sind im vorliegenden Fall die Flächen der Einzelpeaks, ausgedrückt in Flächenprozent der Gesamtfläche des Chromatogrammes. Die Objekte sind die Sorten und Prüfstämme an den einzelnen Versuchsstandorten.

Diese Methode ist geeignet, Daten nach unterschiedlichen Gesichtspunkten zu klassifizieren, sodass auch von der Möglichkeit des Nachweises allfälliger analytischer Einflüsse Gebrauch gemacht werden kann. Anhand eines analytisch einwandfreien Datensatzes wurden das Potential der Methode zur Differenzierung einzelner Subspezies und deren Kreuzungen beurteilt, sowie die Faktoren mit dem größten Einfluss auf die Diskriminierung identifiziert.

2.4.2 Standardisierte Auswertung der PCA

Die faktorenanalytischen Ergebnisse der manifesten Variablen sind sensibel auf Änderungen der Dimensionen. Darum wurde eine Standardisierung der Variablenwerte durchgeführt. Die Standardabweichungen über die gesamten Beobachtungswerte wurden durch deren arithmetische Mittelwerte dividiert (Eckey & Kosfeld 2004).

Dies bedeutet, dass die Standardabweichung, ausgedrückt in Prozent der Peakflächen, berücksichtigt wird. Dadurch werden alle Peaks der Chromatogramme gleich gewichtet und es wird vermieden, dass die ersten Hauptkomponenten nur von den größten Peaks (Hauptpeaks) gebildet werden. Auf diese Art und Weise werden Peaks berücksichtigt, die bei vorheriger Auswertung unbeachtet geblieben wären, obwohl sie unter Umständen für die Unterscheidung der untersuchten *Triticum* Subspezies von größter Bedeutung sind.

2.4.3 PCA Algorithmen

Als weiterer Schritt wurde der reduzierte Datensatz aus Abbildung 15 (bestehend aus den Gliadinen und Gluteninen) mit den zwei gängigsten Algorithmen durchgerechnet. Damit wurde untersucht, ob die voreingestellte Methode im Unscrambler® besser oder gleich gut geeignet ist, um die Daten mittels der PCA zu analysieren. In Tabelle 6 werden die Ergebnisse unterschiedlicher Algorithmen dargestellt.

Tabelle 6: Prozent der erklärten Varianz der ersten sechs Hauptkomponenten für unterschiedliche Rechenalgorithmen

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
NIPALS/none	30	14	10	7	5	4
NIPALS/varimax	24	16	9	7	6	5
SVD/none	30	14	10	7	5	4
SVD/varimax	24	16	9	7	6	5

Die im Unscrambler® bereits voreingestellte NIPALS/none Variante unterscheidet sich nicht von der SVD. Darum wurde diese Voreinstellung für alle Berechnungen und die Darstellung der Ergebnisse beibehalten.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der PCA werden in Form von Biplots (PC1 vs. PC2) abgebildet. Die Grafiken werden in verschiedenen Kategorien (HPLC-Trennsäule, Standort und Spezies) dargestellt.

3.1 PCA - Ausschluss analytischer Einflüsse

Um analytische Einflüsse auszuschalten, wurden sämtliche Ergebnisse unselektiert der PCA unterworfen. Da Extraktions- und äußere Chromatographie-Bedingungen konstant gehalten wurden, war vor allem zu untersuchen, ob ein Einfluss der verwendeten Säulen besteht. Besonders nach andauernder Belastung mit *T. spelta* war eine kürzere Lebensdauer der Säulen feststellbar. Gründe dafür könnten unterschiedliche Zusammensetzungen der Inhaltsstoffe sein, die zu einer kontinuierlichen Verstopfung der Vorsäulen in der HPLC führten. Eine besonders kurze Lebensdauer wurde für Säule C beobachtet, mit welcher ausschließlich Dinkelproben analysiert wurden. Deshalb wurde darauf geachtet, dass mit dem Wechsel zur Säule D neben den Dinkelproben auch einige Proben von *T. aestivum* analysiert wurden. Dadurch erhöhte sich die Lebensdauer der Säule D. Bei den Analysenläufen mit ausschließlich Weichweizenproben (Säule A), war eine langsamere Verstopfung feststellbar.

Zur Ermittlung des Säuleneinflusses wurden die Säulen A bis F als kategorische Variable in die PCA eingesetzt. In den Biplots der Faktorenwerte - sowohl in der standardisierten als auch in der nicht standardisierten Darstellung - zeigte sich eine deutliche Sonderstellung von Säule A (Abbildung 10a). Die Faktorenwerte der Säulen B bis F lagen gleichmäßig verteilt in einem Punkthaufen auf der linken Seite des Faktorenwert-Plots. Bei den Faktorenladungen der nicht standardisierten Auswertung zeigte sich der dominante Einfluss der großen Peaks GLU18, GLU20, GLI25 und GLI26, der bei der standardisierten Auswertung durch die stärkere Berücksichtigung kleinerer Peaks wesentlich zurückgedrängt wurde (Abbildung 10b). Bei den korrelierten Faktorenladungen der nicht standardisierten Auswertung zeigte sich in abgeschwächter Form der überproportionale Einfluss der großen Peaks. Die

in den Grafiken aufscheinenden Bezirksabkürzungen sind in Tabelle 3 (Kapitel 2.1) angeführt.

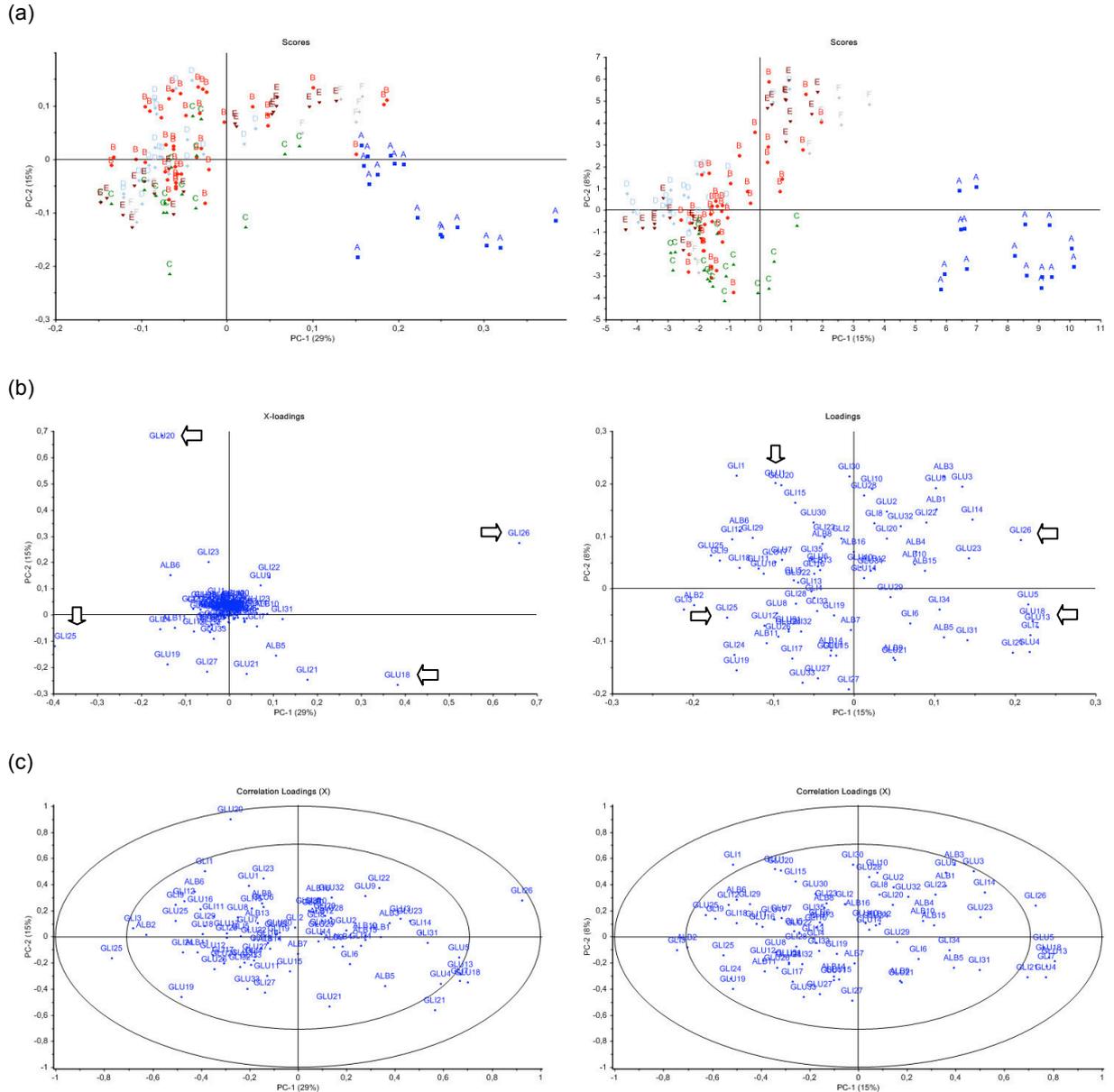


Abbildung 10: Biplots der nicht standardisierten (links) und standardisierten Auswertung (rechts) der Hauptkomponentenanalyse unter Berücksichtigung aller Proben: (a) Differenzierung der Faktorenwerte anhand der HPLC Säulen (A-F); (b) Faktorenloadungen der Proteinfractionen (ALB⁴, GLI, GLU) und -peaks; (c) korrelierte Faktorenloadungen der Proteinfractionen und -peaks

⁴ Die in den Abbildungen enthaltene Abkürzung ALB bezeichnet die Kombination der Albumine+Globuline als Fraktion. Dies ermöglicht eine bessere Übersicht und erleichtert die Darstellung in den Grafiken.

