



Universität für Bodenkultur Wien
University of Natural Resources
and Life Sciences, Vienna

Masterarbeit

Einfluss der Sauerteigführung auf die Verdaubarkeit von Weizengebäck

verfasst von

Lisa KOLARIK, BSc

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Ingenieurin

Wien, Februar 2021

Betreut von:

Assoc. Prof.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Regine Schönlechner

Institut für Lebensmitteltechnologie

Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie

Dr. Stefano D`Amico und DIⁱⁿ Dr.ⁱⁿ Lisa Call

Institut für Futtermittel und Tierernährung

Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mir bei der Durchführung der Diplomarbeit und während des Studiums mit Rat und Tat zur Seite standen.

Vor allem bei Dr. Lisa Call und Dr. Stefano D`Amico möchte ich mich für die Betreuung sowie die fachliche Unterstützung während der Arbeit bedanken.

Auch bedanken möchte ich mich bei Dr. Elisabeth Reiter für die Möglichkeit meine Diplomarbeit im Zuge eines Praktikums an der AGES– Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Wien, zu absolvieren und für das Sammeln neuer Erfahrungen im Bereich der Getreidetechnologie.

Des Weiteren möchte ich mich bei den MitarbeiterInnen des Instituts für Futtermittel und Tierernährung der AGES bedanken, die mich bei der Umsetzung der praktischen Tätigkeiten unterstützt haben und mir mit fachlichen Hilfeleistungen stets zur Seite standen.

Ebenso möchte ich mich bei den beiden Diplomandinnen Anna Krottenthaler und Vanessa Hebenstreit für ihre vielseitige Unterstützung bedanken.

Danke auch an meine Freunde und meine StudienkollegInnen für ihre motivierende Worte und Hilfestellung während des Studiums.

Recht herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, die mir nicht nur während meiner Diplomarbeit, sondern auch während des gesamten Studiums weitergeholfen haben. Danke an meinen Freund für die tägliche Unterstützung und die vielen motivierenden Gespräche.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	- 13 -
2	Abstract.....	- 14 -
3	Einleitung und Aufgabenstellung	- 15 -
4	Theoretischer Hintergrund	- 18 -
4.1	Weizen.....	- 18 -
4.2	Weizenproteine	- 20 -
4.2.1	Albumine/Globuline	- 21 -
4.2.2	Prolamine/Gluteline	- 22 -
4.2.3	Amylase-Trypsin-Inhibitoren.....	- 24 -
4.3	Weizenunverträglichkeiten.....	- 28 -
4.3.1	Zöliakie	- 28 -
4.3.2	Weizenallergie.....	- 30 -
4.3.3	Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie-Weizensensitivität.....	- 32 -
4.3.4	Reizdarmsyndrom	- 33 -
4.4	Strategie und Hintergrund der Herstellung von Sauerteigprodukten-	33 -
4.4.1	Trypsin-Inhibitoraktivität	- 35 -
4.4.2	Bradford	- 36 -
4.4.3	Dumas.....	- 36 -
4.4.4	HPLC.....	- 37 -
5	Material und Methoden	- 39 -
5.1	Material	- 39 -
5.2	Versuchsdurchführung.....	- 39 -
5.3	Analytik	- 43 -
5.3.1	Extraktionen	- 43 -
5.3.2	Trypsin-Inhibitoraktivität-(TIA)-Assay	- 48 -
5.3.3	Bradford Assay zur Bestimmung des löslichen Proteins	- 52 -
5.3.4	Bestimmung der ATI-Konzentration mittels RP-HPLC	- 57 -

5.3.5	Bestimmung des Rohproteingehaltes nach Dumas	- 62 -
5.3.6	Bestimmung des Glutengehaltes mittels RP-HPLC	- 63 -
5.3.7	<i>In vitro</i> Proteinverdau	- 70 -
5.4	Statistik	- 77 -
5.4.1	Grundlegende statistische Methoden	- 77 -
6	Ergebnisse und Diskussion.....	- 80 -
6.1	Vorversuche zur Methodenoptimierung	- 80 -
6.1.1	Extraktion	- 80 -
6.1.2	Chymotrypsin-Inhibitor-Assay	- 83 -
6.2	Charakterisierung der Rohstoffe	- 83 -
6.3	Backversuche	- 89 -
6.3.1	Backversuch mit dem W700 Rösselmehl	- 89 -
6.3.2	Backversuch mit reinsortigen Mehlen.....	- 94 -
7	Schlussfolgerung und Ausblick	- 103 -
8	Literaturverzeichnis.....	- 105 -
9	Anhang	- 115 -

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Entstehung des modernen Weizens durch Kreuzung und Weiterentwicklung (Schuppan & Gisbert-Schuppan 2018)	- 19 -
Abb. 2: Aufbau des Getreidekorns (Baltes & Matissek 2011)	- 20 -
Abb. 3: Indirekter und direkter Wirkungsmechanismus der Amylase-Trypsin-Inhibitoren (übernommen von GanzimmunDiagnostics©)	- 27 -
Abb. 4: Überblick der Weizenunverträglichkeiten: Weizenallergie, Zöliakie, Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie-Weizensensitivität und Reizdarmsyndrom (Dale et al. 2018)	- 28 -
Abb. 5: Absorptionszustände von Coomassie Brilliant Blue Dye-G250 (ROTH 2020)	- 36 -
Abb. 6: Screening der Arnold Mehlprobe (NaCl-Extraktion).....	- 51 -
Abb. 7: Kalibriergerade/-funktion der Haubis Teiglinge mittels BSA-Standard (A), und mittels TI-Standard (B)	- 55 -
Abb. 8: Chromatogramm ATI-Fraktion (Mehlprobe).....	- 59 -
Abb. 9: Kalibriergerade/-funktion zur Berechnung des ATI-Gehaltes mittels TI-Standard (A) und mittels BSA-Standard (B).....	- 60 -
Abb. 10: Chromatogramm Gliadine und Glutenine (Mehlprobe	- 67 -
Abb. 11: Kalibriergerade/-funktion der Gliadine/Glutenine mittels PWG-STD	- 68
-	
Abb. 12: Inhibierung der Pellets und der Überstände der Arnold-Mischprobe bei 70 % und 80 % Sättigung der Probe.....	- 81 -
Abb. 13: Löslicher Proteingehalt der Teiglinge von Backversuch 1 nach variierender Vorsäuerung und unterschiedlicher Dauer der Teigführung in g Protein/100 g Probe TS; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Tamhane	- 89 -
Abb. 14: ATI-Gehalt der Teiglinge von Backversuch 1 nach variierender Vorsäuerung und unterschiedlicher Dauer der Teigführung in g Protein/100 g Probe TS; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Tamhane	- 90 -
Abb. 15: Trypsin-Inhibierungsaktivität der Teiglinge nach variierender Vorsäuerung und unterschiedlicher Dauer der Teigführung in mg/kg TS; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Tamhane.....	- 92 -

- Abb. 16: ATI-Gehalt und TIA in Abhängigkeit von Vorsauermenge (,starter‘) und Teigführungszeit (,time‘) (Call 2020) - 93 -
- Abb. 17 Löslicher Proteingehalt der Teiglinge von den Bäckereien Haubis und Ströck von Backversuch 2 in g Protein/100 g Probe TS; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf die Sorte nach Duncan; Großbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf den Hersteller nach Tamhane - 95 -
- Abb. 18: ATI-Gehalt der Teiglinge der Bäckereien Haubis und Ströck von Backversuch 2 in g Protein/100 g Probe TS, Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf die Sorte nach Tamhane, Großbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf den Hersteller nach Duncan - 96 -
- Abb. 19: Gehalt an Gluten im Gebäck des Semmelbackversuches der AGES sowie der Bäckereien Haubis und Ströck in g Gluten/100 g Probe TS; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf die Sorte nach Tamhane; Großbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf den Hersteller nach Tamhane - 98 -
- Abb. 20: Trypsin-Inhibierungsaktivität der reinsortigen Teiglinge der Bäckereien Haubis und Ströck in mg/kg TS; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf die Sorte nach Tamhane, Großbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf den Hersteller nach Duncan - 100 -
- Abb. 21: Proteinverdaulichkeit in % TS der Gebäcke des Semmelbackversuches der AGES und der Bäckereien Haubis und Ströck; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf die Sorte nach Duncan; Großbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf den Hersteller nach Duncan - 101 -
- Abb. 22: Lösliches Protein in g/100 g Probe der Mehle nach der Methode von Bradford; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Duncan zwischen den Sorten - 116 -
- Abb. 23: ATI-Gehalt in g/100 g Probe der sechs Mehlsorten; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Duncan zwischen den Sorten - 116 -

- Abb. 24: Glutengehalt der sechs Mehlproben in g/100 g Probe; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Duncan zwischen den Sorten - 117 -
- Abb. 25: Proteinverdaubarkeit in % der sechs getesteten Mehle; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Duncan zwischen den Sorten - 117 -
- Abb. 26: Trypsin-Inhibierungsaktivität in mg/kg der Mehle; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Tamhane zwischen den Sorten - 118 -

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Liste der unterschiedlichen ATIs in Weizen (Call et al. 2020)	- 26 -
Tab. 2: Probennummer, Rohstoff; Zulassungsjahr, Ernte und Gruppe der Getreideproben	- 39 -
Tab. 3: Übersicht der Rezeptur des Backversuches 1 der Bäckereien Haubis und Ströck.....	- 41 -
Tab. 4: Übersicht der Rezeptur des Backversuches 2 der Bäckereien Haubis und Ströck.....	- 42 -
Tab. 5: Übersicht der Rezeptur des Semmelbackversuches (SBV) der AGES... 42 -	
Tab. 6: Pipettierschema des Leerstandards, des Standards, der Leerprobe und der Probe	- 50 -
Tab. 7: Pipettierschema zur Herstellung der BSA-Standards	- 53 -
Tab. 8: Pipettierschema zur Herstellung der TI-Standards	- 54 -
Tab. 9: Übersicht der HPLC-Einstellung (ATI-Quantifizierung)	- 58 -
Tab. 10: BSA -Standards für die externe Kalibrierung (ATI - RP-HPLC)	- 59 -
Tab. 11: TI-Standards für die externe Kalibrierung (ATI - RP-HPLC)	- 60 -
Tab. 12: Übersicht der HPLC-Einstellung (Gluten-Quantifizierung)	- 67 -
Tab. 13: Standardreihe des PWG-STD für die externe Kalibrierung (Gluten – RP-HPLC).....	- 68 -
Tab. 14: Pipettierschema zur Herstellung der Verdaulösungen	- 73 -
Tab. 15: Analysiertes lösliches Protein der Arnold-Mischprobe nach ein- bzw. zweistufiger Fällung mit variierender Sättigung (35 %, 70 % und 80 %)-	- 81 -
Tab. 16: Ermittelte Ergebnisse des löslichen Proteins, des ATI-Gehaltes und der Trypsin-Inhibitoraktivität der Mehle mittels CM-Extraktion	- 82 -
Tab. 17: Spearman-Korrelation der Trypsin-Inhibitoraktivität und des ATI- Gehaltes der CM-Extraktion.....	- 83 -
Tab. 18: Analytische Charakterisierung der Weizensorten (Ernte 2019)	- 84 -
Tab. 19: Pearson-Korrelation der proteinbezogenen Daten der ausgewählten Mehlsorten	- 88 -
Tab. 20: Statistische Auswertung der Rezeptureinflüsse (Backversuch 1) (Call 2020)	- 93 -

Tab. 22: Tabelle zur Bestimmung der Ammoniumsulfat-Menge zur Einstellung
der gewählten Konzentration (in % Sättigung) bei 0 °C (Pingoud & Urbanke
1997) - 115 -

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AGES	Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit
Alb/Glo	Albumin/Globulin
ANOVA	Einfaktorielle Varianzanalyse
ATI	Amylase-Trypsin-Inhibitor
BSA-STD	bovine serum albumin standard
CD	celiac disease
CM	Chloroform/Methanol
DTT	Dithiothreitol
EU	Europäische Union
FAO	Food and Agriculture Organization
FODMAP	fermentierbare Oligo-, Di- und Monosaccharide und Polyole
Glia	Gliadin
Glu	Glutenin
HLA	humanen Leukocyte Antigen
HMW	high molecular weight
HTL	Höhere Technische Lehranstalt
IBS	Reizdarmsyndrom
ICC	International Association for Cereal Science and Technology
IgA	Immunglobulin A
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
ILC	innate lymphoid cells
kDA	Kilodalton

LAB	lactic acid bacteria
L-BAPA	Benzoyl-L-Arginin-p-Nitroanilid
LMW	low molecular weight
MMW	medium molecular weight
NCGS	Nicht-Zöliakie-Glutensensitivität
NCWS	Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie-Weizensensitivität
PEP	Propylendopeptidase
PWG	Prolamin working group
PWG-STD	prolamin working group standard
RP-HPLC	reversed phase high performance liquid chromatography
SDS	sodium dodecyl sulfate
SGF	simulated gastric fluid
SIF	simulated intestinal fluid
SSF	simulated salvary fluid
TG	Transglutaminasen
TIA	Trypsin-Inhibitor-Assay
TI-STD	Trypsin-Inhibitor-Standard
TLR4	Toll-like-Rezeptor-4
TS	Trockensubstanz
TSN	total soluble nitrogen
TTA	total titratable acidity
USA	United States of America
WA	Weizenallergie
WDAI	wheat dimeric amylase inhibtiors
WDEIA	Weizenabhängige bewegungsinduzierte Anaphylaxie

WHO	World Health Organization
WMAI	wheat monomeric amylase inhibitors
WTAI	wheat tetrameric amylase inhibitors

1 Zusammenfassung

In dem letzten Jahrzehnt rückte die Erforschung von Weizeninhaltsstoffen, wie Weizenproteinen und Fruktanen, aufgrund von zunehmenden Weizenunverträglichkeiten und damit verbundenen negativen Auswirkungen auf die Gesundheit immer mehr ins Visier der Wissenschaft. Während die Zöliakie bei einem nur sehr geringen Prozentsatz der Bevölkerung auftritt, zeigen andere Weizenunverträglichkeiten wie die Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie-Weizensensitivität und das Reizdarmsyndrom steigende Prävalenzen von bis zu 16 %. Neben Weizenproteinen wie Gluten, wurden die Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATIs) als Hauptauslöser von Weizenunverträglichkeiten identifiziert. Im Vergleich zu Gluten, liegen nur wenig wissenschaftliche Daten über diese antinutritiven Inhaltsstoffe vor.

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Charakterisierung sechs ausgewählter Mehlsorten in Bezug auf deren Rohproteingehalt, Amylase-Trypsin-Inhibitoren-Gehalt, Glutengehalt sowie die Trypsin-Inhibitoraktivität und die Verdaubarkeit. Anschließend wurde die Verbesserung der Verdaubarkeit und die Reduktion des allergenen Potentials der hergestellten reinsortigen Weizenprodukte aufgrund von Rezeptur-bedingten Unterschieden untersucht. Speziell wurde der Einfluss der Sauerteigführung auf die produzierten Teiglinge sowie Gebäcke analysiert.

Anhand eines ersten Backversuches wurde eine Rezeptur zur Produktion von Sauerteigprodukten der Bäckereien Haubis und Ströck entwickelt und diese im zweiten Backversuch angewendet. Des Weiteren erfolgte ein Hefeteig-geführter Semmelbackversuch der AGES. Die Ergebnisse des Hauptbackversuches, zeigten einerseits, dass durch die Sauerteigführung der Gehalt an Amylase-Trypsin-Inhibitoren im Teigling um mehr als die Hälfte reduziert wurde. Andererseits ist die Trypsin-Inhibitoraktivität der Sauerteig-geführten Teiglinge im Vergleich zum jeweiligen Mehl gestiegen. Der Glutenabbau im Gebäck zeigte keine signifikanten Unterschiede bezogen auf die Teigführung. Hervorzuheben ist, dass die Verdaubarkeit unter Einsatz der Sauerteigtechnologie signifikant verbessert wurde.

2 Abstract

Over the past decade, the study of wheat ingredients, such as wheat proteins and fructans, has received an increasing scientific importance since wheat intolerances and associated negative health effects are becoming more common. While celiac disease occurs in a very small percentage of the population, other wheat intolerances such as non-celiac wheat sensitivity and irritable bowel syndrome show increasing prevalence of up to 16 %. In addition to wheat proteins such as gluten, amylase trypsin inhibitors (ATIs) have been identified as major triggers of wheat intolerance. When compared to gluten, little is known about these antinutritive wheat ingredients.

This work dealt with the characterization of six selected flours in terms of their crude protein content, amylase trypsin inhibitor content, gluten content, trypsin inhibitor activity and protein digestibility. Subsequently, the investigation was about improving digestibility and reducing the allergenic potential of the produced pure wheat products due to formulation-related differences. Specifically, the influence of sourdough technology on the produced dough pieces as well as baked goods was analyzed.

Based on a first baking trial, a recipe to produce sourdough products of the bakeries Haubis and Ströck was developed and applied in the second baking trial. Furthermore, a yeast fermentation baking trial was conducted by AGES. On the one hand the results of the main baking trial showed that the sourdough fermentation reduced the content of amylase trypsin inhibitors in the dough by more than half. On the other hand the trypsin inhibitor activity of the sourdough baking products increased in comparison to the respective flour. Gluten degradation in the baked product showed no significant differences related to dough management. It is worth pointing out that digestibility was significantly improved using the sourdough technology.

3 Einleitung und Aufgabenstellung

Heutzutage zählt der Weizen, neben Mais und Reis, zu den weltweit wichtigsten Kulturpflanzen für die menschliche Ernährung und wird in allen Ländern innerhalb der gemäßigten Zone angebaut. Etwa ein Drittel der Getreideanbaufläche wird für den Anbau von Weizen genutzt (Miedaner 2014). Für das Jahr 2020 wird eine Weizenproduktion von 756 Millionen Tonnen erwartet (FAO 2020). Laut Austria Statistik 2020 wurden allein in Österreich vorläufig um die 1,58 Millionen Tonnen Weizen im Jahr 2020 geerntet.

Weizen enthält im Gegensatz zum hohen Nährstoffgehalt auch problematische Inhaltsstoffe, welche zu gesundheitlichen Beeinträchtigungen führen können (Dale et al. 2018). Fermentierbare Oligo-, Di- und Monosaccharide und Polyole (FODMAPs), aber auch eine Reihe an Weizenproteinen, Gluten- und Nicht-Glutenproteine, können Weizenunverträglichkeiten auslösen (Scherf et al 2016a). Neben Glutenproteinen, die als Auslöser der Zöliakie bekannt sind, spielen Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATIs) eine bedeutende Rolle beim Auftreten von Erkrankungen wie dem Bäckerasthma, der Zöliakie, der Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie-Weizensensitivität, der Weizenallergie, dem Reizdarmsyndrom und extraintestinalen Entzündungen (Huebner et al. 2015; Junker et al. 2012; Reig-Otero et al. 2018; Zevallos et al. 2017; Zevallos et al. 2018). Prädisponierte Personen sollten daher den Verzehr von Getreide vermeiden, um bestimmte Unverträglichkeiten zu verhindern (Scherf et al 2016a).

Durch gezielte Lebensmittelverarbeitung kann das allergene Potential von Weizen herabgesetzt werden. Bei der Sauerteigführung wird die Zusammensetzung und die Aktivität der Weizenproteine verändert und es kommt durch die Senkung des pH-Wertes zur Aktivierung von proteolytischen Enzymen (Huang et al. 2020). Die Proteolyse erfolgt durch endogene oder exogene Getreideproteasen und Peptidasen von Milchsäurebakterien des Sauerteiges und zeigt einen Einfluss auf das allergene Potential sowie auf das Potential, Unverträglichkeiten auszulösen (Gobetti et al. 2014). Durch die Aktivität der Propylendopeptidase (PEP) kann ein Abbau von Gluten verzeichnet werden (Jouanin et al. 2018). Zusätzlich kommt es zur Akkumulation von Glutathion im Sauerteig und zur Reduktion von intermolekularen und intramolekularen Disulfidbrückenbindungen. Huang et al. (2020) untersuchte ebenfalls die

Veränderung der Amylase-Trypsin-Inhibitoren während der Sauerteigführung und der Hefeteigführung und kam zu dem Ergebnis, dass durch die Sauerteigfermentation die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Tumornekrosefaktoren reduziert wurde. Aktuelle Daten lassen vermuten, dass ATIs durch die Sauerteigfermentation abgebaut werden können sowie ihre Aktivität vermindert werden kann und somit die Sauerteigtechnologie eine Strategie zur Verbesserung der Entwicklung von Produkten für Personen mit Weizenunverträglichkeiten darstellt.

Ziel dieser Arbeit war es, im Zuge des ID-WHEAT Forschungsprojektes den Einfluss der Sauerteigführung auf die Proteine im Weizen zu analysieren. Zuerst erfolgte ein Vorversuch, der sogenannte Backversuch 1. Hierbei wurden bei den Bäckereien Haubis und Ströck Backversuche im größeren Maßstab unter Verwendung von Sauerteig hergestellt. Um zusätzliche Einflussfaktoren durch die Verwendung verschiedener Mehle auszuschließen, wurde ausschließlich das gut charakterisierte W700 Rösselmehl der Pfahnl Mühle für die Herstellung der Teiglinge bzw. des Gebäcks verwendet. Der Backversuch 1 diente zur Evaluierung von rezeptbedingten Einflüssen durch die Änderung von Prozessparametern, wie der Vorsaueremenge (5 %, 10 %, 15 %), Vorsauerstufe (1- bzw. 2-stufig) und der Fermentationszeit (1,5 h, 8h, 16 h).

Im Hauptversuch (Backversuch 2) wurde eine Rezeptur für die beteiligten Bäckereien basierend auf den Ergebnissen des ersten Backversuches, speziell bezogen auf den ATI- und Fruktanabbau, entwickelt. Mit den sechs ausgewählten reinsortigen Mehlen wurden die jeweiligen Teiglinge/Gebäcke unter Anwendung der Sauerteigtechnologie produziert. Des Weiteren wurde der AGES Semmelbackversuch mit Hefe-fermentierten Teiglingen/Gebäckstücken durchgeführt. Die erhaltenen Produkte wurden mittels unterschiedlicher quantitativer Methoden analysiert, um lösliches Protein, ATI- und Glutengehalt, die Trypsin-Inhibitoraktivität (TIA) und die Verdaubarkeit zu untersuchen. Durch die erhobenen Daten der Mehle, der Sauerteigprodukte und der Hefe-fermentierten Gebäcke, konnte der Einfluss der Sauerteigfermentation im Vergleich zum Hefe-fermentiertem Gebäck aufgezeigt werden. Somit konnten Aussagen über den ATI- und Glutenabbau sowie eine Veränderung der Verdaubarkeit, der TIA und des löslichen Proteins bei der Verarbeitung des Rohstoffes zu Teiglingen/Gebäck getroffen werden.

Zudem wurden verschiedene Extraktionsmethoden untersucht, um spezifisch die Amylase-Trypsin-Inhibitoren zu extrahieren und andere störende Komponenten zu vermeiden. Das Ziel dieses Vorversuches war es, eine Korrelation zwischen der biologischen Aktivität und des ATI-Gehaltes, welche bei der Extraktion mit Natriumchlorid nicht gegeben ist, durch modifizierte Extraktionen mit einer Chloroform/Methanol-Lösung oder einer Ammoniumsulfat-Fällung zu erlangen.

Für die Quantifizierung des ATI- und Glutengehaltes wurden die einzelnen Proteinfractionen der Weizenproben unter Einsatz von RP-HPLC aufgetrennt und analysiert. Des Weiteren wurde das lösliche Protein nach der Methode von Bradford bestimmt. Um fundierte Ergebnisse zu erhalten, wurde zudem die Analyse des Gesamtstickstoffgehaltes nach Dumas durchgeführt. Die Trypsin-Inhibitoraktivität wurde mittels TIA-Assay nach Call et al. (2019) ermittelt. Außerdem wurde ein *in vitro* Verdau umgesetzt, um die Proteinverdaubarkeit der Produkte beurteilen zu können.

4 Theoretischer Hintergrund

4.1 Weizen

Weizen ist weltweit das wichtigste Grundnahrungsmittel und hat andere Getreidearten wie Reis und Mais weit hinter sich gelassen. Die EU gilt als Hauptproduzent, gefolgt von China, Indien und der USA (Schuppan & Gisbert-Schuppan 2018). Bis zur Neolithischen Revolution galt das Getreide nicht als Nahrungsmittel der Menschen, erst seit 10.000 Jahren begann der Anbau und Verzehr von Getreide (Scherf et al. 2016a). Der Weizen (*Triticum* L.) gehört zu den Süßgräsern (*Poaceae*) und bietet eine stärke-, mineralstoff- und vitaminreiche Nahrung.

Die Gattung *Triticum* wird anhand ihrer Chromosomensätze in unterschiedliche Arten eingeteilt. Dabei enthält jeder Chromosomensatz sieben Chromosomen (Miedaner 2014). Die Urform des Weizens ist das Einkorn (*T. monococcum*), ein Wildweizen, der einen diploiden Chromosomensatz (AA) besitzt. Durch das Kreuzen mit Ziegenras entstand Emmer (*T. dicoccum*), welcher als tetraploider Weizen mit vier Chromosomensätzen (AABB) bezeichnet wird. Als Verwandte des Emmers gelten Durum- bzw. Hartweizen (*T. durum*). Durch weitere Kreuzung verdreifachte sich der Chromosomensatz und es entstand der hexaploide Weizen (AABBDD), die Frühform des Dinkels (*T. spelta*). Der moderne Brotweizen bzw. Weichweizen (*T. aestivum*) entwickelte sich aus dem hexaploiden Weizen weiter. In Abb. 1 ist ersichtlich, wie die einzelnen Weizenarten entstanden sind (Schuppan & Gisbert-Schuppan 2018).

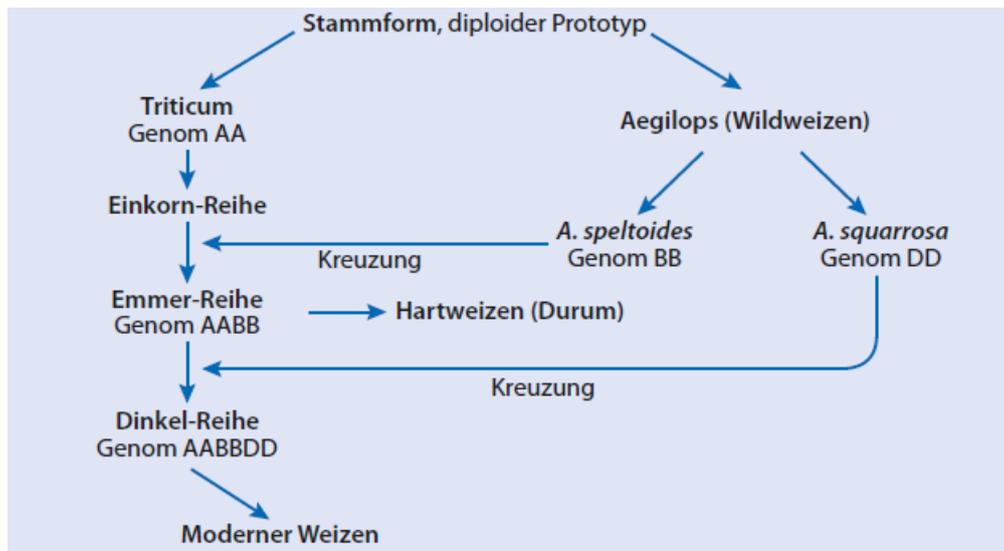


Abb. 1: Entstehung des modernen Weizens durch Kreuzung und Weiterentwicklung (Schuppan & Gisbert-Schuppan 2018)

Im großen Maßstab werden heutzutage Weichweizen und Hartweizen angebaut, wobei etwa 90 % der Ernte der Weichweizen ausmacht. Der sogenannte moderne Weizen wird vor allem für Backzwecke als auch als Futter, Braugetreide und Rohstoff für die Stärkeindustrie genutzt. Durum und Hartweizen werden bevorzugt für die Nudelherstellung genutzt und stammen aus dem Mittelmeerraum (Miedaner 2014).

Das Getreidekorn ist außen von einer Fruchtwand (Pericarp) und einer Samenschale (Testa) umschlossen, die Zellulose und Mineralstoffe enthalten. Nach innen folgt die Aleuronschicht, welche Proteine, Mineralstoffe, Vitamine, vor allem Vitamin B, Enzyme und einen geringen Anteil an Fett beinhaltet. Seitlich beim Nährgewebe befindet sich der Keimling, der reich an Lipiden, Proteinen, Mineralstoffen, Enzymen und Vitaminen ist. Etwa 80 % des Getreidekorns besteht aus dem Mehlkörper (Endosperm). Neben Stärke enthält das Endosperm geringe Mengen an Glucose und Maltose und auch Protein (Baltes & Matissek 2011). In der Abb. 2 sind die unterschiedlichen Bestandteile des Getreidekorns beschrieben.

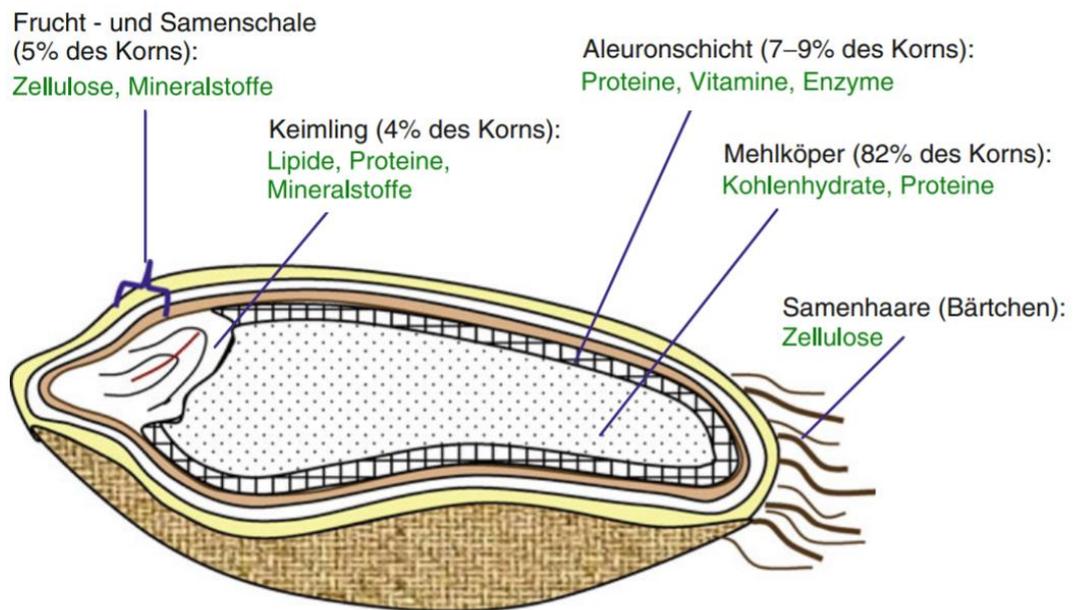


Abb. 2: Aufbau des Getreidekorns (Baltes & Matissek 2011)

Das Weizenkorn kann entweder bespelzt vorliegen, wobei der Weizen von Spelzen umgeben ist und diese auch bei der Ernte nicht abgelöst werden oder freidreschend. Das bedeutet, dass das Korn nackt vorliegt und auch nur die Körner geerntet werden (Miedaner 2014).

4.2 Weizenproteine

In Europa liegt der Proteingehalt von Weizen bei etwa 8-11 % (Rosentrater & Evers 2018). Der Gehalt kann in Getreide von weniger als 6 % bis zu über 20 % variieren und ist abhängig vom Genotyp (Getreide, Art, Sorte) als auch von den Wachstumsbedingungen wie Boden, Klima und Düngung.

Die Getreideproteine können je nach ihrer Funktion in Stoffwechselproteine, Strukturproteine und Speicherproteine eingeteilt werden. Die Stoffwechselproteine, wie Enzyme und Enzym Inhibitoren befinden sich hauptsächlich in der Aleuronschicht und im Keimling. Die Strukturproteine, wie Membranproteine sind in den äußeren Schichten des Getreides und in den Stärke-Granula zu finden. Im Endosperm sind die Speicherproteine lokalisiert, welche etwa 70-80 % der gesamten Getreideproteine ausmachen. Ihre Hauptfunktion ist den Keimling mit Stickstoff und Aminosäuren während der Keimung zu versorgen. Die meisten Getreideproteine enthalten alle 20 proteinogenen Aminosäuren. Es gibt einen signifikanten Unterschied in der Aminosäuresequenz zwischen Albuminen/Globulinen und Prolaminen/Glutelinen

(Wieser et al. 2014). In allen Getreidearten ist der Gehalt an Lysin niedrig, Weizen enthält zudem geringere Mengen an Methionin. Die Proteine des Weizens werden gemäß Osborne (1907) nach ihrer Löslichkeit in vier Fraktionen eingeteilt:

- Albumine
- Globuline
- Prolamine
- Gluteline

Osborne zeigte wie die genannten Fraktionen aus einem Mehl extrahiert werden können (Belitz et al. 2008). Albumine sind löslich in Wasser als auch in Salzlösungen. Globuline gelten als unlöslich in Wasser, sind jedoch in Salzlösungen löslich. Albumine und Globuline können demnach zusammen extrahiert werden. Prolamine können weder in Wasser noch in Salzlösungen gelöst werden, sie werden mittels 60-70 % Ethanol extrahiert. Den Rückstand bilden die Gluteline, welche intermolekulare Disulfidbrückenbindungen aufweisen. Sie können mittels einer Extraktionslösung, die einen wässrigen Alkohol (z.B. 50 % Propanol), ein Reduktionsmittel (z.B. DTT) und disaggregierende Substanzen wie Harnstoff enthalten, extrahiert werden (Wieser et al. 2014).

4.2.1 Albumine/Globuline

Albumine und Globuline zählen größtenteils zu den Stoffwechselproteinen. Die Zusammensetzung der Aminosäuren zeigt einen hohen Anteil an essentiellen Aminosäuren wie Threonin, Lysin und Tryptophan (Wieser et al. 1980). Bestimmte hochmolekulare Albumine weisen Eigenschaften von Speicherproteinen auf, welche einen Einfluss auf die Weizenqualität (Getreidehärte, Teig rheologie und Brotvolumen) haben (Higgins 1984).

