TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Chemie

Studien zur thermischen und mechanischen Modifikation und zum Puroindolingehalt von Weizenmehl

Annerose Claudia Vogel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Prof. Dr. Klaus Köhler
Prüfer der Dissertation:	1. apl. Prof. Dr. Peter Köhler
	2. Prof. Dr. Michael Groll

Die Dissertation wurde am 07.06.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 06.08.2019 angenommen.

Danke….

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. Köhler für die Betreuung dieser Arbeit und dem kritischen Diskurs. Zudem möchte ich mich für die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf zahlreichen nationalen und internationalen Konferenzen zu präsentieren, herzlich bedanken.

Ich danke Prof. Dr. Katharina Scherf für den intensiven wissenschaftlichen Austausch und die konstruktiven Gespräche, die mir in den richtigen Momenten die nötige Motivation gegeben haben.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei meinen Projektpartnern des Lehrstuhls für Brau- und Getränketechnologie der TUM. Insbesondere Dr. Mario Jekle, der durch fachliche und anregende Diskussionen bei Projektmeetings zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Bei Nicole Lisson und Robert Achtzehner bedanke ich mich für die hilfreichen Beiträge, die sie im Rahmen ihrer Wissenschaftlichen Abschlussarbeiten geleistet haben.

Für die Hilfe bei den Dumas-Messungen und die Arbeiten im Backlabor möchte ich mich ganz herzlich bei Anneliese Köhler und Katharina Schiesser bedanken. Weiterer Dank gilt Sami Kaviani-Nejad und Ines Otte für ihre großen Bemühungen bei der LC-MS/MS-Analytik sowie der Aufnahme zahlreicher Chromatogramme und Spektren.

Bei allen Mitarbeitern des Leibniz-Instituts für Lebensmittel-Systembiologie der Technischen Universität München möchte ich mich für die freundschaftliche Atmosphäre, ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Kollegen aus Labor O.52 Angelika Graßl, Dr. Sabrina Geißlitz, Angelika Gabler, Dr. Verena Knorr, Dr. Eva Müller, Dr. Kathrin Schalk und Gerold Rebholz sowie Anke Böswetter und Kristin Kahlenberg danke ich für das gute Laborklima, für die zahlreichen Diskussionen auf intellektueller und persönlicher Ebene, für die unterhaltsamen Mittags- und Kaffeepausen sowie für die zusammen verbrachte Zeit außerhalb der Arbeit.

Besonders Barbara Lexhaller möchte ich für die zusammen erlebte Zeit im und außerhalb vom Büro, unsere konstruktiven Diskussionen in allen Fach- und Lebensfragen sowie ihrer unendlichen Geduld danken, die mir Kraft zur Vollendung meiner Dissertation gegeben hat.

Dana Müller, Christin Ender, Nicole Wernicke, Doreen Richter, Alexandra Jorra, Julia Aurich und Philipp Lange danke ich trotz Entfernung für ihre Freundschaft, für ihre Unterstützung und für die unvergessliche Auszeit vom Alltag!

Bei Jens möchte ich mich besonders für den emotionalen Rückhalt und den nötigen Freiraum bedanken, der mir ermöglicht hat, mich auf meine Ziele zu konzentrieren. Ich danke dir, dass du immer an mich glaubst und immer für mich da bist!

Meinem Bruder Markus danke ich für seine Unterstützung, für sein stetes Interesse an meiner Arbeit, für die vielen Aufmunterungen und auch für die manchmal nötige Ablenkung!

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern. Ihr habt mich, egal was ich machen wollte, immer unterstützt. Alles was ich in meinem Leben erreicht habe, ist das Resultat eurer Liebe und eurer uneingeschränkten Unterstützung. Ihr habt mich zu der gemacht, die ich heute bin! Dafür bin ich sehr dankbar und möchte euch diese Arbeit widmen!

Meinen Großeltern und der ganzen restlichen Familie danke ich von Herzen für das Interesse an meiner Arbeit und dafür, dass sie immer für mich da sind!

Vorveröffentlichungen

Vogel C., Achtzehner R., Köhler P.: Auswirkungen von thermischen und mechanischen Behandlungen auf die Proteinverteilung von Weizenmehl, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Bericht **2016**, S. 94-97, ISBN 978-3-00-056386-7.

Vogel C., Köhler P.: Thermische und mechanische Modifizierung von Weizenproteinen, Gesellschaft Deutscher Chemiker, Lebensmittelchemische Gesellschaft – Fachgruppe in der GDCh, 45. Deutscher Lebensmittelchemikertag, **2016**, S. 155, ISBN 978-3-936028-98-0.