Nach Kontrolle des Säuleneinflusses wurde ein möglicher Standorteinfluss überprüft. Dieser scheint unwahrscheinlich, da außer den Weizenproben des Standortes Obersiebenbrunn (GF_A), auch drei Proben des Standortes Steyregg (UU) in den Diagrammen der Faktorenwerte deutlich im Bereich der Säule A lagen (Abbildung 11).

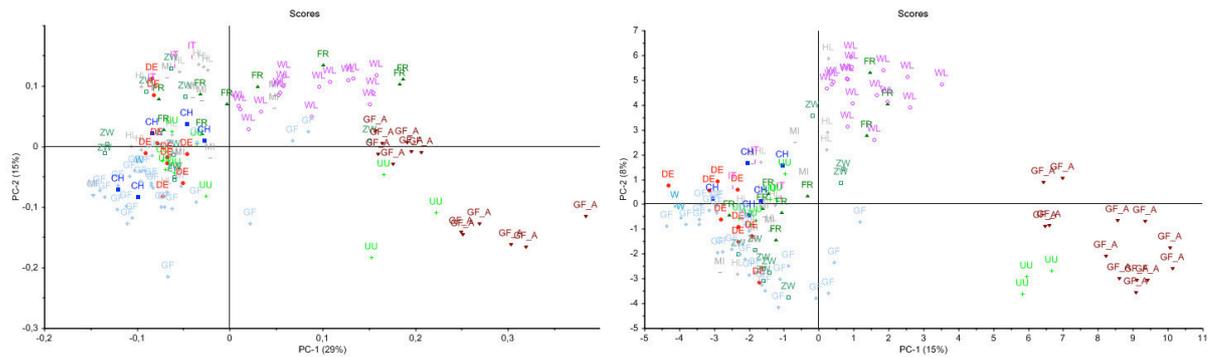


Abbildung 11: Biplots der nicht standardisierten (links) und standardisierten Auswertung (rechts) der ersten beiden Hauptkomponenten unter Berücksichtigung aller Proben: Differenzierung der Faktorenwerte anhand der Standorte, technischer Einfluss wird geprüft (Säulen A-F)

Aufgrund der Abgrenzung der Säule A wurden alle Proben, die mit Säule A analysiert wurden, von der weiteren Datenauswertung ausgenommen, da hier ein technischer Einfluss vermutet werden kann. Zur weiteren Auswertung wurde ein verringerter Probensatz (Säule B bis F) herangezogen.

Nach Ausschluss der Säule A war weder in der standardisierten noch in der nicht standardisierten Darstellung des Faktorenwert-Diagrammes eine Gruppenbildung nach Trennsäulen zu erkennen (Abbildung 12a). Sowohl Faktorenladungen als auch korrelierte Faktorenladungen zeigten in der nicht standardisierten Darstellung einen starken Einfluss der Peaks GLU19, GLU20, GLI25 und GLI26 auf das Gesamtmodell (Abbildung 12b,c). In der standardisierten Darstellung kam es zu einer deutlichen Nivellierung (Gleichstellung) der Einflüsse der Peaks. Neben den bereits in der nicht standardisierten Darstellung bedeutsamen Peaks kamen zahlreiche weitere hinzu, unter anderem ALB3, ALB9, GLU27 und GLU28. Hingegen verloren GLI25 und GLI26 an Bedeutung.

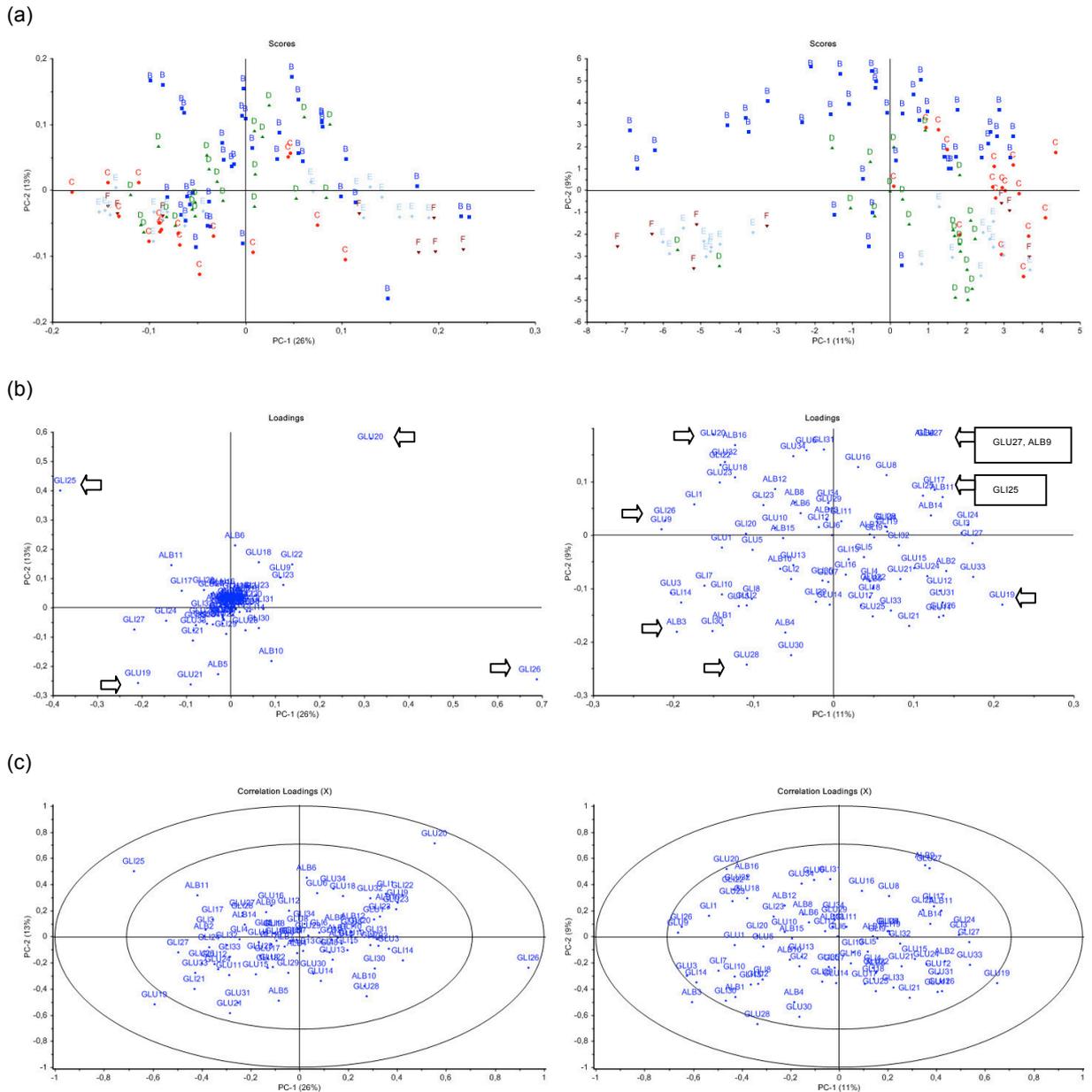


Abbildung 12: Biplots der nicht standardisierten (links) und standardisierten Auswertung (rechts) der Hauptkomponentenanalyse unter Berücksichtigung aller Proben: (a) Differenzierung der Faktorenwerte anhand der HPLC Säulen B-F; (b) Faktorenladungen der Proteinfractionen (ALB, GLI, GLU) und -peaks; (c) korrelierte Faktorenladungen der Proteinfractionen und -peaks

T. spelta (S) und *T. spelta* × *T. aestivum*-Kreuzungen (SX); *T. macha* (M) und *T. spelta* × *T. macha*-Kreuzungen (SM) (Abbildung 14). Dabei konnten nur geringfügige Überlappungen der Gruppen festgestellt werden.

Die Prozentangaben der PC1 in Abbildung 14 liegen in der nicht standardisierten Darstellung bei 26%, bei der standardisierten Auswertung bei 11%. Diese sehr geringen Anteile der erkläraren Varianz sind darauf zurückzuführen, dass im Zuge der Ergebnisse der HPLC-Arbeit viele Peaks erkannt wurden, die wiederum zu vielen PCs führen. Da bei der standardisierten Auswertung die Hauptkomponenten nicht nach den Absolutwerten ihrer Variabilität geordnet werden, sondern nach ihrer in Prozent vom Mittelwert berechneten Variabilität, gelangen auch kleine Peaks zu größerer Bedeutung. Die Erklärung der Gesamtstreuung wird daher auf wesentlich mehr Hauptkomponenten aufgeteilt, als dies bei der nicht standardisierten Auswertung der Fall ist. Dadurch ist der Beitrag in der nicht standardisierten Auswertung aufgrund der nach Größe dominierenden Hauptkomponenten zur Erklärung der Gesamtstreuung geringer.

Die standardisierte Auswertung berücksichtigt jedoch kleinere Peaks, die offenbar einen wesentlichen Beitrag zur Differenzierung leisten, in verstärktem Maße.