Es wurden mehr als 80 % der Albumine und Globuline als Enzyme mit verschiedenen physiologischen Funktionen identifiziert. Nach ihrer Funktion wurden sie in acht unterschiedliche Gruppen eingeteilt: Kohlenhydratmetabolismus (27 %), Proteinmetabolismus (27 %), Stress/Abwehr/Entgiftung (11 %), Zellmetabolismus (6 %), Transkription/Translation (4 %), Stickstoffmetabolismus (4 %), Photosynthese

(4 %), Signaltransduktion (1 %) und unbekannte Proteine (16 %) (Dong et al. 2012).

Das Molekulargewicht liegt meist unter 25 kDa. Einige wenige können ein Molekulargewicht von 60-70 kDa aufweisen. Die beiden Fraktionen liegen hauptsächlich als Monomere vor, bilden jedoch intermolekulare Disulfidbrücken (Tomić et al. 2015).

Den größten Gehalt an Albuminen und Globulinen im Weizenkorn findet man in der Aleuronschicht, der Kleie und im Keimling. Vergleichsweise ist die Konzentration im Endosperm mit bis zu 20 % zum Gesamtproteingehalt relativ gering (Köhler & Wieser 2013; Zilić et al. 2011).

Die α -Amylase-Trypsin-Inhibitoren im Weizen zählen zu den Albuminen und werden im Kapitel 4.2.3. Amylase-Trypsin-Inhibitoren dieser Arbeit näher beschrieben.

4.2.2 Prolamine/Gluteline

Prolamine und Gluteline zählen beide zu den Speicherproteinen. Im Weizen werden die Prolamine auch Gliadine und die Gluteline als Glutenine bezeichnet (Wieser et al. 2014). Die beiden Fraktionen werden als Kleberprotein oder Glutenproteine zusammengefasst. Nach ihrer Struktur werden die Kleberproteine in drei Hauptgruppen, die aus mehreren Untergruppen bestehen, wie folgt eingeteilt:

- Hochmolekulare Gruppe (HMW) mit den HMW-Untereinheiten der Glutenine
- Gruppe mittleren Molekulargewichts (MMW) mit den ω 5- und den ω 1,2-Gliadinen
- Niedermolekulare Gruppe (LMW) mit den α - und γ -Gliadinen und LMW-Untereinheiten der Glutenine (Belitz et al. 2008)

Proteine der hochmolekularen Gruppe bestehen aus 600–800 Aminosäureresten und besitzen ein Molekulargewicht von 70–90 kDa. Sie enthalten hohe Mengen an Glutamin (26-36 %), Glycin (16-20 %) und Prolin (10-15 %) und machen somit etwa 60 % des Gesamtaminosäuregehalts dieser Proteine aus.

Die ω 1,2-Gliadine der MMW-Proteingruppe enthalten 320–380 Aminosäurereste und weisen ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa auf. Die ω 5-Gliadine des Weizens, welche ebenfalls zur Gruppe der Proteine mit mittlerem Molekulargewicht gehören, mit etwa 420 Aminosäurereste besitzen ein Molekulargewicht von ungefähr 50 kDa. Die Proteine dieser Gruppe zeigen eine sehr unregelmäßige Aminosäurezusammensetzung mit einem üblicherweise hohen Anteil an Glutaminen (37-53 %), Prolinen (20-29 %) und Phenylalaninen (9-10 %) und machen zusammen etwa 80 % des Gesamtaminosäuregehalts der MMW-Gruppe aus.

Die niedermolekulare Gruppe zählt etwa 300 Aminosäurereste und weist ein Molekulargewicht von 28-35 kDa auf. Die Aminosäuresequenz wird von den Aminosäuren Glutamin (28-36 %) und Prolin (11-22 %) dominiert und besitzt einen relativ hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren wie Leucin (5-9 %) und Valin (5-8 %) (Scherf et al. 2016a).

Gluten ist definiert als eine Proteinfraction von Weizen, Roggen, Gerste, Hafer sowie ihren Kreuzungen und Derivaten, die manche Menschen nicht vertragen und die unlöslich in Wasser und 0,5 M NaCl ist. Als glutenfrei gelten Produkte, deren Glutengehalt 20 mg/kg nicht überschreitet. Lebensmittel mit einem reduzierten Glutengehalt weisen Mengen zwischen 20-200 mg/kg auf (CODEX STAN 118-1979, 2008). Nahrungsmittel können von Natur aus glutenfrei sein oder ein bzw. mehrere Inhaltsstoffe aus Weizen, Gerste Roggen und Hafer sowie Kreuzungen enthalten, wobei das Gluten durch spezielle Verfahren entfernt wurde, sodass der Gehalt an Gluten unter 20 mg/kg liegt. Aus biochemischer Sicht ist Gluten ein Gemisch von Prolaminen und Glutelinen. Die Glutenpeptide, welche für Zöliakiepatienten potentiell schädlich sind, entstehen durch die enzymatische Spaltung von Gluten in kleinere Fragmente. Manche Glutenpeptide gelten als immunogen oder toxisch. Sie werden bei glutenunempfindlichen Personen entweder mit dem Stuhl ausgeschieden oder durch Darmbakterien abgebaut. Der menschliche Körper besitzt keine Enzyme, welche fähig sind diese prolinreichen Peptide vollständig abzubauen. Bei Personen, die unter der Zöliakie oder an einer Glutenunverträglichkeit leiden, können die Glutenpeptide als Auslöser von Entzündungsreaktionen fungieren. Dabei durchdringen sie das Darmepithel und lösen in der darunterliegenden Gewebeschicht Entzündungen aus (Harter 2019).

Die Glutenproteine sind von besonderer Bedeutung für die Backeigenschaften eines Produktes. Die Glutenine sind für die Quervernetzungen verantwortlich. Sie bilden eine netz- oder schwammartige Gestalt und führen somit zur gewünschten Lockerheit des Produktes. Die Gliadine führen zur Stabilisierung des Backproduktes durch Einlagerung in die Hohlräume und Netzgebilde. Durch die schwammartige Struktur kann besonders gut Wasser und Kohlenstoffdioxid eingelagert werden. (Schuppan & Gisbert-Schuppan 2018). Hydratisierte Gliadine zeigen eine geringere Elastizität und Kohäsivität als Glutenine und sind verantwortlich für die Viskosität und die Dehnbarkeit des Teiges. Die hydratisierten Glutenine sind dagegen kohäsiv und elastisch und verleihen dem Teig daher Festigkeit und Elastizität (Wieser et al. 2014).

4.2.3 Amylase-Trypsin-Inhibitoren

Die Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATIs) wurden im Jahre 1973 das erste Mal isoliert und gelangten ab diesem Zeitpunkt in das Blickfeld wissenschaftlicher Untersuchungen (Silano et al. 1973). ATIs zählen zu den potenziellen Auslösern der Weizenallergie (engl. wheat allergy, WA) und der Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie-Weizensensitivität (engl. non celiac gluten (wheat) sensitivity, NCGS/NCWS). Sie wurden zudem als Ursache von Bäckerasthma identifiziert (Sánchez-Monge et al. 1992).

Amylase-Trypsin-Inhibitoren gehören zur Albumin/Globulin-Fraktion und machen etwa 2-4 % des gesamten Weizenproteins aus (Dupont et al. 2011). Die niedermolekulare, wasserlösliche Proteinfamilie weist Molekulargewichte im Bereich von 12-16 kDa auf. Anhand der Aggregation der Moleküle können sie in drei Gruppen eingeteilt werden. Die monomeren Weizen Amylase Inhibitoren (engl. wheat monomeric amylase inhibitors, WMAI), auch als 0,28 Proteine bezeichnet, zeigen Molekulargewichte zwischen 12-15 kDa. Hingegen sind die nicht-kovalent gebundenen dimeren Amylase Inhibitoren (engl. wheat dimeric amylase inhibitors, WDAI), auch bezeichnet als 0,19, 0,36, 0,38 und 0,53 und die tetrameren Inhibitoren (engl. wheat tetrameric amylase inhibitors, WTAI) durch größeren Molekulargewichte von 24-30 kDa und 50-60 kDa charakterisiert. Während die WMAIs und WDAIs hauptsächlich das Enzym Amylase inhibieren, fungieren WTAIs als bifunktionale Inhibitoren von Amylase und Trypsin (Shewry et al. 1984, Altenbach et al. 2011). Aufgrund ihrer Löslichkeit in einer Mischung

aus Chloroform und Methanol werden die WTAls auch als CM-Proteine bezeichnet (Shewry et al. 1984).

Die Amylase-Trypsin-Inhibitoren, welche zur Superfamilie der Prolamine gehören, sind cysteinreiche Proteine, die durch die Bildung von Disulfidbrückenbindungen ein dreidimensionales Netzwerk mit einem hohen Anteil an α -Helices formieren. Dies verleiht den ATIs ihre Stabilität gegenüber der Proteolyse und thermischen Einflüssen (Kreis et al. 1985).

Anhand einer Genomsequenzierung wurden 19 gencodierende Sequenzen für unterschiedliche ATIs und ähnliche Protease Inhibitoren in modernen hexaploiden Weizen identifiziert. Dazu gehören zwei WMAIs, vier WDAls, sechs WTAls und vier Trypsin Inhibitoren (CMx und WTI). Neben den ATIs zählen auch Weizen-Chymotrypsin-Inhibitoren (engl. wheat chymotrypsin inhibitor, WCI) und Weizen-Amylase-Subtilisin-Inhibitoren zur ATI-Familie (Altenbach et al. 2011). Die 0,19 und CM-Proteine besitzen mehr als 50 % Anteil an der Gesamtmenge an ATIs (Zevallos et al. 2017). In Tab. 1 sind 13 unterschiedliche ATIs aufgelistet, die einen Einfluss auf den Proteingehalt im Weizen aufweisen und nicht nur durch Gensequenzierung nachgewiesen wurden (UniProtKB, <https://www.uniprot.org/uniprot>).

Tab. 1: Liste der unterschiedlichen ATIs in Weizen (Call et al. 2020)

Abbreviation	Aggregation	UniProtKB name	UniProtKB accession no.	No. of amino acids	MW [kDa]	Cysteine residues
0.28	WMAI	Alpha-amylase inhibitor 0.28	P01083	123	13.326	10
0.19	WDAI	Alpha-amylase inhibitor 0.19	P01085	124	13.337	10
0.53	WDAI	Alpha-amylase inhibitor 0.53	P01084	124	13.185	9
CM1	WTAI	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM1	P16850	120	13.086	10
CM2	WTAI	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM2	P16851	120	13.035	10
CM3	WTAI	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM3	P17314	143	15.832	10
CM16	WTAI	Alpha-amylase/trypsin inhibitor CM16	P16159	119	13.437	10
CM17	WTAI	CM 17 protein	Q41540	119	13.431	10
CMX1/3	WTAI	Trypsin/alpha-amylase inhibitor CMX1/CMX3	Q43723	97	11.408	10
CMX2	WTAI	Trypsin/alpha-amylase inhibitor CMX2	Q43691	97	11.466	10
WCI		Chymotrypsin inhibitor WCI	P83207	119	12.944	10
WASI		Endogeneous alpha-amylase/subtilisin inhibitor	P16347	180	19.633	4
WTI		Bowman-Birk type trypsin inhibitor	P81713	71	7.962	10

ATIs und andere Protease Inhibitoren sind im Endosperm des Getreidekorns lokalisiert und zählen zum natürlichen Abwehrmechanismus der Pflanze vor Parasiten und Insekten, indem sie die Amylase- und Trypsin-Aktivität hemmen. Die ATIs im Weizen inhibieren jedoch keine Enzyme im Getreide (Ryan 1990; Carbonero & García-Olmedo 1999).

Amylase-Trypsin-Inhibitoren beeinflussen über zwei unabhängige Wirkungsmechanismen auch die menschliche Gesundheit. Man unterscheidet

hierbei den indirekten und den direkten Einfluss der ATIs, wie in Abb. 3 ersichtlich.

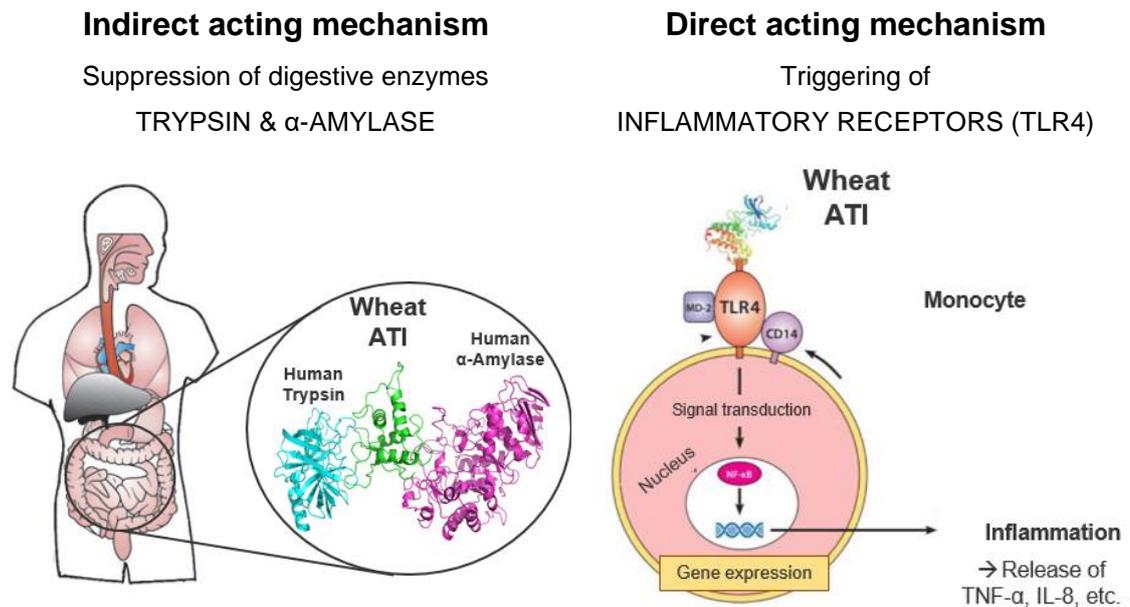


Abb. 3: Indirekter und direkter Wirkungsmechanismus der Amylase-Trypsin-Inhibitoren (übernommen von GanzimmunDiagnostics©)

Indirekt hemmen sie die Enzyme Amylase und Trypsin, welche zu den Hauptverdauungsproteinen im menschlichen Darm zählen. Dies führt zur Akkumulation von unverdauten und potenziell immunogenen Peptiden. ATIs weisen zwei unabhängige Bindungsstellen für Amylase und Trypsin auf, weshalb sie fähig sind beide Enzyme gleichzeitig zu binden (Cuccioloni et al. 2016). Einen direkten Einfluss zeigen ATIs bei der Bindung von spezifischen proinflammatorischen Rezeptoren. ATIs passieren aufgrund ihrer Resistenz gegenüber der intestinalen Proteolyse den Dünndarm als intaktes Protein und agieren nach dem Verdau als Auslöser der angeborenen Immunantwort in menschlichen Körperzellen, indem sie den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) aktivieren und somit proinflammatorische Chemokine und Zytokine, wie Interleukin (IL-8) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) freisetzen, die zu Entzündungen und diversen Symptomen führen. CM3 und 0,19 ATIs wurden als Hauptauslöser des TLR4-Rezeptors identifiziert (Junker et al. 2012; Cuccioloni et al. 2017; Zevallos et al. 2017).

4.3 Weizenunverträglichkeiten

Während der Weizen für die meisten Menschen als Grundnahrungsmittel dient, führt die Konsumation des Getreides bei einem geringeren Anteil der Weltbevölkerung zu negativen Auswirkungen auf die Gesundheit. Nicht alle Komponenten des Weizenkorns wirken sich gleichermaßen auf die Weizenunverträglichkeit aus. Weizenproteine und Fruktane zählen zu den Hauptauslösern (Arentz-Hansen et al. 2002). Neben der Zöliakie, welche gut erforscht und namentlich bekannt ist, sind noch drei weitere Erkrankungen oder Überempfindlichkeiten wie die Weizenallergie, die Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie-Weizensensitivität und das Reizdarmsyndrom von Bedeutung (Abb. 3). Die genannten Weizenunverträglichkeiten weisen eine breite Bandbreite an klinischen Symptomen auf (Dale et al., 2018). In den letzten Jahrzehnten konnte ein bedenklicher Anstieg an Patienten, die an einer Weizenunverträglichkeit leiden, beobachtet werden (Caminero & Verdu 2019).

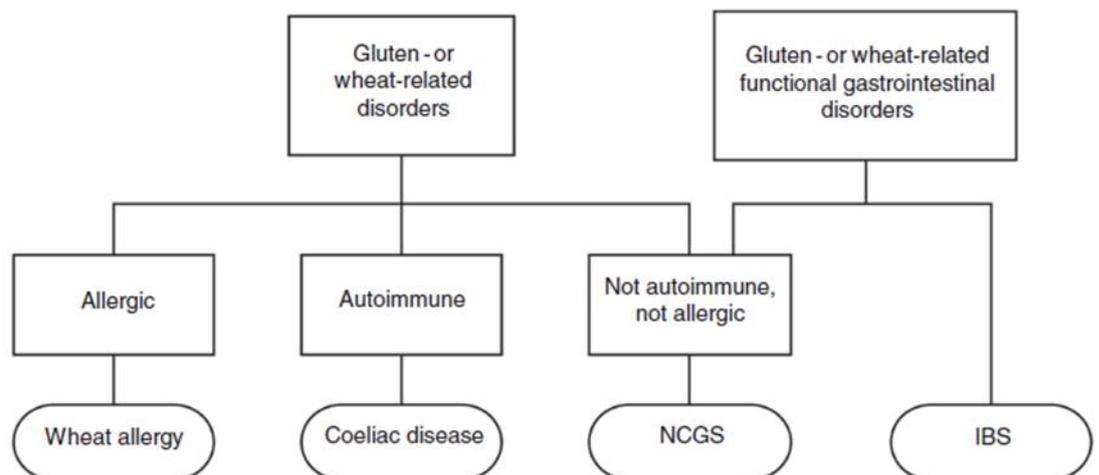


Abb. 4: Überblick der Weizenunverträglichkeiten: Weizenallergie, Zöliakie, Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie-Weizensensitivität und Reizdarmsyndrom (Dale et al. 2018)

4.3.1 Zöliakie

Die Zöliakie (engl. celiac disease, CD) ist eine chronische immuninduzierte Enteropathie des Dünndarms, ausgelöst durch die Aufnahme von Gluten durch die Nahrung von genetisch prädisponierten Menschen (Ludvigsson et al. 2013). Weltweit leiden ungefähr 1 % der Menschen an der Zöliakie (Ludvigsson et al. 2014). Etwa 95 % der Zöliakiepatienten besitzen vererbte humane

Leukozytenantigene (engl. human leukocyte antigen, HLA), welche zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Gluten führen. Da etwa 30-40 % der Bevölkerung die sogenannten HLA-DQ2 und/oder HLA-DQ8 Gene besitzen, wird vermutet, dass das Vorhandensein dieser Gene nicht der einzige Auslöser der Zöliakie ist (Catassi et al. 2013). Es wurde nachgewiesen, dass neben der schlechten Verdaubarkeit von Gluten auch ungewöhnlich durchlässige Darmwände eine Rolle spielen (Sapone et al. 2011). Marsh (1992) beschreibt, dass nicht nur das adaptive, sondern auch das angeborene Immunsystem einen Einfluss auf die Erkrankung hat.

Nach der Nahrungsaufnahme von Zöliakiepatienten können intakte Glutenpeptide die Dünndarmschleimhaut passieren. Das humane Enzym, die Tissue Transglutaminase (engl. tissue transglutaminase, tTG), vollzieht hierbei eine Deaminierung der Glutenpeptide. Die deaminierten Glutenpeptide binden die HLA-DQ2 Moleküle, wodurch es zur Aktivierung der intestinalen T-Lymphozyten über den T-Zell-Rezeptor kommt. In weiterer Folge werden proinflammatorische Zytokine, wie Interferon- γ , Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Interleukin (IL-2) freigesetzt, die zur Schädigung der Enterozyten und zu intestinalen Läsionen führen (Ludvigsson et al. 2013; Mocan & Dumitraşcu 2016).

Zu den klassischen Symptomen der CD zählen gastrointestinale Symptome wie Bauchschmerzen, Durchfall und Blähungen. Eine auftretende Villi-Atrophie führt zur Malabsorption von Mikro- und Makronährstoffen und somit zum Gewichtsverlust oder zu Wachstumsstörungen. Einige Patienten zeigen auch Symptome wie Müdigkeit, Anämie, Osteoporose, Dermatitis herpetiformis, neurologische Ausfälle, Depressionen, Unfruchtbarkeit und Zahnschmelzhypoplasie. Im Gegenzug dazu gibt es auch Patienten, bei denen die Erkrankung diagnostiziert wurde, denen jedoch jegliche Symptome fehlen (Ludvigsson et al. 2013; Ludvigsson et al. 2014).

Zur Diagnose der CD werden serologische Tests, wie zum Beispiel auf Serum IgA anti-endomysiale-, anti-TG2- und/oder anti-deaminierte Gliadinpeptid-Antikörper und eine Biopsie des Zwölffingerdarms durchgeführt. Durch die Kombination eines serologischen Tests und einem histologischen Befund kann mit fast 100 % iger Sicherheit die Krankheit nachgewiesen werden. Vor den Tests muss eine glutenhaltige Diät mit einer minimalen Aufnahme von 10 g Gluten pro

Tag für sechs Wochen sichergestellt werden, um die Zöliakie überhaupt diagnostizieren zu können (Lebwohl et al. 2018; Scherf et al. 2016a).

Neue Erkenntnisse zeigen das wahrscheinlich auch Nicht-Glutenproteine wie Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATIs), Serpine und Avenin-like Proteine die Zöliakie auslösen (Huebner et al. 2015; Sánchez et al. 2018).

4.3.2 Weizenallergie

Die Weizenallergie (engl. wheat allergy, WA) wird definiert als eine Reaktion auf Weizenproteine unter Involvierung des Immunsystems. Die Allergie wird durch die IgE-Antikörper vermittelt. Bei Getreide wie Roggen oder Gerste ist die Erkrankung nicht von Bedeutung, sofern keine IgE-Kreuzreaktion vorliegt (Pourpak et al. 2005). Weltweit leiden etwa 0,4-4 % der Menschen an einer Weizenallergie (Czaja-Bulsa & Bulsa 2017).

Unterschiedliche Faktoren wie eine Schädigung der Epithelien begünstigen die Exposition mit den Weizenproteinen und somit die Weizenallergie. Die Sekretion von IL-25 oder IL-33 durch die Epithelienzellen führt zur Differenzierung der dendritischen Zellen in einen Phenotyp, welcher zu einer Th2 Zellantwort führt. Aber auch andere Zellen wie Typ 2 Innate Lymphoid Cells (ILCs) führen zu der Th2 Zellantwort (Yu et al. 2016). Es kommt zur Produktion von Zytokinen wie IL-4, IL-5 und IL-13, die eine wichtige Rolle bei der Bildung der IgE-Antikörper spielen. Bei einer wiederholten Exposition gegenüber Weizenproteinen binden die IgE-Antikörper den FcεRI Rezeptor auf basophilen Zellen und Mastzellen und es kommt zur Erkennung sowie Bindung der spezifischen Epitope auf den Weizenallergenen. Dies führt zur Freisetzung von inflammatorischen und vasoaktiven Mediatoren (Berin & Sampson 2013; Tordesillas et al. 2017).

Bei der WA kommt es zu verschiedenen klinischen Manifestationen abhängig vom Alter der Patienten. Die Allergie, welche mit der Nahrungsaufnahme von Weizen assoziiert wird, zeigt eine Prävalenz bei Kindern und kann mit dem Erwachsenenalter wieder abklingen (Keet et al. 2009; Nilsson et al. 2015). Zu den Symptomen, die mit der Weizenaufnahme durch die Nahrung in Verbindung gebracht werden können, zählen unter anderem Erbrechen, Bauchschmerzen, Urtikaria, Angioödem, Anaphylaxie, respiratorische Symptome und Hautreaktionen.

Bei Erwachsenen kommt es häufiger zur weizenabhängigen bewegungsinduzierten Anaphylaxie (WDEIA). Bei dieser Form der Allergie führt nicht allein die Aufnahme von Weizen zu einer allergischen Reaktion, sondern die Kombination mit zum Beispiel intensiver körperlicher Bewegung (Christensen et al. 2019). Seltener durch andere Faktoren wie die zusätzliche Aufnahme von Acetylsalicylsäure, andere nicht-steroidale entzündungshemmende Arzneimittel, Alkohol oder ein schlechter Allgemeinzustand des Patienten. Bis zu den ersten Symptomen nach der Exposition dauert es etwa ein bis vier Stunden. Die Krankheit tritt bei nur weniger als 0,1 % der Bevölkerung auf (Scherf et al. 2016b).

Die Weizenallergie kann auch durch die Inhalation von Weizenproteinen hervorgerufen werden und wird dann als Bäckerasthma bezeichnet (Quirce & Diaz-Perales 2013). Die Inhalation von Weizenmehl hat den bedeutendsten Einfluss als Auslöser der Erkrankungen. Zu den Symptomen gehören Schnupfen, aber auch Konjunktivitis oder Hautreaktionen. Meistens zeigen Patienten, die an Bäckerasthma erkrankt sind, nach der Aufnahme von gekochtem Weizen sowie Weizenprodukten keine Symptome, außer bei der Kontamination der Produkte durch Weizenmehl (Armentia et al. 2009).

Verantwortlich für die Weizenallergie sind verschiedene Weizenallergene wie α -Amylase/Trypsin Inhibitoren oder nicht-spezifische Lipid-Transfer-Proteine (Palacin et al. 2007, 2009, 2010) sowie unter anderem ein Pflanzenabwehrprotein, ω -5-Gliadine, α -, β -, γ -Gliadine, LMW-, HMW-Glutene und Thioredoxin (Pahr et al. 2013; Morita et al. 2009; Le et al. 2016; Baar et al. 2012; 2014; Hofer et al. 2018; Weichel et al. 2006).

Die Diagnose der Weizenallergie je nach klinischem Bild erfolgt anhand einer genauen klinischen Krankengeschichte, der physischen Verfassung des Patienten und der Auswahl eines geeigneten Tests. Die anfänglichen Tests beruhen auf der Messung von spezifischen IgE-Antikörpern gegenüber Weizenextrakten und Weizenallergenen im Blutserum und auf dem Haut-Prick-Test. Im Falle der Allergie aufgrund der Nahrungsaufnahme von Weizen wird weiterführend ein Nahrungsmitteltest mittels Doppel-Placebo-Effekt durchgeführt (Sicherer & Sampson 2018). Die Diagnose von WDEIA beinhaltet eine genaue klinische Krankengeschichte, den Test auf IgE-Antikörper gegenüber Weizen und spezifische Weizenallergene wie ω -5-Gliadine und eine Placebo kontrollierte Weizen/Bewegungschallenge. Bei letzterem Test erfolgt 30 min nach der

Weizenaufnahme eine 15-20-minütige Bewegungseinheit auf dem Laufband (Scherf et al. 2016b; Cianferoni 2016). Das Bäckerasthma wird ebenfalls durch die klinischen Symptome, das Vorkommen spezifischer IgE-Antikörper und/oder der Durchführung eines Haut-Prick-Tests diagnostiziert. Des Weiteren kann ein Inhalationstest durchgeführt werden (Cianferoni 2016).

4.3.3 Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie-Weizensensitivität

Die Nicht-Zöliakie-Nicht-Weizenallergie-Weizensensitivität (engl. non-celiac wheat sensitivity, NCWS) ist eine Unverträglichkeit, welche auf die Nahrungsaufnahme von Gluten und/oder anderen Getreidekomponenten zurückzuführen ist. NCWS ist weder eine IgE-induzierte Weizenallergie noch eine Autoimmunerkrankung wie die Zöliakie (Rotondi Aufiero et al. 2018). Das angeborene Immunsystem spielt eine bedeutende Rolle beim Auftreten der NCWS (Reese et al. 2018). Schätzungsweise leiden etwa 6 % der Bevölkerung an der Erkrankung (Scherf et al. 2016a).

Glutenkomponenten wie Gliadine können aufgrund einer Interaktion mit dem CXCR3-Rezeptor oder anderen Mechanismen, die auf die Freisetzung von Molekülen passieren, die Darmpermeabilität erhöhen (Lammers et al. 2008; Hollon et al. 2015). Als weitere Faktoren wurden Amylase-Trypsin-Inhibitoren, welche vermutlich zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems führen (Zevallos et al. 2017), und fermentierbare Oligo-, Di-, Monosaccharide und Polyole (engl. fermentable oligo-, di-, monosaccharides and polyols, FOMAPs) identifiziert (Biesiekierski et al. 2013).

Nach Stunden oder Tagen treten unter anderem Symptome wie Bauchschmerzen, Blähungen, Durchfall, Müdigkeit, Kopfweh, Muskel- und Gelenkschmerzen und Ekzeme auf (Leonard et al. 2017). Bei der Erkrankung kommt es zu keinen bleibenden Schäden des Darms. Die Symptome verschwinden bei glutenfreier oder glutenarmer Ernährung und gelten im Vergleich zur CD und WA als relativ mild. (Rotondi Aufiero et al. 2018; Reese et al. 2018).

Da diagnostische Biomarker zur Identifizierung der NCWS fehlen, kommt es zur Ausschlussdiagnose von CD und WA und zur Beobachtung der Symptome bei

Verzicht oder Verminderung der Glutenaufnahme (Carroccio et al. 2012; Catassi et al. 2015).

Die Definition der NCWS als eigenständige Krankheit führt zu Kontroversen innerhalb der Wissenschaft (Reese et al. 2018; Sapone et al. 2012).

4.3.4 Reizdarmsyndrom

Das Reizdarmsyndrom (engl. irritable bowel syndrome, IBS) ist die häufigste chronische gastrointestinale Störung beim Menschen. Die Prävalenz liegt bei etwa 6-16 % (Hungin et al., 2003; Krogsgaard et al., 2013). Die Verbreitung der Erkrankung weist eine starke geografische Abhängigkeit auf, so leiden in Südamerika etwa 21 % und im Vergleich nur 7 % der Menschen in Südostasien an dem IBS (Borghini et al. 2017). Die Krankheit ist definiert als Funktionsstörung des Darms mit wiederkehrenden Bauchschmerzen und damit verbundener Entleerung oder Änderung der Darmperistaltik (Canavan et al 2014).

Als Auslöser konnten neben Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATIs) auch FODMAPS wie Fruktane im Getreide identifiziert werden, wobei letztere als Hauptauslöser ermittelt wurden.

Beim IBS unterscheidet man je nach klinischem Erscheinungsbild zwischen drei Formen, nämlich IBS mit Diarrhö, IBS mit Verstopfung und eine gemischte Form (Borghini et al. 2017). Zu den Symptomen, die denen der NCWS stark ähneln, zählen Bauchschmerzen, Blähungen, Durchfall, Verstopfung, Bauchkrämpfe, Übelkeit und eine veränderte Darmflora.

Ähnlich wie bei der NCWS, ist eine zuverlässige Diagnose aufgrund fehlender Biomarker schwierig. (Catassi et al. 2017). Patienten, die unter dem IBS leiden sollten auf eine niedrige Aufnahme an FODMAPs achten, um die Symptome zu reduzieren. Zudem können probiotische Nahrungsergänzungsmittel die Symptome positiv beeinflussen (Dale et al. 2019).

4.4 Strategie und Hintergrund der Herstellung von Sauerteigprodukten

Die Anwendung der Sauerteigtechnologie im Bereich der Getreidetechnologie stellt eine der ältesten Lebensmittelbiotechnologien dar und wurde in erster Linie

zu Untersuchung von sensorischen sowie strukturellen Eigenschaften als auch der Haltbarkeit von gebackenen Produkten eingesetzt. Die Sauerteigtechnologie kommt vor allem zum Einsatz bei Weizen, Roggen und Vollkornmehlen aber auch bei nicht-konventionellem Mehl, Nebenerzeugnissen des Mahlvorganges (Kleie und Keimling) sowie glutenfreien Produkten. Heutzutage sind eine Vielzahl an wissenschaftliche Daten über den Einfluss der Sauerteigfermentation auf die funktionellen Eigenschaften von Gebäck vorhanden. Die Sauerteigtechnologie kann zur Senkung des glykämischen Indexes sowie des Glutengehaltes, Verbesserung der Eigenschaften des Ballaststoff-Komplexes und Erhöhung der Aufnahme von Mineralstoffen, Vitaminen und sekundäre Pflanzenstoffe führen. Die Proteolyse durch endogene oder exogene Getreideproteasen und Peptidasen von Milchsäurebakterien des Sauerteiges beeinflusst das allergene Potential oder Unverträglichkeiten der Patienten gegenüber Getreide. Des Weiteren kommt es durch den mikrobiellen Metabolismus während der Sauerteigführung zur Bildung von ernährungsphysiologisch aktiven Komponenten wie Peptiden und Aminosäurederivate mit unterschiedlichen Funktionen und potenziellen präbiotischen Exo-Polysacchariden (Gobetti et al. 2014).

Der Sauerteig ist definiert als eine Mischung aus Wasser und Mehl, welche durch die Inokulation von ausgewählten Starterkulturen oder durch spontane heterogene Milchsäurebakterien (engl. lactic acid bacteria, LAB) und Hefen fermentiert wird. Hefen produziert während der Fermentation CO₂, wohingegen die LABs für die Säuerung des Teiges durch die Produktion von organischen Säuren verantwortlich sind. Die Bildung der organischen Säuren führt zur Verbesserung des Aromas, der Textur und der Haltbarkeit (De Vuyst & Neysens 2005). In einer Studie von Fraberger et al. (2020) wurden 20 traditionell österreichische Sauerteige, darunter 11 Weizen – und neun Roggensauerteige, welche von Bäckereien als auch Haushalten stammen, auf ihre unterschiedliche Mikrobiota untersucht. Die Identifikation der isolierten Milchsäurebakterien zeigte fünf unterschiedliche Gattungen und 33 Spezien, wobei die heterofermentativen *Lactobacillus spp.* vorherrschten. In den analysierten Weizensauerteigen wurden primär *Leuconostoc spp.*, *Streptococcus spp.* und *Pediococcus spp.* identifiziert. Zudem wurden sieben Hefespezies ermittelt, jedoch konnten 63 % der Spezien *Saccharomyces cerevisiae* zugeordnet werden. Ein einziger Sauerteig enthält bis

zu acht unterschiedlichen Milchsäurebakterien und vier unterschiedliche Hefe Spezien. Die untersuchten Weizensauerteige zeigten pH-Werte im Bereich von 3,69 und 4,36 und TTA-Messungen von 7,18 bis 17,04 mL NaOH/10 g. Die erhaltenen Werte deckten sich mit anderen Studien. Das Senken des pH-Wertes und der Anstieg der TTA ist abhängig von der vorherrschenden Mikrobiota und deren Metabolite.