Vogel C., Lisson N., Köhler P.: Auswirkungen von thermischen und mechanischen Behandlungen auf die funktionellen Eigenschaften von Weizenmehl, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Bericht **2017**, S. 43-45, ISBN 978-3-00-058295-0.

Vogel C., Scherf K., Köhler P.: Massenspektrometrischer Nachweis und Charakterisierung von Puroindolinen in Weizen, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Bericht **2017**, S. 46-47, ISBN 978-3-00-058295-0.

Vogel C., Scherf K., Köhler P.: Entwicklung einer LC-MS-Methode zur Quantifizierung von Puroindolinen in Weizenmehl, Gesellschaft Deutscher Chemiker, Lebensmittelchemische Gesellschaft – Fachgruppe in der GDCh, 46. Deutscher Lebensmittelchemikertag, **2017**, S. 66, ISBN 978-3-947197-03-3.

Vogel C., Scherf K., Köhler P.: Auswirkungen von thermischen und mechanischen Behandlungen auf die Proteinverteilung und die funktionellen Eigenschaften von Weizenmehl, *FOOD-Lab*, **4/2017**, S. 20-25

Vogel C., Scherf K. A., Koehler P.: Effects of thermal and mechanical treatments on the physicochemical properties of wheat flour. *European Food Research and Technology*. **2018**, *244 (8)*, 1367–1379.

Vogel C., Scherf K. A., Koehler P.: Improvement of technological properties of wheat flour due to effects of thermal and mechanical treatments. *European Food Research and Technology*. **2019**, *245 (1)*, 167-178.

Inhalt

1 Einleitung 8

1.1 Getreide 8

1.1.1 Systematische Einordnung und Verwendung des Weizens 9
1.1.2 Aufbau eines Weizenkorns 9
1.1.3 Kornhärte 10
1.1.4 Die Qualitätsklassen des Weizens 12
1.1.5 Weizenproteine 13
1.1.6 Weizenkleber 15
1.1.7 Methoden zur Bestimmung der Backqualität von Weizenmehlen 16
1.1.8 Quantifizierung der Proteintypen und des Weizenklebers 19
1.1.9 Weizenstärke 20

1.2 Vermahlung 21

1.2.1 Walzenstuhl 23
1.2.2 Kryomühle 23
1.2.3 Kugelmühle 24
1.2.4 Prallmühle (Ultra-Zentrifugalmühle) 25
1.2.5 Zerkleinerungstechniken und deren Effekte auf die Stärkemodifikation 25
1.2.6 Zerkleinerungstechniken und deren Effekte auf die Proteinmodifikation 27

1.3 Puroindoline 30

2 Problemstellung und Zielsetzung 36

3 Ergebnisse und Diskussion 37

3.1 Grundbestimmungen 38

3.1.1 Rohproteingehalt nach Dumas (ICC-Standard Nr. 167) 38
3.1.2 Feuchtigkeitsgehalt 39
3.1.3 Aschegehalt (ICC-Standard Nr. 104/1) 39

3.2 Modifizierungen der Basismehle mittels Zerkleinerung durch verschiedene Mühlentypen 40

3.2.1 Mechanische Modifikationen mittels Kugelmühle 40
3.2.2 Mechanische Modifikationen mittels Zentrifugalmühle 42

3.3 Chemisch-physikalische Untersuchungen der modifizierten Mehle 43

3.3.1 Bestimmung des Stärkeschädigungsgrades mittels SDmatic 43
3.3.2 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelektrophorese) 47