In bisherigen Publikationen, die sich vor allem mit den Zusammenhängen der Proteine mit den technologischen Merkmalen beschäftigt haben (Belitz et al. 1989, Wieser et al. 1998) oder die die Unterscheidung zwischen *Triticum* Subspezies zum Gegenstand hatten (Galova et al. 2002), wurde die Albumin+Globulin Fraktion weitgehend vernachlässigt.

Wie die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben, leisten die Albumine+Globuline jedoch durchaus einen gewissen Beitrag zur Differenzierung. So ist etwa zu erkennen, dass sich bei der Standardisierung die Faktorenwerte der Dinkelproben (S) in Abbildung 15 bei Nichtberücksichtigung der Albumin+Globulin Fraktion weiter in den Bereich der Weizenproben erstrecken. Die Plots der Faktorenladungen wurden durch den Ausschluss der Albumin+Globulin Fraktion kaum beeinflusst. Das Ergebnis erscheint durchaus plausibel, in Anbetracht der

Tatsache, dass etwa die Albumin+Globulin Fraktionen ALB3 und ALB9 hohe Faktorenladungen bzw. korrelierte Faktorenladungen aufwiesen (Abbildung 12) und somit einen wesentlichen Einfluss auf die Gesamtstreuung hatten.

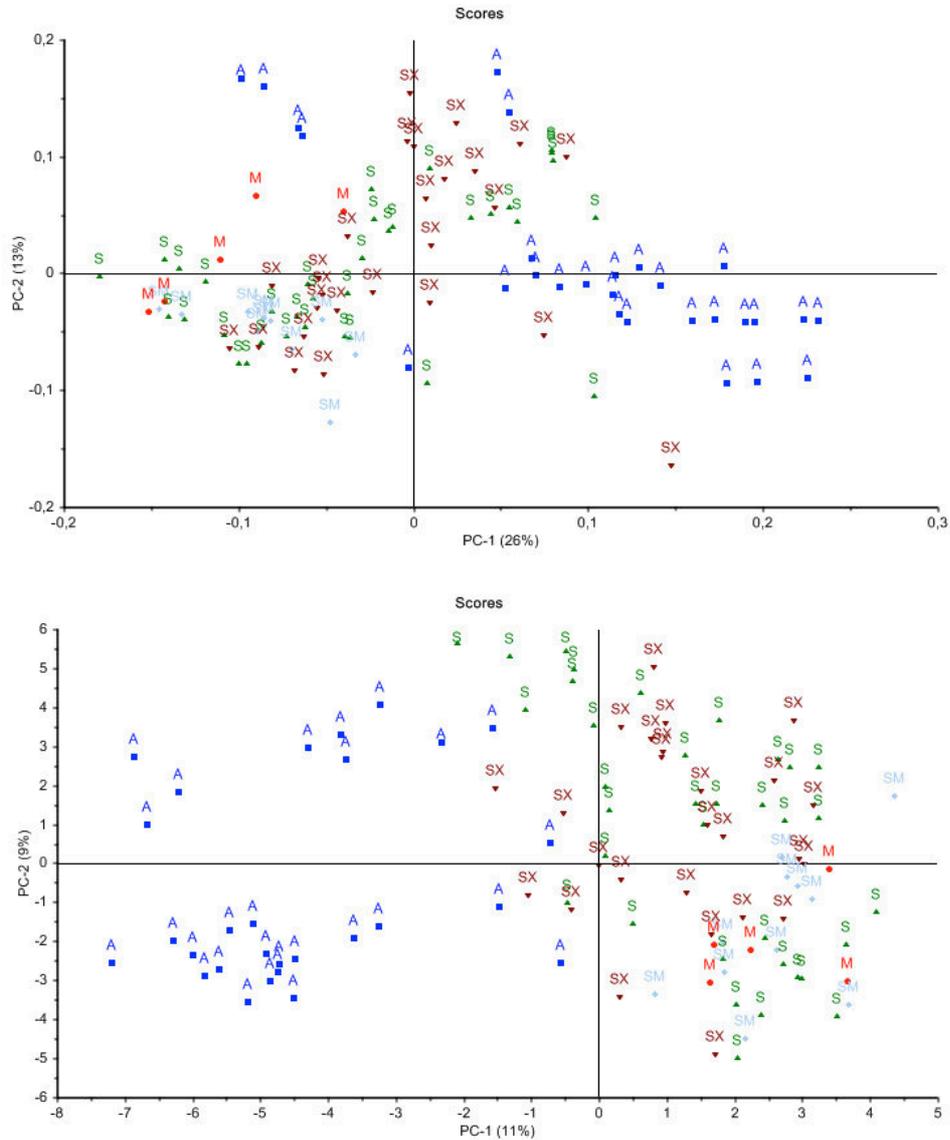


Abbildung 14: Biplots der nicht standardisierten (oben) und standardisierten Auswertung (unten) der ersten beiden Hauptkomponenten unter Berücksichtigung aller Proteinfractionen ALB, GLI, GLU: Differenzierung der Faktorenwerte anhand der Spezies (A, S, SX, M, SM)

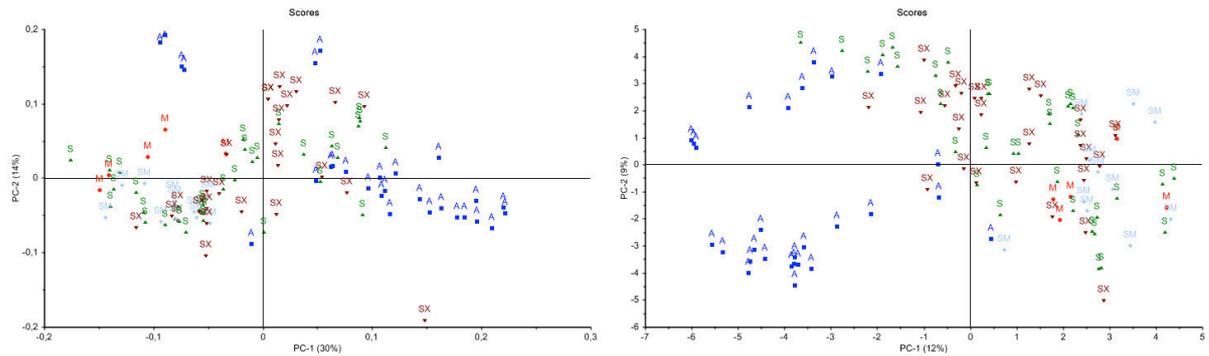


Abbildung 15: Biplots der nicht standardisierten (links) und standardisierten Auswertung (rechts) der ersten beiden Hauptkomponenten unter Berücksichtigung der Proteinfractionen GLI, GLU: Differenzierung der Faktorenwerte anhand der Spezies (A, S, SX, M, SM)

Von Wieser & Kieffer (2001) und König et al. (2011) wurde unter anderem das Gliadin/Glutenin-Verhältnis als Unterscheidungsmerkmal zwischen Weizen und Dinkel herangezogen. Daher wurde auch in der vorliegenden Arbeit dieser Parameter in die Hauptkomponentenanalyse miteinbezogen um eventuell eine Verbesserung der Differenzierung zu erreichen.

Wie die Versuche zeigten, konnte durch Hinzufügen dieses Verhältnisses zu einem aus Gliadin- und Glutenin-Peaks bestehenden Datensatz nur in der nicht standardisierten Darstellung eine scheinbar verbesserte Unterscheidung zwischen Weizen und den übrigen Subspezies erreicht werden. In der standardisierten Abbildung konnte keine Verbesserung gegenüber der Auswertung ohne Albumine+Globuline herbeigeführt werden.

Die Biplots der Faktorenwerte der standardisierten Auswertung sind in etwa ident mit jenen der Auswertung ohne Gliadin/Glutenin-Verhältnis (Abbildung 15 und Abbildung 16). Da die numerischen Werte des Gliadin/Glutenin-Verhältnisses und dessen Streuung in einer anderen Größenordnung lagen, als die der Auswertung zugrunde gelegten Peakflächen, war eine Beurteilung des Einflusses dieses Parameters jedoch nur anhand der standardisierten Auswertung sinnvoll.

Der Einfluss des Gliadin/Glutenin-Verhältnisses ist in Abbildung 16b,c bei der nicht standardisierten Auswertung in den Faktorenladungen und korrelierten

Faktorenladungen deutlich erkennbar. Das Verhältnis ist jedoch offenbar nur in der Lage, eine Unterscheidung zwischen *Aestivum*-Weizen und den übrigen Subspezies zu bewirken. In der standardisierten Auswertung kommt dieser Komponente keine derart überragende Bedeutung zu. Dies macht auch das oben angeführte Ergebnis, dass die Einbeziehung des Gliadin/Glutenin-Verhältnisses keine Verbesserung brachte, plausibel.

3.2.3 Proben von den Versuchsstellen der AGES

Grundsätzlich kann anhand der Faktorenwerte Grafik gezeigt werden, dass auch mit geringeren Stichprobenumfängen eine Trennung zwischen *Aestivum*-Weizen und den beiden zur Untersuchung gelangten Subspezies möglich ist (Abbildung 17a). Die Faktorenwerte der AGES-Proben sind denen des Gesamtdatensatzes ähnlich. Bei der nicht standardisierten Auswertung zeigten die gleichen Peaks wie bei der Untersuchung des Gesamtdatensatzes ohne Proben der Säule A (Abbildung 12), GLI25, GLI26, GLU19 und GLU20 aufgrund ihrer Größe die höchsten Faktorenladungswerte. Bei den standardisierten Faktorenladungen und korrelierten Faktorenladungen verloren diese Peaks jedoch stärker an Gewicht, als dies bei der Auswertung der Gesamtdaten der Fall war.