Das Prinzip der Sauerteigführung beruht auf die Veränderung der Zusammensetzung und der Aktivität der Weizenproteine, indem der pH-Wert auf das pH-Optimum endogener Getreideproteasen gesenkt wird. Anschließend erfolgt durch die Aktivierung der Enzyme die Proteolyse (Huang et al. 2020). Das Enzym Propylendopeptidase (PEP) degradiert die Glutenproteine (Jouanin et al. 2018). Zusätzlich kommt es zur Akkumulation von Glutathion in heterofermentativen Laktobazillen im Sauerteig und des Weiteren zur Reduktion von intermolekularen und intramolekularen Disulfidbrückenbindungen in Weizenproteinen (Huang et al. 2020).

Die Kombination der Sauerteigtechnologie und der Hefe Fermentation zeigt eine Reduktion der FODMAPs im Brot. Durch die Verlängerung der Fermentationszeit kann der Abbau der Fruktane erhöht werden (Pejcz et al. 2019). Außerdem wurde durch *in vivo* Fütterungsversuche an Mäusen ein hoher ATI-Abbau durch Lactobacillus-Arten beobachtet, was zur Reduktion von Entzündungen führte (Caminero et al. 2019). Trotzdem ist wenig über den Abbau von ATIs während der Sauerteigführung bekannt.

4.4.1 Trypsin-Inhibitoraktivität

Der modifizierte Trypsin-Inhibitoraktivität-(TIA)-Assay nach Lisa Call et al. (2019) dient zur Bestimmung der Trypsin-Inhibitoraktivität in Weizen und Weizenprodukten. Die Trypsin-Inhibitoren werden mittels einer salzhaltigen, gepufferten Lösung aus den Weizenproben extrahiert. Die im Probenextrakt enthaltenen Trypsin-Inhibitoren hemmen anschließend das im Testansatz zugesetzte Trypsin. Als Substrat wird Benzoyl-L-Arginin-p-Nitroanilid (L-BAPA) eingesetzt und zur Messung der verbleibenden Trypsinaktivität herangezogen. Die Menge an freigesetztem p-Nitroanilid wird bei einer Wellenlänge von 410 nm spektrophotometrisch bestimmt. p-Nitroanilid ist das Endprodukt der enzymatischen Reaktion und proportional der Konzentration an Trypsin-

Inhibitoren im Probenextrakt. Das Ergebnis wird angegeben als inhibierte Trypsinmenge (mg) pro 1 kg Weizenprobe

4.4.2 Bradford

Diese Methode dient zur photometrischen quantitativen Bestimmung von Proteinkonzentrationen in einer biologischen Probe. Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G250 weist drei unterschiedliche Absorptionszustände auf, die jeweils bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren. Bei der Bindung des Farbstoffes mit einem Protein kommt es zu einem Übergang vom kationischen zum anionischen Zustand und zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von etwa 470 nm auf 595 nm. Da das Ausmaß der Absorptionsänderung über einen weiten Bereich proportional der Menge an vorhandenem Protein ist, kann somit die Proteinkonzentration ermittelt werden.

Coomassie Brilliant Blue-G250 bindet bevorzugt basische Aminosäuren. Dies führt zu einer unterschiedlich starken Absorption verschiedener Proteine. Aus diesem Grund wird die Kalibration mittels BSA empfohlen (ROTH 2020).

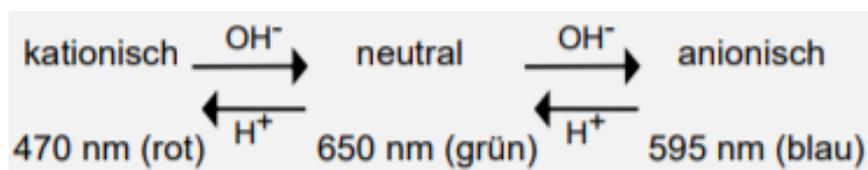


Abb. 5: Absorptionszustände von Coomassie Brilliant Blue Dye-G250 (ROTH 2020)

4.4.3 Dumas

Die Methode nach Dumas beruht auf die quantitative Stickstoffbestimmung von diversen Proben, wie zum Beispiel Fleisch, Mehl oder Futtermittel durch die Verbrennung bei hohen Temperaturen. Die Atmosphäre im Verbrennungsrohr im Gerät ist mit Sauerstoff angereichert. Der gebundene Stickstoff in der Probe verbrennt zu N_2 und NO_x . Halogene, welche in der Probe gebunden vorliegen, reagieren zu flüchtigen Halogenverbindungen, Schwefel reagiert zu SO_2 und SO_3 , Wasserstoff zu H_2O und Kohlenstoff zu CO_2 . Anschließend erfolgt die quantitative Umsetzung zu molekularem Stickstoff, Schwefel wird absorbiert und flüchtige Halogenverbindungen werden gebunden. Nach der vollständigen Oxidation der Probe wird der Gasstrom getrocknet. Danach wird die Messkomponente mittels

Wärmeleitfähigkeitsdetektor detektiert und das Messsignal ausgewertet. Das integrierte Messsignal wird über eine nichtlineare Kalibrierung einem absoluten Stickstoffgehalt der Probe zugeordnet. Zuletzt wird der prozentuelle Stickstoffgehalt aus dem absoluten Stickstoffgehalt und der Einwaage berechnet. Mit Hilfe eines empirischen Faktors wird der Stickstoffgehalt in den Proteingehalt umgerechnet. Der empirische Faktor für Weizen ist 5,7 und für Roggen 6,25 (ICC-Norm Nr. 167 - Bestimmung von Rohprotein in Getreide und Getreideerzeugnissen für Lebens- und Futtermittel mit dem Verbrennungsverfahren nach Dumas).

4.4.4 HPLC

Die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) gehört zu den wichtigsten und leistungsfähigsten Trennmethoden. Das Prinzip der Chromatographie beruht auf einem Trennprozess bei dem das Probengemisch zwischen zwei Phasen, einer stationären und einer mobilen Phase, verteilt wird. Die Trennung erfolgt aufgrund von physikalischen oder chemischen Wechselwirkungen der Probe mit den beiden Phasen. Als stationäre Phase kommen kleine Teilchen fester, poröser und oberflächenaktiver Materialien oder Trägermaterialien zum Einsatz. Als mobile Phase werden Flüssigkeiten verwendet. Substanzen mit einer höheren Affinität zur mobilen Phase besitzen kürzere Retentionszeiten und gelangen somit zuerst zum Säulenausgang. Das Signal einer Probe wird detektiert und in einem Chromatogramm wird dessen Intensität gegen die Zeit aufgetragen, es entstehen sogenannte Peaks (Gey 2015).

Das Gerät besteht aus vier Hauptelementen:

- Pumpe
- Injektor
- Trennsäule
- Detektor inklusive Auswertesystem

Im Zuge der durchgeführten Analysen der Proben wurde mit der Umkehrphasen-HPLC (engl. reversed phase, RP) gearbeitet. Im Gegensatz zur Normalphasen-HPLC ist die stationäre Phase unpolar (hydrophob) und die mobile Phase polar (hydrophil). Die Trennung der Proteine basiert auf ihrer Polarität (Matissek et al.

2014). Die RP-HPLC gilt als effiziente Methode zur Quantifizierung von Proteinen. Im Zuge der Osborne Fraktionierung erfolgt die Auswertung mittels RP-HPLC, wodurch die einzelnen komplexen Fraktionen aufgetrennt werden können (Wieser et al. 1998).

5 Material und Methoden

5.1 Material

In Tab. 2 sind die im Zuge der Diplomarbeit verwendeten Rohstoffe dargestellt. Die Rohstoffe mit den Nummern 1-6 zählen zum modernen Brotweizen und wurden im Herbst 2018 an vier verschiedenen Standorten (Tulln, Raasdorf, Reichersberg, Probstdorf) angebaut. Nach der Ernte im Sommer 2019 wurden die jeweiligen Sorten in definierten Mengen vermischt und zu einem Mehl des Typs W700 vermahlen, um diverse Standorteinflüsse ausschließen zu können. Das W700 Rösselmehl mit der Nummer 7 wurde von der Firma Pfahnl Mühle zur Verfügung gestellt.

Tab. 2: Probennummer, Rohstoff; Zulassungsjahr, Ernte und Gruppe der Getreideproben

Nr.	Rohstoff	Zulassungsjahr	Ernte	Gruppe
1	Adesso	2012	2019	Brotweizen
2	Alessio	2016	2019	Brotweizen
3	Amicus	2012	2019	Brotweizen
4	Arnold	2009	2019	Brotweizen
5	Aurelius	2016	2019	Brotweizen
6	Laurenzio	2012	2019	Brotweizen
7	W700 Rösselmehl	-	-	-

5.2 Versuchsdurchführung

Diese Arbeit wurde in Anlehnung an das ID WHEAT Projekt der Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, der Universität für Bodenkultur und der HTL Wels durchgeführt. Im zweiten Projektjahr erfolgte die Selektion relevanter Weizensorten und die Analyse derer Proteinfractionen. Die Auswahl basierte auf einer detaillierten Charakterisierung der Mehle der Ernte 2018 eines weitläufigen Probensets (5 unterschiedliche Weizenarten, 46 Weizensorten, 64 Proben). Die basierend auf dieser Charakterisierung ausgewählten sechs sortenreinen Mehle (Adesso, Alessio, Amicus, Arnold, Aurelius, Laurenzio) dienten als Ausgangsmaterial für analytische als auch rheologische Untersuchungen sowie als Rohstoffe für den zweiten Backversuch.

Zu Beginn der Arbeit erfolgte die Charakterisierung der sechs Mehlproben der Ernte 2019 anhand der Trypsin-Inhibitoraktivität, des löslichen Proteins, der Proteinverdaubarkeit, des ATI-, des Rohprotein- und des Glutengehaltes. Anschließend wurden Backversuche der Bäckereien Haubis und Ströck im größeren Maßstab unter Anwendung der Sauerteigtechnologie durchgeführt. Beim Backversuch 1 wurden zur Evaluierung rezeptbedingter Einflüsse verschiedene Prozessparameter, wie die Menge an Vorsauer und die Teigführungszeit, variiert. Um weitere Einflussfaktoren durch die Verwendung von unterschiedlichen Mehlen zu vermeiden, wurde der erste Backversuch mit einem gut charakterisierten Mehl der Pfahnl Mühle (W700 Rösselmehl) durchgeführt. Die unterschiedlichen Rezepturen des Backversuches sind in Tab. 3 angeführt. Die daraus entstandenen Teiglinge/Gebäcke wurden in Hinblick auf das lösliche Protein, den ATI-Gehalt sowie die Trypsin-Inhibitoraktivität analytisch untersucht. Basierend auf den Ergebnissen des Backversuches 1 wurden Prozessparameter (Tab. 4) für jede der Bäckereien definiert und diese im zweiten Backversuch mit den sechs reinsortigen Mehlen angewandt. Aufgrund von Geheimhaltung sind keine genauen Rezepte der Bäckereien Haubis und Ströck bekannt. Des Weiteren wurden im Zuge des Backversuches 2 der Semmelbackversuch (SBV) der AGES durchgeführt. In Tab. 5 ist die Rezeptur sowie eine kurze Durchführung des SBV ersichtlich. Die Teiglinge/Gebäcke wurden anschließend auf das lösliche Protein, den ATI- und den Glutengehalt, die TIA und den Proteinverdau untersucht und mit den ermittelten Daten der Mehle verglichen. Somit können Aussagen über den ATI- und Glutenabbau, die Verdaubarkeit als auch die Änderung der Trypsin-Inhibitoraktivität und des löslichen Proteins durch die Sauerteigfermentation sowie die reine Hefe-Fermentation der Produkte gemacht werden. Neben dem Vergleich der Ausgangsstoffe mit den Produkten können ebenfalls Unterschiede der beiden Fermentationsarten analysiert werden.

Tab. 3: Übersicht der Rezeptur des Backversuches 1 der Bäckereien Haubis und Ströck

	Vorsauermenge [%]	Vorsauerstufe	Teigführungszeit [h]	Mehl
Haubis¹				
S V1 kurz	5	-	1,5	Rösselmehl
S V2 kurz	10	-	1,5	Rösselmehl
S V3 kurz	15	-	1,5	Rösselmehl
S V1 lang	5	-	16	Rösselmehl
S V2 lang	10	-	16	Rösselmehl
S V3 lang	15	-	16	Rösselmehl
Ströck²				
B S1 kurz	10	1	8	Rösselmehl
B S2 kurz	10	2	8	Rösselmehl
B S1 lang	10	1	18	Rösselmehl
B S2 lang	10	2	18	Rösselmehl

¹Haubis arbeitet mit einem einstufig-geführten Vorsauer, daher wurde hier die Vorsauermenge zur Herstellung einer Sauerteig-Semmel (S) variiert

²Ströck arbeitet mit einem zweistufig-geführten Vorsauer, daher wurden hier die unterschiedlichen Stufen zur Herstellung eines Sauerteig-Baguettes (B) variiert; von den Proben mit langer Führung standen nur die fertigen Gebäcksproben für analytische Untersuchungen zur Verfügung

Tab. 4: Übersicht der Rezeptur des Backversuches 2 der Bäckereien Haubis und Ströck

	Vorsauermenge [%]	Vorsauerstufe	Teigführungszeit [h]	Mehl
Haubis¹				
S Adesso lang	10	-	16	Adesso
S Alessio lang	10	-	16	Alessio
S Amicus lang	10	-	16	Amicus
S Arnold lang	10	-	16	Arnold
S Aurelius lang	10	-	16	Aurelius
S Laurenzio lang	10	-	16	Laurenzio
Ströck²				
B Adesso lang	10	2	18	Adesso
B Alessio lang	10	2	18	Alessio
B Amicus lang	10	2	18	Amicus
B Arnold lang	10	2	18	Arnold
B Aurelius lang	10	2	18	Aurelius
B Laurenzio lang	10	2	18	Laurenzio

¹Haubis arbeitet mit einem einstufig-geführten Vorsauer, daher wurde hier die Vorsauermenge zur Herstellung einer Sauerteig-Semmel (S) variiert

²Ströck arbeitet mit einem zweistufig-geführten Vorsauer, daher wurden hier die unterschiedlichen Stufen zur Herstellung eines Sauerteig-Baguettes (B) variiert

Tab. 5: Übersicht der Rezeptur des Semmelbackversuches (SBV) der AGES

SBV	Mehl [g]	Presshefe [g]	Kochsalz [g]	Speiseöl [g]	0,1 % ige Ascorbinsäure Lsg. [mL]
	2	50	18	10	20

In Rapid Mixer wird das jeweilige Mehl (Adesso, Alessio, Amicus, Arnold, Aurelius, Laurenzio) mit Wasser, Hefe, Salz, Speiseöl, Malzmehl und Ascorbinsäure zu einem Teig vermischt; es folgen die Verarbeitungsschritte Pressenruhe, Rundwirken, Reifung, Stanzung mit Semmelstanzmaschine, Endgare und Backen

5.3 Analytik

5.3.1 Extraktionen

Es wurde zwischen den Extraktionen mit Natriumchlorid (NaCl), Chloroform/Methanol (CM) und Ammoniumsulfat unterschieden. Die verwendeten Geräte und Hilfsmittel der drei Extraktionen wurden in den beiden nachfolgenden Unterkapiteln zusammengefasst.

5.3.1.1 Verwendete Geräte

- Analysenwaage, Genauigkeit: Min 10 mg, Max 205 mg, d = 0,1 g, e = 1 mg (Mettler Toledo AT 200, Schweiz)
- Laborwaage Sartorius, Modellnummer: BP2100S, Genauigkeit: Max 2100 g, d = 0,01 (Sartorius AG, Deutschland)
- Zentrifuge Multifuge 1S-R (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland)
- pH Meter inoLab® (WTW, Deutschland)
- Ultra-Turrax T 25 basic (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
- Magnetrührer (Thermo Fisher Scientific, Deutschland)
- Minishaker, Typ: IKA MS 1 (Sigma/Aldrich, USA)
- Kolbenhubpipette 500-5000 µL (Mettler-Toledo, Österreich)
- IKA Trayster D (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
- Rotavapor R-215, Vacuum Controller V-850, Vacuum Pump V-700, Multivapor P-6 (Büchi Labortechnik AG, Schweiz)

5.3.1.2 Verwendete Hilfsmittel

- Falcon Zentrifugenröhrchen 15 mL (Corning Science, Mexiko)
- Zentrifugenröhrchen 50 mL Cellstar© Typ: 210261 (Greiner bio-one, Österreich)
- Magnetrührstäbchen
- Spatel
- Trichter
- Eprovettenständer
- diverse Messkolben
- diverse Bechergläser

- diverse Messzylinder
- 1 L Glasflasche
- Pipettenspitzen (Mettler-Toledo, Österreich)
- Spritzenfilter Chromafil® CA 0.45 µm Membran (Machery-Nagel, Deutschland)
- Braun Injekt® Solo 2 mL (B. Braun Melsungen AG, Deutschland)

5.3.1.3 Verwendete Chemikalien (NaCl-Extraktion)

- Natriumchlorid – NaCl (Merck, Deutschland)
- Kaliumdihydrogenorthophosphat – KH₂PO₄ (Merck, Deutschland)
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat – Na₂HPO₄*2H₂O (Merck, Deutschland)
- Destilliertes Wasser

5.3.1.4 Herzustellende Lösungen (NaCl-Extraktion)

Na₃PO₄-Puffer (pH 7):

- Lösung A: 9,072 g KH₂PO₄ in 1 L
- Lösung B: 11,866 g Na₂HPO₄*2H₂O in 1 L

Herstellung des Puffers aus 38,8 mL der Lösung A und 61,2 mL der Lösung B.

Extraktionslösung (NaCl (150 mM), Na₃PO₄ (pH 7))

Einwaage in 2 L-Messkolben:

Es wurden 17,532 g NaCl eingewogen und 40 mL des Na₃PO₄-Puffers hinzugefügt, danach in ca. 1,5 L H₂O gelöst und anschließend bis zur Markierung mit H₂O aufgefüllt.

5.3.1.5 Durchführung NaCl-Extraktion

Je nach Probenart (Getreide, Teiglinge, Gebäck) wurden diese unterschiedlich aufbereitet. Die Getreideproben wurden zuerst mittels Fallzahlmühle auf eine Partikelgröße von <0,7 mm und des Weiteren mit der Retschmühle auf <0,2 mm vermahlen. Von den sechs Weizenproben wurden je 2 g ± 0,001 g Probe in 50 mL Tubes eingewogen und die Einwaage notiert. Es wurden 10 mL Extraktionslösung zugefügt und die Probe für etwa 20 s gevortext. Die Lösung wurde mit einem Magnetrührstäbchen versehen und bei 280 rpm für mindestens 5 min gerührt. Anschließend wurde das Magnetrührstäbchen wieder entfernt.

Teiglinge und Semmeln mussten zuerst aufgetaut werden. Im Gegensatz zu den Weizenmehlproben wurden $3 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$ Probe in 50 mL Tubes eingewogen und die genaue Einwaage notiert. Anschließend wurde die Probe mit 5 mL Extraktionslösung versetzt und mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Mit weiteren 5 mL Extraktionslösung in einem 50 mL Tube wurden die Rückstände am Ultra-Turrax suspendiert und diese Lösung der homogenisierten Probe zugegeben. Das Rühren mit Hilfe eines Magnetrührstäbchens bei 280 rpm entfiel.

Danach wurden die Probenlösungen bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Überstand in einen 10 mL Messkolben überführt und mit der Extraktionslösung aufgefüllt. Zuletzt erfolgte die Überführung der Extrakte in 15 mL Tubes und die Filtration mittels Spritzenfilter $0,45 \mu\text{m}$. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Probenextrakte bei $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

5.3.1.6 Verwendete Chemikalien (CM-Extraktion)

- Natriumchlorid – NaCl (Merck, Deutschland)
- Chloroform – CHCl_3 (Merck, Deutschland)
- Methanol – CH_3OH (Merck, Deutschland)
- n-Hexan – $\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ (LGC Standards Promochem, Wesel, Deutschland)
- Acetonitril (ACN) – CH_3CN (Merck, Deutschland)
- Destilliertes Wasser

5.3.1.7 Herzustellende Lösungen (CM-Extraktion)

20 % v/v Acetonitril

Es wurden 200 mL des Acetonitrils in einen 1 L Messkolben pipettiert und mit bidestilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Chloroform-Methanol-Lösung

Die Herstellung erfolgte im Abzug und setzte das Tragen einer Schutzbrille sowie das Verwenden von Handschuhen voraus. Es wurden mit Hilfe eines 250 mL Messzylinders 250 mL Chloroform und 250 mL Methanol in einer 1 L Glasflasche vermischt. Die Flasche wurde mit den entsprechenden Gefahrensymbolen versehen.

5.3.1.8 Durchführung der CM-Extraktion

Von den sechs Weizenmehlproben wurden je $5 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$ in 50 mL Tubes eingewogen und die genaue Einwaage notiert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter dem Abzug durchgeführt. Außerdem wurde das Tragen von Handschuhen und Schutzbrille vorausgesetzt. Die Proben wurden mit 20 mL Hexan versetzt und für 20 s gevortext. Danach wurden sie für 10 min bei 40 rpm in den Überkopfschüttler und für 10 min bei 4000 rpm in die Zentrifuge gestellt. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Proben über Nacht mit geöffnetem Deckel im Abzug stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde der Probe 20 mL Chloroform-Methanol-Lösung zugegeben und 20 s gevortext. Die Proben wurden mit einem Magnetrührstäbchen versehen und bei 280 rpm für mindestens 5 min gerührt. Das Magnetrührstäbchen wurde dann wieder entfernt und die Probenlösung für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen 20 mL Messkolben überführt und mit Chloroform-Methanol-Lösung bis zur Marke aufgefüllt. Es wurden die gesamten 20 mL der Proben in den Kolben des Rotavapors überführt und bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ und 250 mbar abgedampft. Zuletzt wurde der Rückstand mit 5 mL 20 % Acetonitril gelöst und in einen 5 mL Messkolben überführt und bis zur Marke mit Acetonitril aufgefüllt. Die Probenextrakte wurden bis zur weiteren Verwendung in 15 mL Tubes im Gefrierschrank aufbewahrt. Die Extrakte wurden vor der Analyse für 30 min in das Ultraschallbad gestellt und mittels Spritzenfilter $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ filtriert.

5.3.1.9 Verwendete Chemikalien (Ammoniumsulfat-Extraktion)

- Natriumchlorid – NaCl (Merck, Deutschland)
- Kaliumdihydrogenorthophosphat – KH_2PO_4 (Merck, Deutschland)
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Deutschland)
- Acetonitril (ACN) – CH_3CN (Merck, Deutschland)
- Ammoniumsulfat – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck, Deutschland)
- Destilliertes Wasser

5.3.1.10 Herzustellende Lösungen (Ammoniumsulfat-Extraktion)

Na_3PO_4 -Puffer (pH 7):

- Lösung A: 9,072 g KH_2PO_4 in 1 L
- Lösung B: 11,866 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 1 L

Herstellung des Puffers aus 38,8 mL der Lösung A und 61,2 mL der Lösung B.

Extraktionslösung (NaCl (150 mM), Na₃PO₄ (pH 7))

Einwaage in 2 L-Messkolben:

Es wurden 17,532 g NaCl eingewogen und 40 mL des Na₃PO₄-Puffers hinzugefügt, danach in ca. 1,5 L H₂O gelöst und anschließend bis zur Markierung mit H₂O aufgefüllt.

20 % v/v Acetonitril

Es wurden 200 mL des Acetonitrils in einen 1 L Messkolben pipettiert und mit bidestilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

5.3.1.11 Durchführung der Ammoniumsulfat-Extraktion

Es wurden 2 g \pm 0,001 g Probe in ein 50 mL Tube eingewogen, mit 10 mL Extraktionslösung versetzt und für etwa 20 s gevortext. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 280 rpm gerührt und für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Währenddessen wurde je nach gewünschter Konzentration in % Sättigung die Menge an Ammoniumsulfat eingewogen (siehe Tab. 22 im Anhang). Bei einer Sättigung von 70 % wurden 436 g (NH₄)₂SO₄ pro Liter hinzugefügt. Daher wurden 4,36 g (NH₄)₂SO₄ in einem 10 mL Messkolben eingewogen, 4 mL des Überstandes hinzugefügt und mit der Extraktionslösung bis zur Marke aufgefüllt. Somit wurde die Probe 1:2,5 vorverdünnt. Das Pellet wurde verworfen. Anschließend wurden die Proben vom Messkolben in 15 mL Tubes überführt und 10 min bei 40 rpm in den Überkopfschüttler gestellt. Zuletzt wurden die Proben nochmals 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand konnte dann verworfen werden. Das Pellet wurde mit 10 mL 20 % Acetonitril versetzt. Die Proben wurden bis zum weiteren Gebrauch eingefroren. Vor der Analyse wurden sie mittels Spritzenfilter 0,45 μ m filtriert.

Bei der zweistufigen Fällung wurde zuerst die Einstellung der niedrigeren Konzentration (in % Sättigung) und anschließend die Einstellung der höheren Konzentration durchgeführt. Im Zuge des Vorversuches erfolgte im ersten Schritt eine 35 % ige Sättigung und in einem weiteren Schritt die 70 % ige Sättigung der Lösung. Bei der Durchführung der zweistufigen Fällung erfolgten die gleichen Schritte wie bei der einstufigen Fällung, nur für jeweils beide aufeinanderfolgenden Fällungen. Hierbei wurde der Überstand der ersten Fällung nicht verworfen, sondern für die zweite Fällung herangezogen. Unter

anderem sind durch volumen-bedingte Einflüsse die Probenverdünnung und die Berechnung der Ammoniumsulfat-Menge der zweiten Fällung genau zu beachten.

5.3.2 Trypsin-Inhibitoraktivität-(TIA)-Assay

5.3.2.1 Verwendete Geräte

- Minishaker, Typ: IKA MS 1 (Sigma/Aldrich, USA)
- Mikroliterzentrifuge (VWR by Hitachi Koki Co, Taiwan)
- Kolbenhubpipette 20-200 µL (Mettler-Toledo, Österreich)
- Kolbenhubpipette 500-5000 µL (Mettler-Toledo, Österreich)
- Kolbenhubpipette 10-100 µL (Mettler-Toledo, Österreich)
- Temperiertes Wasserbad
- UV/VIS Spektralphotometer V-630 (Jasco, Japan)

5.3.2.2 Verwendete Hilfsmittel

- Mikroliter Reaktionsgefäße 2,0 mL (Eppendorf©, Deutschland)
- Pipettenspitzen (Mettler-Toledo, Österreich)
- Einwegküvetten semi- micro (VWR)
- Stoppuhr

5.3.2.3 Verwendete Chemikalien

- Salzsäure – HCl 25 %, 6 M (Merck, Deutschland)
- Essigsäure – CH₃COOH 100 % (Eisessig) (Merck, Deutschland)
- Calciumchlorid-Dihydrat – CaCl₂*2 H₂O (Merck, Deutschland)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan – H₂NC(CH₂OH)₃ (Merck, Deutschland)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) - C(H₃)₂SO (Merck, Deutschland)
- N α -Benzoyl-L-Arginin-4-Nitroanilid-Hydrochlorid – L-BAPA, Reinheit >99 %, Aufbewahrung bei -18 °C (Sigma-Aldrich, Deutschland)
- Trypsin vom Rinderpankreas, Type I-10.000 BAEE Units/mg Protein, Aufbewahrung bei -18 °C (Sigma-Aldrich, USA)

5.3.2.4 Herzustellende Lösungen

Salzsäure (0,001 M)

Es wurden 10 mL einer 0,1 M HCl mit H₂O auf 1 L in einem Messkolben aufgefüllt.

Calciumchlorid-Lösung

Einwaage in 1 L Messkolben:

Es wurden 735 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mit 0,001 M HCl gelöst und anschließend musste der pH-Wert ($3,0 \pm 0,1$) überprüft werden.

Trypsin-Stammlösung

Einwaage in 1 L Messkolben:

27,0 mg Trypsin wurden mit einer Calciumchlorid-Lösung bis zur Markierung aufgefüllt und im Kühlschrank aufbewahrt. Das Trypsin musste zuvor auf Raumtemperatur gebracht werden, zudem wurde die Einwaage notiert.

Trypsin-Arbeitslösung (13,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

1 mL der Trypsin-Stammlösung wurden in einen 20 mL Messkolben pipettiert und mit Calciumchlorid-Lösung bis zur Markierung aufgefüllt. Die Arbeitslösung sollte jeden Tag frisch hergestellt werden.

Falls mehr als 27,0 mg Trypsin zur Herstellung der Stammlösung eingewogen wurden, wurde anstatt 1 mL ein entsprechendes Aliquot zur Herstellung der Arbeitslösung verwendet.

Beispiel: Einwaage 27,7 mg

Berechnung: $\frac{27,0}{27,7} = 0,975 \rightarrow$ Es wurden 0,975 mL der Trypsin-Stammlösung in einen 20 mL Messkolben pipettiert und mit Calciumchlorid-Lösung bis zur Markierung aufgefüllt.

Trispuffer/Calciumchlorid-Lösung

Einwaage in 1L-Messkolben:

6,05 g Tris und 735 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ wurden in 900 mL Wasser gelöst, der pH-Wert mit 25 % iger HCl auf $8,2 \pm 0,1$ eingestellt und mit Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

L-BAPA Reagenz

Einwaage in 50 mL Messkolben:

15 mg L-BAPA wurden in 0,5 mL DMSO gelöst und mit Trispuffer/Calciumchlorid-Lösung aufgefüllt. Das L-BAPA Reagenz sollte jede Woche frisch hergestellt werden.

Bei großer Probenanzahl wurde die doppelte Menge (27 mg) eingewogen, in 1 mL DMSO gelöst und anschließend auf 100 mL aufgefüllt.

Essigsäure (5,3 M)

Es wurden 303 mL Eisessig mit Wasser in einem 1 L-Messkolben aufgefüllt.

5.3.2.5 Durchführung

Zur Überprüfung der Trypsin-Inhibitoraktivität der Arbeitslösung diente ein Standard. Die Differenz der Absorption des Standards und des Leerstandards sollte etwa 0,3 betragen. War dies nicht der Fall, musste eine neue Trypsin-Stammlösung hergestellt werden. Für jeden Probenextrakt wurde eine Leerprobe hergestellt, welche mit den Proben gleichzeitig analysiert werden musste. Es erfolgte eine Vierfachbestimmung, indem die Proben jeweils zweimal eingewogen und extrahiert wurden und jeder Extrakt doppelt gemessen wurde.

Zuerst wurde ein sogenanntes Screening zur Abschätzung des linearen Inhibierungsbereiches, welcher bei einer Inhibitoraktivität von 40-60 % lag, der jeweiligen Probe durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Extraktmengen ($x = 20 \mu\text{L}$, $50 \mu\text{L}$, $80 \mu\text{L}$, $100 \mu\text{L}$ und $150 \mu\text{L}$) mit den entsprechenden Mengen an Wasser (Endvolumen $200 \mu\text{L}$) vermischt und gemessen. Zusätzlich erfolgte eine Messung des Leerstandards, des Standards und der Leerproben. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Ergebnisse des Screenings in einer Inhibierungskurve (x-Achse: Extraktmenge, y-Achse: Inhibitoraktivität in Prozent) dargestellt. Beim Screening war eine Einfachbestimmung der Probe ausreichend.

Tab. 6: Pipettierschema des Leerstandards, des Standards, der Leerprobe und der Probe

Eppendorf Tubes [2 mL]	Leerstandard	Standard	Leerprobe	Probe
Probenextrakt	0	0	x	x
Wasser	600 μL	600 μL	600 $\mu\text{L} - x$	600 $\mu\text{L} - x$
Essigsäure	200 μL	0	200 μL	0
L-BAPA Reagenz	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
10 min im Wasserbad bei $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,25 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubieren				
Trypsin-Arbeitslösung	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
Vortexen, 20 min \pm 5 s im Wasserbad bei $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,25 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubieren				
Essigsäure	0	200 μL	0	200 μL
Eppis verschließen und über Kopf mischen, 3 min bei 14 000 rpm zentrifugieren, Messung der Absorption bei 410 nm in einer 10 mm Küvette gegen Wasser				

Nach dem Stoppen der Reaktion mit Essigsäure waren die Messlösungen für ca. 2 Stunden stabil.

5.3.2.6 Auswertung

Aus unterschiedlichen Extrakten wurde die Trypsin-Inhibitoraktivität der Mehl-, Teig- und Gebäckproben ermittelt. In Gl. 1 wurde mittels der Messdaten von Standard, Leerstandard, Probe und Leerprobe die Inhibierung in Prozent berechnet.

$$I = \frac{((A_{Std} - A_{LStd}) - (A_P - A_{LP}))}{(A_{Std} - A_{LStd})} * 100$$

Gl. 1: Berechnung der Prozent an Inhibierung

I Prozent an Inhibierung [%]

A_{Std} Absorption des Standards

A_{LStd} Absorption des Leerstandards

A_P Absorption der Probe

A_{LP} Absorption der Leerprobe

Die Ergebnisse des Screenings wurden in einer Inhibierungskurve dargestellt, wie in Abb. 6 ersichtlich.