3.3.3 Modifizierte Osborne-Fraktionierung 49
3.3.4 SDSL-/GMP-Fraktionierung....56
3.3.5 Rastelektronenmikroskopische (REM)-Aufnahmen von modifizierten Mehlen .62
3.3.6 Partikelgrößenverteilung (PGV)....68
3.3.7 Hauptfaktoren, die die Feuchte, Temperatur nach der Vermahlung, den Stärkeschädigungsgrad und die Partikelgröße beeinflussen 72
3.4 Rheologie....74
3.4.1 Wasseraufnahme und Teigentwicklungszeiten....74
3.4.2 Feuchtklebergehalt (FK) und Gluten Index (GI)....79
3.4.3 Kleber- und Teigzugversuche....82
3.4.4 GlutoPeak Test (GPT)....89
3.4.5 Backversuche im Mikromaßstab - Mikrobacktest (MBT)....93
3.4.6 Krumentextur....99
3.4.7 Korrelation der analytischen und rheologischen Parameter mit dem SLV....105
3.5 Puroindoline (PIN)....107
3.5.1 Extraktion der PIN....107
3.5.2 Optimierung der PIN-Extraktion....107
3.5.3 Überprüfung der Reinheit des isolierten PIN-Extraktes mittels SDS-PAGE ...109
3.5.4 Überprüfung der Extraktzusammensetzung mittels LC-ESI$^+$-QToF-MS 110
3.5.5 Entwicklung einer LC-MS-Methode zur PIN-Quantifizierung....111
3.5.6 Tryptische Hydrolyse des PIN-Isolates....113
3.5.7 LC-MS-Analyse der Hydrolysate mit Ion Trap-Detektion (CID-Modus) 114
3.5.8 LC-MS/MS-Methodenentwicklung mit markierten und unmarkierten Peptiden 117
3.5.9 Bestimmung der Peptidreinheit 130
3.5.10 Skyline-Software 134
3.5.11 Methodenvalidierung....135
3.5.12 Messung von Proben 142
4 Experimentelle Angaben....146
4.1 Chemikalien, Reagenzien und Materialien 146
4.2 Gewinnung und Charakterisierung des Probenmaterials....148
4.2.1 Charakterisierung der Mehle 148
4.2.2 Mechanische Modifikationen mittels Planeten-Kugelmühle *PM 100* 151
4.2.3 Mechanische Modifikationen mittels Ultra-Zentrifugalmühle *ZM 200* 152
4.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)....153

4.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 154
4.5 Modifizierte Osborne-Fraktionierung 157
4.5.1 Extraktion 157
4.5.2 Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) 158
4.6 Quantitative SDSL- und GMP-Analyse 160
4.6.1 Extraktion 160
4.6.2 Gel-Permeations-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (GP-HPLC) 161
4.7 Rheologie 162
4.7.1 Bestimmung der Teigentwicklungszeit, der Wasseraufnahmefähigkeit und der Teigstabilität 162
4.7.2 Feuchtklebergehalt (in Anlehnung an ICC-Nr. 137/1) 162
4.7.3 Zugversuche 163
4.7.4 Gluten Index (GI) 163
4.7.5 GlutoPeak Test (GPT) 164
4.7.6 Mikrobacktest (MBT) 164
4.7.7 Krumentextur 165
4.8 Puroindoline 166
4.8.1 Optimierung der Stärkeextraktion 166
4.8.2 PIN-Extraktion 167
4.8.3 Reduktion des PIN-Extraktes mit TCEP vor Alkylierung und Hydrolyse 168
4.8.4 Alkylierung des PIN-Extraktes mit Chloracetamid vor Hydrolyse 168
4.8.5 Enzymatische Hydrolyse des PIN-Extraktes mit Trypsin 169
4.8.6 ESI-Quadrupol-Time-of-Flight Massenspektrometrie (LC-ESI$^+$-QToF-MS) 170
4.8.7 LC-Ionenfallen Massenspektrometrie mit CID-Fragmentierung (LC-ESI$^+$-Ion Trap-MS/MS-CID) 172
4.8.8 TripleQuad-LC-MS mit CID-Fragmentierung (LC-ESI$^+$-Triple Quad MS/MS-CID) 174
4.8.9 Responsegeraden 175
4.8.10 Methodenvalidierung 175
4.8.11 SDS-PAGE 176
4.9 Statistische Methoden 177
5 Zusammenfassung 178
6 Literaturverzeichnis 181
7 Anhang i

Abkürzungen und Trivialnamen chemischer Verbindungen

AACCI	American Association of Cereal Chemists International
ACN	Acetonitril
AGT	Aggregation Time
ALGL	Albumin-/Globulin-Fraktion
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
AS	Aminosäure
ATR	vertikale Rührwerkskugelmühle
BE	Brabender Equivalents
BPC	Base Peak Chromatogram
BSL	Beschreibende Sortenliste
CAA	Chloracetamid
CD	Circulardichroismus
CID	Collision-Induced Dissociation
DE	Dehnenergie
DDT	Dough Development Time (Teigentwicklungszeit)
DGDG	Digalactosyldiacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DU	Durum
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Einkorn
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EM	Emmer
E_{max}	Dehnbarkeit
ESI	Elektrosprayionisation
ETD	Electron-Transfer Dissociation
FK	Feuchtkleber
GI	Gluten Index
GLIA	Gliadine (gesamt)/Gliadin-Fraktion
GLUT	Glutenine (gesamt)/Glutenin-Fraktion
GMP	Gluteninmakropolymer
GP-HPLC	Gelpermeations-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
GSP	Grain Softness Protein
Ha-Locus	Hardness Locus
HCT	High Capacity Trap