Es ist davon auszugehen, dass bei einer geringeren Anzahl von Proben ein höherer Zufallsfaktor in die Auswertung einfließt und somit den Ergebnissen der Gesamtauswertung höheres Gewicht zukommt.

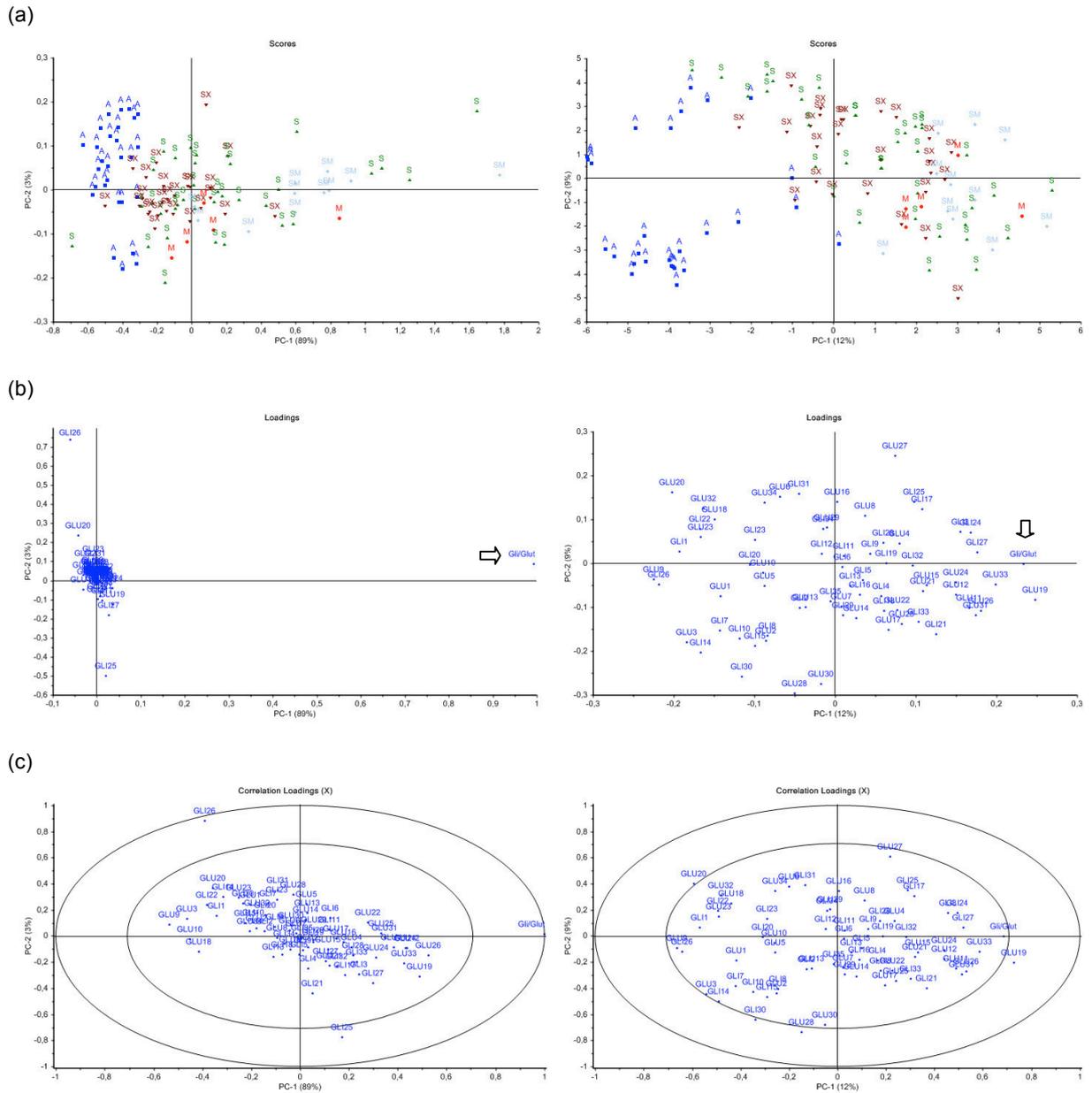


Abbildung 16: Biplots der nicht standardisierten (links) und standardisierten Auswertung (rechts) der Hauptkomponentenanalyse unter Berücksichtigung der Proteinfractionen GLI, GLU und des GLI/GLU Verhältnisses: (a) Differenzierung der Faktorenwerte anhand der Spezies; (b) Faktorenladungen der Proteinfractionen und -peaks (c) korrelierte Faktorenladungen der Proteinfractionen und -peaks

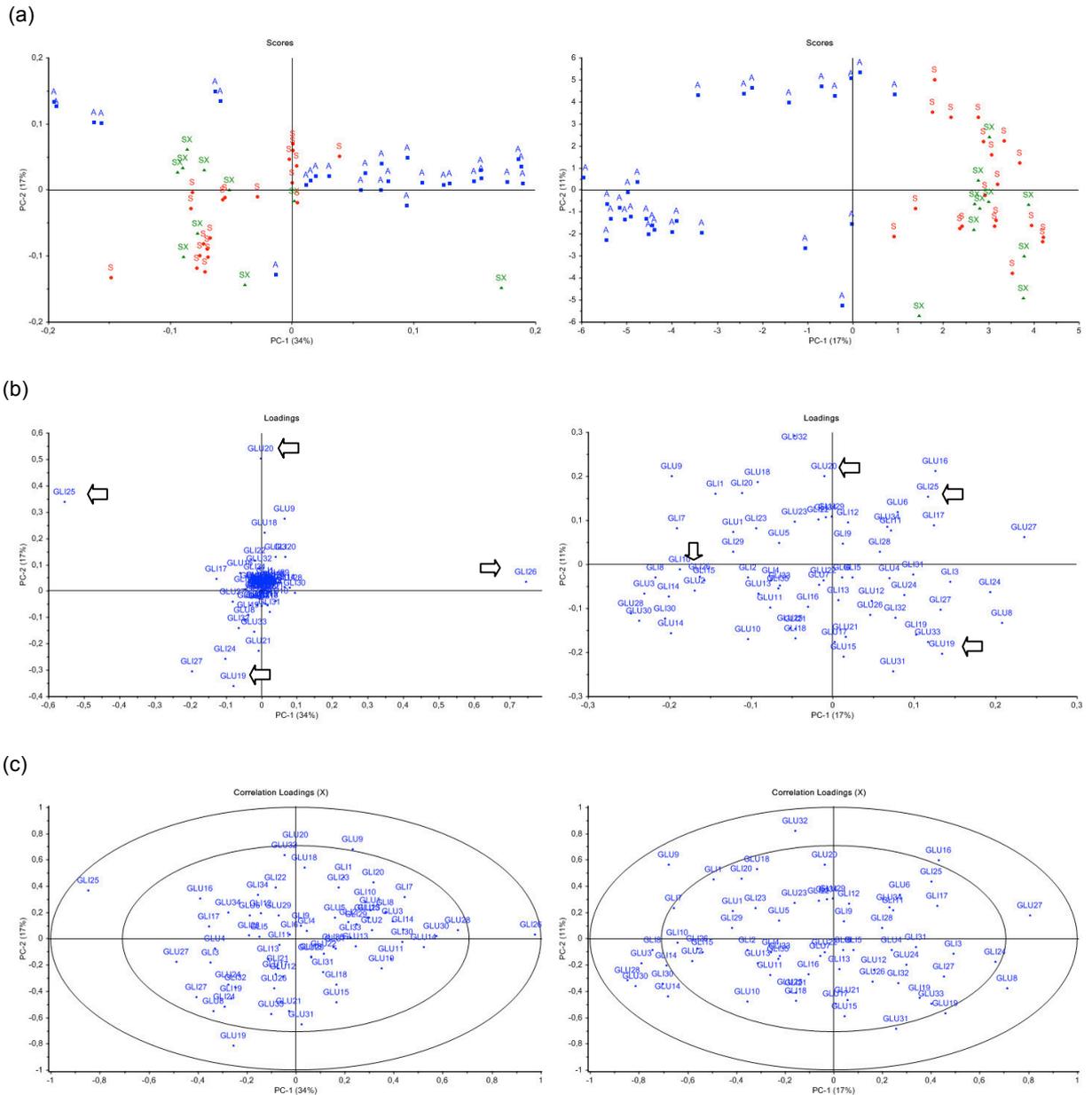


Abbildung 17: Biplots der nicht standardisierten (links) und standardisierten Auswertung (rechts) der Hauptkomponentenanalyse unter ausschließlicher Berücksichtigung der AGES Proben: (a) Differenzierung der Faktorenwerte anhand der Spezies (A, S, SX); (b) Faktorenladungen der Proteinfractionen (GLI, GLU) und -peaks; (c) korrelierte Faktorenladungen der Proteinfractionen und -peaks

Abschließend kann festgehalten werden, dass es vor allem bei Anwendung der standardisierten Auswertung durchaus möglich ist, *Aestivum*-Weizen von Dinkel bzw. *Macha*-Weizen mit relativ hoher Sicherheit zu unterscheiden. Eine Erkennung von Dinkelsorten, bei denen Weichweizen eingekreuzt wurde, war allerdings nicht möglich. Da die geometrischen Abstände der Faktorenwerte der einzelnen Subspezies gering waren, bzw. es zu einer direkten Berührung der Punkthaufen kam, kann auch davon ausgegangen werden, dass eine Quantifizierung von Beimengungen, etwa von Weichweizen zu Dinkel, kaum möglich ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen somit die Feststellung von König et al. (2011), dass derzeit kein geeignetes Verfahren für diesen Zweck zur Verfügung steht. Durch die in dieser Arbeit gesammelten Erfahrungen konnte jedoch eine Grundlage für eine methodische Weiterentwicklung geschaffen werden, die vor allem eine Verbesserung der Trennmethoden (verbunden mit erhöhtem, instrumentellem Aufwand) zum Gegenstand haben müsste, da eine Erhöhung der Eindeutigkeit der Peakidentifizierung und -quantifizierung die Leistungsfähigkeit des Gesamtverfahrens erheblich steigern würde.