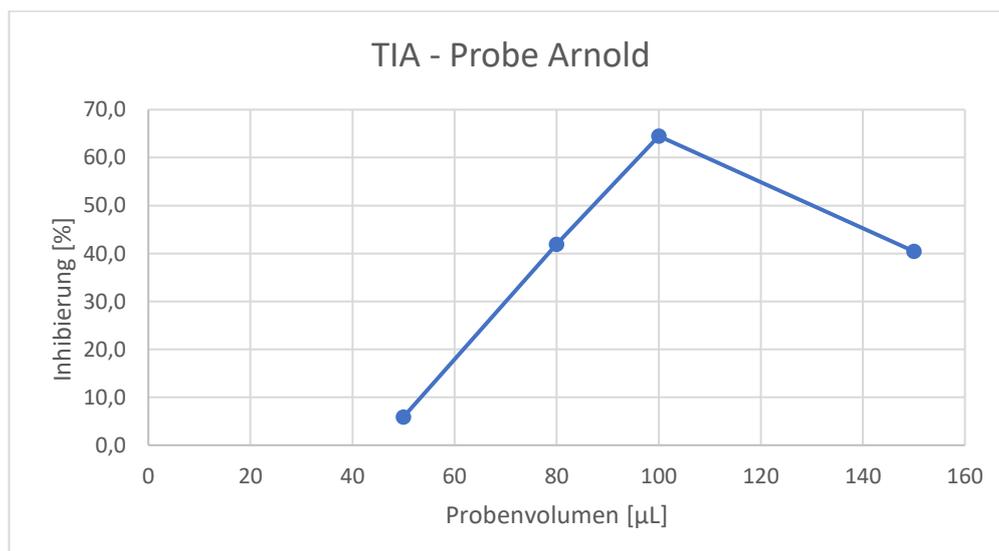


Abb. 6: Screening der Arnold Mehlprobe (NaCl-Extraktion)

Anhand der graphischen Darstellung des Screenings wurde das Probenvolumen ermittelt, um innerhalb des linearen Bereichs von 40-60 % Inhibierung zu liegen.

Nachdem das benötigte Probenvolumen ermittelt wurde, erfolgt die Berechnung der Trypsin-Inhibitoraktivität in mg inhiertes Trypsin pro kg Probe mit Gl. 2, sowie die Umrechnung des Ergebnisses bezogen auf die Trockensubstanz (TS) in Gl. 3.

$$TIA = \frac{I}{100} * \frac{m_1 * f_1 * f_2}{m_0} * 100$$

Gl. 2: Berechnung der Trypsin-Inhibierungsaktivität in mg/kg

TIA Trypsin-Inhibierungsaktivität [mg/kg]

m_0 Probeneinwaage [g]

m_1 Trypsineinwaage [mg]

f_1 Verdünnung des Probenextraktes

f_2 Umrechnungsfaktor basierend auf der Reinheit des Trypsins ($2,8 * 10^{-4}$)

$$TIA = \left(\frac{TIA}{100 - W} \right) * 100$$

Gl. 3: Umrechnung der TIA in mg/kg TS

W Wassergehalt [%]

5.3.3 Bradford Assay zur Bestimmung des löslichen Proteins

5.3.3.1 Verwendete Geräte

- Infinite® M200 PRO NanoQuant plate reader (Tecan Group Ltd., Schweiz)
- Kolbenhubpipette 20-200 µL (Mettler-Toledo, Österreich)
- Kolbenhubpipette 500-5000 µL (Mettler-Toledo, Österreich)
- Kolbenhubpipette 10-100 µL (Mettler-Toledo, Österreich)
- Mehrkanalpipette 20-200 µL (Mettler-Toledo, Österreich)

5.3.3.2 Verwendete Hilfsmittel

- Mikrotiterplatten
- Mikroliter Reaktionsgefäße 2,0 mL (Eppendorf©, Deutschland)
- Falcon Zentrifugenröhrchen 15 mL (Corning Science, Mexiko)
- diverse Messkolben
- Pipettenspitzen (Mettler-Toledo, Österreich)

- Pipettierschema
- Stoppuhr

5.3.3.3 Verwendete Chemikalien/Standards

- Roti®-Quant 5x Konzentrat (Carl Roth, Deutschland)
- Natriumchlorid – NaCl (Merck, Deutschland)
- Acetonitril (ACN) – CH₃CN (Merck, Deutschland)
- Bovines Serumalbumin (BSA) – Reinheit ≥98 % (Carl Roth, Deutschland)
- Trypsin Inhibitor (TI) – Reinheit 19 % (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, USA)
- destilliertes Wasser

5.3.3.4 Herzustellende Lösung

Roti®-Quant

Zur Herstellung wurden zwei Teile Roti®-Quant und 5,5 Teile destilliertes Wasser vermischt. Zur Herstellung von 30 mL Roti®-Quant-Lösung wurden 8 mL Roti®-Quant in einen 30 mL Messkolben pipettiert und mit destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung sollte direkt vor der Verwendung hergestellt werden und zwischen den Messungen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

5.3.3.5 Herstellung der Standards

Zur Erstellung der beiden Kalibriergeraden wurden BSA und TI als Standards herangezogen. Es wurde von beiden eine Stammlösung mit einer Konzentration von 50 mg/100 mL hergestellt. Aus den Stammlösungen wurden die benötigten Verdünnungen hergestellt, welche aus Tab. 7 und Tab. 8 entnommen werden können. Für die Verdünnungen wurden 10 mL Messkolben verwendet und nach Zugabe der Stammlösung mit NaCl bis zur Marke aufgefüllt.

Tab. 7: Pipettierschema zur Herstellung der BSA-Standards

BSA [mg/mL]	Verdünnung	BSA-Stammlsg. [mL]	NaCl [mL]
0,245	1:2	5	5
0,098	1:5	2	8
0,049	1:10	1	9
0,020	1:25	0,4	9,6
0,010	1:50	0,2	9,8
0,005	1:100	0,1	9,9

Konzentrationsangabe unter Einberechnung der Reinheit des BSA-STD (≥98 %)

Tab. 8: Pipettierschema zur Herstellung der TI-Standards

TI [mg/mL]	Verdünnung	TI-Stammlsg. [mL]	NaCl [mL]
0,048	1:2	5	5
0,024	1:4	2,5	7,5
0,019	1:5	2	8
0,012	1:8	1,25	8,75
0,010	1:10	1	9
0,004	1:25	0,4	9,6

Konzentrationsangabe unter Einberechnung der Reinheit des TI-STD (19 %)

5.3.3.6 Durchführung

Die Proben wurden je nach Extraktion unterschiedlich verdünnt. Die passende Verdünnung wurde durch ein Screening ermittelt. Die Proben wurden mit der jeweiligen Extraktionslösung verdünnt. Die Standards sowie Proben wurden in Dreifachbestimmung analysiert. Zudem wurden Blindwerte der jeweiligen Extraktionslösungen ermittelt. Es wurden 50 µL der Standards und der Proben, je nach Pipettierschema, auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Anschließend wurden 200 µL Roti[®]-Quant-Lösung mittels Mehrkanalpipette zu den Standards und den Proben pipettiert. Auftretende Luftblasen wurden entfernt, da ansonsten eine Verfälschung des Messergebnisses auftreten würde. Die Mikrotiterplatte wurde für 5 min in einer geschlossenen Lade bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm.

5.3.3.7 Auswertung

Das lösliche Protein der unterschiedlichen Extrakte der Mehl-, Teig- und Gebäckproben wurde photometrisch bestimmt. Wie bereits erwähnt, erfolgte die Kalibrierung mittels BSA- und TI-Standards. Es handelte sich hierbei um eine externe Kalibrierung. Die Standardreihen inklusive deren Konzentrationen wurden bereits in Tab. 8 und Tab. 9 angeführt. In Abb. 7 sind die beiden Kalibriergeraden und deren Funktion für die NaCl-Probenextrakte der Haubis Teiglinge als Beispiel angeführt. Die Messung der Standards, der Proben und des Blanks erfolgte simultan auf einer Mikrotiterplatte. Von allen Messwerten wurde der Mittelwert der gemessenen Blanks abgezogen und erst anschließend die Kalibriergeraden erstellt.

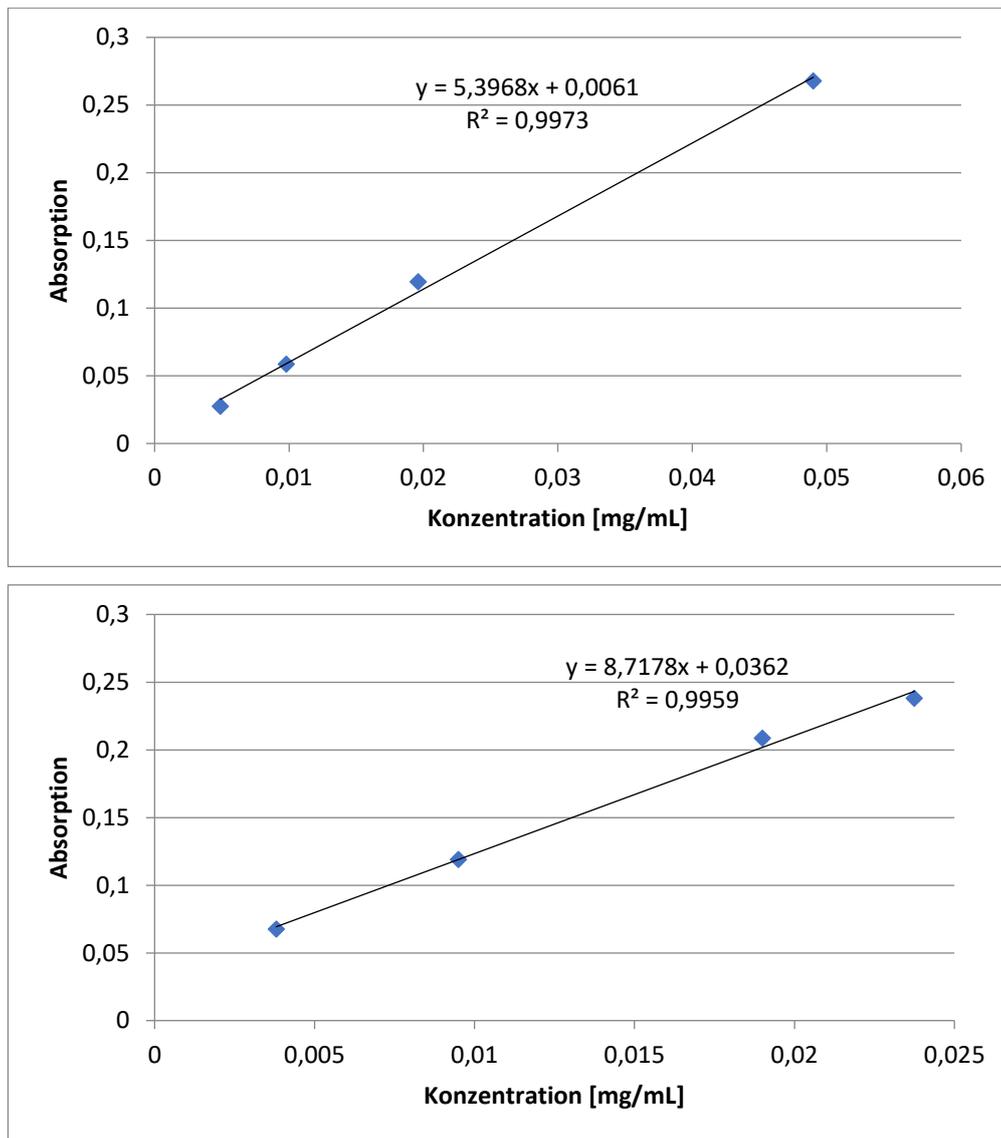


Abb. 7: Kalibriergerade/-funktion der Haubis Teiglinge mittels BSA-Standard (A), und mittels TI-Standard (B)

Die Konzentration an löslichem Protein des Extraktes wurde ermittelt, indem das Probensignal (Absorption) in die Gleichung der BSA-Kalibriergeraden eingesetzt und durch Umformen der Funktion $y = k \cdot x + d$ berechnet wurde. Die Gl. 4 beinhaltet die Einberechnung der vorgenommenen Verdünnung. Mittels Gl. 5 erfolgte die Berechnung der Konzentration der tatsächlichen Probe. In Gl. 6 ist die Umrechnung des Ergebnisses in g Protein/100 g Probe angeführt. Gl. 7 und Gl. 8 basieren auf der Berechnung des Gehaltes an löslichem Protein bezogen auf die Trockensubstanz (TS) der Probe, welche sich je nach Probenart (Mehl, Teigling) unterscheidet. Zur Berechnung der Ergebnisse wurden die Daten der Kalibrierung mittels BSA-Standards herangezogen, da sich der TI-Standard in Vorversuchen als unrein erwiesen hat.

$$x = \frac{(y - d)}{k} * f$$

Gl. 4: Berechnung der Proteinkonzentration des Probenextraktes in mg/mL

x₁ Proteinkonzentration Extrakt [mg/mL]

y Probensignal [A_{595 nm}]

k Steigung [cm]

d Abstand [cm]

f Verdünnungsfaktor Probenextrakt

$$c = \frac{EW}{V_{EX}}$$

Gl. 5: Berechnung der Konzentration der Probe in mg/mL

c Konzentration Probe [mg/mL]

EW Einwaage [mg]

V_{EX} Extraktionsvolumen [mL]

$$a_1 = \frac{x}{c} * 100$$

Gl. 6: Berechnung des löslichen Proteingehaltes in g Protein/100 g Probe

a₁ Proteingehalt [g/100 g]

$$a = \left(\frac{a_1}{100 - W} \right) * 100$$

Gl. 7: Berechnung des Proteingehaltes der Mehlproben bezogen auf die Trockensubstanz in g Protein/100 g Probe TS

a Proteingehalt [g/100 g TS]

W Wassergehalt [%]

$$a = \left(\frac{a_1}{TM} \right) * 100$$

Gl. 8: Berechnung des Proteingehaltes der Teiglinge bezogen auf die Trockensubstanz in g Protein/100 g Probe TS

TM Trockenmasse [%]

5.3.4 Bestimmung der ATI-Konzentration mittels RP-HPLC

5.3.4.1 Verwendete Geräte

Die RP-HPLC der Chromaster Serie 5000 (Hitachi Ltd., Tokyo) besteht aus folgenden Teilen:

- Organizer
- 5430 Diode Array Detector
- 5310 Column Oven
- 5260 Autosampler
- 5160 Pump
- Säule: HALO C18 breite Porensäule von Advanced Materials Technology (150 mm x 2,1 mm, 2,7 µm Partikelgröße und 1000 Å) mit inkludierter Vorsäule

- Kolbenhubpipette 20-200 µL (Mettler-Toledo, Österreich)

5.3.4.2 Verwendete Hilfsmittel

- HPLC-Vials
- Deckel für HPLC-Vials

5.3.4.3 Verwendete Chemikalien/Standards

- Acetonitril (ACN) – CH₃CN (Merck, Deutschland)
- Trifluoressigsäure (TFA) – C₂HF₃O₂ (Sigma-Aldrich, Deutschland)
- Methanol – CH₃OH (Merck, Deutschland)
- Bidestilliertes Wasser
- Bovines Serumalbumin (BSA) – Reinheit ≥98 % (Carl Roth, Deutschland)
- Trypsin-Inhibitor (TI) – Reinheit >95 % (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, USA)

5.3.4.4 Herstellung der Laufmittel

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

In einem 1 L-Messkolben wurde bidestilliertes Wasser vorgelegt, 1 mL Trifluoressigsäure hinzupipettiert und mit bidestilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

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

In einem 1 L Messkolben wurde Acetonitril (HPLC grade) vorgelegt und 1 mL Trifluoressigsäure hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung bis zur Marke mit Acetonitril aufgefüllt und gut geschüttelt.

5.3.4.5 Durchführung

Es wurde von allen hergestellten Probenextrakten eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zuerst wurden die Lösungen für den Spülvorgang angeschlossen. Die Pumpe wurde bei einer niedrigen Flussrate von 0,2 mL/min gestartet. Danach wurde überprüft, ob die Säule dicht ist und anschließend konnte der Ofen auf 45 °C aufgeheizt werden. Für den fünfstufigen Spülvorgang des Samplers wurden Methanol und 20 % Acetonitril verwendet. Die Einlaufzeit des Gerätes lag etwa bei 30 min bis zu 1 Stunden. Als Laufmittel für die Messung wurden Laufmittel A und B eingesetzt. Der Verlauf der linearen Gradientenelution ist in Tab. 9 ersichtlich. Für die Messung wurde die Flussrate auf 0,35 mL/min erhöht. Währenddessen konnte das Chromatographie-Programm am Rechner gestartet werden. Im *sample table* wurde die Probenbezeichnung zur jeweiligen Position im Autosampler sowie das entsprechende Injektionsvolumen und die Methode eingegeben. Die aufgetauten und bereits filtrierten Probenextrakte (NaCl, CM) wurden in HPLC Vials überführt und in den Autosampler in die vorgesehenen Positionen gestellt. Nach jeder sechsten Messung erfolgte die Messung eines Blanks. Die Standards wurden am Anfang als auch am Ende jeder Messung positioniert. Die Messung konnte anschließend gestartet werden.

Tab. 9: Übersicht der HPLC-Einstellung (ATI-Quantifizierung)

	ATIs	
Injektionsvolumen	10 µL Mehl	50 µL Teigling
Laufzeit	50 min	
Flussrate	0,35 mL/min	
Säulenofentemperatur	45 °C	
Probenschleife	100 µL	
Absorption	214 nm	
Referenzmaterial	TI und BSA	
Blank	40 % ACN	
Gradient	0 min:	7 % Laufmittel B, 93 % Laufmittel A
	15 min:	27 % Laufmittel B, 73 % Laufmittel A
	45 min:	47 % Laufmittel B, 53 % Laufmittel A
	50 min:	57 % Laufmittel B, 43 % Laufmittel A

5.3.4.6 Auswertung

Der ATI-Gehalt wurde aus den NaCl- sowie CM-Extrakten bestimmt. Durch die chromatographische Auftrennung mittels der RP-HPLC konnte die ATI-Fraktion der Mehle und der Teiglinge ermittelt werden. In Abb. 8 ist die Integration eines Chromatogramms anhand einer ausgewählten Mehprobe ersichtlich. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu erzielen, wurde für den gesamten Probenumfang ein einheitliches Auswerteschema angewendet. Die Peakflächen der einzelnen Peaks der ATI-Fraktion wurden integriert und addiert.

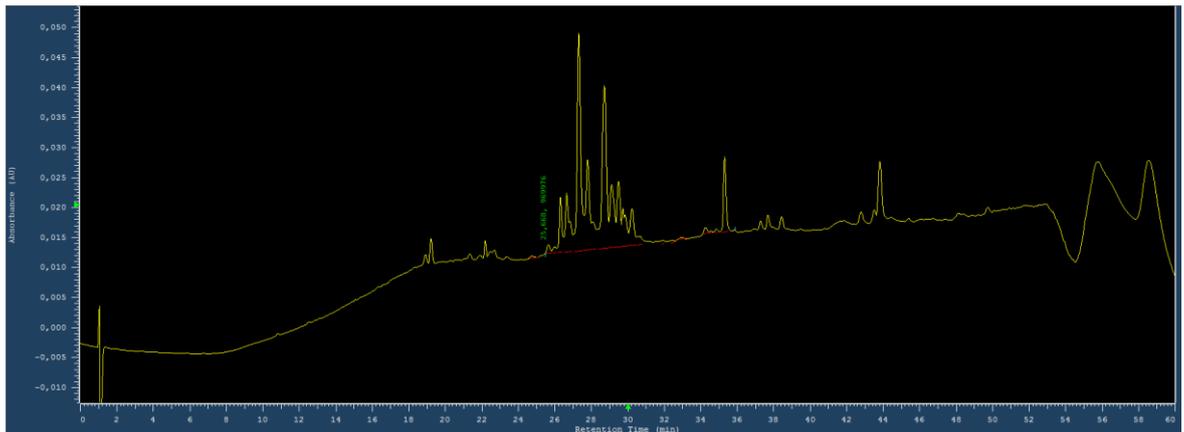


Abb. 8: Chromatogramm ATI-Fraktion (Mehlprobe)

Die Kalibrierung für die ATI-Fraktion wurde mittels BSA- und TI-Standard mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Es handelte sich hierbei um eine externe Kalibrierung. In Tab. 10 und Tab. 11 sind die Standardreihen der Kalibrierungen angeführt.

Tab. 10: BSA -Standards für die externe Kalibrierung (ATI - RP-HPLC)

BSA-STD	Konz. Stocklösung [mg/mL]	Injektionsvolumen [µL]	Proteinmenge [µg]
BSA-1	0,539	1	0,54
BSA-2	0,539	3	1,62
BSA-3	0,539	5	2,70
BSA-4	0,539	10	5,39
BSA-5	0,539	25	13,48
BSA-6	0,539	50	26,95

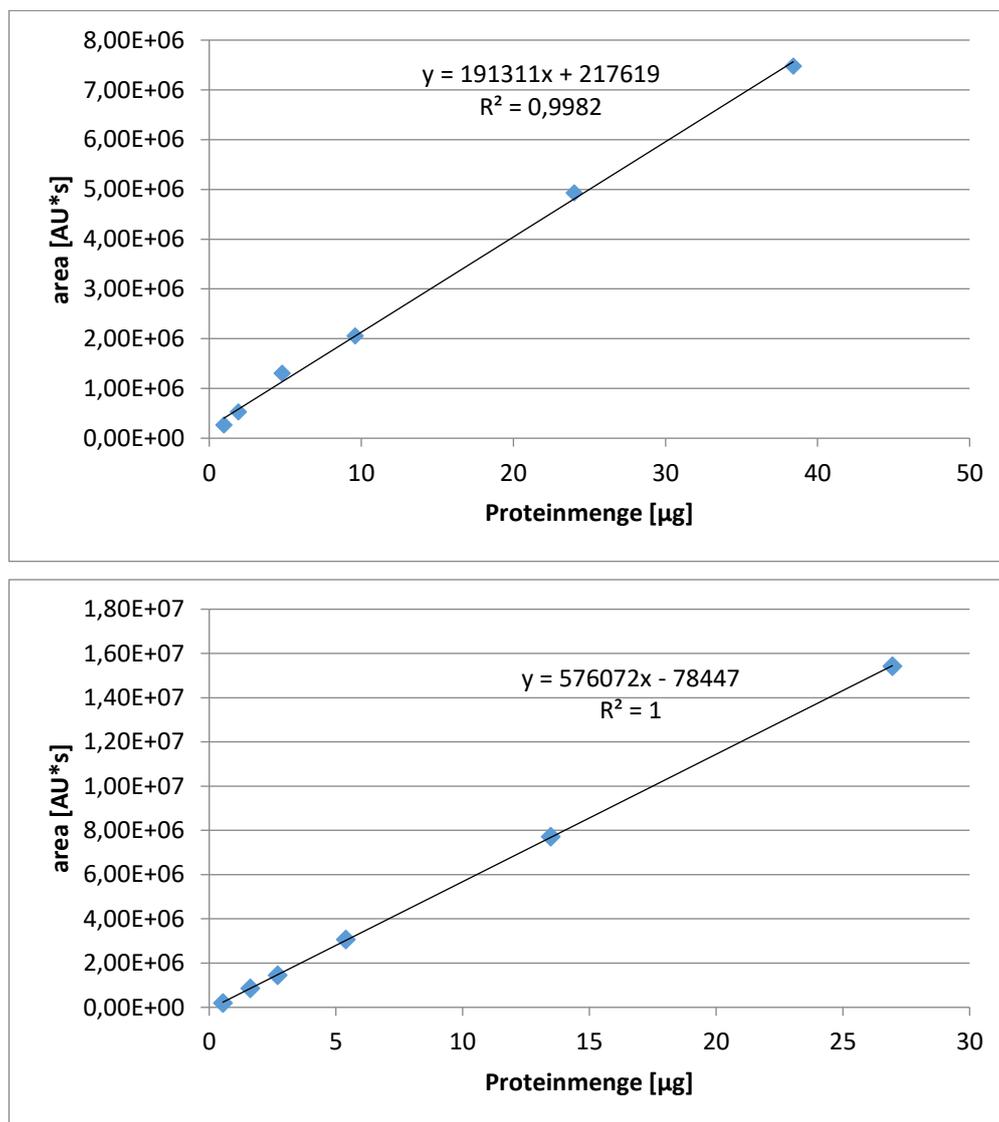
Konzentrationsangabe unter Einberechnung der Reinheit des BSA-STD
(≥98 %)

Tab. 11: TI-Standards für die externe Kalibrierung (ATI - RP-HPLC)

TI-STD	Konz. Stocklösung [mg/mL]	Injektionsvolumen [µL]	Proteinmenge [µg]
TI-1	0,096	10	0,96
TI-2	0,096	20	1,92
TI-3	0,096	50	4,80
TI-4	0,48	20	9,60
TI-5	0,48	50	24,0
TI-6	0,48	80	38,4

Konzentrationsangabe unter Einberechnung der Reinheit des TI-STD (96 %)

In Abb. 9 sind die beiden Kalibriergeraden und deren Funktionen ersichtlich.

**Abb. 9:** Kalibriergerade/-funktion zur Berechnung des ATI-Gehaltes mittels TI-Standard (A) und mittels BSA-Standard (B)

Anschließend wurde anhand der ermittelten Peakfläche der ATI-Gehalt wie folgt berechnet. Um die ATI-Konzentration zu bestimmen, wurde das Probensignal (area) in die Gleichung eingesetzt und durch Umformen der Funktion $y = k \cdot x + d$

berechnet. Die Berechnung der Konzentration an Amylase-Trypsin-Inhibitoren im Extrakt in $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ / $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ ist in Gl. 9 angeführt. Mittels Gl. 10 erfolgte die Umrechnung auf die Einheit $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, indem durch das Injektionsvolumen dividiert wurde.

Über die Einwaage der Probe und das Extraktionsvolumen wurde die Konzentration der tatsächlichen Probe ermittelt, wie in Gl. 11 ersichtlich ist. Die Berechnung des Gehaltes an Amylase-Trypsin-Inhibitoren in $\text{g}/100 \text{g}$ Probe erfolgte wie in Gl. 12. Die Bestimmung der ATI-Konzentration bezogen auf die Trockensubstanz (TS) wurde wie in Gl. 13 und Gl. 14 durchgeführt. Zur Berechnung der Ergebnisse wurden die Daten der Kalibrierung mittels TI-Standard herangezogen, um eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen von Kapeller (2019) zu erzielen.

$$x_1 = \frac{(y - 217619)}{191311}$$

Gl. 9: Berechnung der ATI-Konzentration des Extraktes in $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ (Mehl) oder $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ (Teigling)

x_1 ATI-Konzentration Extrakt [$\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$; $\mu\text{g}/50\mu\text{L}$]

y Probensignal [AU]

$$x = \frac{x_1}{V_{Inj}}$$

Gl. 10: Berechnung der ATI-Konzentration des Extraktes in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

x ATI-Konzentration Extrakt [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]

V_{Inj} Injektionsvolumen [μL]

$$c = \frac{EW * 1000}{V_{EX}}$$

Gl. 11: Berechnung der ATI-Konzentration der Probe in mg/mL

c ATI-Konzentration Probe [mg/mL]

EW Einwaage [g]

V_{EX} Extraktionsvolumen [mL]

$$a_1 = \frac{x}{c}$$

Gl. 12: Berechnung des ATI-Gehaltes in g Protein/100 g Probe

a_1 Proteingehalt ATIs [g/100 g]

$$a = \left(\frac{a_1}{100 - W} \right) * 100$$

Gl. 13: Berechnung des ATI-Gehaltes der Mehlproben bezogen auf die Trockensubstanz in g Protein/100 g Probe TS

a Proteingehalt ATIs [g/100 g TS]

W Wassergehalt [%]

$$a = \left(\frac{a_1}{TM} \right) * 100$$

Gl. 14: Berechnung des ATI-Gehaltes der Teiglinge in g Protein/100 g Probe TS

TM Trockenmasse [%]

5.3.5 Bestimmung des Rohproteingehaltes nach Dumas

5.3.5.1 Verwendete Geräte

- Dumaster rapid N exceed (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz)
- Analysenwaage XPE204, Unterteilung 0,0001 g (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland)

5.3.5.2 Verwendete Hilfsmittel

- Spatel
- Pinzette
- LECO Zinnfolie

5.3.5.3 Verwendete Referenzmaterialien

- Asparginsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Referenzgerste RM503

5.3.5.4 Durchführung

Für die Gesamtstickstoffbestimmung nach Dumas wurden alle sechs Mehlproben analysiert. Bei jeder Messreihe wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Es erfolgte eine Kalibrierung mit Asparaginsäure, welche vier Mal gemessen wurde. Zudem wurden Messungen von Blindwerten und Gersten-Referenzmaterial

durchgeführt. Danach wurden 180-240 mg der Proben in eine Zinnfolie eingewogen. Die genaue Einwaage wurde in die Eingabetabelle überführt. Die Proben wurden vorsichtig mit der Zinnfolie verschlossen und zu einem Pellet geformt. Anschließend wurden die Pellets in die entsprechenden Positionen des Probentellers platziert und die Messung konnte gestartet werden. Für die Berechnung des Proteingehalts von Weizen wurde ein Proteinfaktor von 5,70 herangezogen.

5.3.5.5 Auswertung

Durch das Programm des Dumasters erfolgte bereits die Berechnung des Proteingehaltes in g Protein/100 g Probe unter Einberechnung des Proteinfaktors für Weizen. Anschließend wurde das Ergebnis des Proteingehaltes bezogen auf die Trockensubstanz (TS) angeben und mit nachfolgender Gleichung (Gl. 15) berechnet.

$$a = \left(\frac{a_1}{100 - W} \right) * 100$$

Gl. 15: Berechnung des Rohproteingehaltes der Mehlproben bezogen auf die Trockensubstanz in g/100 g Probe TS

a₁ Rohproteingehalt [g/100 g]

a Rohproteingehalt [g/100 g TS]

W Wassergehalt [%]

5.3.6 Bestimmung des Glutengehaltes mittels RP-HPLC

5.3.6.1 Verwendete Geräte

- Analysenwaage, Genauigkeit: Min 10 mg, Max 205 mg, d = 0,1 g, e = 1 mg (Mettler Toledo AT 200, Schweiz)
- Vortex REAX 1R (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland)
- IKA Trayster D (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
- Trockenschrank Typ 15115300002020 (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Zentrifuge Multifuge 1S-R (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland)
- Kolbenhubpipette 500-5000 µL (Mettler-Toledo, Österreich)

- Schüttelwasserbad GFL 1086 (Aigner Unilab Laborfachhandel GesmbH, Österreich)
- Ultraschallbad Sonorex RK 510 H (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Deutschland)
- Cimarec i Multipoint (Fisher Scientific GmbH, Deutschland)

RP-HPLC System der Chromaster Serie 5000 (Hitachi Ltd., Tokyo) bestehend aus folgenden Teilen:

- Organizer
- 5430 Diode Array Detector
- 5310 Column Oven
- 5260 Autosampler
- 5160 Pump
- Säule: HALO C18 breite Porensäule von Advanced Materials Technology (150 mm x 2,1 mm, 2,7 µm Partikelgröße und 1000 Å) mit inkludierter Vorsäule

5.3.6.2 Verwendete Hilfsmittel

- Falcon Zentrifugenröhrchen 15 mL (Corning Science, Mexiko)
- Zentrifugenröhrchen 50 mL Cellstar© Typ: 210261 (Greiner bio-one, Österreich)
- diverse Messkolben
- diverse Bechergläser
- Pipettenspitzen (Mettler-Toledo, Österreich)
- Spatel
- Spritzenfilter Chromafil® CA 0.45 µm Membran (Machery-Nagel, Deutschland)
- Braun Injekt® Solo 2 mL (B. Braun Melsungen AG, Deutschland)
- HPLC Vials
- Deckel für HPLC-Vials
- Stoppuhr
- Magnetrührstäbchen
- Pasteurpipetten

5.3.6.3 Verwendete Chemikalien/Standards

- Natriumchlorid – NaCl (Nr.: 1.06404.5000, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 1,4-Dithiothreitol (DTT) – C₄H₁₀O₂S₂ (Nr.: 6908.2, Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Natriumdodecylsulfat (SDS) – C₁₂H₂₅NaO₄S (Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Acetonitril (ACN) – CH₃CN (Nr.: 1.00030.2500, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Trifluoressigsäure (TFA) – C₂HF₃O₂ (Nr.: 91700, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- N-Hexan – H₃C(CH₂)₄CH₃ (für die HPLC, Nr.: SO-5167-B025, LGC Standards Promochem, Wesel, Deutschland)
- Stickstoff
- Bidestilliertes Wasser
- Prolamin working group-(PWG)-Standard

5.3.6.4 Herzustellende Lösungen

2 % m/v Natriumchlorid

Es wurden 20 g NaCl in einem 1 L Messkolben eingewogen und anschließend mit bidestilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

1 % m/v Natriumdodecylsulfat, 0,5 % Dithiothreitol

Zur Herstellung der Lösung wurden 20 g SDS und 10 g DTT in einen 2 L Messkolben eingewogen und mit bidestilliertem Wasser unter Rühren mittels Magnetrührer gelöst. Um den gebildeten Schaum zu entfernen wurde die Lösung für 30 min in das Ultraschallbad gestellt.

5.3.6.5 Durchführung

Vorbereitung

Es wurden etwa 0,25 g der Mehlproben und 0,50 g der Gebäckproben in 15 mL Tubes eingewogen und die genaue Einwaage notiert. Zum Entfetten wurden die Proben im Abzug mit 10 mL Hexan versetzt und für mindestens 2 min in den Überkopfschüttler gestellt. Danach wurden die Proben für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und der Rückstand mit dem restlichen Hexan im Trockenschrank bei maximal 50 °C getrocknet.

Albumine und Globuline

Um nur die Glutenfraktion zu erhalten, wurden im ersten Schritt der Extraktion die Albumine und Globuline zwei Mal mit 10 mL 2 % NaCl extrahiert und somit abgetrennt. Hierfür wurden die getrockneten Proben zuerst mit 10 mL 2 % NaCl versetzt und mittels Metallspatel durchmischt. Danach wurden die Proben für etwa 20 s gevortext, sodass kein Pellet mehr sichtbar war und für 10 min bei 40 rpm in den Überkopfschüttler gestellt. Des Weiteren wurden die Suspensionen für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand in einen 20 mL Messkolben überführt. Der Vorgang wurde wiederholt und der 20 mL Messkolben anschließend mit der Extraktionslösung bis zur Marke aufgefüllt.

Gliadine und Gluteline

Bei einem weiteren Extraktionsschritt wurden die Gliadine und Gluteline zwei Mal mit 20 mL Extraktionslösung 1 % SDS und 0,5 % DTT extrahiert. Im ersten Schritt wurde der Rückstand mit Hilfe der 20 mL Extraktionslösung in ein 50 mL Tube überführt. Nach der Zugabe der Lösung wurde die Probe wieder mit dem Metallspatel vorgelöst, gevortext und mit Stickstoff begast. Anschließend wurden die Proben im Wasserbad 10 min bei 60 °C geschüttelt. Nach der Hälfte der Zeit wurden die Proben kurz gevortext. Zuletzt wurden die Proben bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand in einen 50 mL Messkolben überführt. Der Vorgang wurde wiederholt und der 50 mL Messkolben mit der Extraktionslösung bis zur Marke aufgefüllt.