HMW-UE	High-Molecular-Weight-Untereinheiten
ICC	International Association for Cereal Science and Technology
IS	Interner Standard
KM	Kugelmühle
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LMW-UE	Low-Molecular-Weight-Untereinheiten
LoD	Limit of Detection, Nachweisgrenze
LoQ	Limit of Quantification, Bestimmungsgrenze
LoT	Lift off Time
MBT	Mikro-Backtest
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
M_r	relative molare Masse
MRM	Multi-Reaction-Monitoring
MRMT	Mikro-Rapid-Mix Test
MS	Massenspektrometrie
MSL	Mischstammlösung
MT	Maximum Torque
NMR	Kernspinresonanz
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PGV	Partikelgrößenverteilung
pI	isolelektrischer Punkt
PIN	Puroindolin
PMT	Peak Maximum Time
PTFE	Polytetraflourethylen
PTM	Posttranslational Modifications
PWG	Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
rpm	Rounds per Minute (Umdrehungen pro Minute)
RSD	Relative Standard Deviation (relative Standardabweichung)
R_{max}	Dehnwiderstand
RP	Rohproteingehalt
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
QToF	Quadrupol-Time-of-flight
SD	Absolute Standard Deviation (absolute Standardabweichung)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDSL	Natriumdodecylsulfat-lösliche Fraktion
SEM	Scanning Electron Microscopy
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SLV	spezifisches Botvolumen (mL/g Teig)
SRM	Single-Reaction-Monitoring
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Total Ion Current (Totalionenstrom)
TK	Trockenkleber
TM	Trockenmasse
TPA	Texture Profile Analyse
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UPP	Unextractable Polymeric Protein
WA	Wasseraufnahme
WW	Weichweizen
ZM	Zentrifugalmühle

Ein- und Dreibuchstabencodes für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asp	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Getreide

Getreide ist weltweit eines der wichtigsten Grundnahrungsmittel. Für die menschliche Ernährung ist Getreide die Hauptquelle an Kohlenhydraten (ca. 70 % des Bedarfs) sowie eine bedeutende Proteinquelle (ca. 50 %). Neben dem hohen Kohlenhydrat- und Proteingehalt deckt der Konsum von verarbeitetem Getreide einen Großteil des täglichen Bedarfs an B-Vitaminen (50-60 %) sowie vieler Mineralstoffe und Spurenelemente.

Getreide wird auf ca. 60 % der Weltackerfläche angebaut. Zu den bedeutendsten Getreidearten zählen Weizen, Roggen, Reis, Mais, Gerste, Hirse und Hafer, die sich aus den Wildformen von Gräsern entwickelt haben. Neben Mais und Reis ist Weizen mit einem Anteil von etwa 29 % der Weltgetreideproduktion eine der bedeutendsten Getreidearten. Dabei wird ca. 70 % des weltweit geernteten Weizens für die menschliche Ernährung verwendet (Belitz et al., 2008).

Die stoffliche Zusammensetzung verschiedener Getreidearten, welche in Abhängigkeit von der Sorte und den Anbaubedingungen variieren kann, veranschaulicht die Tabelle 1.

Tabelle 1: Chemische Zusammensetzung der Getreidearten (Belitz et al., 2008)

	Weizen [Gew.-%]	**Roggen** [Gew.-%]	**Mais** [Gew.-%]	**Gerste** [Gew.-%]	**Hafer** [Gew.-%]	**Hirse** [Gew.-%]
Wasser	13.2	13.7	12.5	11.7	13.0	12.1
Protein (Nx6.25)	11.7	9.5	9.2	10.6	12.6	10.6
Lipide	2.2	1.7	3.8	2.1	7.1	4.05
Kohlenhydrate	59.6	60.7	64.2	63.3	55.7	68.8
Ballaststoffe	13.3	13.2	9.7	9.8	9.7	3.8
Mineralstoffe	1.5	1.9	1.3	2.25	2.85	1.6

Der durchschnittliche Proteingehalt von Weichweizen (11.4-13.3 %) (Souci et al., 2016) ist von vielen Faktoren, wie z.B. Weizensorte (Genotyp) sowie Wachstumsbedingungen (z.B. Klima, Stickstoffdüngung, Bodenverhältnisse) abhängig.

Allgemein weisen die Weizenarten Dinkel, Emmer, Einkorn und Durum einen höheren Proteingehalt als Weichweizen auf, sodass Emmer mit einem Proteingehalt von 12-15 %, Einkorn mit 11-15 % und Durum mit 12-16 % deutlich über dem durchschnittlichen Gehalt von Weichweizen liegen (Longin et al., 2016).