Als Methode dafür kommt zum Beispiel die *Liquid chromatography-mass spectrometry* (LC/MS) in Frage. Bei der LC/MS erfolgt eine genauere Zuordnung der Peaks aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts und Polarität der Proteine (Manfred Werteker, persönliche Mitteilung). Auch König et al. (2011) schreiben, dass die LC/MS Methode für den spezifischen Nachweis von Weizen in Dinkel und Dinkelprodukten genutzt werden kann. Gao et al. (2010) weisen darauf hin, dass neuere Methoden wie HPCE (*high performance capillary electrophoresis*) oder verschiedene MS-Methoden (*mass spectrometry*) dafür geeignet sind, um insbesondere HMW-GS Untereinheiten zu charakterisieren. Bean et al. (1998) gehen in ihrer Studie auf die Proteinuntersuchung mittels HPCE genauer ein und führen deren Vorteile wie Vielseitigkeit, einfache Automatik und Schnelligkeit an. Weiters wird auf die verschiedenen analytischen Methoden zur Bestimmung von Getreideproteinen eingegangen und deren Vor- und Nachteile angeführt. Wrigley (2004) beschreibt die MS-Methoden als teure aber schnelle Analysemöglichkeit, um Gliadine zu identifizieren. Die Clusteranalyse, welche mittels Unscrambler®

durchgeführt wurde, konnte keine plausiblen Ergebnisse liefern. Im Dendrogramm fand keine Trennung von Weichweizen, Dinkel und Dinkel × Weichweizen-Kreuzungen statt, deshalb fehlte eine genaue Zuordnung der Sorten.

An et al. (2005) hingegen kommen in ihrer Untersuchung anhand von HMW-GS und LMW-GS bei 270 europäischen Dinkel und 25 Weichweizen durch Gelelektrophorese auf eine unterschiedliche Gruppierung der beiden Spezies, da unterschiedliche Gruppen im Dendrogramm gebildet werden. Auch Mikrosatelliten Marker stellen laut Bertin et al. (2001) eine passende Methode dar, um eine Trennung von *T. spelta* und *T. aestivum* im Stammbaum zu ermöglichen.

4 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Unterscheidung der verschiedenen Weizen-Subspezies und, falls möglich, von deren Kreuzungen mit Hilfe von HPLC und der Auswertung der Chromatogramme durch Hauptkomponentenanalyse zu ermöglichen. Dies ist unter anderem deshalb wichtig, um Möglichkeiten zur analytischen Identifizierung der Rohstoffe zum Schutz vor unzulässigem Wettbewerb und Täuschung von HerstellerInnen, VerarbeiterInnen und KonsumentInnen zu schaffen. Durch die quantitative Erfassung der Proteinkomponenten der Albumine+Globuline, Gliadine und Glutenine gefolgt von geeigneten Schritten zur statistischen Auswertung, war es möglich diesem Ziel nahe zu kommen.

Durch Anwendung der Hauptkomponentenanalyse konnten die zur Untersuchung stehenden Subspezies von *T. aestivum* unterschieden werden. Eine Erkennung von *Aestivum*-Einkreuzungen in *T. spelta* sowie eine Einkreuzung von *T. macha* in *T. spelta* waren jedoch nicht möglich. Dies kann einerseits auf die grundsätzlich hohe Ähnlichkeit der Proteinspektren der Subspezies, andererseits aber auch auf den Umstand, dass durch Rückkreuzung oft nur minimale Weichweizen-Genetik in modernen Dinkelsorten vorhanden ist, zurückgeführt werden.

Durch den Vergleich standardisierter und nicht standardisierter Auswertungen konnte gezeigt werden, dass durch Erstere eine wesentlich bessere Trennung der Subspezies erzielt werden konnte. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Unterscheidbarkeit nur zu einem geringen Teil auf der differenzierten Ausbildung der mengenmäßig vorherrschenden Proteinkomponenten beruht. Einen großen Beitrag zur Unterscheidbarkeit leisten offenbar auch die kleineren Fraktionen. Die für die Differenzierung relevanten Fraktionen sind durch besonders hohe Faktorenladungen bzw. korrelierte Faktorenladungen gekennzeichnet. Eine besondere Bedeutung kam unter anderen den Fraktionen ALB3, ALB9, GLU27, GLU28, GLI25 und GLI26 zu (Abbildung 12b).

Es ist somit ersichtlich, dass die Differenzierung der Subspezies nicht nur auf den technologisch bedeutungsvollen Gliadinen und Gluteninen beruht, sondern auch die Albumin+Globulin Fraktion einen gewissen Beitrag liefert, wie auch aus dem

Vergleich der Faktorenwert Grafiken (mit und ohne dieser Fraktion) hervorgeht. Ohne der Albumin+Globulin Fraktion ist eine etwas stärkere Überlappung von *T. aestivum* und *T. spelta* sichtbar. In der vorliegenden Arbeit konnten zwar unterschiedliche Gliadinmuster erkannt werden, jedoch eine Unterscheidung von Weichweizen- und *Macha*-Einkreuzungen auf Basis des Gliadinmusters konnte nicht durchgeführt werden.

Durch Einbeziehung des Gliadin/Glutenin-Verhältnisses konnte vor allem eine Verbesserung der Differenzierung bei nicht standardisierter Auswertung erreicht werden. Bei der für die praktische Anwendung wesentlich vorteilhafteren standardisierten Auswertung brachte die Berücksichtigung des Gliadin/Glutenin-Verhältnisses keinen zusätzlichen Nutzen. Die Durchführung des in dieser Arbeit angewandten Verfahrens (aus HPLC-Trennung der Proteine mit anschließender Hauptkomponentenanalyse) wurde durch die oft nicht eindeutige Zuordenbarkeit der Chromatogramm-Peaks erheblich erschwert. In weiterer Folge war daher auch nicht das gesamte Potential der Methode zur Diskriminierung von Weizen Subspezies ausschöpfbar.

Die Anwendung von HPLC/MS-Methoden, bei welchen durch Kombination der Trennung der Proteine gemäß ihrer Polarität in der Chromatographie mit der Bestimmung der Molekulargewichte in der Massenspektrometrie eine eindeutige Identifizierung und Quantifizierung möglich ist, könnte das Verfahren hinsichtlich Zuverlässigkeit und Trennschärfe wesentlich verbessern und somit die Praxistauglichkeit entscheidend erhöhen. Dem zuvor erwähnten Missstand, dass Methoden zur Feststellung des quantitativen Anteils von Weizen in Dinkelprodukten bis jetzt noch nicht zustande gekommen sind, könnte auf diesem Wege mit hoher Wahrscheinlichkeit abgeholfen werden.

5 Literaturverzeichnis

- Abdel-Aal, E.-S. M., Hucl, P., Sosulski, F. W. (1995) Compositional and nutritional characteristics of spring einkorn and spelt wheats. *Cereal Chemistry* 72: 621-4.
- Abdel-Aal, E.-S. M., Young, J. C., Rabalski, I., Hucl, P., Fregeau-Reid, J. (2007) Identification and quantification of seed carotenoids in selected wheat species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 787-94. DOI: 10.1021/jf062764p
- AGES (2013) Winterdinkel. In: Österreichische beschreibende Sortenliste 2013, Landwirtschaftliche Pflanzenarten. Schriftenreihe 21/2013, pp. 51-54. Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (AGES), Wien.
- An, X., Li, Q., Yan, Y., Xiao, Y., Hsam, S. L. K., Zeller, F. J. (2005) Genetic diversity of European spelt wheat (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L. em. Thell.) revealed by glutenin subunit variations at the *Glu-1* and *Glu-3* loci. *Euphytica* 146: 193-201. DOI: 10.1007/s10681-005-9002-6
- Batey, I. L. (2004) Gluten and modified gluten. In: Wrigley, C., Corke, H., Walker, C. E. (Eds.), *Encyclopedia of grain science*, Vol. 2, pp. 25-30. Elsevier Ltd., Oxford.
- Bean, S. R., Bietz, J. A., Lookhart, G. L. (1998) High-performance capillary electrophoresis of cereal proteins. *Journal of Chromatography A* 814: 25-41. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00437-3
- Becker, K., Buchmann, M., Kunz, P. (2008) Unterscheidung von Dinkel und Weizen mittels Gelelektrophorese. *Agrarforschung Schweiz* 15: 224-9.
- Belitz, H. D., Seilmeier, W., Wieser, H. (1989) Die Proteine des Dinkels (*Triticum spelta*). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 189: 1-5. DOI: 10.1007/BF01120438
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. (2008) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 6. Auflage (Kapitel 15: Getreide und Getreideprodukte, pp. 691-727). Springer Verlag, Berlin.
- Bertin, P., Grégoire, D., Massart, S., De Froidmont, D. (2001) Genetic diversity among European cultivated spelt revealed by microsatellites. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 148-56. DOI: 10.1007/s001220051630