Die unterschiedlichen Extrakte wurden mittels Spritzenfilter 0,45 µm in HPLC-Vials filtriert und bis zur Messung eingefroren. Es wurde ebenfalls der Extraktionsrückstand bis zur weiteren Verwendung im Gefrierschrank gelagert.

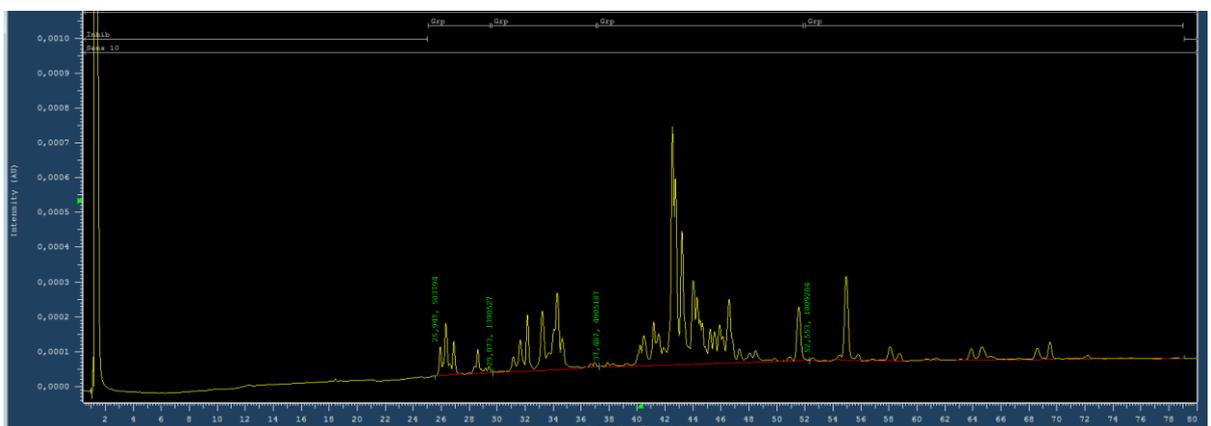
Das Prinzip der Durchführung von der Inbetriebnahme der HPLC-Anlage bis zum Starten der Messung wurde bereits bei Punkt 5.3.4.5 beschrieben. Neben der Methode gab es aber auch Unterschiede bei den HPLC-Einstellungen, wie in Tab. 12 ersichtlich.

Tab. 12:Übersicht der HPLC-Einstellung (Gluten-Quantifizierung)

Gluten	
Injektionsvolumen	15 µL Mehl 15 µL Gebäck
Laufzeit	99 min
Flussrate	0,35 mL/min
Säulenofentemperatur	50 °C
Probenschleife	100 µL
Absorption	214 nm
Referenzmaterial	PWG-STD
Blank	40 % ACN
Gradient	0 min: 15 % Laufmittel B, 85 % Laufmittel A 10 min: 25 % Laufmittel B, 75 % Laufmittel A 40 min: 42,5 % Laufmittel B, 57,5 % Laufmittel A 60 min: 50 % Laufmittel B, 50 % Laufmittel A 80 min: 60 % Laufmittel B, 40 % Laufmittel A 85 min: 75 % Laufmittel B, 25 % Laufmittel A 86 min: 95 % Laufmittel B, 5 % Laufmittel A 89,1 min: 15 % Laufmittel B, 85 % Laufmittel A

5.3.6.6 Auswertung

Der Glutengehalt wurde aus den Extrakten der Gliadin/Glutenin-Fraktion bestimmt. Durch die Anwendung der RP-HPLC wurde der Gehalt an Gluten der sechs ausgewählten Mehle und der Gebäcke (2. Backversuch) ermittelt. In Abb. 10 ist die Integration eines Chromatogramms anhand einer ausgewählten Mehlprobe ersichtlich. Es wurde für den gesamten Probenumfang ein einheitliches Auswerteschema angewendet, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu erzielen. Die Peakflächen der einzelnen Peaks der Gliadin/Glutenin-Fraktion wurden integriert und addiert.

**Abb. 10:** Chromatogramm Gliadine und Glutenine (Mehlprobe)

Die Kalibrierung für die Gliadin/Glutenin-Fraktion erfolgte mittels PWG-Standards (PWG-STD) nach van Eckert et al. (2006). Es handelte sich hier um eine externe Kalibrierung. Die Standardreihen sind in Tab. 13 angeführt.

Tab. 13: Standardreihe des PWG-STD für die externe Kalibrierung (Gluten – RP-HPLC)

Glia/Glu-STD	Konz. Stocklösung [mg/mL]	Injektionsvolumen [µL]	Proteinmenge [µg]
PWG-1	0,088	3	0,26
PWG-2	0,088	10	0,88
PWG-3	0,088	30	2,63
PWG-4	2,19	1	2,19
PWG-5	2,19	5	10,95
PWG-6	2,19	10	21,90

Konzentrationsangabe unter Einberechnung der Reinheit des PWG-STD (87,6 %)

In Abb. 11 ist die Kalibriergerade und deren Funktion abgebildet. Vor Beginn des Probenlaufs erfolgte die Messung der Standards zur Ermittlung der Kalibriergeraden.

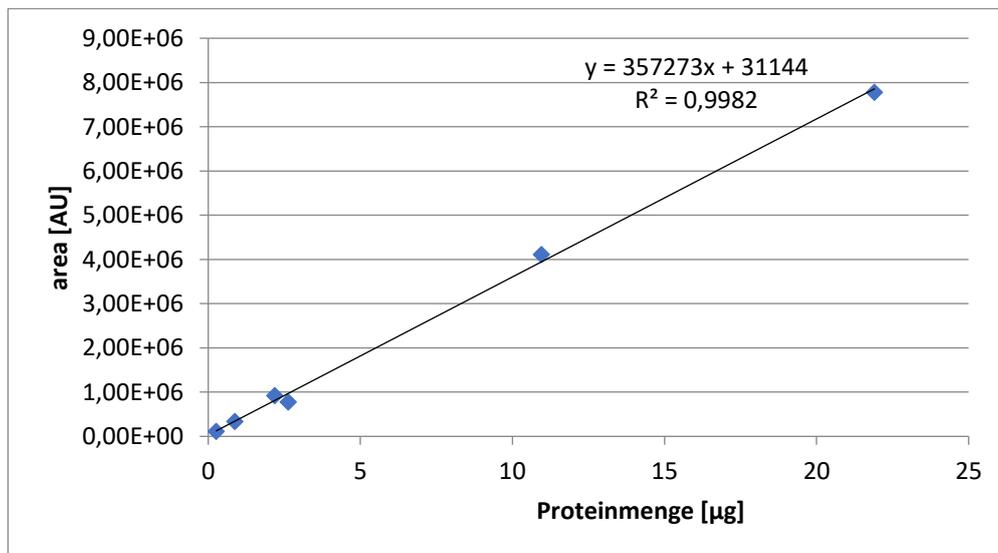


Abb. 11: Kalibriergerade/-funktion der Gliadine/Glutenine mittels PWG-STD

Wie auch bei der Bestimmung des ATI-Gehaltes wurde das Probensignal (area) in die Gleichung eingesetzt und durch Umformen der Funktion $y = k \cdot x + d$ die Konzentration an Gluten im Extrakt berechnet. Die Berechnung der Gliadin/Glutenin-Fraktion in µg/15 µL ist in Gl. 16 angeführt. In Gl. 17 wurde die Proteinkonzentration auf µg/µL umgerechnet, indem durch das Injektionsvolumen dividiert wurde.

Über die Einwaage der Probe und das Extraktionsvolumen wurde die Glutenkonzentration der Probe ermittelt, wie in Gl. 18 ersichtlich ist. Die Berechnung des Glutengehaltes in g/100 g Probe erfolgte wie in Gl. 19. Die Umrechnung auf Gluten in g/100 g Probe bezogen auf die Trockensubstanz (TS) wird wie in Gl. 20 durchgeführt.

$$x_1 = \frac{(y - 31.144)}{357.273}$$

Gl. 16: Berechnung der Gliadine/Glutenine des Extraktes in µg/15 µL

x_1 Proteinkonzentration Extrakt [µg/15 µL]

y Probensignal [AU]

$$x = \frac{x_1}{V_{Inj}}$$

Gl 17: Berechnung der Gliadine/Glutenine des Extraktes in µg/µL

x Proteinkonzentration Extrakt [µg/µL]

V_{Inj} Injektionsvolumen [µL]

$$c_{EX} = \frac{EW * 1000}{V_{EX}}$$

Gl 18: Berechnung der Glutenkonzentration der Probe in mg/mL

c_{EX} Glutenkonzentration Probe [mg/mL]

EW Einwaage [g]

V_{EX} Extraktionsvolumen [mL]

$$a_1 = \frac{x}{c_{EX}}$$

Gl 19: Berechnung des Glutengehaltes in g Protein/100 g Probe

a_1 Glutengehalt [g/100 g]

$$a = \left(\frac{a_1}{100 - W} \right) * 100$$

Gl 20: Berechnung des Glutengehaltes in g Protein/100 g Probe TS

a Glutengehalt [g/100 g TS]

W Wassergehalt [%]

5.3.7 *In vitro* Proteinverdau

5.3.7.1 Verwendete Geräte

- Analysenwaage, Genauigkeit: Min 10 mg, Max 205 mg, d = 0,1 g, e = 1 mg (Mettler Toledo AT 200, Schweiz)
- Vortex REAX 1R (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland)
- IKA Trayster D (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
- Trockenschrank Typ 15115300002020 (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Zentrifuge Multifuge 1S-R (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland)
- Schüttelwasserbad GFL 1086 (Aigner Unilab Laborfachhandel GesmbH, Österreich)
- pH Meter inoLab® (WTW, Deutschland)
- Dumaster rapid N exceed (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Schweiz)
- Analysenwaage XPE204, Unterteilung 0,0001 g (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland)
- Kolbenhubpipette 20-200 µL (Mettler-Toledo, Österreich)
- Kolbenhubpipette 500-5000 µL (Mettler-Toledo, Österreich)
- Kolbenhubpipette 10-100 µL (Mettler-Toledo, Österreich)

5.3.7.2 Verwendete Hilfsmittel

- Zentrifugenröhrchen 50 mL Cellstar© Typ: 210261 (Greiner bio-one, Österreich)
- diverse Messkolben
- diverse Bechergläser
- Pipettenspitzen (Mettler-Toledo, Österreich)
- Magnetrührstäbchen
- Metallspatel
- Stoppuhr
- Mörser
- Pasteurpipetten

5.3.7.3 Verwendete Chemikalien

- Kaliumchlorid – KCl (Merck, Deutschland)

- Kaliumdihydrogenphosphat – KH_2PO_4 (Merck, Deutschland)
- Natriumhydrogencarbonat – NaHCO_3 (Merck, Deutschland)
- Natriumchlorid – NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Magnesiumchlorid-Hexahydrat – $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ (Merck, Deutschland)
- Ammoniumcarbonat – $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (Merck, Deutschland)
- Salzsäure – HCl 25 %, 6 M (Merck, Deutschland)
- Calciumchlorid-Dihydrat – $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ (VWR Chemicals, USA)
- Natriumhydroxid – NaOH 32 % (VWR Chemicals, USA)
- Bidestilliertes Wasser

5.3.7.4 Verwendete Enzyme und Gallenpulver

- Amyloglucosidase, 34,6 Units/mg of solid (on soluble starch) (Megazyme Ltd., Irland)
- Lipase from porcine pancreas Type II, 100-500 Units/mg Protein (Nr.: L3126-25G, Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, USA)
- Pepsin from porcine gastric mucosa, $\geq 2,500$ Units/mg Protein (Nr.: P7012-1G, Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, USA)
- Trypsin from bovine pancreas Type I, $\sim 10,000$ BAEE Units/mg Protein (Nr.: T8003-1G, Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, USA)
- Bile bovine (Nr.: B3883-25G, Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, USA)
- α -Chymotrypsin from bovine pancreas, Type I-S (Nr.: C7762-100MG, Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, USA)

5.3.7.5 Herzustellende Stocklösungen

Kaliumchlorid (0.5 M; 37,3 g/L)

Es wurden etwa 37,3 g KCl in einen 1 L Messkolben eingewogen und mit bidestilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Kaliumdihydrogenphosphat (0,5 M; 68 g/L)

Zur Herstellung einer 0,5 M KH_2PO_4 -Lösung wurden 17 g KH_2PO_4 in einen 250 mL Messkolben eingewogen und bis zur Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Natriumhydrogencarbonat (1 M; 84 g/L)

Die Einwaage betrug 168 g NaHCO_3 in einen 2 L Messkolben. Anschließend wurde mit bidestilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Natriumchlorid (2 M; 117 g/L)

Zur Herstellung der NaCl -Lösung wurden 117 g NaCl in einen 1 L Messkolben eingewogen und mit bidestilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Magnesiumchlorid-Hexahydrat (0,15 M; 30,5 g/L)

Es wurden 3,05 g $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ in einen 100 mL Messkolben eingewogen und mit destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Ammoniumcarbonat (0,5 M; 48 g/L)

Es wurden 2,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ in einen 50 mL Messkolben eingewogen und anschließend mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Calciumchlorid-Dihydrat (0,3 M; 44,1 g/L)

Es wurden 441 mg $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ in einen 10 mL Messkolben eingewogen und mit destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Salzsäure (1 M)

Die Herstellung erfolgte aus einer 6 M HCl durch das Mischen von fünf Teilen H_2O mit einem Teil der 6 M HCl .

Natriumhydroxid (1 M)

Die Herstellung erfolgte aus einer 2 M NaOH durch das Mischen von einem Teil H_2O mit einem Teil der 2 M NaOH .

5.3.7.6 Herstellung der Verdauulösungen

Aus den Stocklösungen wurden die drei Verdauulösungen SSF (engl. simulated salvary fluid), SGF (engl. simulated gastric fluid) und SIF (simulated intestinal fluid) laut nachfolgendem Pipettierschema hergestellt.

Tab. 14: Pipettierschema zur Herstellung der Verdauelösungen

Salzlösungen	SSF (pH 7)		SGF (pH 3)		SIF (pH 7)	
	[mL]	[mM]	[mL]	[mM]	[mL]	[mM]
KCl	7,55	15,1	3,45	6,9	3,4	6,8
KH ₂ PO ₄	1,855	3,7	0,45	0,9	0,4	0,8
NaHCO ₃	3,4	13,6	6,25	25	21,25	85
NaCl	-	-	5,9	47,2	4,8	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,25	0,15	0,2	0,12	0,55	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,03	0,06	0,25	0,5	-	-
HCl	0,045	1,1	0,65	15,6	0,35	8,4

5.3.7.7 Herstellung Enzym- und Galle-Lösungen

Amyloglucosidase

Es wurden 216,76 mg des Enzyms in einen 5 mL Messkolben eingewogen und mit destilliertem Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Lipase

Zur Herstellung der Enzymlösung wurden 120 mg der Lipase in einen 5 mL Messkolben eingewogen und mit destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Pepsin

Es wurden 160 mg Pepsin in einen 5 mL Messkolben eingewogen und anschließend mit destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Rindergalle-Lösung

Von der Rindergalle wurden 81,71 mg in einen 20 mL Messkolben eingewogen und mit der SIF-Lösung bis zur Marke aufgefüllt.

Trypsin-Chymotrypsin-Lösung

Es wurden 8 mg Trypsin und 100 mg Chymotrypsin in einen 100 mL Messkolben eingewogen und mit der SIF-Lösung bis zur Markierung aufgefüllt.

5.3.7.8 Durchführung

Vorbereitung

Zuerst wurde das Gewicht der einzelnen leeren Tubes mit Deckel notiert. Dann wurden 2,5 g der Proben (Mehle, Gebäck) in 50 mL Tubes eingewogen und ebenfalls die genaue Einwaage notiert. Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung. Die Gebäckproben wurden davor bei 100 °C im Trockenschrank getrocknet. Das Schüttelwasserbad wurde auf 37 °C vorgeheizt. Die SSF-, SGF- und SIF-Lösungen wurden hergestellt und im Wasserbad

vorgewärmt. Die Enzymlösungen wurden immer frisch oder am Vortag hergestellt und im Kühlschrank gelagert.

Orale Phase

In der oralen Phase wurde die Probe zuerst mit 2 mL temperierter SSF-Lösung versetzt. Anschließend wurden 12,5 µL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ -Lösung und 0,25 mL Amylase-Lösung zugegeben. Um eine geeignete Konsistenz zu erhalten wurde den Mehlprobe 2,5 mL H_2O und den Gebäckproben 15 mL H_2O zugesetzt. Danach wurde zu jeder Probe noch 0,238 mL H_2O pipettiert. Die Proben wurden für 2 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert.

Gastrische Phase

In der gastrischen Phase wurde den Proben 4 mL SGF-Lösung und 2,5 µL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ -Lösung zugegeben. Danach erfolgte die Einstellung eines pH-Wertes von ungefähr 3 durch die Zugabe von 300 µL 1 M HCl. Im Anschluss wurde die Probe mit jeweils 0,25 mL Lipase-Lösung und 0,25 mL Pepsin-Lösung versetzt. Nach der Zugabe erfolgte die pH-Kontrolle und gegebenenfalls die Zugabe von HCl oder NaOH. Den Proben wurde 0,198 mL destilliertes Wasser zugesetzt und anschließend wurden diese bei 37 °C für 2 Stunden im Schüttelwasserbad inkubiert. Währenddessen wurden die Proben des Öfteren gevortext.

Intestinale Phase

In der letzten Phase wurde die Probe mit 4 mL SIF und 20 µL $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ -Lösung versetzt. Anschließend erfolgte die Einstellung eines pH-Wertes von ungefähr 7 mittels 200 µL 1 M NaOH (beim Gebäck etwa 220 µL). Danach wurden 1,25 mL der Rindergalle-Lösung zugegeben und die Probe für 30 min in den Überkopfschüttler überführt. Den Proben wurde 2,5 mL der Trypsin-Chymotrypsin-Lösung zugegeben. Wie auch bei der gastrischen Phase wurde der pH-Wert kontrolliert und falls notwendig mit NaOH oder HCl korrigiert. Zuletzt wurden 2,07 mL Wasser zugesetzt. Die Proben wurden nochmals für 2 St bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Währenddessen wurden die Proben abermals gevortext.

Am Ende wurden die Proben für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Proben wurden für 2 Tage bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet.

5.3.7.9 Auswertung

Zur Berechnung der Verdaubarkeit wurde zuallererst die Auswaage wie in Gl. 21 bestimmt. Des Weiteren erfolgte für jedes Gebäck die Berechnung eines Korrekturfaktors anhand von Gl. 22. Der verdaute Proteinanteil der Mehlproben wurde wie in Gl. 23 ermittelt. Hierbei wurde der verdaute Proteingehalt durch den unverdauten Proteingehalt dividiert und um den verdauten Anteil zu erhalten von der Zahl 1 subtrahiert. Um die Verdaubarkeit in Prozent (%) zu erhalten, musste das Ergebnis mal der Zahl 100 gerechnet werden. Bei den Gebäcken wurde zudem der Korrekturfaktor miteinberechnet (Gl. 24).

$$AW_{Pr} = AW_{ges} - (EW_{Pr} + EW_T)$$

Gl. 21: Berechnung der Nettoauswaage der Probe in g

AW_{Pr} Auswaage Probe [g]

AW_{ges} Auswaage Probe und Tube mit Deckel [g]

EW_{Pr} Einwaage Probe [g]

EW_T Einwaage Tube mit Deckel [g]

$$f_K = \left(\frac{AW_M}{AW_G} \right)$$

Gl. 22: Berechnung des Korrekturfaktors für die analysierten Gebäcke

F_K Korrekturfaktor

AW_M Auswaage Mehl [g]

AW_G Auswaage Gebäck [g]

$$V = \left[1 - \left(\frac{P_v}{P} \right) \right] * 100$$

Gl. 23: Berechnung der Verdaubarkeit der Mehlproben in %

V Verdaubarkeit [%]

P_v Proteingehalt der verdauten Proben [%]

P Proteingehalt der unverdauten Proben [%]

$$V = \left[1 - \left(\frac{P_v}{\frac{f_K}{P}} \right) \right] * 100$$

Gl. 24: Berechnung der Verdaubarkeit der Gebäckproben unter Einberechnung des Korrekturfaktors

5.4 Statistik

In der Wissenschaft ist die Anwendung statistischer Methoden zur entsprechenden Analyse und richtigen Interpretation von erhobenen Daten unbedingt notwendig. Die statistische Auswertung dieser Diplomarbeit erfolgte mittels folgender Software:

- Excel 2010 (Microsoft Corp.)
- SPSS Statistics (IBM Corp. Version 27)

5.4.1 Grundlegende statistische Methoden

Arithmetischer Mittelwert

Das arithmetische Mittel (\bar{x}) ist definiert als die Summe aller Beobachtungen dividiert durch die Anzahl der Beobachtungen. Der Mittelwert dient zur repräsentativ-nivellierenden Mittelung für mehrere bis zahlreiche nicht zu heterogene Beobachtungen (Hedderich & Sachs 2018).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} (x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Standardabweichung, Varianz

Die Streuung metrischer Daten wird als gemittelte Abweichung vom jeweiligen Mittelwert angegeben. Die Standardabweichung (s) ist die positive Quadratwurzel aus dem Mittelwert der quadrierten Abweichungen des Mittelwerts.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Die Varianz (s^2) ist das Quadrat der Standardabweichung und besitzt daher als Dimension das Quadrat der Dimension der einzelnen Beobachtungen x_i .

Prüfung auf Normalverteilung

Die Normalverteilung der Daten gilt für viele statistische Testmethoden als Voraussetzung. Hierfür stehen unter anderem der Kolmogorov-Smirnov-Test und der Shapiro-Wilk-Test zur Verfügung, welche beide im Zuge der Arbeit zum Einsatz kamen. Um die Signifikanz des Ergebnisses zu ermitteln, wird der p-Wert bestimmt. Ist dieser geringer als das Signifikanzniveau ($p = 0,05$) wird die

Hypothese abgelehnt, da keine Normalverteilung der Daten vorliegt (Hedderich & Sachs 2018).

Prüfung auf Varianzhomogenität

Eine weitere wichtiger Voraussetzung für spätere Tests, wie z.B. die ANOVA, ist die Homogenität der Varianzen, die anhand eines Levene-Tests untersucht wird. Der Levene-Test prüft die Nullhypothese, dass bei allen Gruppen die Varianzen innerhalb einer gewissen Schwankungsbreite gleich sind. Die Daten müssen für diesen Test nicht normalverteilt vorliegen. Die Hypothese, dass die Varianzen homogen verteilt sind, wird abgelehnt, wenn das Ergebnis des Levene-Tests signifikant ($p < 0,05$) ist. Bei einem Signifikanzwert von $> 0,05$ kann jedoch von einer Varianzhomogenität ausgegangen werden (Hedderich & Sachs 2018). In der SPSS Software wird die Voraussetzung der Varianzhomogenität bei der Durchführung einer ANOVA direkt mitgetestet.

Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)

Bei der einfaktoriellen Varianzanalyse wird der Einfluss eines Faktors (nominale Einflussgröße) auf eine Zielvariable (Untersuchungsmerkmal) untersucht. Die Nullhypothese H_0 gibt an, dass die Mittelwerte \bar{x} übereinstimmen. Im Zuge der ANOVA wird H_0 mittels Vergleich der Varianzen gegen die Alternativhypothese H_1 (es unterscheiden sich zumindest zwei Mittelwerte) geprüft. Voraussetzung zur Durchführung einer ANOVA ist die Normalverteilung der Daten als auch das Vorliegen von Varianzhomogenität (Timischl 2013).

Post-Hoc-Test

Da die ANOVA nur angibt, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht, jedoch nicht zwischen welchen, erfolgt des Weiteren die Durchführung eines Post-hoc-Tests. Anhand eines Post-hoc-Tests kann festgestellt werden, welche der Datengruppen sich voneinander signifikant unterscheiden. Bei Varianzhomogenität wurde der Scheffé-Test und der Test nach Duncan und bei Varianzinhomogenität wurde der Test Tamhane T2 angewendet. Zwischen zwei Gruppen besteht ein Unterschied, wenn das Signifikanzniveau $< 0,05$ ist. Besteht hingegen kein Unterschied, werden die beiden Gruppen derselben homogenen Untergruppe zugeordnet (Hedderich & Sachs 2018).

Korrelation

Eine Korrelations- oder Zusammenhangsanalyse gilt als Teilgebiet der multivariaten Statistik. Hierbei erfolgt das Messen der Intensität und der Richtung von Zusammenhängen von mindestens zwei Merkmalen. Als R^2 wird das Ausmaß der Korrelation angegeben. Je größer R^2 , desto stärker der Zusammenhang der beiden Größen. Bei normalverteilten Daten wird eine Maßkorrelationsanalyse nach Pearson angewendet, während bei nicht normalverteilten Datensätzen eine Rangordnungskorrelation nach Spearman durchgeführt wird. (Eckstein 1997) Die SPSS Software gibt an, ob eine signifikante ($p < 0,05$) oder hoch signifikante Korrelation ($p < 0,01$) vorliegt.

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Vorversuche zur Methodenoptimierung

6.1.1 Extraktion

Da bereits mehrfach aufgezeigt wurde, dass zwischen dem Amylase-Trypsin-Inhibitoren-(ATI)-Gehalt und der biologischen Aktivität von Amylase-Trypsin-Inhibitoren keine Korrelation vorliegt, erfolgten Extraktionsversuche mit Chlorform/Methanol- und Ammoniumsulfat-Lösungen. Das Ziel der Vorversuche war es, durch eine modifizierte Extraktion spezifisch ATIs zu extrahieren, da andere Proteine auch eine hemmende Wirkung gegenüber α -Amylasen und Trypsin aufweisen (Call et al. 2019). In der Studie von Sagu et al. (2019) wurde die Extraktion von ATIs mittels Chlorform, Methanol, Dichlormethan, Ammoniumsulfat und Natriumchlorid (NaCl) in Weizen untersucht. Es wurde festgestellt, dass die verwendete Salzlösung, die Salzkonzentration, der pH-Wert des Puffers und die Extraktionszeit den größten Einfluss auf die Löslichkeit der ATIs aufweist. Ammoniumsulfat- und Natriumchlorid-Lösungen kommen bevorzugt zum Einsatz, wobei die Extraktion mit Natriumchlorid zu einer spezifischeren Löslichkeit der Proteine führt.

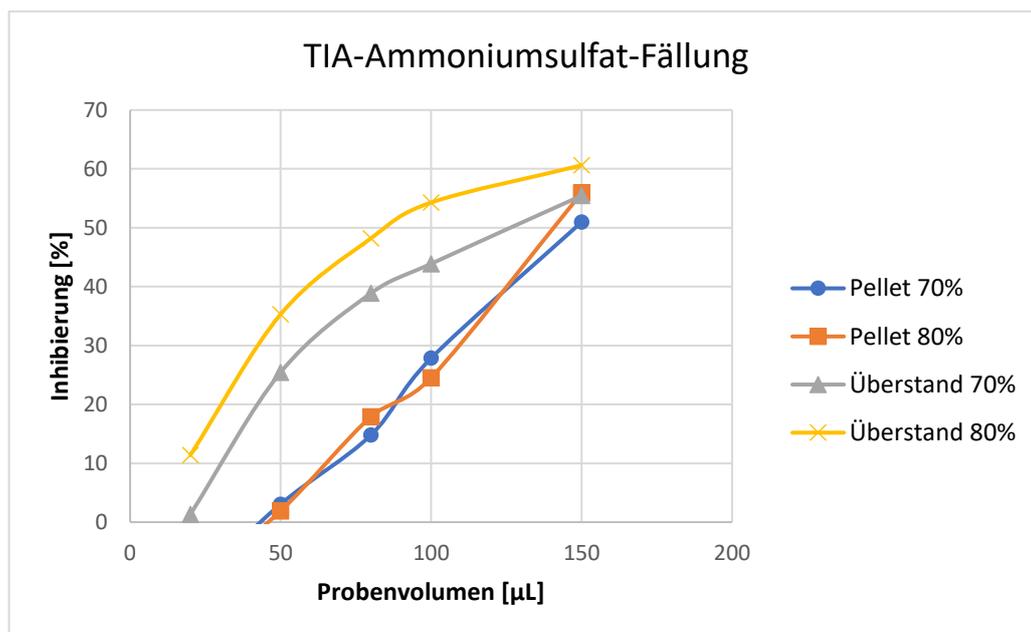
Nach der Ammoniumsulfat-Fällung wurde das lösliche Protein als auch die Trypsin-Inhibitoraktivität der Arnold Mischprobe analysiert. Es wurden ein- bzw. zweistufige Fällungen mit 35 %, 70 % und 80 % Sättigung der Probe durchgeführt. Im Vergleich der 70 % und 80 % Sättigung der einstufigen Fällung, konnte kein Unterschied festgestellt werden, es wurde für beide Fällungen ein Gehalt von 0,59 g/100 g Probe ermittelt. Hingegen wurde ein niedrigerer Gehalt an löslichem Protein bei der zweistufigen Fällung mit 70 % Sättigung als bei der einstufigen Variante beobachtet. In Hinblick auf die Durchführung ist die einstufige Fällung einfacher und weniger anfällig für Fehler. Laut Kostecki & Karakaya (2017) wird eine Sättigung von 70 % für Mehl und Brot empfohlen, welche sich anhand der erbrachten Ergebnisse (Tab. 15) am Sinnvollsten darstellt.

Tab. 15: Analysiertes lösliches Protein der Arnold-Mischprobe nach ein- bzw. zweistufiger Fällung mit variierender Sättigung (35 %, 70 % und 80 %)

	TSN [g/100g]		
	35 % Sättigung	70 % Sättigung	80 % Sättigung
1-stufige Fällung	0,32 ± 0,02	0,59 ± 0,03	0,59 ± 0,04
2-stufige Fällung	0,28 ± 0,01	0,38 ± 0,01	-

± Standardabweichung

Die Trypsin-Inhibitoraktivität (TIA) wurde nur mittels einstufiger Fällung mit 35 %, 70 % und 80 % Sättigung der Probe bestimmt. Wie in Abb. 12 ersichtlich, wurden im Pellet niedrigere TIA-Werte als im Überstand festgestellt. Dies lässt vermuten, dass anhand der Extraktion mit Ammoniumsulfat die ATIs nicht ausreichend extrahiert wurden. Im Vergleich zur Extraktion mit NaCl wurden generell niedrigere Gehalte an löslichem Protein als auch niedrigere Aktivitäten im Extrakt der Ammoniumsulfat-Fällung ermittelt, weshalb die genannte Extraktion keine Verbesserung darstellt und nicht geeignet ist speziell ATIs zu extrahieren.

**Abb. 12:** Inhibierung der Pellets und der Überstände der Arnold-Mischprobe bei 70 % und 80 % Sättigung der Probe

Des Weiteren erfolgte die Extraktion mit einer Mischung aus Chloroform und Methanol (1:1). Die tetrameren ATIs sind löslich in Chloroform/Methanol-(CM)-Mischungen und werden daher auch als CM-Proteine bezeichnet. Die sogenannten CM-Proteine wurden als Hauptauslöser der Trypsin-Inhibierung in Weizen identifiziert (Call et al. 2019). Aufgrund dieser Erkenntnis lag das Augenmerk bei diesem Vorversuch bei der Verbesserung der Extraktion von

ATIs. Ziel war es ausschließlich Amylase-Trypsin-Inhibitoren zu extrahieren und somit den Einfluss anderer inhibitorischer Enzyme in der Probe zu vermindern. Es wurden verschiedene Durchführungen analysiert, wobei die Einwaage, das Volumen der eingedampften Probe und das Volumen in dem diese wieder gelöst/aufgenommen wurde als auch die Wahl des Lösungsmittels bei der Wiederaufnahme variierte. Die besten Ergebnisse konnten bei einer Einwaage von 5 g Probe in 20 mL Extraktionslösung und der Aufnahme in 5 mL 20 % iger Acetonitril-Lösung erzielt werden (4-fache Aufkonzentrierung der Proben). Nach erfolgter CM-Extraktion wurden alle sechs ausgewählten Mehlsorten in Bezug auf den Gehalt an löslichem Protein, den ATI-Gehalt und die Trypsin-Inhibitoraktivität untersucht (Tab. 16).

Tab. 16: Ermittelte Ergebnisse des löslichen Proteins, des ATI-Gehaltes und der Trypsin-Inhibitoraktivität der Mehle mittels CM-Extraktion

	Adesso	Alessio	Amicus	Arnold	Aurelius	Laurenzio
Gehalt lösl. Protein [g/100g TS]	0,21 ^d ± 0,01	0,18 ^c ± 0,01	0,20 ^{c,d} ± 0,01	0,12 ^b ± 0,01	0,13 ^b ± 0,01	0,09 ^a ± 0,01
ATI-Gehalt [g/100g TS]	1,18 ^e ± 0,05	0,74 ^c ± 0,02	0,91 ^d ± 0,00	0,37 ^b ± 0,00	0,40 ^b ± 0,01	0,30 ^a ± 0,00
TIA [mg/kg TS]	<BG ^a	<BG ^a	<BG ^a	3,3 ^b ± 2,8	5,2 ^c ± 3,9	4,6 ^c ± 6,2

± Standardabweichung; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Duncan (TSN- und ATI-Gehalt) und Tamhane (TIA) zwischen den Sorten

Die Ergebnisse des löslichen Proteins, welche mittels Bradford ermittelt wurden, lagen weit unterhalb der berechneten ATI-Gehalte. Die Amylase-Trypsin-Inhibitoren gehören, wie bereits beschrieben, zu der löslichen Albumin/Globulin-Fraktion, weshalb der analysierte ATI-Gehalt geringer als der Gehalt an löslichem Protein ausfallen sollte. Bei der Messung mittels Bradford, wurde jedoch beobachtet, dass bei der Verwendung von 20 % iger Acetonitril-Lösung ein Auslaufen der Probelösung aus den Pipettenspitzen stattfand. Dies konnte als mögliche Ursache der niedrigen löslichen Proteingehalte identifiziert werden. In Anbetracht der Ergebnisse der ATI-Gehalte konnten zwischen allen Sorten mit der Ausnahme von Arnold und Aurelius, signifikante Unterschiede erkannt werden. Wie auch bei der Extraktion mit Natriumchlorid (Tab. 18) lagen die Trypsin-Inhibitoraktivitäten der Sorten Adesso, Alessio und Amicus unterhalb der Bestimmungsgrenze von 15 mg/kg. Die Sorte Arnold unterschied sich mit einer

TIA von 3,3 mg/kg signifikant von den anderen Weizensorten. Die Proben Aurelius und Lorenzo wiesen die höchsten TIA-Werte auf. Die Trypsin-Inhibitoraktivität nach erfolgter Chloroform/Methanol-Extraktion war deutlich geringer im Vergleich zur Extraktion mit Natriumchlorid. In Tab. 17 ist eine negative hochsignifikante Korrelation zwischen dem Gehalt an Amylase-Trypsin-Inhibitoren und der biologischen Aktivität ersichtlich. Aufgrund der außergewöhnlichen Situation durch Covid19 und dem dadurch eingeschränkten Labor- und Forschungsbetrieb, konnten keine weiteren Analysen sowie Wiederholungen der Extraktionen durchgeführt werden. Die Charakterisierung der Rohstoffe und die Durchführung sowie die Analyse der Backversuche im Zuge des ID WHEAT Projektes hatten eine größere Bedeutung.