- Blatter, R. H. E., Jacomet, S., Schlumbaum, A. (2002) Spelt - specific alleles in HMW glutenin genes from modern and historical European spelt (*Triticum spelta* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 104: 329-37. DOI: 10.1007/s001220100680
- Blatter, R. H. E., Jacomet, S., Schlumbaum, A. (2004) About the origin of European spelt (*Triticum spelta* L.): allelic differentiation of the HMW Glutenin B1-1 and A1-2 subunit genes. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 360-67. DOI: 10.1007/s00122-003-1441-7
- BMG (2014) Österreichisches Lebensmittelbuch (Codex Alimentarius Austriacus), (B 18 Backerzeugnisse) Bundesministerium für Gesundheit, Wien. [http://www.lebensmittelbuch.at/suche/?tx_solr%5Bq%5D=Dinkel&tx_solr%5Bfilter%5D%5B0%5D=chapter%253A1284; besucht am 28. Februar 2014]
- BMLFUW (2013) Grüner Bericht 2013. Bericht über die Situation der österreichischen Land- und Forstwirtschaft, 54. Auflage. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Abteilung II 5, Wien.
- Breiman, A., Graur, D. (1995) Wheat evolution. *Israel Journal of Plant Sciences* 43: 85-98. DOI: 10.1080/07929978.1995.10676595
- Caballero, L., Martin, L. M., Alvarez, J. B. (2007) Agrobiodiversity of hulled wheats in Asturias (North of Spain). *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 267-77. DOI: 10.1007/s10722-005-4049-8
- Campbell, K. G. (1997) Spelt: Agronomy, genetics, and breeding. *Plant Breeding Reviews* 15: 187-213.
- Cheftel, J. C., Cuq, J. L., Lorient, D., Reimerdes, E. H., Müller, G. (1992) Weizenproteine. In: Cheftel, J. C., Cuq, J. L., Lorient, D. (Eds.), *Lebensmittelproteine - Biochemie, funktionelle Eigenschaften, Ernährungsphysiologie, chemische Modifizierung*, pp. 241-60. Behr's Verlag, Hamburg.
- D'Ovidio, R., Masci, S. (2004) The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *Journal of Cereal Science* 39: 321-39. DOI: 10.1016/j.jcs.2003.12.002
- Dvorak, J., Luo, M. (2001) Evolution of free-threshing and hulled forms of *Triticum aestivum*: old problems and new tools. In: Caligari, P. D. S., Brandham, P. E. (Eds.), *Wheat taxonomy: the legacy of John Percival*, pp. 127-36. Academic Press, London.

- Dvorak, J., Di Terlizzi, P., Zhang, H. B., Resta, P. (1993) The evolution of polyploidy wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36: 21-31. DOI: 10.1139/g93-004
- Dvorak, J., Deal, K. R., Luo, M. C., You, F. M., von Borstel, K., Dehghani, H. (2012) The origin of spelt and free-threshing hexaploid wheat. *Journal of Heredity* 103: 426-41. DOI: 10.1093/jhered/esr152
- Ebermann, R., Elmadfa, I. (2011) Proteine. In: Ebermann, R., Elmadfa, I. (Eds.), *Lehrbuch der Lebensmittelchemie und Ernährung*, 2. Auflage, pp. 57-77. Springer Verlag, Wien. DOI: 10.1007/978-3-211-49348-9
- Eckey, H. F., Kosfeld, R. (2004) Faktorenanalyse. In: Voß, W. (Ed.), *Taschenbuch der Statistik*, 2. Auflage, pp. 531-59. Fachbuchverlag Leipzig im Carl-Hanser-Verlag, München.
- Eckey, H. F., Kosfeld, R., Rengers, M. (2002) *Multivariate Statistik - Grundlagen - Methoden - Beispiele*. Gabler, Wiesbaden.
- Engert, N., Stranz, A., Henning, W., Honermeier, B. (2011) Grain quality, phenolic acid contents and antioxidative capacity of different spelt wheat (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) cultivars. *Cereal Technology/Getreidetechnologie* 65 (3): 106-15.
- Forssell, F., Wieser, H. (1995) Dinkel und Zöliakie. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 201: 35-9. DOI: 10.1007/BF01193198
- Galova, Z., Michalik, I., Knoblochova, H., Gregova, E. (2002) Variation in HMW glutenin subunits of different species of wheat. *Rostlinna Vyroba* 48: 15-9.
- Gao, L., Ma, W., Chen, J., Wang, K., Li, J., Wang, S., Bekes, F., Appels, R., Yan, Y. (2010) Characterization and comparative analysis of wheat high molecular weight glutenin subunits by SDS-PAGE, RP-HPLC, HPCE, and MALDI-TOF-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 2777-86. DOI: 10.1021/jf903363z
- Geisler, G. (1988) *Pflanzenbau - Ein Lehrbuch - Biologische Grundlagen und Technik der Pflanzenproduktion*, 2. Auflage. Parey, Berlin.
- Gilissen, L. J. W. J., van der Meer, I. M., Smulders, M. J. M. (2014) Reducing the incidence of allergy and intolerance to cereals. *Journal of Cereal Science*: 1-17. DOI: 10.1016/j.jcs.2014.01.005

- Grausgruber, H., Sailer, C., Ghambashidze, G., Bolyos, L., Ruckenbauer, P. (2004a) Genetic variation in agronomic and qualitative traits of ancient wheats. In: Vollmann, J., Grausgruber, H., Ruckenbauer, P. (Eds.), Genetic variation for plant breeding, pp. 19-22. BOKU - University of Natural Resources and Applied Life Science, Vienna.
- Grausgruber, H., Scheiblauber, J., Schönlechner, R., Ruckenbauer, P., Berghofer, E. (2004b) Variability in chemical composition and biologically active constituents of cereals. In: Vollmann, J., Grausgruber, H., Ruckenbauer, P. (Eds.), Genetic variation for plant breeding, pp. 23-6. BOKU - University of Natural Resources and Applied Life Science, Vienna.
- Guzmán, C., Caballero, L., Moral, A., Alvarez, J. B. (2010) Genetic variation for waxy proteins and amylose content in Spanish spelt wheat (*Triticum spelta* L.). Genetic Resources and Crop Evolution 57: 721-5. DOI: 10.1007/s10722-009-9507-2
- Jahn-Deesbach, W., Schipper, A., Müller, H. (2004) Carotinoide in Weizen. Cereal Technology/Getreidetechnologie 58: 203-6.
- Kasarda, D. D. (2013) Can an increase in celiac disease be attributed to an increase in the gluten content of wheat as a consequence of wheat breeding? Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 1155-9. DOI: 10.1021/jf305122s
- Kasarda, D. D., D'Ovidio, R. (1999) Deduced amino acid sequence of an α -gliadin gene from spelt wheat (*spelta*) includes sequences active in celiac disease. Cereal Chemistry 76: 548-55. DOI: 10.1094/CCHEM.1999.76.4.548
- Keil, H. M. (2010) Wie viel Weizen ist im Dinkel? F2m food multimedia GmbH [<http://www.brotundbackwaren.de/jahrgang-2010/articles/brotbackwaren-ausgabe-042010.html>]; besucht am 10. Dezember 2013]
- Kessler, W. (2007) Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik. Wiley-VchVerlag, Weinheim.
- Kilian, B., Özkan, H., Pozzi, C., Salamini, F. (2009) Domestication of the *Triticeae* in the fertile crescent. In: Feuillet, C., Muehlbauer, G. J. (Eds.), Genetics and genomics of *Triticeae*, pp. 81-119. Plant genetics and genomics: crops and models, Vol. 7. Springer Science+Business Media.

- Kirchmaier, S., Vollmann, J., Ayana, N. G., Siebenhandl-Ehn, S., Prückler, M., Grausgruber, H. (2012) Phänotypisierung mittels Nahinfrarot-Spektroskopie am Beispiel Gelbpigmentgehalt des Weizens. 62. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs, pp. 37-41. LFZ Raumberg-Gumpenstein, Irdning.
- Kling, C. I. (1988) Dinkel - ein altes Getreide tritt in den Vordergrund. In: 1. Dinkelsymposium, 29. Juli, Hohenheim, pp. 29-47. Dinkelackerstiftung zur Förderung des Getreides Dinkel, Stuttgart.
- Kling, C.I. (2009) Spelzweizenzüchtung in Deutschland. *Cereal Technology /Getreidetechnologie* 63 (4): 37-47.
- Kluge, F., Mitzka, W. (1960) *Etymologisches Wörterbuch der deutschen Sprache*, 18. Auflage. Walter de Gruyter & Co., Berlin.
- Konvalina, P., Grausgruber, H. (2012) Dinkel (*Triticum spelta* L.). In: Konvalina, P. (Ed.), *Anbau und Verarbeitungsmöglichkeiten von Alternativgetreide und Pseudocerealien im biologischen Landbau*, pp. 53-74. Südböhmische Universität, Budweis.
- König, A., Wieser, H., Köhler, P. (2011) Analytische Unterscheidung von Weizen und Dinkel anhand typischer Proteine und Peptide. *Cereal Technology/Getreidetechnologie* 65 (1): 40-7.
- Körper-Grohne, U. (1995) *Nutzpflanzen in Deutschland - von der Vorgeschichte bis heute* (Kapitel: Dinkel, Spelz, pp. 68-86). Nikol Verlags Gesellschaft, Hamburg.
- Küster, H., Nefzger, U., Seidl, H., Waechter, N. (1999) *Korn - Kulturgeschichte des Getreides*. Verlag Pustet, Salzburg.
- Lev-Yadun, S., Gopher, A., Abbo, S. (2000) The cradle of agriculture. *Science* 288: 1602-3. DOI: 10.1126/science.288.5471.1602
- Lieberei, R., Reisdorff, C., Franke, W. (2012) *Nutzpflanzen*, 8. Auflage (Kapitel 4.1: Kohlenhydratliefernde Pflanzen, pp. 69-117). Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Linder, A., Berchtold, W. (1982) *Statistische Methoden III, Multivariate Verfahren*. (Kapitel 4: Hauptkomponentenanalyse, pp. 61-77), Birkhäuser Verlag, Basel.
- Mayer, F., Haase, I., Raschdorf, L., Paschke-Kratzin, A., Fischer, M. (2011) Unterscheidung von Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Dinkel (*Triticum spelta*