Tab. 17: Spearman-Korrelation der Trypsin-Inhibitoraktivität und des ATI-Gehaltes der CM-Extraktion

	TIA	ATI
TIA	1	-0,726** 0,001
	24	17
ATI	-0,726** 0,001	1
	17	18

6.1.2 Chymotrypsin-Inhibitor-Assay

Des Weiteren erfolgte die Literaturrecherche sowie die Planung eines modifizierten Chymotrypsin-Inhibitor-Assays. Das Ziel war es, diesen möglichst gut an den TIA-Assay nach Lisa Call et al. 2019 anzupassen. Erste Versuche lieferten jedoch keine stabilen Ergebnisse. Aufgrund von Zeitmangel durch Covid19 verursacht, konnten keine weiterführenden Analysen durchgeführt werden.

6.2 Charakterisierung der Rohstoffe

Die sechs Mehlsorten, welche als Rohstoffe für den zweiten Backversuch dienten, wurden anhand ausgewählter Methoden charakterisiert. Es erfolgte die Bestimmung der Trypsin-Inhibitoraktivität (TIA), des löslichen Proteins (TSN), der

Proteinverdaubarkeit, des Amylase-Trypsin-Inhibitor-(ATI)-, des Rohprotein- und des Glutengehaltes (graphische Darstellung siehe auch Anhang Abb. 22-26).

Tab. 18: Analytische Charakterisierung der Weizensorten (Ernte 2019)

	Adesso	Alessio	Amicus	Arnold	Aurelius	Laurenzio
Rohproteingehalt [g/100g TS]	13,7 ^d ± 0,01	13,2 ^b ± 0,08	12,1 ^a ± 0,06	14,7 ^e ± 0,07	13,1 ^b ± 0,04	13,5 ^c ± 0,06
Gehalt lösl. Protein [g/100g TS]	1,24 ^b ± 0,06	1,44 ^{a,b} ± 0,15	1,13 ^a ± 0,10	1,16 ^a ± 0,06	1,20 ^{a,b} ± 0,06	1,32 ^{a,b} ± 0,06
ATI-Gehalt [g/100g TS]	1,06 ^c ± 0,01	1,12 ^c ± 0,05	0,86 ^a ± 0,00	0,91 ^b ± 0,01	0,88 ^b ± 0,07	0,92 ^b ± 0,01
Glutengehalt [g/100g TS]	13,11 ^b ± 0,49	13,50 ^b ± 0,03	11,96 ^a ± 0,40	14,83 ^c ± 0,12	12,70 ^{a,b} ± 0,84	12,82 ^b ± 0,23
TIA [mg/kg TS]	<BG ^a	<BG ^a	<BG ^a	62 ^b ± 0,01	175 ^c ± 0,03	203 ^c ± 5,58
Verdaubarkeit [%]	88 ^a ± 0,7	90 ^b ± 1,2	91 ^b ± 1,1	91 ^b ± 0,8	92 ^c ± 0,5	90 ^b ± 0,7

± Standardabweichung; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Duncan und Tamhane (ATI-Gehalt) zwischen den Sorten

Anhand der Methode nach Dumas wurden die Rohproteingehalte, welche in Tab. 18 angeführt sind, ermittelt. Die mittleren Proteingehalte lagen innerhalb eines Bereichs von 12,1-14,7 g/100 g. Die Mehlsorte Arnold zeigte den höchsten Proteingehalt mit 14,7 g/100 g. Beim Vergleich der Gehalte der angebauten Weichweizensorten in Österreich durch das Bundesamt für Ernährungssicherheit (2020) wies die Sorte Arnold ebenso den höchsten Rohproteingehalt auf. Zudem lieferte Kapeller (2019) ähnliche Ergebnisse anhand der Rohproteinbestimmung der Weizenernte vom Jahr 2018. Der Rohproteingehalt der Sorte Arnold lag ebenfalls bei 14,7 g/100 g. Generell wies die Ernte vom Jahr 2019 leicht höhere Rohproteingehalte als die Vorjahresernte auf, mit der Ausnahme von der Sorte Alessio. Der geringste Proteingehalt (Ernte 2019: 12,1 g/100 g, Ernte 2018: 11,6 g/100 g) wurde in beiden Erntejahren bei der Sorte Amicus beobachtet. Da die Standortbedingungen bei allen Sorten gleich waren, konnte davon ausgegangen werden, dass der Unterschied von sortenspezifischen Faktoren abhängig war. Neben genetischen Differenzen beeinflussen höhere Temperaturen (Dupont et al. 2006) sowie eine vermehrte Düngung (Shewry et al. 2013) nachweislich den Gesamtproteingehalt. Die unterschiedlichen

Rohproteingehalte innerhalb einer Sorte der Ernte 2018 und der Ernte 2019 sind möglicherweise auf diverse Umwelteinflüsse zurückzuführen (Kramer 1979).

Um das lösliche Protein zu bestimmen wurde die Methode nach Bradford durchgeführt. Wie in Tab. 18 ersichtlich wurden Proteingehalte im Bereich von 1,13-1,44 g/100 g ermittelt. Die Sorte Alessio zeigte den höchsten mittleren Gehalt an löslichem Protein mit 1,44 g/100 g. Am wenigsten lösliches Protein wurde beim Weizen Amicus mit 1,13 g/100 g nachgewiesen. Die Albumin/Globulin-Fraktion sollte in etwa 20 % des Gesamtproteingehaltes darstellen. Der Anteil der ermittelten Werte lag jedoch nur bei etwa 9 %. Lisa Call et al. (2020) erzielte anhand der gleichen Methode höhere Gehalte der Weizenernte vom Jahr 2018. Die Gehalte des löslichen Proteins lagen innerhalb eines Bereiches von 1,57-2,47 g/100 g. Die Weizensorten Adesso und Lorenzo wiesen die höchsten Gehalte auf, die Sorte Aurelius hingegen den niedrigsten Gehalt an löslichem Protein. Eine Ursache dafür könnte eine ungenaue Messung gewesen sein, aber auch diverse Umwelteinflüsse könnten den Proteingehalt beeinflusst haben. Um Erkenntnisse darüber zu erlangen, müsste die Messung wiederholt werden.

Des Weiteren erfolgte die Bestimmung der ATI-Gehalte mittels RP-HPLC. Die ATI-Gehalte der Mehlproben lagen im Bereich von 0,86-1,12 g/100 g (Tab. 18). Den höchsten Gehalt an ATIs wies die Sorte Alessio mit 1,12 g/100 g auf. Ebenfalls hohe Werte wurden bei der Mehlprobe Adesso beobachtet. Das Mehl mit dem geringsten Gehalt war die Sorte Amicus mit einem Wert von 0,86 g/100 g. Der Vergleich der ATI-Gehalte der sechs Weizenmehlsorten wies signifikante Unterschiede auf. Die beiden Sorten Alessio und Adesso sowie die Sorten Arnold, Aurelius und Lorenzo unterschieden sich signifikant voneinander. Durch den geringen ATI-Gehalt der Mehlsorte Amicus unterschied sich diese signifikant von den anderen fünf Mehlproben. Kapeller et al. (2019) analysierte unter anderem die ATI-Gehalte der gleichen Sorten und ermittelte etwas höhere Gehalte, welche innerhalb eines Bereiches von 1,02-1,24 g/100 g lagen. Den höchsten Gehalt wies die Weizensorte Lorenzo auf, gefolgt von der Sorte Adesso. Der niedrigste ATI-Gehalt wurde ebenfalls bei der Sorte Amicus beobachtet. Besonders die ATIs gelangten ins Blickfeld wissenschaftlicher Untersuchungen, da vermutet wird, dass durch moderne Weizenzüchtung deren Gehalt erhöht wurde, jedoch liegen dafür keine wissenschaftlich belegten

Nachweise vor (Ryan, 1990; Junker et al., 2012). Kapeller (2019) kam ebenfalls zu dem Entschluss, dass hinsichtlich des Zulassungsjahres der untersuchten Weichweizensorten, keine Tendenz in Richtung höhere ATI-Gehalte bei modernen Sorten besteht. In der Studie von Boukid et al. (2017) konnte hingegen eine gering höhere Konzentration an CM3 Proteinen in modernen Sorten festgestellt werden. Geisslitz et al. (2018) verwies wiederum, dass gezielte Züchtungen zur Reduktion von unerwünschten Weizeninhaltsstoffen, wie ATIs, genutzt werden können. Jedoch könnte ein geringerer Anteil an ATIs, welchen eine große Bedeutung als natürlicher Pflanzenabwehrstoff zukommt, zur Erhöhung des Einsatzes von Pestiziden führen.

Im Zuge der Charakterisierung der Mehlsorten wurde ebenfalls der Glutengehalt mittels RP-HPLC bestimmt. Wie in Tab. 18 dargestellt, lagen die ermittelten Gehalte an Gluten innerhalb eines Bereiches von 12,0-14,8 g/100 g. Die Weizensorte Arnold zeigte den höchsten Gehalt an Gluten mit 14,8 g/100 g, gefolgt von der Sorte Alessio mit 13,5 g/100 g. Hingegen wurde der geringste Anteil an Gluten bei der Weizenprobe Amicus mit 12,0 g/ 100 g beobachtet. Die Sorten Adesso, Alessio, Aurelius und Laurentio lagen auf einem ähnlichen Niveau und wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Hingegen zeigten die Sorten Amicus und Aurelius deutlich geringere Werte. Die Sorte Arnold unterschied sich signifikant von den anderen Sorten. In Anbetracht der ermittelten Glutengehalte der Ernte 2018 von Kapeller (2019) konnten vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Die Gehalte erstrecken sich innerhalb eines größeren Bereiches von 10,6-15,7 g/100 g. Die Sorte Arnold wies ebenso den höchsten Gehalt auf, ebenfalls gefolgt von der Sorte Alessio. Zudem wurde der geringste Glutengehalt mit nur 10,6 g/100 g im Weizenmehl der Sorte Amicus nachgewiesen. Die Glutenproteine des Weizenmehles besitzen einen großen Einfluss auf die Verarbeitung von unterschiedlichen Lebensmitteln (Weegels et al. 1996) und machen etwa 63-90 % des Gesamtproteingehaltes aus (Emanuelson et al. 2003). Im Vergleich des Rohproteingehaltes mit dem Glutengehalt der sechs Weizenmehlsorten unterschieden sich die ermittelten Werte der jeweiligen Sorten kaum. Dies kann auf die Messunsicherheit der RP-HPLC Methode zurückzuführen sein.

Um die Trypsin-Inhibitoraktivität in den sechs Weizensorten zu ermitteln, wurde der TIA-Assay nach Call et al. (2019) durchgeführt. Die Ergebnisse in mg/kg sind

in Tab. 18 zusammengefasst. Innerhalb der sechs Sorten variierte die Trypsin-Inhibitoraktivität von einem Bereich von <15-203 mg/kg. In Tab. 18 ist ersichtlich, dass die Sorte *Laurencio* den höchsten mittleren TIA-Wert mit 203 mg/kg aufwies, gefolgt von der Sorte *Aurelius* mit einer Trypsin-Inhibitoraktivität von 175 mg/kg. Die *Arnold* Mehlprobe zeigte mit 62 mg/kg nur etwa ein Drittel der Aktivität der bereits genannten Sorten. Die TIA-Werte der Mehle *Adesso*, *Alessio* und *Amicus* lagen unterhalb der Bestimmungsgrenze von 15 mg/kg. Die Sorte *Arnold* unterschied sich signifikant von den restlichen Mehlproben. Zwischen den beiden Sorten *Aurelius* und *Laurencio* bestand hingegen kein signifikanter Unterschied bezüglich der TIA. Wissenschaftliche Daten in Bezug auf die Trypsin-Inhibitoraktivität in Weizen sind eher mangelhaft. In der Studie von Call et al. (2020) wurden unter anderem die sechs Mehle des Erntejahres 2018 anhand ihrer Trypsin-Inhibitoraktivität analysiert. Den höchsten TIA-Wert wies ebenfalls die Sorte *Laurencio* mit 216 mg/kg auf, gefolgt von den Sorten *Aurelius* mit 167 mg/kg und *Arnold* mit 84,7 mg/kg. Die Qualitätsweizen *Laurencio* und *Arnold* der Ernte 2018 zeigten höhere Aktivitäten, was auf Temperaturunterschiede sowie die Menge des Niederschlags der beiden Erntejahre zurückzuführen ist. Bei den Unterschieden der TIA innerhalb der beiden Ernten (2018 und 2019) wurde von einem Sorteneffekt ausgegangen, da die Standortbedingungen der jeweiligen Ernten bei allen Sorten die gleichen waren.

Außerdem wurden Versuche in Bezug auf die Proteinverdaubarkeit von Mehl und deren Produkte durchgeführt. Die Verdaubarkeit der sechs ausgewählten Mehle betrug zwischen 88-92 %, wie in Tab. 18 erkenntlich. Das Mehl *Aurelius* wies die beste Verdaulichkeit mit 92% der getesteten Mehlsorten auf. Es folgten mit sinkender Proteinverdaubarkeit die Sorten *Arnold*, *Amicus*, *Alessio* und *Laurencio*. Die schlechteste Verdaubarkeit wurde bei der Sorte *Adesso* mit einem Wert von 88 % beobachtet. In Anbetracht der Sorten *Alessio*, *Amicus*, *Arnold* und *Laurencio* konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Die Sorten *Adesso* und *Aurelius* wurden jeweils in eine homogene Gruppe eingeteilt und unterschieden sich somit signifikant von den anderen Weizensorten. Abdel-Aal & Hucl (2002) ermittelten eine mittlere Proteinverdaubarkeit von Weizenmehl von 86%. Eine weitere Untersuchung der Proteinverdaulichkeit an Ratten verwies auf eine Verdaubarkeit von 96 % von Weizen (Eggum et al. 1981). Die erhaltenen

Ergebnisse decken sich mit mehreren wissenschaftlichen Studien, welche im Zuge der Verdaubarkeit von Weizen durchgeführt wurden.

Um einen Zusammenhang zwischen dem TSN-Gehalt, dem ATI-Gehalt, dem Rohprotein, der Proteinverdaubarkeit und dem Glutengehalt zu ermitteln, wurde eine Korrelation nach Pearson durchgeführt.

Tab. 19: Pearson-Korrelation der proteinbezogenen Daten der ausgewählten Mehlsorten

	TSN	ATI	Rohprotein	Verdau	Gluten
TSN	1	0,500*	-0,053	-0,546**	-0,242
		0,035	0,834	0,006	0,333
	24	18	18	24	18
ATI	0,500*	1	0,317	-0,415	0,228
	0,035		0,200	0,087	0,363
	18	18	18	18	18
Rohprotein	-0,053	0,317	1	-0,391	0,853**
	0,834	0,200		0,109	0,000
	18	18	18	18	18
Verdau	-0,546**	-0,415	-0,391	1	-0,165
	0,006	0,087	0,109		0,512
	24	18	18	36	18
Gluten	-0,242	0,228	0,853**	-0,165	1
	0,333	0,363	0,000	0,512	
	18	18	18	18	18

Wie in der Tab. 19 ersichtlich, lag eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Gehalt an ATIs und dem löslichen Protein vor. Hingegen handelte es sich zwischen dem löslichen Protein und der Proteinverdaubarkeit um eine hochsignifikante negative Korrelation, da die Korrelation auf dem Niveau von 0,05 signifikant war. Die höchste Signifikanz mit einem Wert von 0,853 konnte zwischen den Ergebnissen des Rohproteins und dem Glutengehalt ermittelt werden. Des Weiteren wurde eine Spearman-Korrelation für die nicht normalverteilten Werte des TIA-Assays mit den Messwerten der restlichen Methoden durchgeführt. Es konnte jedoch keine statistisch signifikante Korrelation ermittelt werden.

6.3 Backversuche

6.3.1 Backversuch mit dem W700 Rösselmehl

Im Rahmen der Backversuche 1 wurden bei den beteiligten Bäckereien (Haubis und Ströck) Versuche im größeren Maßstab unter Verwendung von Sauerteig durchgeführt. Um den Einfluss der Prozessparameter (Vorsauermenge, Fermentationszeit) zu ermitteln, wurde die mittels W700 Rösselmehl hergestellten Teiglinge auf ihr lösliches Protein, den Amylase-Trypsin-Inhibitor-(ATI)-Gehalt sowie auf ihre Trypsin-Inhibitoraktivität (TIA) analysiert. Die Backversuche 1 erfolgten alle mit dem Mehl der Pfahnl Mühle, um weitere Einflussfaktoren durch die Verwendung unterschiedlicher Mehle zu eliminieren.

Die Quantifizierung des löslichen Proteins erfolgte anhand der Methode nach Bradford. Die Gehalte an löslichem Protein des Backversuches 1 sind in Abb. 13 graphisch dargestellt.

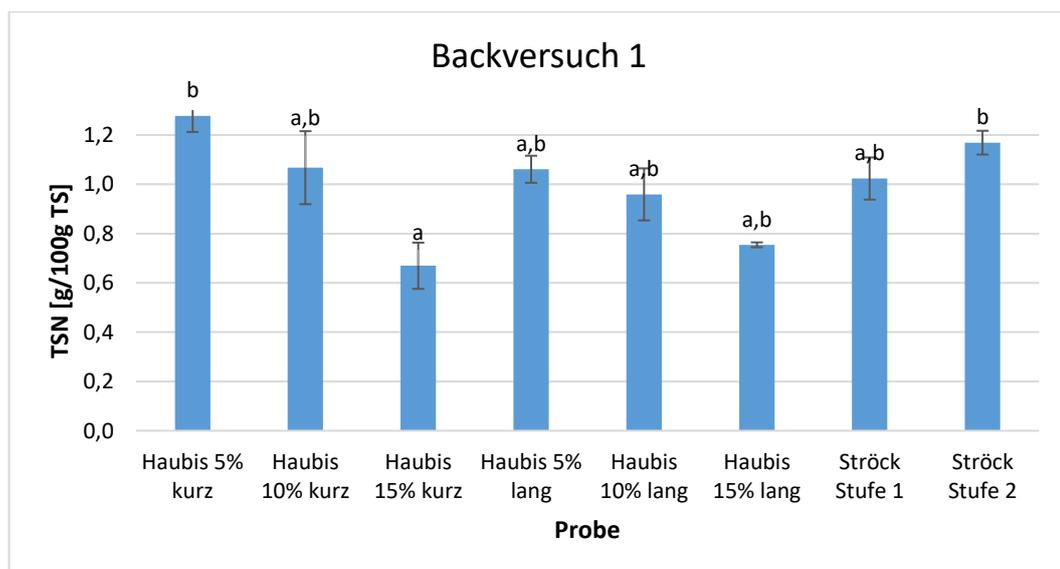


Abb. 13: Löslicher Proteingehalt der Teiglinge von Backversuch 1 nach variierender Vorsäuerung und unterschiedlicher Dauer der Teigführung in g Protein/100 g Probe TS; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Tamhane

In Anbetracht des löslichen Proteins der Backversuche 1 erstreckten sich die Gehalte innerhalb eines Bereiches von 0,7-1,3 g/100 g. Den höchsten Gehalt zeigte der Haubis Teigling mit 5 % Vorsauermenge und kurzer Teigführung. Der geringste Gehalt an löslichem Protein des Vorversuches mit 0,7 g/100g war ebenfalls bei den Haubis Teiglingen mit kurzer Teigführung zu beobachten,

jedoch mit 15 % Vorsauermenge. Die Haubis Teiglinge, welche einer längeren Fermentationsdauer unterzogen wurden, zeigten generell ein geringeres lösliches Protein (geringeren Bereich). Wie auch bei der kurzen Teigführung der Haubis Teiglinge, war ebenso bei langer Teigführung eine Abnahme des Gehaltes an löslichem Protein mit steigender Vorsauermenge ersichtlich. Beim Backversuch 1 von Ströck zeigte der Teigling mit dem zweistufigen geführten Vorsauer-Teig (1,2 g/100g) höhere Werte als der einstufig geführte Teigling mit einem Gehalt von 1,0 g/100g. Wie im Diagramm (Abb. 11) deutlich erkennbar, führte eine gesteigerte Vorsauermenge zu einem höheren Abbau des löslichen Gesamtstickstoffes der analysierten Teiglinge. Durch die intensivere Säuerung des Teiges, kam es während der Gärung zu einem graduellen Abbau in Abhängigkeit vom jeweiligen Säuregrad. Längere Teigführungszeiten verstärkten diesen Effekt nochmals. Im Vergleich der Teiglinge mit 5 % und 15 % Vorsauermenge konnte eine Abnahme des Proteingehaltes von bis zu 52 % beobachtet werden. Außerdem erzielte Ströck mit einem einstufig-geführten Vorsauer einen höheren Abbau im Vergleich zur zweistufigen Variante.

Im Zuge des Backversuches 1 wurden zudem die ATI-Gehalte der erzeugten Teiglinge mittels RP-HPLC untersucht und in Abb. 14 graphisch dargestellt.

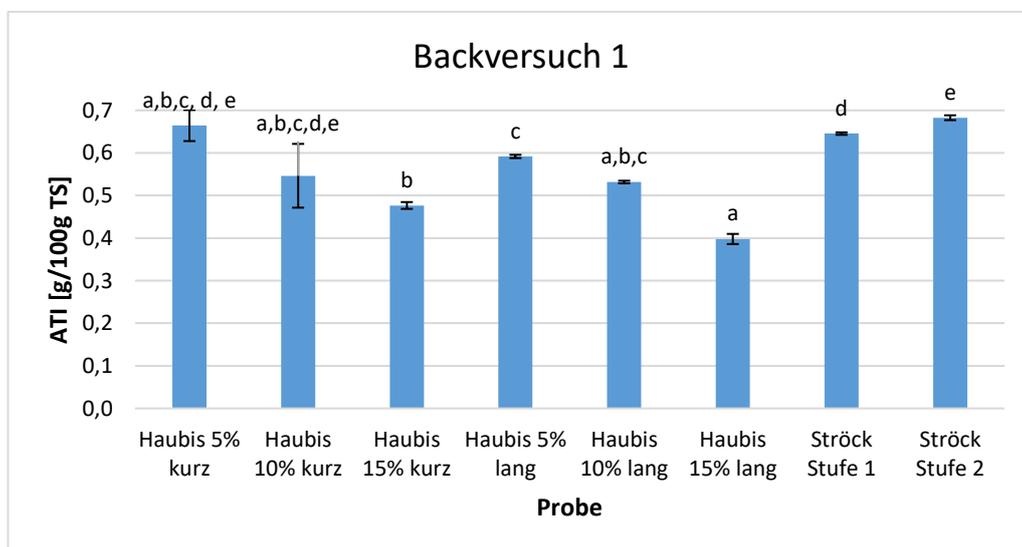


Abb. 14: ATI-Gehalt der Teiglinge von Backversuch 1 nach variierender Vorsäuerung und unterschiedlicher Dauer der Teigführung in g Protein/100 g Probe TS; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Tamhane

Den höchsten ATI-Gehalt wies der zweistufig geführte Vorsauer-Teigling von Ströck mit 0,68 g/100g auf. Der einstufig geführte Ströck Teigling unterschied sich signifikant anhand des ermittelten Gehaltes von 0,65 g/100 g. Wie bereits bei der Methode nach Bradford beobachtet wurde, nehmen ebenfalls die ATI-Konzentrationen der Haubis Teiglinge mit steigender Vorsauermenge als auch mit steigender Fermentationsdauer ab. Die Haubis Teiglinge der kurzen Teigführung zeigten Gehalte im Bereich von 0,66-0,48 g/100 g. Im Vergleich dazu erstreckten sich die ATI-Mengen der Haubis Teiglinge der langen Teigführung von 0,59-0,40 g/100 g. Sie wiesen generell niedrigere ATI-Mengen auf und zeigten ebenso eine Abnahme der ATI-Konzentrationen mit erhöhter Vorsauermenge auf. Der geringste Gehalt an ATIs wurde demnach im Teigling von Haubis mit 15 % Vorsauermenge und langer Fermentationsdauer nachgewiesen. In Anbetracht der Untersuchung der ATI-Gehalte der Teiglinge von Backversuch 1 konnten deutlich geringere ATI-Konzentrationen mit einer gesteigerten Vorsauermenge festgestellt werden. Die ATIs wurden durch die Ansäuerung des Teiges während der Fermentation in Abhängigkeit des Säuregrades graduell abgebaut. Im Vergleich zum W700 Rösselmehl (ATI-Gehalt von $1,51 \pm 0,28$ g/100 g) war ein Abbau des ATI-Gehaltes der Teiglinge von bis zu 80 % erzielt worden. Außerdem erfolgte ein verbesserter Abbau beim zweistufig-geführten Vorsauer als bei der einstufigen Variante des Ströck Vorversuches. Der ATI-Gehalt müsse um 90 % reduziert werden, um Symptome der Weizenunverträglichkeit einzudämmen (Statement Detlef Schuppan, MD, PhD). Um genaue Aussagen über den ATI-Gehalt des fertigen Gebäcks zu treffen, müsste hierbei zusätzlich der Gehalt der erhitzten Gebäckproben bestimmt werden.

Die Trypsin-Inhibierungsaktivität wurde ebenfalls für die Teiglinge des Backversuches 1 ermittelt und in Abb. 15 anhand eines Balkendiagrammes dargestellt.

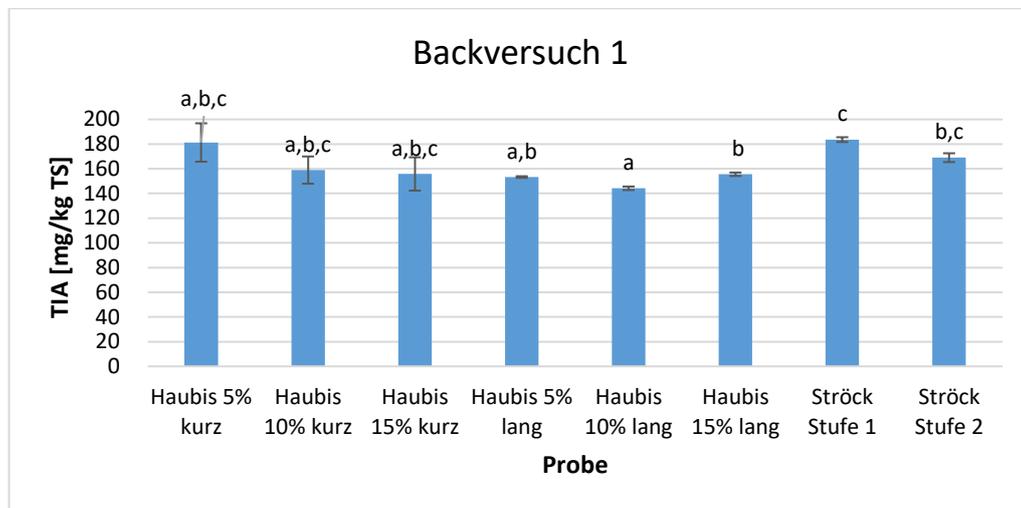


Abb. 15: Trypsin-Inhibierungsaktivität der Teiglinge nach variierender Vorsäuerung und unterschiedlicher Dauer der Teigführung in mg/kg TS; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Tamhane

Die ermittelten TIA-Werte des Backversuches 1 lagen innerhalb eines Bereiches von 144-184 mg/kg. Den höchsten Wert wies der einstufig geführte Vorsauer-Teigling von Ströck auf. Der zweistufig geführte Ströck-Teigling zeigte vergleichsweise eine Aktivität von 169 mg/kg. Die Aktivitäten der Teiglinge von Haubis der kurzen Teigführung erstreckten sich innerhalb eines Bereiches von 156-181 mg/kg, wobei mit gesteigerter Vorsauermenge die TIA sank. Im Vergleich zeigten die Haubis Teiglinge der lange Teigführung niedrigere Aktivitäten. Zudem sank deren Aktivität bei Erhöhung der Vorsauermenge des Teiglings von 5 % auf 10 % und stieg wiederum bei einer Vorsauermenge von 15 %. Die niedrigste TIA konnte im Teigling von Haubis bei langer Teigführung und bei 10% Vorsauer festgestellt werden. Während durch die Anwendung der Sauerteigtechnologie das lösliche Protein und die ATI-Konzentration sanken, stieg die Trypsin-Inhibitoraktivität der analysierten Teiglinge des Vorversuches. Die Bestimmung der TIA des W700 Rösselmehls zeigte eine Aktivität von 118 mg/kg und lag damit unter allen ermittelten Aktivitäten der Teiglinge des Backversuches 1. Die TIA erhöhte sich durch die Sauerteigführung um etwa 18-36 %. Des Weiteren konnte im Zuge des Vorversuches in den Gebäckproben keine Inhibierung von Trypsin mehr nachgewiesen werden, welche

überprüfungsmäßig analysiert wurden. Dies wurde auf die zusätzliche Erhitzung des Gebäcks zurückgeführt. Dieses Ergebnis wurde durch einen Modellversuch der HTLLMT Wels bestätigt. Der Modellversuch beruhte auf der Erhitzung einer trockenen Mehlprobe und einer Mehl/Salzwasser-Suspension auf 100°C. Das Mehl verlor nur geringfügig an Trypsin-Inhibierungsaktivität, während in der Suspension keine Aktivität mehr beobachtet werden konnte (Schuster & Plöchl 2020). Es wird jedoch davon ausgegangen, dass ATIs oder deren Abbauprodukte weiterhin für Entzündungen im Darm sorgen können (Call 2020).

In Abb. 16 und Tab. 20 ist die statistische Auswertung der TIA- und ATI-Ergebnisse ersichtlich, die den Einfluss der Vorsauermenge und der Fermentationsdauer auf die ATI-Konzentration sowie auf die Trypsin-Inhibitoraktivität darstellt.

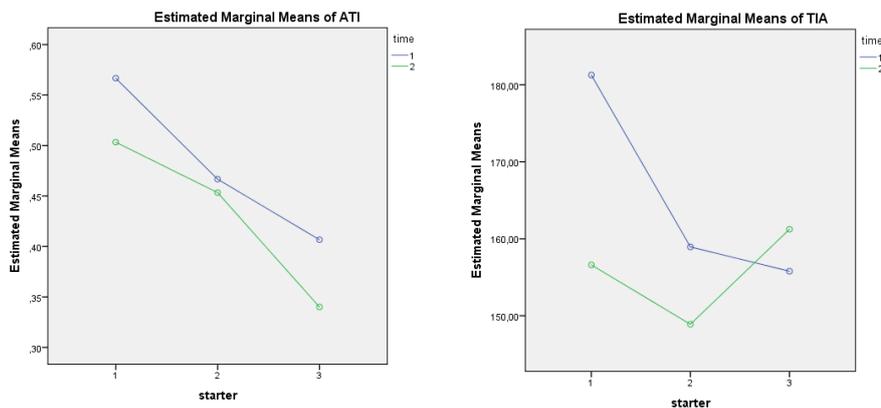


Abb. 16: ATI-Gehalt und TIA in Abhängigkeit von Vorsauermenge (,starter‘) und Teigführungszeit (,time‘) (Call 2020)

Tab. 20: Statistische Auswertung der Rezeptureinflüsse (Backversuch 1) (Call 2020)

	Vorsauermenge		Teigführungszeit	
	p-Wert	partielles Eta ²	p-Wert	partielles Eta ²
ATI-Gehalt	0,000	0,874	0,006	0,475
TIA	0,083	0,241	0,080	0,161

p-Wert > 0,05 werden als signifikant betrachtet; partielles ETA² gibt an, wie viel der Varianz der abhängigen Variablen (ATI-Gehalt, TIA) prozentual durch die unabhängige Variable (Vorsauermenge, Teigführungszeit) erklärt wird

Je größer das partielle Eta², desto größer auch der Einfluss dieses Parameters auf den ATI-Gehalt sowie die TIA. Die Vorsauermenge konnte als größter Einflussfaktor auf den Abbau von ATIs im Teigling identifiziert werden.

Die Sauerteigtechnologie beeinflusst durch die Ansäuerung, die Proteolyse und die Aktivierung einer Reihe an Enzymen, aber auch die Synthese von mikrobiologischen Metaboliten die Teig- und Backwarenmatrix sowie die funktionelle/nutritive Qualität der Lebensmittel (Gobetti et al. 2014). Der Proteinabbau durch die Sauerführung ist nicht nur auf die mikrobiologische Aktivität von Proteasen zurückzuführen, sondern hauptsächlich auf die Senkung des pH-Wertes auf ein Optimum für die Aktivität von Weizen-Endoproteasen. (Gänzle et al. 2008; Lopenen et al. 2009). Die chemische Ansäuerung zeigte sich als weniger effektiv als der mikrobiologische Abbau (Di Cagno et al. 2004).

6.3.2 Backversuch mit reinsortigen Mehlen

Aus den Ergebnissen des ersten Backversuches wurde für jede Bäckerei eine Rezeptur entwickelt und im zweiten Backversuch mit den ausgewählten Mehlen (Adesso, Alessio, Amicus, Arnold, Aurelius, Lorenzo) umgesetzt. Die Bäckerei Haubis arbeitete mit 10 % Vorsauermenge, einstufiger Vorsäuerung und einer Teigführungszeit von 16 Stunden, Ströck hingegen mit 10 % Vorsauermenge, einer zweistufigen Vorsäuerung und einer Teigführungszeit von 18 Stunden.

Zur Bestimmung des löslichen Proteins mittels Bradford, des ATI-Gehaltes mittels RP-HPLC und der Trypsin-Inhibitoraktivität mittels TIA-Assays wurden im Zuge des zweiten Backversuches die Teiglinge der Bäckereien Haubis und Ströck herangezogen. Die Herstellung der Teiglinge basierte auf die Verwendung der sechs reinsortigen Mehle. Zur Ermittlung des Glutengehaltes und der Proteinverdaubarkeit wurden die Gebäcke der Bäckereien Haubis und Ströck sowie die Gebäcke des AGES Semmelbackversuches analysiert. Zur Herstellung der Gebäcke wurden ebenso ausschließlich die sechs reinsortigen Mehle als Rohstoffe verwendet. Anschließend wurden die erhaltenen Ergebnisse der Teiglinge und der Gebäcke mit den Daten des jeweilig reinsortigen Mehles verglichen, welche durch die Charakterisierung der Mehle (Kapitel 6.2.) ermittelt wurden, und somit der Einfluss der Sauerteigführung beschrieben.

In Abb. 17 ist das lösliche Protein der analysierten Teiglinge der Bäckereien Haubis und Ströck ersichtlich.

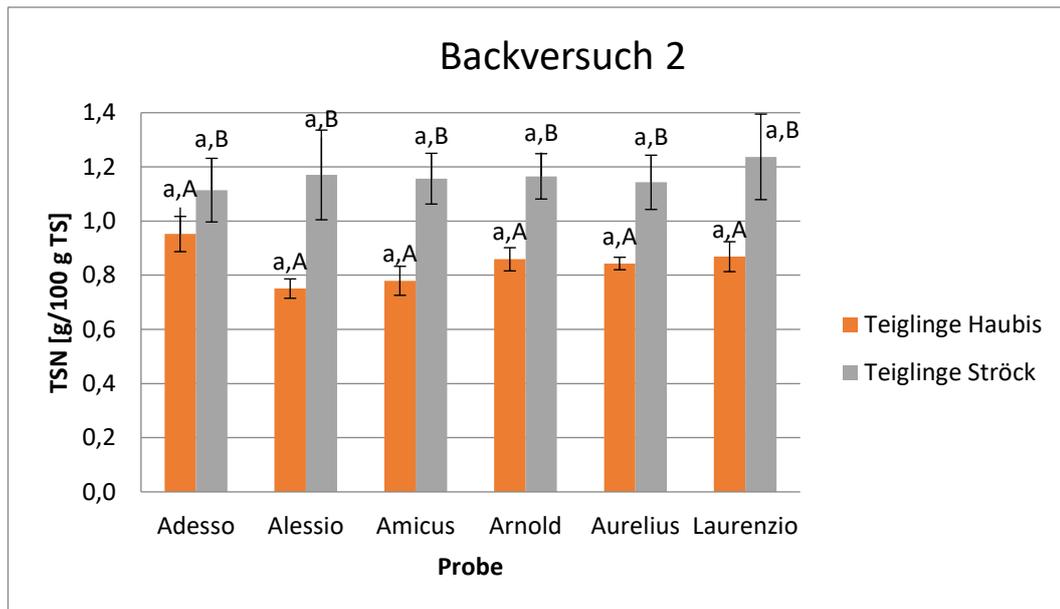


Abb. 17 Löslicher Proteingehalt der Teiglinge von den Bäckereien Haubis und Ströck von Backversuch 2 in g Protein/100 g Probe TS; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf die Sorte nach Duncan; Großbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf den Hersteller nach Tamhane

Die Gehalte an löslichem Protein (TSN) der Mehle wurden bereits in Kapitel 6.2. (Tab. 18) beschrieben. Während die Gehalte der Teiglinge von Ströck annähernd gleich hoch oder höher als die der Mehle waren, wiesen die Teiglinge von Haubis um 26-47 % niedrigere Gehalte als die der Mehle auf. Bereits bei den Vorversuchen zeigte der zweistufig-geführte Vorsauer Teigling von Ströck höhere Werte als bei einstufigem Vorsauer, was auf einen besseren Abbau der Glutenproteine deutete. Die löslichen Proteingehalte der Teiglinge der Bäckerei Ströck lagen innerhalb eines Bereiches von 1,11-1,24 g/100 g, wohingegen bei den Teiglingen der Bäckerei Haubis Gehalte von 0,75-0,95 g/100 g ermittelt wurden. Wie im Diagramm ersichtlich, konnte kein signifikanter Unterschied der Sorten beobachtet werden. Die Teiglinge von Ströck und Haubis unterschieden sich hingegen signifikant. Bei den Teiglingen der Bäckerei Ströck war zu beachten, dass die relative Standardabweichung bis zu doppelt so hoch wie bei den Haubis Teiglingen war. Bei den Sorten Amicus und Arnold konnte ein höherer Gehalt an TSN als bei den Mehlen beobachtet werden. Coda et al. (2012) und Rizzello et al. (2007) beschrieben in ihren Studien, dass nach der Fermentation mit ausgewählten Sauerteig-Milchsäurebakterien und Hefen sich

das typische Verhältnis der Fraktionen der Weizenproteine veränderte. Aufgrund der Proteolyse von Gliadinen und Gluteninen steigt der Stickstoffgehalt der Albumin/Globulin-Fraktion, da die gebildeten Fragmente in Wasser/Salz-Extrakten löslich sind. Des Weiteren verbessert die Proteolyse in einem limitierten Ausmaß den Geschmack des Gebäcks, da Aminosäuren und Peptide als Präkursor für flüchtige Geschmackskomponenten gelten (Gassenmeier & Schieberle 1995; Thiele et al. 2002).

Des Weiteren wurde der Einfluss der Sauerteigführung auf den ATI-Gehalt ermittelt (Abb. 18).

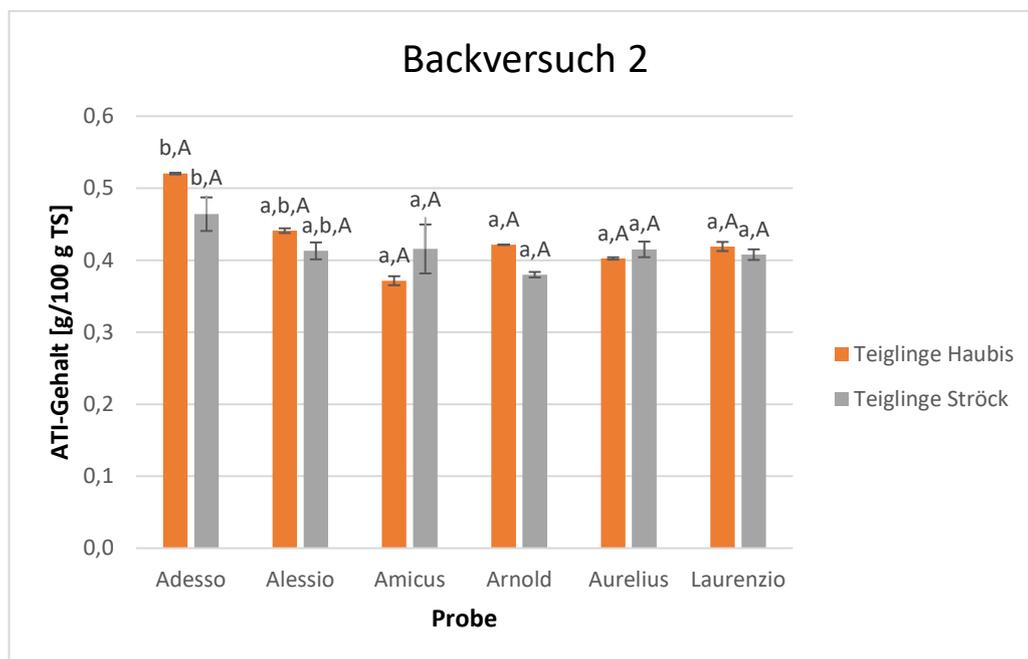


Abb. 18: ATI-Gehalt der Teiglinge der Bäckereien Haubis und Ströck von Backversuch 2 in g Protein/100 g Probe TS, Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf die Sorte nach Tamhane, Großbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf den Hersteller nach Duncan

Die ATI-Gehalte der sechs Mehlsorten können aus Tab. 18 entnommen werden. In Anbetracht der Ergebnisse war deutlich zu sehen, dass durch die Sauerteigführung ein eindeutiger Abbau an Amylase-Trypsin-Inhibitoren (ATIs) zu beobachten war. Die Gehalte der Teiglinge erstreckten sich innerhalb eines Bereiches von 0,37-0,52 g/100 g (Vergleich Mehl 0,86-1,12 g/100 g). Es konnte eine Reduktion der ATI-Mengen von etwa 50-60 % erzielt werden. Zwischen den Sorten waren kaum Unterschiede erkennbar. Die Teiglinge der beiden Bäckereien Haubis und Ströck zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Ähnliche Ergebnisse wurden anhand der Studie von Fraberger et al. (2020) ermittelt, wobei mit einzelnen Milchsäurebakterien ein ATI-Abbau von 52-85 % festgestellt wurde. Seitdem Amylase-Trypsin-Inhibitoren als pro-inflammatorische Proteine in Weizen identifiziert wurden und bekannt ist, dass diese sich negativ auf die menschliche Gesundheit auswirken können, ist die Erforschung der ATIs von wissenschaftlichem Interesse. Huang et al. (2020) untersuchten den Einfluss der Sauerteigführung sowie des Hefe-fermentierten Brotes auf den Abbau sowie die Aktivität der sogenannten ATIs. Es wurde aufgezeigt, dass während der Sauerteigfermentation mit Multispezies-Kulturen bei einem pH-Wert unter 4 die ATI-Tetramere durch die Aktivierung der Aspartatproteasen abgebaut werden und nur mehr weniger als 30 % der ATIs als Tetramere vorliegen. Hingegen bleiben die ATI-Tetramere bei der Hefe-Fermentation intakt. Während nach der Sauerteigfermentation die Amylase-Inhibitoraktivität sinkt, steigt die Konzentration an freien Thiol-Gruppen. Im Vergleich von unfermentierten Weizen, konnte durch die Sauerteigtechnologie ebenfalls die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen verringert werden. Die gewonnenen Daten lassen darauf schließen, dass durch die Anwendung der Sauerteigtechnologie ATIs abgebaut werden und die Aktivität vermindert werden kann und daher eine Strategie zur Verbesserung der Produkte hinsichtlich ihrer Verträglichkeit für Menschen mit Weizenunverträglichkeiten darstellt. Der Abbau von Albuminen, wie ATIs, in Sauerteigen wurde davor noch nicht erforscht, da der Fokus der meisten Studien auf dem Abbau der Glutenproteine während der Fermentation lag.

Die Ermittlung des Glutenabbaus in den analysierten Gebäckproben ist in Abb. 19 veranschaulicht.

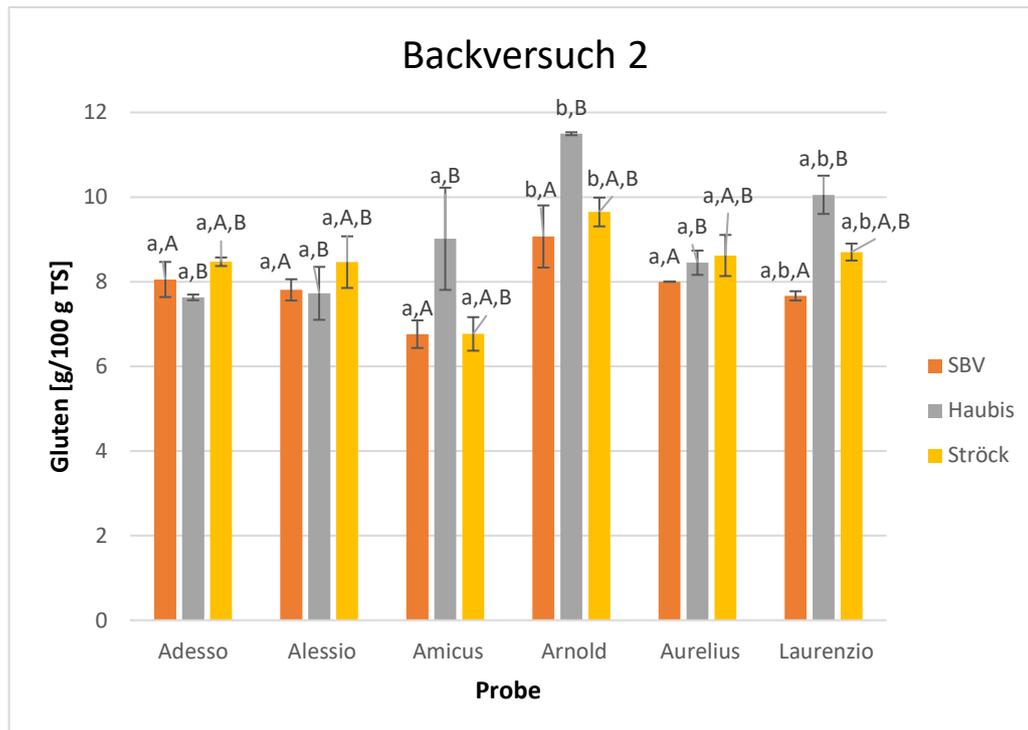


Abb. 19: Gehalt an Gluten im Gebäck des Semmelbackversuches der AGES sowie der Bäckereien Haubis und Ströck in g Gluten/100 g Probe TS; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf die Sorte nach Tamhane; Großbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf den Hersteller nach Tamhane

Im Zuge der Arbeit wurde ein Abbau der Glutenproteine mittels Sauerteigführung als auch durch Hefe-fermentiertes Gebäck beobachtet. Bei den Hefe-fermentierten Gebäcken des Semmelbackversuches konnte ein Abbau an Gluten von 37-44 % ermittelt werden. Der höchste Abbau wurde bei der Sorte Amicus erzielt. Im Vergleich dazu zeigten die Sauerteiggebäcke der Bäckereien Haubis und Ströck eine Verminderung des Glutens von 22-43 % und 32-43 %. Bei dem Gebäck von Haubis konnten Schwankungen des Glutenabbaus zwischen den sechs Sorten von bis zu 21 % ermittelt werden, der höchste Abbau mit über 40 % wurde innerhalb der Sorten Adesso und Alessio verzeichnet. Der Unterschied des Abbaus an Gluten zwischen den reinsortigen Gebäcken von Ströck war geringer. Die höchste Abnahme des Glutengehaltes wurde wie auch bei der Hefe-fermentierten Semmel bei der Sorte Amicus berechnet. Die teilweise hohen Standardabweichungen wurden auf die Verwendung des Tensides SDS zurückgeführt, welches zum Aufschäumen der Lösung führte und beim

Überführen sowie Auffüllen der Proben Probleme bereitete. Im Allgemeinen wiesen die Hefe-fermentierten Gebäcke einen niedrigeren Glutengehalt als die Sauerteiggebäcke auf. Signifikante Unterschiede wurden zwischen allen Sauerteiggebäcken der Bäckerei Haubis und den Hefe-fermentiertem Gebäcken festgestellt werden. In der Studie von Rizello et al. (2019) konnte kein signifikanter Unterschied des Glutengehaltes zwischen dem Hefe-fermentiertem Brot und dem Sauerteigbrot mit Hefe festgestellt werden. Der beobachtete Glutenabbau war auf die stattfindende Proteolyse zurückzuführen. Die Proteolyse erfolgte durch die mikrobielle Ansäuerung des Teiges auf das pH-Optimum der Aspartatproteasen, welche eine Schlüsselrolle in Bezug auf die Proteindegradation spielen. Des Weiteren führen spezifische Milchsäurebakterienstämme zur sekundären Proteolyse von Peptiden, wodurch es zur Akkumulation von Aminosäuren im Teig kommt, während Hefen Aminosäuren im Zuge des Wachstums verbrauchen. Durch die Ansäuerung sowie die Reduktion von Disulfidbrückenbindungen in Glutenproteinen erhöht sich die Löslichkeit der Glutenproteine und daher auch deren proteolytischer Abbau (Gänzle et al. 2008, Fraberger et al. 2020). Die Gliadine gelten als die Fraktion, welche am anfälligsten gegenüber der Proteolyse ist. Es wurde eine komplette Hydrolyse speziell für Polypeptide, die einen isoelektrischen Punkt kleiner als 8,5 besitzen, beschrieben. (De Anglis et al. 2010). Im Vergleich zu den Gliadinen besitzen die Glutenine eine höhere Resistenz gegenüber der Proteolyse (Di Cagno et al. 2020).

Im Zuge der Arbeit erfolgte ebenfalls die Bestimmung der Trypsin-Inhibitoraktivität (TIA) der Sorten Arnold, Aurelius und Laurentio der Sauerteiggeführten Teiglinge der Bäckereien Haubis und Ströck (Abb. 20). Die restlichen Sorten der Teiglinge wurden nicht analysiert, da dessen TIA im Mehl unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen (Tab. 18).

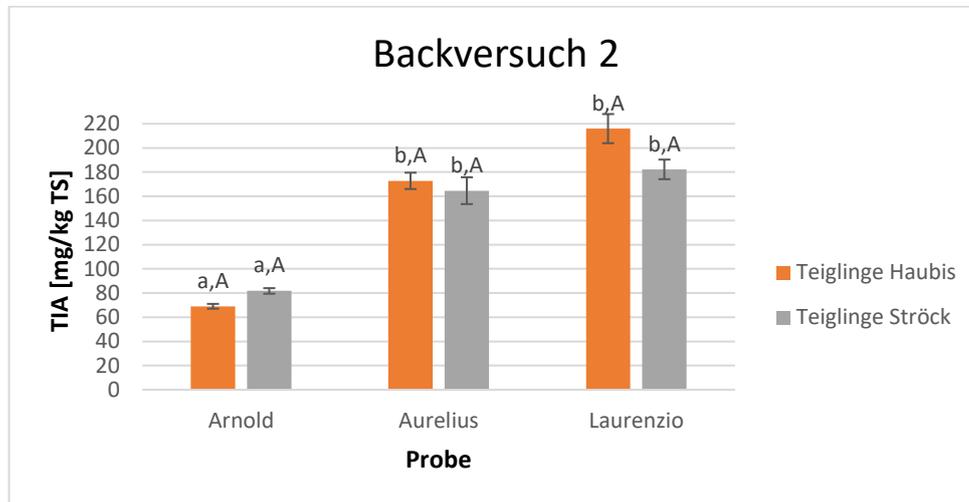


Abb. 20: Trypsin-Inhibierungsaktivität der reinsortigen Teiglinge der Bäckereien Haubis und Ströck in mg/kg TS; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf die Sorte nach Tamhane, Großbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf den Hersteller nach Duncan

Bei der Weizensorte Arnold war zu beobachten, dass die Teiglinge von Haubis und Ströck um bis zu 10 % bzw. 24 % höhere Aktivitäten als das reinsortige Mehl (Tab. 18) aufwiesen. In Anbetracht der Sorte Aurelius zeigten die Sauerteiggeführten Teiglinge ebenso höhere Aktivitäten der Teigling. Bei der Sorte Laurentio wurde beim Teigling der Bäckerei Haubis eine um bis zu 6 % höhere Aktivität ermittelt, während der Teigling der Bäckerei Ströck eine bis zu 10 % geringere Trypsin-Inhibitoraktivität aufwies. Zwischen den beiden Sauerteigen konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Jedoch unterschied sich der Teigling der Sorte Arnold, wie auch bei den analysierten Mehlproben, signifikant von den Sorten Aurelius und Laurentio. Hier wurde wie auch bereits bei der Charakterisierung der Mehle von einem Sorteneffekt ausgegangen, da Standorteinflüsse vernachlässigt werden konnten. Laut Huang et al. (2020) konnte eine niedrigere β -Amylase Inhibierung durch die Sauerteigführung festgestellt werden, jedoch liegen keine Studien in Bezug auf die Trypsin-Inhibitoraktivität in Sauerteiggebäck- bzw. -teiglingen vor.

Ebenfalls erfolgte die Ermittlung der Proteinverdaubarkeit der Gebäcke von Haubis und Ströck und des Semmelbackversuches (SBV) der AGES.

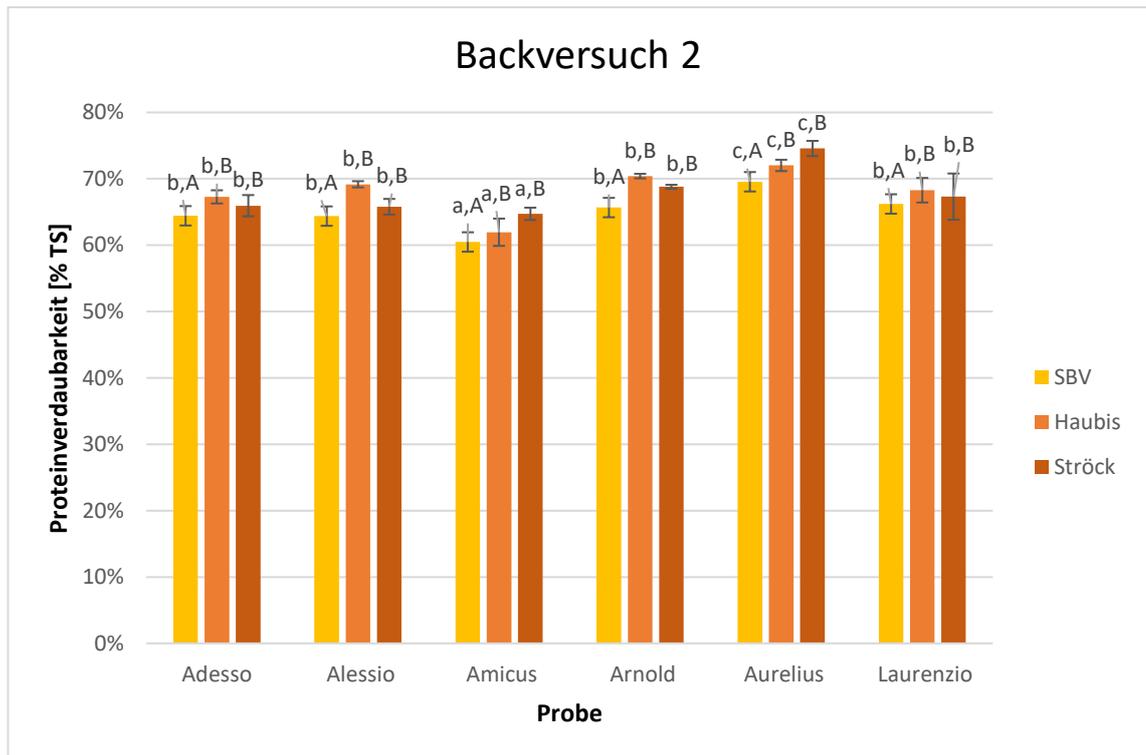


Abb. 21: Proteinverdaulichkeit in % TS der Gebäcke des Semmelbackversuches der AGES und der Bäckereien Haubis und Ströck; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf die Sorte nach Duncan; Großbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen bezogen auf den Hersteller nach Duncan

Wie in Abb. 21 gut erkennbar, zeigten die Gebäcke des Semmelbackversuches der AGES im Vergleich zu den Sauerteiggebäcken eine geringere Proteinverdaubarkeit. Die Werte der Verdaubarkeit der Mehle sind aus Tab. 18 zu entnehmen. Die Gebäcke der Bäckereien Haubis und Ströck wiesen Verdaubarkeiten im Bereich von 62-72 % sowie 65-75 % auf. In Hinblick auf die Ergebnisse des SBV zeigten die Sorten Adesso, Alessio und Amicus alle niedrige Verdaubarkeiten im Bereich von 60-64 %, wohingegen bei den restlichen Sorten Werte von etwa 66-70 % beobachtet wurden. Es konnte eine eigentlich eher geringe, jedoch signifikant bessere Proteinverdaulichkeit im Sauerteig erzielt werden, die Ergebnisse der Sauerteiggebäcke zeigten im Durchschnitt um 4 % höhere Werte als die des Hefe-fermentiertem Gebäcks. Die generell höchste Verdaubarkeit konnte im Mehl als auch in den Gebäcken der Sorte Aurelius nachgewiesen werden. Rizzello et al. (2019) beschrieb ebenfalls eine bessere Verdaulichkeit von Sauerteigbrot als von reinem hefe-fermentiertem Brot. In der

Studie wurde eine Verdaubarkeit von 64 % für Hefe-fermentiertes Brot sowie einer Verdaulichkeit von 72 % in Sauerteigbrot (ebenfalls zusätzlich Hefe als Starterkultur verwendet) ermittelt. Die veröffentlichten Proteinverdaubarkeiten stimmen mit den analysierten Verdaubarkeiten, welche im Zuge dieser Arbeit ermittelt wurden überein, jedoch kamen unterschiedliche Versuchsdurchführungen zum Einsatz. Im Allgemeinen ist bekannt, dass die Verdaubarkeit während der Gärung zunimmt, jedoch während dem Backen wieder abnimmt (Wu et al. 2017; Smith et al. 2015). Der *in vitro* Proteinverdau basierte auf der sogenannten Multienzymtechnik unter Verwendung der Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und einer Peptidase (Pepsin) (Pederson & Eggum 1983; Abdel-Aal & Hucl 2002). Die menschlichen gastrointestinalen Verdauungsenzyme wie Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin sind nicht in der Lage ein Protein vor oder nach den Aminosäuren Prolin und Glutamin zu spalten. Deshalb kann Gluten, welches durch einen hohen Anteil an Glutamin und Prolin charakterisiert ist, im humanen Gastrointestinaltrakt nicht abgebaut werden (Scherf et al. 2018). Smith et al. (2015) untersuchte die Verdaubarkeit der Glutenproteine in Mehl und Brot, welches mit demselben Mehl hergestellt wurde. Der Backprozess reduzierte wie bereits erwähnt die Verdaubarkeit. Die höhere Verdaulichkeit des Mehles wurde auf die partikelförmige Struktur des Mehles zurückgeführt, da die große Oberfläche eine bessere Angriffsfläche von Stärke- und Proteine-Moleküle für die Verdauungsenzyme darstellt. Zudem wirkt sich die Bildung von Gluten-Stärke Komplexen während des Backvorganges auf die Proteinverdaulichkeit aus.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Sauerteigführung auf die Proteinverdaubarkeit von Weizengebäck zu untersuchen sowie die Bekömmlichkeit zu verbessern. Hierzu wurde zuerst die Charakterisierung der sechs ausgewählten reinsortigen Mehle, welche als Rohstoffe für den zweiten Backversuch dienen, durchgeführt. Anschließend erfolgte ein Vorversuch, der sogenannte erste Backversuch, um den Einfluss der Sauerteigtechnologie auf die Teiglinge der Bäckereien Haubis und Ströck zu untersuchen. Um einen Sorteneffekt auszuschließen wurden alle Teiglinge mit einem gut charakterisierten Rösselmehl hergestellt. Im Zuge des Vorversuches wurde die Vorsauermenge sowie die Fermentationsdauer variiert, wobei die Vorsauermenge den größten Einfluss auf den Amylase-Trypsin-Inhibitor-(ATI)-Abbau zeigte. Aufgrund der Ergebnisse des ersten Backversuches wurde für die Bäckerei Haubis ein Rezept mit 10 % Vorsauermenge, einstufiger Vorsäuerung und einer Teigführungszeit von 16 Stunden entwickelt. Für die Bäckerei Ströck wurde ebenfalls eine Vorsauermenge von 10 %, jedoch eine zweistufige Vorsäuerung und eine Teigführungszeit von 18 Stunden vorgesehen.

Anhand des zweiten Backversuches erfolgte die Umsetzung der entwickelten Rezepte mit den sechs reinsortigen Mehle sowie die Durchführung des Semmelbackversuches (SBV) der AGES mit den ausgewählten Mehlsorten. Bei dem SBV handelte es sich um Hefe-fermentiertes Gebäck, weshalb ein direkter Vergleich zum Sauerteig-fermentiertem Gebäck hergestellt werden konnte.

In Anbetracht der Ergebnisse des zweiten Backversuches zeigten die Teiglinge der Bäckerei Ströck im Vergleich zu den jeweiligen Mehlen gleich hohe oder höhere Konzentrationen an löslichem Protein. Dies deutete auf einen verbesserten Abbau von Gluten durch die Anwendung der Sauerteigtechnologie. Die Teiglinge von Haubis wiesen jedoch ein geringeres lösliches Protein auf. Durch die Untersuchung des Einflusses der Sauerteigführung auf den Amylase-Trypsin-Inhibitor-Gehalt wurde eine Reduktion der ATI-Mengen von etwa 50-60 % nachgewiesen. Des Weiteren wurde im Zuge des zweiten Backversuches ein Glutenabbau der Sauerteiggebäcke der beiden Bäckereien von 22-43 % verzeichnet. Im Vergleich mit dem Gebäck des Semmelbackversuches wurde eine Verminderung des Glutens von 37-44 % festgestellt. Somit konnte im

Allgemeinen ein geringerer Glutengehalt in den Hefe-fermentierten Gebäckproben nachgewiesen werden. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Hefe-Gebäck und dem Ströck Sauerteiggebäck beobachtet werden. Zudem wurde bei der Beurteilung der Trypsin-Inhibitoraktivität der Sauerteiglinge eine höhere Aktivität als bei den Mehlproben beobachtet. Zuletzt erfolgte die Ermittlung der Proteinverdaubarkeit der Gebäcke des Semmelbackversuches und der Sauerteiggebäcke. Die Hefe-fermentierten Gebäcke zeigten im Durchschnitt um 4 % geringere Verdaubarkeiten. Bei den Sauerteiggebäcken konnte eine Verdaubarkeit von 62-75 % erreicht werden. Hervorzuheben ist, dass die Prozessführung einen stärkeren Einfluss auf die Ergebnisse hatte als die Rohstoffauswahl.

Die erfolgten Vorversuche zur Optimierung der Extraktion der Amylase-Trypsin-Inhibitoren, ergaben keine deutlichen Verbesserungen. Aufgrund des eingeschränkten Labor- und Forschungsbetriebs, durch Covid-19 verursacht, konnte nicht ausreichend Zeit investiert werden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

Des Weiteren erfolgte die Planung sowie erste Vorversuche eines Chymotrypsin-Inhibitor-Assays. Dieser konnte ebenfalls aufgrund der außergewöhnlichen Situation durch Covid-19 nicht vertieft werden.

Die erzielten Forschungsergebnisse stellen wertvolle Grundlagen für die beiden Firmenpartner Haubis und Ströck dar, da diese für die Entwicklung leichter verdaulicher Backwaren genutzt werden können. Das Sauerteiggebäck erfüllt grundsätzlich alle Voraussetzungen für eine bessere Bekömmlichkeit und Verdaubarkeit. Jedoch muss die Auswirkung der ATI-Abbauprodukte ermittelt werden. Zurzeit liegen aufgrund mangelnder wissenschaftlicher Daten, inwiefern Amylase-Trypsin-Inhibitoren für bestimmte Weizenunverträglichkeiten verantwortlich sind, keine medizinischen Richtlinien/Empfehlungen für deren Verzehr vor. Um das gewonnene Wissen noch weiter auszubauen sind in weiterer Folge weitere Forschungsprojekte notwendig. Im Zuge dessen sind medizinische Studien sowie die Festlegung von Richtlinien erforderlich.

8 Literaturverzeichnis

- Abdel-Aal, E-SM & Hucl, P. (2002). Amino Acid Composition and In Vitro Protein Digestibility of Selected Ancient Wheats and their End Products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(6), 737–747. doi:10.1006/jfca.2002.1094
- Altenbach, SB; Vensel, WH; Dupont, FM (2011). The spectrum of low molecular weight alpha-amylase/protease inhibitor genes expressed in the US bread wheat cultivar Butte 86. *BMC Research Notes*, 4, 242.
- Arentz-Hansen, H; McAdam, S; Molberg, Ø; Fleckenstein, B; Lundin, K; Jørgensen, T; Jung, G; Roepstorff, P; Sollid, L (2002). Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* 123:803–9.
- Armentia, A; Diaz-Perales, A; Castrodeza, J; Duenas-Laita, A; Palacin, A; Fernandez, S (2009). Why can patients with baker's asthma tolerate wheat flour ingestion? Is wheat pollen allergy relevant? *Allergologia et Immunopathologia* 37 (4):203–4.
- Austria Statistik (2020). Feldfrucht- und Dauerwiesenproduktion 2020. https://www.statistik.at/web_de/statistiken/wirtschaft/land_und_forstwirtschaft/agrарstruktur_flaechen_ertraege/feldfruechte/123771.html. 12.10.2020
- Baar, A; Pahr, S; Constantin, C; Giavi, S; Manoussaki, A; Papadopoulos, NG; Ebner, C; Mari, A; Vrtala, S; Valenta, R (2014). Specific IgE reactivity to tri a 36 in children with wheat food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133 (2):585–7.
- Baar, A; Pahr, S; Constantin, C; Scheiblhofer, S; Thalhamer, J; Giavi, S; Papadopoulos, NG; Ebner, C; Mari, A; Vrtala, S; Valenta, R (2012). Molecular and immunological characterization of tri a 36, a low molecular weight glutenin, as a novel major wheat food allergen. *The Journal of Immunology* 189 (6):3018–25.
- Bundesamt für Ernährungssicherheit BAES (2020). Winterweizen, Winterweichweizen. <https://bsl.baes.gv.at/kulturen/getreide/winterweizen-winterweichweizen/#c7067>. 17.11.2020
- Baltes, W; Matissek, R (2011). Lebensmittelchemie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 7. vollständige Auflage.
- Berin, MC; Sampson, HA (2013). Mucosal immunology of food allergy. *Current Biology* 23 (9): R389–400.
- Biesiekierski, JR; Peters, SL; Newnham, ED; Rosella, O; Muir, JG; Gibson, PR (2013). No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates. *Gastroenterology*, 145, 320-328.
- Boukid, F; Prandi, B; Sforza, S; Sayar, R; Seo, YW; Mejri, M; Yacoubi, I (2017). Understanding the Effects of Genotype, Growing Year, and Breeding on Tunisian Durum Wheat

- Allergenicity. 1. The Baker's Asthma Case. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(28), 5831–5836.
- Borghini, R; Donato, G; Alvaro, D; Picarelli, A (2017). New insights in IBS-like disorders: Pandora's box has been opened. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 10 (2), S. 79–89.
- Call, L; Reiter, EV; Wenger-Oehn, G; Strnad, I; Grausgruber, H; Schoenlechner, R; D'Amico, S (2019). Development of an enzymatic assay for the quantitative determination of trypsin inhibitory activity in wheat. *Food Chemistry* 299, 125038.
- Call, L; Kapeller, M; Grausgruber, H; Reiter, E; Schoenlechner, R; D'Amico, S (2020). Effects of Species and Breeding on Wheat Protein Composition. *Journal of Cereal Science*.
- Caminero, A; McCarville, JL; Zevallos, VF; Pigrau, M; Yu, XB; Jury, J; Galipeau, HJ; Clarizio, AV; Casqueiro, J et al. (2019). Lactobacilli Degrade Wheat Amylase Trypsin Inhibitors to Reduce Intestinal Dysfunction Induced by Immunogenic Wheat Proteins. *Gastroenterology* 156:2266–2280.
- Caminero, A; Verdu, EF (2019). Metabolism of wheat proteins by intestinal microbes: Implications for wheat related disorders. *Gastroenterología y Hepatología (English Edition)*, 42(7), 449–457.
- Canavan, C; West, J; Card, T (2014). The epidemiology of irritable bowel syndrome. *Clinical Epidemiology*, 6, 71-80.
- Carbonero, P; García-Olmedo, F (1999). A Multigene Family of Trypsin/ α -Amylase Inhibitors from Cereals. P.R. Shewry and R. Casey (eds.), *Seed Proteins*, 617-633.
- Carroccio, A; Mansueto, P; Iacono, G; Soresi, M; D'Alcamo, A; Cavataio, F; Brusca, I; Florena, AM; Ambrosiano, G; Seidita, A et al. (2012). Non-celiac wheat sensitivity diagnosed by double-blind placebo-controlled challenge: Exploring a new clinical entity. *The American Journal of Gastroenterology* 107 (12):1898–906.
- Catassi, C; Alaedini, A; Bojarski, C; Bonaz, B; Bouma, G; Carroccio, A; et al. (2017). The overlapping area of non-celiac gluten sensitivity (NCGS) and wheat-sensitive irritable bowel syndrome (IBS): An update. *Nutrients*, 9, 1268.
- Catassi, C; Bai, JC; Bonaz, B; Bouma, G; Calabrò, A; Carroccio, A; et al. (2013). Non-celiac gluten sensitivity: The new frontier of gluten related disorders. *Nutrients*, 5, 3839-3853.
- Catassi, C; Elli, L; Bonaz, B; Bouma, G; Carroccio, A; Castillejo, G; Cellier, C; Cristofori, F; De Magistris, L; Dolinsek, J et al. (2015). Diagnosis of non-celiac gluten sensitivity (NCGS): The Salerno experts' criteria. *Nutrients* 7 (6):4966–77.
- Christensen, MJ; Eller, E; Mortz, CG; Brockow, K; Bindsvlev-Jensen, C (2019). Wheat-dependent cofactor-augmented anaphylaxis: A prospective study of exercise, aspirin, and alcohol efficacy as cofactors. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* 7 (1):114–21.