- L.) über das Fettsäuremuster. *Cereal Technology/Getreidetechnologie* 65 (3): 100-5.
- Mayer, F., Haase, I., Graubner, A., Heising, F., Paschke-Kratzin, A., Fischer, M. (2012) Use of polymorphisms in the γ -gliadin gene of spelt and wheat as a tool for authenticity control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 1350-7. DOI: 10.1021/jf203945d
- McFadden, E. S., Sears, E. R. (1946) The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *Journal of Heredity* 37: 107-16.
- Meyer, D. (1993) Anbau und Züchtung. In: Seibel, W., Steller, W. (Eds.), *Spelz- und Schälgetreide*, pp. 19-20. Behr's Verlag, Hamburg.
- Miedaner, T., Longin, F. (2012) *Unterschätzte Getreidearten - Einkorn, Emmer, Dinkel & Co.* Agrimedia, Clenze.
- Münzing, K., Seling, S., Unbehend, G., Kähler, A., Plaumann, S., Meyer C. (2009) *Biodinkel. Hochwertige Backwaren durch Optimierung von Anbau und Verarbeitung.* Bioland Beratung GmbH, Mainz.
- Nesbitt, M., Samuel, D. (1996) From staple crop to extinction? The archaeology and history of the hulled wheats. In: Padulosi, S., Hammer, K., Heller, J. (Eds.), *Hulled wheats, Proceedings of the 1st International Workshop on Hulled Wheats, 21-22 July 1995, Castelvecchio Pascoli, Italy*, pp. 41-100. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Radic-Miehle, H. (2000) *Charakterisierung von Speicherproteinen und Speicherprotein-Genen des Dinkels (Triticum spelta L.) sowie Abgrenzung zum hexaploiden Weizen (Triticum aestivum L.).* Dissertation, Universität Hohenheim. Verlag Grauer, Stuttgart.
- Ranhotra, G. S., Gelroth, J. A., Glaser, B. K., Lorenz, K. J. (1996) Nutrient composition of spelt wheat. *Journal of Food Composition and Analysis* 9: 81-4. DOI: 10.1006/jfca.1996.0009
- Rimbach, G., Möhring, J., Ebersdobler, H. F. (2010) *Getreide.* In: Rimbach, G., Möhring, J., Ebersdobler, H. F. (Eds.), *Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger*, pp. 121-46. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-642-04486-1_6

- Sailer, C. (2004) Emmer wheat, from the neolithic staple crop to a genetic resource. Diplomarbeit, Universität für Bodenkultur Wien.
- Schieberle, P., Köhler, P., Fischer, M., Paschke, A., Haase, I. (2010) Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von Weizenanteilen in Dinkelprodukten. Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn. [http://www.feibonn.de/projekte/projektdatenbank.html/fv_15619/; besucht am 30. Oktober 2013]
- Schober, T. (2001) Eigenschaften der Kleberproteine des Dinkels - Entscheidungshilfen für Züchtungsprogramme aus technologischer Sicht. Dissertation, Universität Hohenheim, Stuttgart.
- Schober, T., Kuhn, M. (1999) Einsatz von Kapillarelektrophorese und fundamentalrheologischen Methoden in der Sortendifferenzierung bei Dinkel. Getreide, Mehl und Brot 53 (3): 169-76.
- Schober, T. J., Kuhn, M. (2003) Capillary zone electrophoresis for gliadin separation: applications in a spelt breeding program. European Food Research and Technology 217: 350-9. DOI: 10.1007/s00217-003-0740-1
- Schober, T., Bean, S. R., Kuhn, M. (2006) Gluten proteins from spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) cultivars: A rheological and size-exclusion high-performance liquid chromatography study. Journal of Cereal Science 44: 161-73. DOI: 10.1016/j.jcs.2006.05.007
- Schwedt, G. (1995) Physikalisch-chemische Trennmethode. In: Schwedt, G. (Ed.), Analytische Chemie - Grundlagen, Methoden und Praxis, pp. 363-444. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Shewry, P. R., Tatham, A. S. (1997) Disulphide bonds in wheat gluten proteins. Journal of Cereal Science 25: 207-27. DOI: 10.1006/jcrs.1996.0100
- Shewry, P. R., Halford, N. G., Belton, P. S., Tatham, A. S. (2002) The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. Philosophical Transactions of the Royal Society London B: Biological Sciences 357: 133-42. DOI: 10.1098/rstb.2001.1024
- Tosi, P., Gritsch, C. S., He, J., Shewry, P. R. (2011) Distribution of gluten proteins in bread wheat (*Triticum aestivum*) grain. Annals of Botany 108: 23-35. DOI: 10.1093/aob/mcr098

- Vincentini, O., Maialetti, F., Gazza, L., Silano, M., Dessi, M., De Vincenzi, M., Pogna, N. E. (2007) Environmental factors of celiac disease: Cytotoxicity of hulled wheat species *Triticum monococcum*, *T. turgidum* ssp. *dicoccum* and *T. aestivum* ssp. *spelta*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22: 1816-22. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2006.04680.x
- Wieser, H. (2000) Comparative investigations of gluten proteins from different wheat species. *European Food Research and Technology* 211: 262-8. DOI: 10.1007/s002170000165
- Wieser, H. (2006) Vergleich von reinen Dinkeln und Dinkel/Weizen Kreuzungen. *Cereal Technology/Getreidetechnologie* 60 (4): 223-31.
- Wieser, H. (2007) Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology* 24: 115-9. DOI: 10.1016/j.fm.2006.07.004
- Wieser, H., Kieffer, R. (2001) Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a micro-scale. *Journal of Cereal Science* 34: 19-27. DOI: 10.1006/jcrs.2000.0385
- Wieser, H., Antes, S., Seilmeier, W. (1998) Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Cereal Chemistry* 75: 644-50. DOI: 10.1094/CCHEM.1998.75.5.644
- Wold, S., Esbensen, K., Geladi, P. (1987) Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2: 37-52. DOI: 10.1016/0169-7439(87)80084-9
- Wrigley, C. (2004) Variety identification of cereal grains. In: Wrigley, C., Corke, H., Walker, C. E. (Eds.), *Encyclopedia of grain science*, Vol. 3, pp. 310-1. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Zohary, D., Hopf, M., Weiss, E. (2012) *Domestication of plants in the old world. The origin and spread of domesticated plants in south-west Asia, Europe, and the Mediterranean Basin*, 4. Auflage. Oxford University Press, New York.

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die „Gründer-Pflanzen“ der neolithischen Revolution und deren Wildformen (modifiziert nach Kilian et al. 2009).....	15
Tabelle 2: Klassifizierung der Getreideproteine bei Weizen (modifiziert nach Cheftel et al. 1992)	19
Tabelle 3: Herkunft, Ernte und Artzugehörigkeit der Proben.....	28
Tabelle 4: Lebensdauer und Probenanzahl der Säulen	38
Tabelle 5: HPLC Einstellungen zur Analyse der verschiedenen Proteine.....	39
Tabelle 6: Prozent der erklärten Varianz der ersten sechs Hauptkomponenten für unterschiedliche Rechenalgorithmen	44

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: „Fruchtbarer Halbmond“ und Verbreitungsgebiete von Weizen-Wildarten im vorderasiatischen Raum (modifiziert nach Geisler 1988)	14
Abbildung 2: Älteste Fundstellen von Dinkel (<i>T. spelta</i>) aus der Jungsteinzeit in Europa und Asien (1-3 und 6 wurden als „wahrscheinlich Dinkel“ bezeichnet) (modifiziert nach Körber-Grohne 1995).....	15
Abbildung 3: Phylogenie der Getreidearten und botanische Bezeichnung (nach Rimbach et al. 2010)	16
Abbildung 4: Unbegrante (links) und begrante Form (rechts) von <i>T. spelta</i> (Virtueller Sortengarten Getreide, Institut für Pflanzenwissenschaften, ETH Zürich) 17	
Abbildung 5: Saugluft-Stufensichter zur Trennung von Korn und Spreu (links), Siebmaschine zur Fraktionierung nach Korngröße (rechts).....	32
Abbildung 6: Kaffeemühle mit der zu vermahlenden Probe (links), sowie Waage mit Probenröhrchen und Mehlschalen (rechts)	35
Abbildung 7: Membranfilter, blaues Rack mit Samplerfläschchen (links), Minishaker VXA und Vortex Ultraturax zum Vermischen der Proben (rechts)	37
Abbildung 8: Rack für Probenfläschchen (links), HPLC Station mit PC (rechts).....	40
Abbildung 9: Chromatogramme von Ebners Rotkorn für die Fraktionen Albumine+Globuline (a), Gliadine (b) und Glutenine (c)	42
Abbildung 10: Biplots der nicht standardisierten (links) und standardisierten Auswertung (rechts) der Hauptkomponentenanalyse unter Berücksichtigung aller Proben: (a) Differenzierung der Faktorenwerte anhand der HPLC Säulen (A-F); (b) Faktorenladungen der Proteinfractionen (ALB, GLI, GLU) und -peaks; (c) korrelierte Faktorenladungen der Proteinfractionen und -peaks	46
Abbildung 11: Biplots der nicht standardisierten (links) und standardisierten Auswertung (rechts) der ersten beiden Hauptkomponenten unter Berücksichtigung aller Proben: Differenzierung der Faktorenwerte anhand der Standorte, technischer Einfluss wird geprüft (Säulen A-F).....	47
Abbildung 12: Biplots der nicht standardisierten (links) und standardisierten Auswertung (rechts) der Hauptkomponentenanalyse unter Berücksichtigung aller Proben: (a) Differenzierung der Faktorenwerte anhand der HPLC Säulen B-F; (b) Faktorenladungen der Proteinfractionen (ALB, GLI, GLU) und -peaks; (c) korrelierte Faktorenladungen der Proteinfractionen und -peaks	48
Abbildung 13: Biplots der nicht standardisierten (links) und standardisierten Auswertung (rechts) der ersten beiden Hauptkomponenten unter Berücksichtigung	

der Säulen B-F: Differenzierung der Faktorenwerte anhand der Standorte; zum Ausschluss des Standorteinflusses auf die Probenverteilung.....	49
Abbildung 14: Biplots der nicht standardisierten (oben) und standardisierten Auswertung (unten) der ersten beiden Hauptkomponenten unter Berücksichtigung aller Proteinfractionen ALB, GLI, GLU: Differenzierung der Faktorenwerte anhand der Spezies (A, S, SX, M, SM)	51
Abbildung 15: Biplots der nicht standardisierten (links) und standardisierten Auswertung (rechts) der ersten beiden Hauptkomponenten unter Berücksichtigung der Proteinfractionen GLI, GLU: Differenzierung der Faktorenwerte anhand der Spezies (A, S, SX, M, SM)	52
Abbildung 16: Biplots der nicht standardisierten (links) und standardisierten Auswertung (rechts) der Hauptkomponentenanalyse unter Berücksichtigung der Proteinfractionen GLI, GLU und des GLI/GLU Verhältnisses: (a) Differenzierung der Faktorenwerte anhand der Spezies; (b) Faktorenladungen der Proteinfractionen und -peaks (c) korrelierte Faktorenladungen der Proteinfractionen und -peaks	54
Abbildung 17: Biplots der nicht standardisierten (links) und standardisierten Auswertung (rechts) der Hauptkomponentenanalyse unter ausschließlicher Berücksichtigung der AGES Proben: (a) Differenzierung der Faktorenwerte anhand der Spezies (A, S, SX); (b) Faktorenladungen der Proteinfractionen (GLI, GLU) und -peaks; (c) korrelierte Faktorenladungen der Proteinfractionen und -peaks	55
Abbildung 18: Zentrifugen-Röhrchen (links), Zentrifuge zur Extraktion der Proteinfractionen (rechts)	71
Abbildung 19: Trockenschrank (links), händische Probenreinigung (rechts)	71
Abbildung 20: Fliehkraftschäler	72

Bildquellen:

Abbildung 4: Virtueller Sortengarten Getreide, Institut für Pflanzenwissenschaften, ETH Zürich (2008) [<http://www.sortengarten.ethz.ch/?content=nav&node=79>, <http://www.sortengarten.ethz.ch/?content=nav&node=83>, besucht am 10. Oktober 2013]

Abbildung 5-8 und 18-20: eigene Bilder der Autorin (2012, 2013)

Abbildung 9: mit der HPLC am 9. Oktober 2012 erstellt

Abbildungen 10-17: mit der Software Unscrambler® erstellt (Mai bis Oktober 2013)

8 Anhang

8.1 Abbildungen

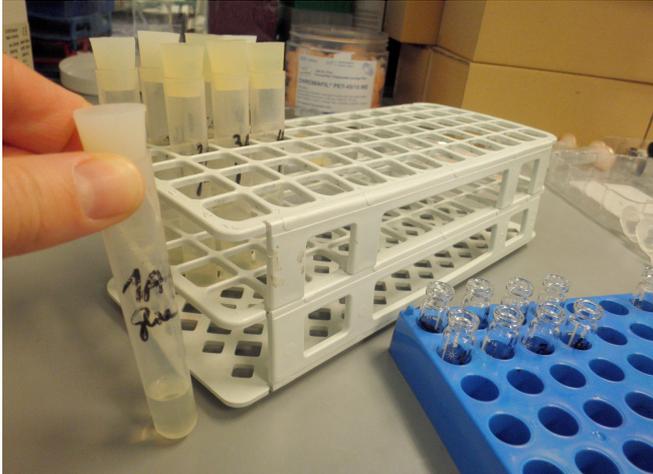


Abbildung 18: Zentrifugen-Röhrchen (links), Zentrifuge zur Extraktion der Proteinfraktionen (rechts)

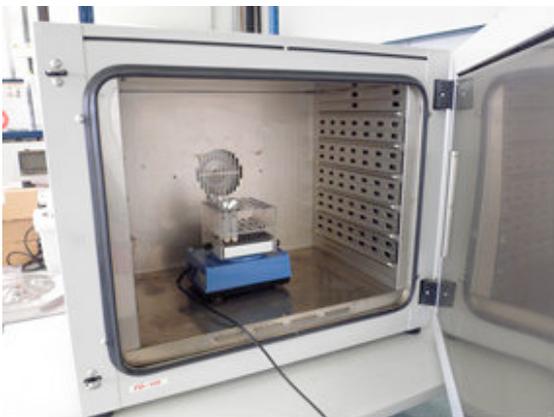


Abbildung 19: Trockenschrank (links), händische Probenreinigung (rechts)



Abbildung 20: Fliehkraftschäler

8.2 Publikation

BREUER, M., WERTEKER, M., GRAUSGRUBER H. (2013) Analytical identification of wheat subspecies - a contribution to consumer protection. 64. Tagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs: Mutagenese und Hochdurchsatz-Screening, CORNET Projekte, 25.-26. November 2014, Raumberg-Gumpenstein, pp. 79. Höhere Bundeslehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft Raumberg-Gumpenstein, Irdning.

ISBN-13: 978-3-902849-00-7

ISSN: 2072-9596

Vortrag am 25. November 2013

Analytical identification of wheat subspecies - A contribution to consumer protection

Magdalena Breuer¹, Manfred Werteker^{2*} and Heinrich Grausgruber¹

Abstract

In the last years the consumer was faced with an increasing number of baking products made from neglected wheat subspecies such as spelt wheat (*Triticum aestivum* L. subsp. *spelta* (L.) Thell., *T. aestivum* L. subsp. *macha* (Dekapr. & Menabde) MacKey) and their crossbreeds.

In the interest of producers and consumers reliable analytical methods for the distinction of these subspecies from common wheat (*T. aestivum* L.) are necessary. The consumer has to be protected against fraudulent use of common wheat in spelt wheat products and the producer against dishonest competitors. Under the aspects of emerging non coeliac wheat incompatibilities in some groups of the population the purity of raw material gets also a public health dimension.

The task of this study was the development of a method for analytical distinction of wheat subspecies based on HPLC-spectra of the albumin/globulin, gliadin and glutenin fractions resulting from a modified Osborn-fractionation. The peak areas of the separated proteins were quantified and evaluated by principal component analysis. Additionally the influence of the gliadin/glutenin-ratio on the distinguishability was investigated.

From five locations of the Austrian VCU trials of 2011 three *T. aestivum*, four *T. spelta* varieties and two crossbreeds were analysed (45 samples). To increase the number of wheat samples 29 wheat samples from two locations of the VCU trials of 2012 were included in the study. Moreover, 47 samples of *T. spelta*, *T. macha* and *T. macha*×*T. spelta* from single locations in Austria, Germany and Italy, were provided by the breeding programme of the Department of Crop Sciences of the University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna.

The best results with respect to the differentiation were obtained by the application of a standardised evaluation of the principal component analysis. In this mode the absolute magnitude of the peaks is neglected and only their relative variability is important for the alignment of the principal components. In this way the influence of small peaks is enhanced and their importance for the distinction of subspecies may be recognized. All three subspecies could be separated properly by this method, however, the detection of crossbreeds (*T. spelta*×*T. aestivum*) was not possible.

Keywords

Food security, HPLC, principal component analysis, spelt wheat, *Triticum*

Acknowledgments

The study was sponsored by FFG.

References

- KESSLER W, 2007: Multivariate Datenanalyse für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik. Wiley-VCH Verlag GmbH Co KGaA, Weinheim.
- WIESER H, ANTES S, SEILMEIER W, 1998: Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Cereal Chem* 75, 644-650.

¹ University of Natural Resources and Life Sciences, Department of Crop Sciences, Konrad Lorenz Straße 20, 3430 TULLN, Austria

² Austrian Agency for Health and Food Safety, Institute for Feed and Animal Nutrition, Spargelfeldstraße 191, 1220 VIENNA, Austria

* Corresponding author: Manfred WERTEKER, manfred.werteker@ages.at