- Cianferoni, A (2016). Wheat allergy: Diagnosis and management. *Journal of Asthma and Allergy* 9:13–25.
- Coda, R; Rizzello, CG; Pinto, D; Gobbetti, M (2012). Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1087-1096.
- Cuccioloni, M; Mozzicafreddo, M; Ali, I; Bonfili, L; Cecarini, V; Eleuteri, AM & Angeletti, M (2016). Interaction between wheat alpha-amylase/trypsin bi-functional inhibitor and mammalian digestive enzymes: Kinetic, equilibrium and structural characterization of binding. *Food Chemistry*, 213, 571–578.
- Cuccioloni, M; Mozzicafreddo, M; Ali, I; Bonfili, L; Cecarini, V; Eleuteri, AM & Angeletti, M (2017). Interfering with the high-affinity interaction between wheat amylase trypsin inhibitor CM3 and toll-like receptor 4: in silico and biosensor-based studies. *Scientific Reports*, 7(1).
- Czaja-Bulsa, G; Bulsa, M (2017) What Do We Know Now about IgE-Mediated Wheat Allergy in Children? *Nutrients*, 35.
- Dale, HF; Biesiekierski, JR; Lied, GA. (2018). Non-coeliac gluten sensitivity and the spectrum of gluten-related disorders: an updated overview. *Nutrition Research Reviews*, 1–10.
- Dale, HF; Rasmussen, SH; Asiller, ÖÖ; Lied, GA (2019). Probiotics in Irritable Bowel Syndrome: An Up-to-Date Systematic Review. *Nutrients*.
- De Angelis, M; Cassone, A; Rizzello, CG; Gagliardi, F; Minervini, F; Calasso, M; Di Cagno, R; Francavilla, R; Gobbetti, M (2010). Mechanism of degradation of immunogenic gluten epitopes from *Triticum turgidum* L. var. durum by sourdough lactobacilli and fungal proteases. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 508-518.
- De Vuyst, L; Neysens, P (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology* 16(1-3), 43–56.
- Di Cagno, R; De Angelis, M; Auricchio, S; Greco, L; Clarke, C; De Vincenzi, M et al. (2004). Sourdough Bread Made from Wheat and Nontoxic Flours and Started with Selected Lactobacilli Is Tolerated in Celiac Sprue Patients. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1088–1096.
- Dong, K; Ge, P; Ma, C; Wang, K; Yan, X; Gao, L et al. (2012): Albumin and globulin dynamics during grain development of elite Chinese wheat cultivar Xiaoyan 6. *Journal of cereal science* 56 (3), S. 615–622.
- Dupont, FM; Vensel, WH; Tanaka, CT; Hurkman, WJ; Altenbach, SB (2011). Deciphering the complexities of the wheat flour proteome using quantitative two-dimensional electrophoresis, three proteases and tandem mass spectrometry. *Proteome Science*, 9(10).

- Eckstein, PP (1997). *Angewandte Statistik mit SPSS: Praktische Einführung für Wirtschaftswissenschaftler*. Springer Fachmedien Wiesbaden.
- Eggum, BO; Kreft, I; Javornik, B (1981). Chemical composition and protein quality of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, 30(3-4), 175–179.
- Emanuelson, J; Wollenweber, B; Jorgensen, JR; Andersen, SBF; Jensen, CR (2003). Wheat Grain Composition and Implications for Bread Quality. *Plant Production no. 92*; Danish Institute of Agricultural Sciences: Tjele, Denmark.
- FAO (2019). World Food Situation: FAO Cereal Supply and Demand Brief: Cereal markets to remain well supplied in 2020/21. <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/12.10.2020>
- Fraberger, V; Unger, C; Kummer, C; Domig, KJ (2020). Insights into microbial diversity of traditional Austrian sourdough. *LWT*, 109358.
- Gassenmeier, K; Schieberle, P (1995). Potent aromatic compounds in the crumb of wheat bread (French-type) - influence of pre-ferments and studies on the formation of key odorants during dough processing. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 201, 241-248.
- Gänzle, MG; Loponen, J; Gobbetti, M (2008). Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Food Science & Technology*, 19(10), 513–521.
- Geisslitz, S; Ludwig, C; Scherf, KA; Koehler, P (2018). Targeted LC-MS/MS reveals similar contents of α -amylase/trypsin-inhibitors as putative triggers of non-celiac gluten sensitivity in all wheat species except einkorn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(46), 12395-12403.
- Gobbetti, M; Rizzello, CG; Di Cagno, R; De Angelis, M (2014). How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. *Food Microbiology*, 37, 30–40.
- Hedderich, J; Sachs, L (2018). *Angewandte Statistik*. Springer Spectrum Berlin Deutschland 16. überarbeitete und erweiterte Ausgabe.
- Higgins, TJV (1984). Synthesis and regulation of major protein in seed. *Plant Physiology* 35, 191-221.
- Hofer, G; Wieser, S; Bogdos, MK; Gattinger, P; Nakamura, R; Ebisawa, M; Mäkelä, M; Papadopoulos, NG; Valenta, R; Keller, W (2018). Three-dimensional structure of the wheat b-amylase Tri a 17, a clinically relevant food allergen. *Allergy*
- Hollon, J; Puppa, EL; Greenwald, B; Goldberg, E; Guerrerio, A; Fasano, A (2015). Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with nonceliac gluten sensitivity. *Nutrients* 7 (3):1565–76.

- Hungin, APS; Whorwell, PJ; Tack, J; Mearin, F (2003). The prevalence, patterns and impact of irritable bowel syndrome: an international survey of 40 000 subjects. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 17, 643-650.
- Huang, X; Schuppan, D; Rojas Tovar, LE; Zevallos, VF; Loponen, J; Gänzle, M (2020). Sourdough Fermentation Degrades Wheat Alpha-Amylase/Trypsin Inhibitor (ATI) and Reduces Pro-Inflammatory Activity. *Foods*, 9(7), 943.
- Huebener, S; Tanaka, CK; Uhde, M; Zone, JJ; Vensel, WH; Kasarda, DD et al. (2014). Specific Nongluten Proteins of Wheat Are Novel Target Antigens in Celiac Disease Humoral Response. *Journal of Proteome Research*, 14(1), 503–511.
- Jouanin, A; Gilissen, LJWJ; Boyd, LA; Cockram, J; Leigh, FJ; Wallington, EJ et al. (2018). Food processing and breeding strategies for coeliac-safe and healthy wheat products. *Food research international* (Ottawa, Ont.) 110, S. 11–21.
- Junker, Y; Zeissig, S; Kim, SJ; Barisani, D; Wieser, H; Leffler, DA; et al. (2012). Wheat amylase trypsin inhibitors drive intestinal inflammation via activation of toll-like receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(13), 2395-2408.
- Kapeller, M (2019). Charakterisierung der Proteinfractionen in unterschiedlichen Weizenarten und -sorten. Diplomarbeit am Institut für Futtermittel und Tierernährung der AGES – Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit und am Institut für Lebensmitteltechnologie des Departments für Lebensmittelwissenschaften und -technologie der Universität für Bodenkultur, Wien
- Keet, CA; Matsui, EC; Dhillon, G; Lenehan, P; Paterakis, M; Wood, RA (2009). The natural history of wheat allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 102 (5):410.
- Köhler, H; Andersen, G (2016): Alte Weizenarten neu entdeckt. Renaissance von Einkorn und Emmer. *Ernährungs Umschau* (8), S. 29–32.
- Köhler, P; Wieser, H (2013). Chemistry of Cereal Grains. *M. Gobbetti und M. Gänzle (Hg.): Handbook on Sourdough Biotechnology*, Bd. 16. Boston, MA: Springer US, S. 11–45.
- Kramer, T (1979). Environmental and genetic variation for protein content in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 28(2), 209–218.
- Kreis, M; Forde, BG; Rahman, S; Mifflin, BJ; Shewry, PR (1985). Molecular evolution of the seed storage proteins of barley, rye and wheat. *Journal of Molecular Biology*, 183(3), 499–502.
- Krogsgaard, LR; Engsbro, AL; Bytzer, P (2013). The epidemiology of irritable bowel syndrome in Denmark. A population-based survey in adults ≤50 years of age. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 48, 523-529.
- Laatikainen, R; Koskenpato, J; Hongisto, SM; Loponen, J; Poussa, T; Huang, X et al. (2017). Pilot Study: Comparison of Sourdough Wheat Bread and Yeast-Fermented Wheat Bread in Individuals with Wheat Sensitivity and Irritable Bowel Syndrome. *Nutrients*, 9(11), 1215.

- Lammers, KM; Lu, R; Brownley, J; Lu, B; Gerard, C; Thomas, K; Rallabhandi, P; Shea-Donohue, T; Tamiz, A; Alkan, S et al. (2008). Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor cxcr3. *Gastroenterology* 135 (1):194–204.
- Loponen, J; Kanerva, P; Zhang, C; Sontag-Strohm, T; Salovaara, H; Gänzle, MG (2009). Prolamin Hydrolysis and Pentosan Solubilization in Germinated-Rye Sourdoughs Determined by Chromatographic and Immunological Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 746–753.
- Le, TA; Al Kindi, M; Tan, JA; Smith, A; Heddle, RJ; Kette, FE; Hissaria, P; Smith, WB (2016). The clinical spectrum of omega-5- gliadin allergy. *Internal Medicine Journal* 46 (6):710–6.
- Lebwohl, B; Sanders, DS; Green, PHR (2018). Coeliac disease. *The Lancet* 391 (10115), S. 70–81. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31796-8.
- Leonard, MM; Sapone, A; Catassi, C; Fasano, A (2017). Celiac disease and nonceliac gluten sensitivity: A review. *JAMA* 318 (7): 647–56.
- Ludvigsson, JF; Leffler, DA; Bai, J; Biagi, F; Fasano, A, Green, PHR; et al. (2013). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, 62(1), 43-52.
- Ludvigsson, JF; Bai, JC; Biagi, F; Card, TR; Ciacci, C; Ciclitira, PJ; et al. (2014). Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut*, 63, 1210-1228.
- Marsh, MN (1992). Mucosal pathology in gluten sensitivity. *Coeliac Disease*, ed. M Marsh, pp. 136–91. Oxford, UK: Blackwell Sci.
- Miedaner, T (2014). Kulturpflanzen: Botanik – Geschichte – Perspektiven. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Mocan, O; Dumitraşcu, DL (2016). The broad spectrum of celiac disease and gluten sensitive enteropathy. *Clujul Medical*, 89(3), 335-342.
- Morita, E; Matsuo, H; Chinuki, Y; Takahashi, H; Dahlström, J; Tanaka, A (2009). Food-dependent exercise-induced anaphylaxis - Importance of omega-5 gliadin and HMW-glutenin as causative antigens for wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Allergology International* 58:493–8
- Nilsson, N; Sjolander, S; Baar, A; Berthold, M; Pahr, S; Vrtala, S; Valenta, R; Morita, E; Hedlin, G; Borres, MP; Nilsson, C (2015). Wheat allergy in children evaluated with challenge and IgE antibodies to wheat components. *Pediatric Allergy and Immunology* 26 (2): 119–25.
- Nionelli, L; Rizzello, C (2016). Sourdough-Based Biotechnologies for the Production of Gluten-Free Foods. *Foods*, 5(4), 65.
- Pahr, S; Constantin, C; Papadopoulos, NG; Giavi, S; Mäkelä, M; Pelkonen, A; Ebner, C; Mari, A; Scheiblhofer, S; Thalhamer, J et al. (2013). A-purothionin, a new wheat allergen

- associated with severe allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132 (4):1000–3.
- Pedersen, B; Eggum, BO (2009). Prediction of protein digestibility by an in vitro enzymatic pH-stat procedure. *Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde*, 49(1-5), 265–277.
- Pejcz, E; Spychaj, R; Gil, Z (2019). Technological methods for reducing the content of fructan in wheat bread. *Foods*, 6, 663.
- Pingoud, A; Urbanke, C (1997). *Arbeitsmethoden der Biochemie*. Walter de Gruyter, Berlin, New York
- Pourpak, Z; Mesdaghi, M; Mansouri, M; Kazemnejad, A; Toosi, SB; Farhoudi, A (2005). Which cereal is a suitable substitute for wheat in children with wheat allergy?. *Pediatric Allergy and Immunology* 16 (3):262–6.
- Quirce, S; Diaz-Perales, A (2013). Diagnosis and management of grain-induced asthma. *Allergy, Asthma & Immunology Research* 5: 348–56.
- Reese, I; Schäfer, C; Kleine-Tebbe, J; Ahrens, B; Bachmann, O; Ballmer-Weber, B; Beyer, K; Bischoff, SC; Blümchen, K; Dölle, S et al. (2018). Non-celiac gluten/wheat sensitivity (NCGS) – A currently undefined disorder without validated diagnostic criteria and of unknown prevalence: Position statement of the task force on food allergy of the German Society of Allergology and Clinical Immunology (DGAKI).
- Reig-Otero, Y; Manes, J; Manyes, L (2018). Amylase-trypsin inhibitors in wheat and other cereals as potential activators of the effects of nonceliac gluten sensitivity. *Journal of Medicinal Food*, 21, 207-214.
- Rizzello, CG; De Angelis, M; Di Cagno, R; Camarca, A; Silano, M; Losito, I; De Vincenzi, M; De Bari, MD; Palmisano, F; Maurano, F; Gianfrani, C; Gobbetti, M (2007). Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4499-4507.
- Rizzello, CG; Portincasa, P; Montemurro, M; Di Palo, DM; Lorusso, MP; De Angelis, M et al. (2019). Sourdough Fermented Breads are More Digestible than Those Started with Baker's Yeast Alone: An In Vivo Challenge Dissecting Distinct Gastrointestinal Responses. *Nutrients*, 11(12), 2954.
- Rosentrater, KA; Evers, AD (2018). *Kent's Technology Of Cereals: An Introduction For Students Of Food Science And Agriculture. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* 5. Edition.
- ROTH (2020). Instructions for use: Roti®-Quant: Protein quantitation assay according to Bradford. <https://www.carlroth.com> 21.10.2020.

- Rotondi Aufiero, V; Fasano, A; Mazzarella, G (2018). Non-celiac gluten sensitivity: How its gut immune activation and potential dietary management differ from celiac disease. *Molecular Nutrition & Food Research* 62(9), 1700854.
- Ryan, CA (1990). Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 28(1), 425–449.
- Sagu Tchewonpi, S; Huschek, G; Bönick, J; Homann, T; Rawel, HM (2019). A New Approach of Extraction of α -Amylase/trypsin Inhibitors from Wheat (*Triticum aestivum* L.), Based on Optimization Using Plackett–Burman and Box–Behnken Designs. *Molecules*, 24(19), 3589.
- Sánchez, D; Štěpánová-Honzová S; Hospodková, M; Hoffmanová, I; Hábová, V; Halado, P; et al. (2018). Occurrence of serum antibodies against wheat alpha-amylase inhibitor 0.19 in celiac disease. *Physiological Research*, 67(4), 613-622.
- Sánchez-Monge, R; Gomez, L; Barber, D; Lopez-Otin, C; Armentia, A; Salcedo, G (1992). Wheat and barley allergens associated with baker's asthma. *Biochemical Journal*, 281, 401-405.
- Sapone, A; Lammers, KM; Casolaro, V; Cammarota, M; Giuliano, MT; De Rosa, M; et al. (2011). Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Medicine*, 9(23).
- Sapone, A; Bai, CJ; Ciacci, C; Dolinsek, J; Green, PH; Hadjivassiliou, M; Kaukinen, K; Rostami, K; Sanders, DS; Schumann, M et al. (2012). Spectrum of gluten-related disorders: Consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine* 10 (1):13.
- Scherf, KA; Koehler, P; Wieser, H (2016a): Gluten and wheat sensitivities. *Journal of cereal science* 67, S. 2–11.
- Scherf, KA; Brockow, K; Biedermann, T; Koehler, P; Wieser, H (2016b). Wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clinical & Experimental Allergy* 46:10–20.
- Scherf, KA; Wieser, H; Koehler, P (2018). Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products. *Food Research International*, 110, 62–72.
- Schuppan, D; Gisbert-Schuppan, K (2018). Tägliches Brot: Krank durch Weizen, Gluten und ATI. Springer-Verlag GmbH Deutschland.
- Schuster, E; Plöchl, S (2020). ID-Wheat: Verbesserung der Verdaulichkeit von Weizenprodukten. Diplomarbeit der HTL für Lebensmitteltechnologie – Getreide- und Biotechnologie Wels.
- Shewry, PR; Lafiandra, D; Salcedo, G; Aragoncillo, C; Garcia-Olmedo, F; Lew, EJJ; et al. (1984). N-terminal amino acid sequences of chloroform/methanol-soluble proteins and albumins from endosperms of wheat, barley and related species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 304(1120), 297.

- Sicherer, SH; Sampson, HA (2018). Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 141 (1): 41–58.
- Silano, V; Pocchiari, F; Kasarda, DD (1973). Physical characterization of α -amylase inhibitors from wheat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 317, 139-148.
- Smith, F; Pan, X; Bellido, V; Toole, GA; Gates, FK; Wickham, MS et al. (2015). Digestibility of gluten proteins is reduced by baking and enhanced by starch digestion. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(10), 2034–2043.
- Thiele, C; Gänzle, MG; Vogel, RF (2002). Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. *Cereal Chemistry*, 79, 45-51.
- Timischl; W (2013). *Angewandte Statistik - Eine Einführung für Biologen und Mediziner*. Springer-Verlag Wien 3. Auflage.
- Tomić, J; Torbica, A; Popović, L; Strelec, I; Vastag, Ž; Pojić, M; Rakita, S (2015). Albumins Characterization in Relation to Rheological Properties and Enzymatic Activity of Wheat Flour Dough. *Journal of Agricultural Science and Technology* 17, S. 805–816.
- Tordesillas, L; Berin, MC; Sampson, HA (2017). Immunology of food allergy. *Immunity* 47 (1):32–50.
- Weegels, PL; Van de Pijpekamp, AM; Graveland, A; Hamer, RJ; Schofield, JD (1996). Depolymerisation and re-polymerisation of wheat glutenin during dough processing. Relationships between glutenin macropolymer content and quality parameters. *Cereal Sci* 23, 103–111.
- Weichel, M; Glaser, AG; Ballmer-Weber, BK; Schmid-Grendelmeier, P; Cramer, R (2006). Wheat and maize thioredoxins: A novel cross-reactive cereal allergen family related to baker's asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117 (3):676–81.
- Wieser, H; Seilmeier, W; Belitz, HD (1980). Vergleichende Untersuchungen über partielle Aminosäuresequenzen von Prolaminen und Glutelinen verschiedener Getreidearten. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* 170, 17-26.
- Wu, T; Taylor, C; Nebl, T; Ng, K; Bennett, LE (2017). Effects of chemical composition and baking on in vitro digestibility of proteins in breads made from selected gluten-containing and gluten-free flours. *Food Chemistry*, 233, 514–524.
- Yu, W; Freeland, DMH; Nadeau, KC (2016). Food allergy: Immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 16 (12):751–65.
- Zevallos, VF; Raker, V; Tenzer, S; Jimenez-Calvente, C; Ashfaq-Khan, M; Rüssel, N; et al. (2017). Nutritional wheat amylase-trypsin inhibitors promote intestinal inflammation via activation of myeloid cells. *Gastroenterology*, 152, 1100-1113.

- Zevallos, VF; Raker, VK; Maxeiner, J; Scholtes, P; Steinbrink, K; Schuppan, D (2018). Dietary wheat amylase trypsin inhibitors exacerbate murine allergic airway inflammation. *European Journal of Nutrition*.
- Zilić, S; Barać, M; Pešić, M; Dodig, D; Ignjatović-Mićić, D (2011). Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes. *International journal of molecular sciences* 12 (9), S. 5878–5894.

9 Anhang

Tab. 21: Tabelle zur Bestimmung der Ammoniumsulfat-Menge zur Einstellung der gewählten Konzentration (in % Sättigung) bei 0 °C (Pingoud & Urbanke 1997)

	Endkonzentration an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (% Sättigung)																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Zugegebene $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Menge in g pro L																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70

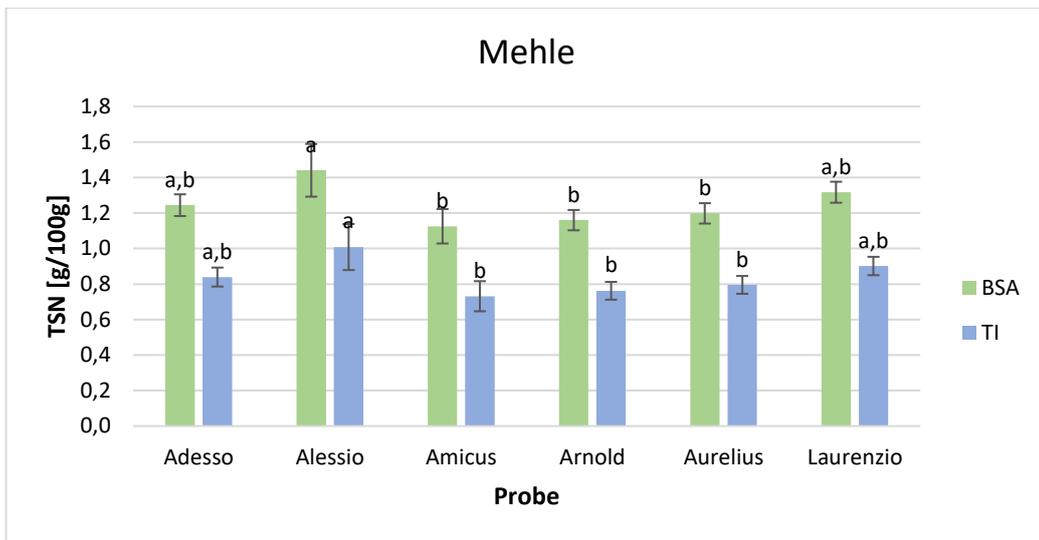


Abb. 22: Lösliches Protein in g/100 g Probe der Mehle nach der Methode von Bradford; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Duncan zwischen den Sorten

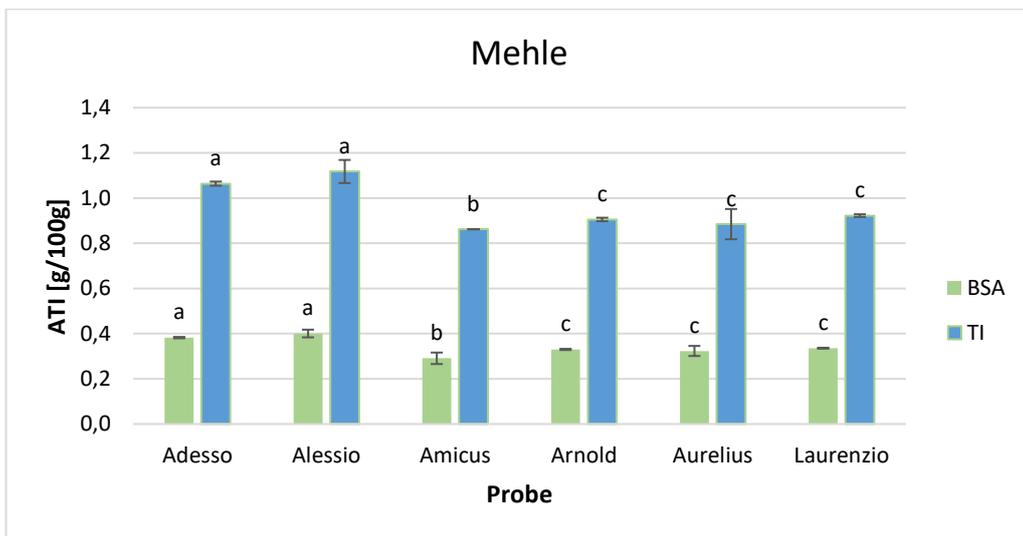


Abb. 23: ATI-Gehalt in g/100 g Probe der sechs Mehlsorten; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Duncan zwischen den Sorten

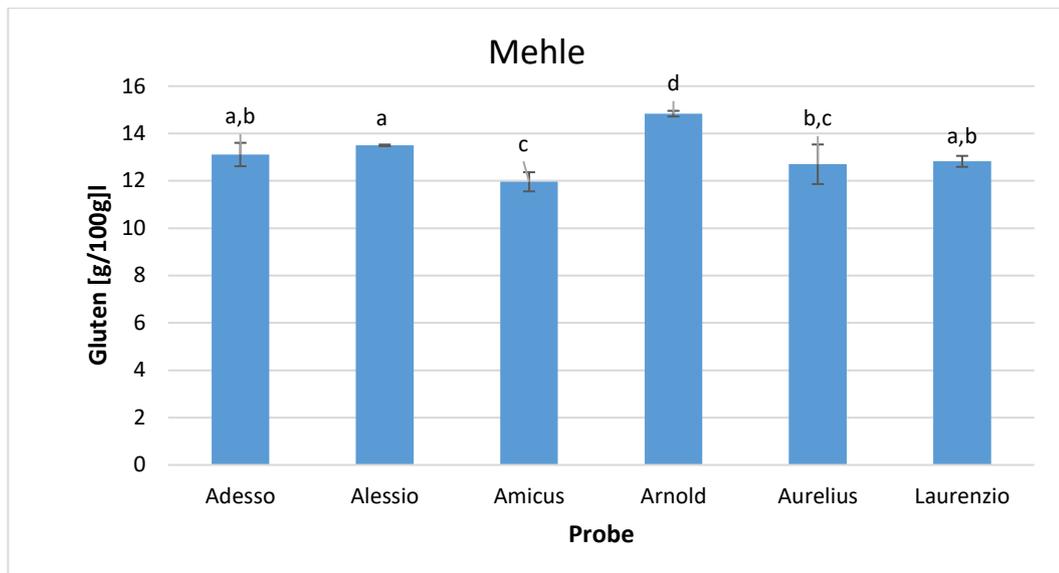


Abb. 24: Glutengehalt der sechs Mehlsproben in g/100 g Probe; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Duncan zwischen den Sorten

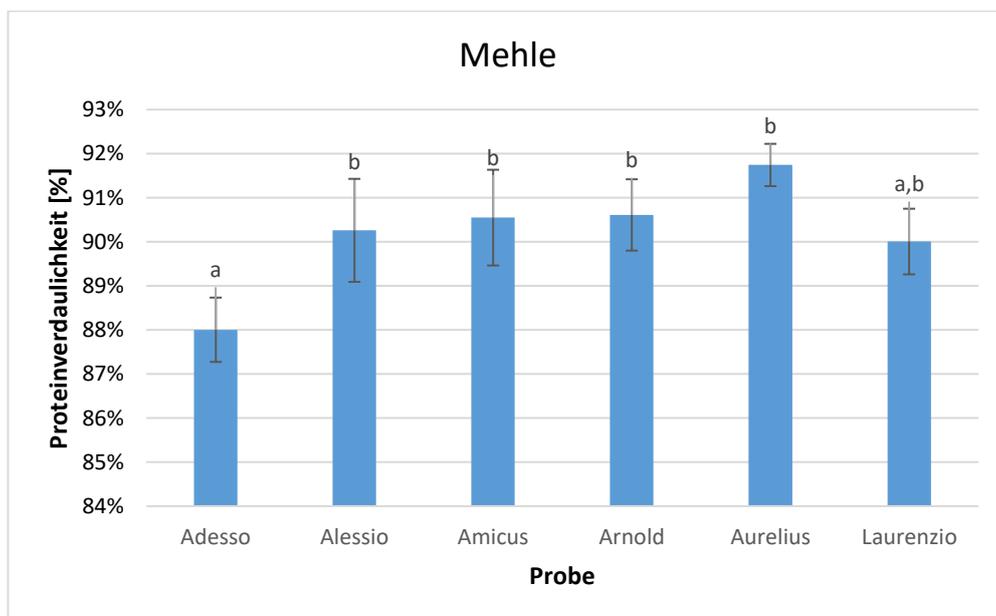


Abb. 25: Proteinverdaubarkeit in % der sechs getesteten Mehle; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Duncan zwischen den Sorten

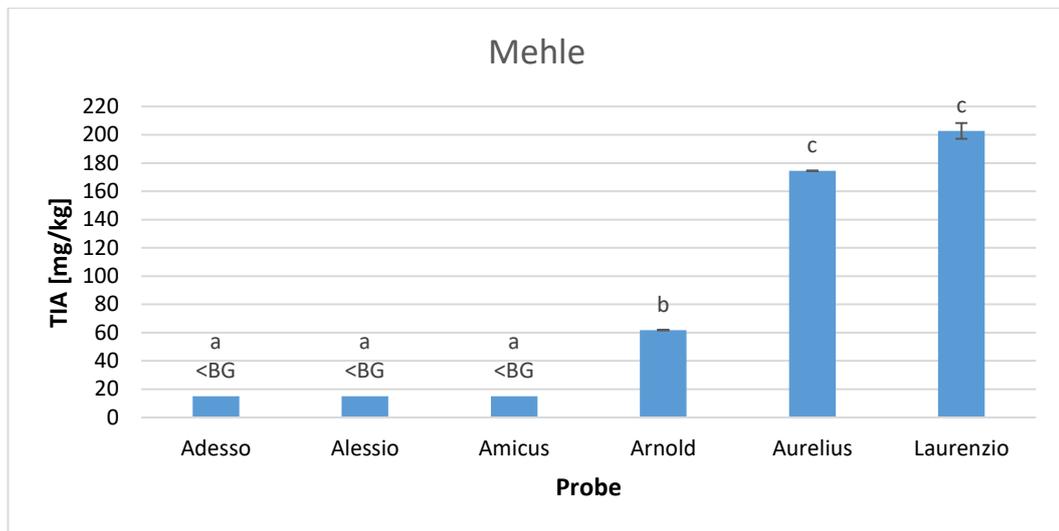


Abb. 26: Trypsin-Inhibierungsaktivität in mg/kg der Mehle; Kleinbuchstaben beschreiben die homogenen Untergruppen nach Tamhane zwischen den Sorten

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: **Lisa Kolarik**
Geburtsdatum: 26.01.1994
Geburtsort: Wien
Familienstand: ledig
Nationalität: Österreich

**Ausbildung:**

seit 2018 Masterstudium
Lebensmittelwissenschaften und
–technologie an der Universität für Bodenkultur Wien

2012 - 2018 Bachelorstudium Lebensmittel- und Biotechnologie
an der Universität für Bodenkultur Wien

2004 – 2012 Allgemeinbildende höhere Schule, Polgargymnasium
Wien 22

Berufserfahrung:

seit 10/2013 Ordinationsassistentin in der Tierarztpraxis
Großhofen (Teilzeit)

01/2020-07/2020 Diplomarbeit bei AGES GmbH Wien

08/2015 Ferialpraktikum bei Baxalta Orth an der Donau

07/2013 Ferialpraktikum bei Eissalon Isola Bella Groß-
Enzersdorf

02/2013 Praktikum in der Tierarztpraxis Großhofen

09/2012 Ferialpraktikum bei Eissalon Isola Bella Groß-
Enzersdorf

Besondere Kenntnisse und zusätzliche Informationen:

Fremdsprachen Englisch und Französisch

EDV-Kenntnisse Text- und Datenverarbeitende (Microsoft Office) –
fortgeschrittene Kenntnisse

Persönliche Kompetenzen Verlässlichkeit, Teamfähigkeit, Genauigkeit,
Verantwortungsbewusstsein

Zusatzausbildungen Führerschein B
Unternehmensführerschein Modul A

Außeruniversitäres Engagement Schwimmen, Wandern, Snowboarden

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Formulierungen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Diese schriftliche Arbeit wurde noch an keiner Stelle vorgelegt.

Lisa Kolarik