1.1.1 Systematische Einordnung und Verwendung des Weizens

Weizen nimmt durch die Fähigkeit zur Kleberbildung und die darauf beruhende exzellente Backfähigkeit eine Sonderstellung unter den Getreidearten ein. Wie in Abbildung 1 zu erkennen, gehört der Weizen phylogenetisch gesehen zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*) und zur Gattung *Triticum* (Belitz et al., 2008).

Hartweizen (Durum) zählt zu den Sorten der tetraploiden Emmerreihe, deren Sorten meist begrannt sind. Weichweizen hingegen zählt zu der hexaploiden Dinkelreihe mit vorwiegend unbegrannten Sorten. Der Mehlkörper der Weichweizensorten ist gewöhnlich mehlig-weich, derjenige von Hartweizen glasig-hart. Bei der Vermahlung resultieren aus Weichweizen überwiegend Mehle und aus Hartweizen Grieße. Daraus hervorgehende Verwendungsmöglichkeiten sind für Mehle aus Weichweizen hauptsächlich Brot und Gebäcke und für Grieße aus Hartweizen Teigwaren (Kirsch und Odenthal, 2008).

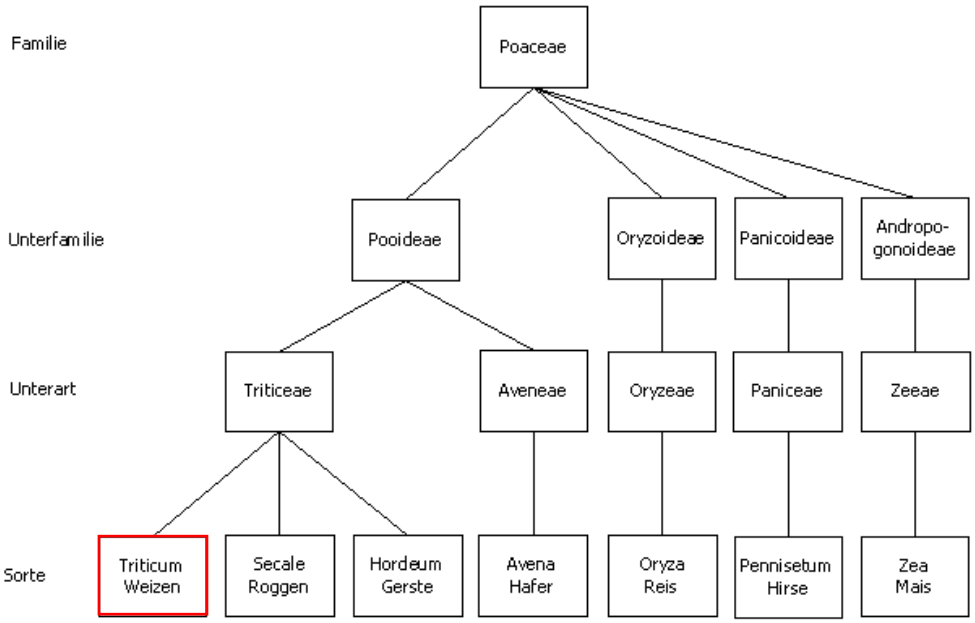


Abbildung 1: Phylogenie der Getreidearten (Belitz et al., 2008)

1.1.2 Aufbau eines Weizenkorns

Das Weizenkorn besteht im Wesentlichen aus drei Bestandteilen: dem Keimling, der Schale und dem Mehlkörper (Vgl. Abbildung 2).

Die Schale des Korns (15 Gew.-%) enthält v.a. Ballast- und Mineralstoffe sowie Proteine und Vitamine. Außer bei Vollkornmehl (Ausmahlungsgrad von 100 %) wird diese Schicht als Kleie beim Mahlen abgetrennt (Lindhauer, 2003).

Unterhalb der Frucht- und Samenschale, die u.a. als Schutz vor Feuchtigkeit und Schädlingen fungieren, liegt die proteinreiche Aleuronschicht. Hauptaufgabe dieser Schicht, die viele Vitamine und Enzyme enthält, ist die Bildung von Endospermzellen.

Die Aleuronschicht umhüllt den stärkehaltigen Mehlkörper, das sogenannte Endosperm, welcher als Nährstoffgrundlage des Keimlings bis zur Wurzelbildung dient. Die Endospermzellen machen über 80 % des Weizenkorns aus, sind dünnwandig und bestehen hauptsächlich aus Stärke und Protein, vorwiegend Gluten.

Der Keimling trägt deutlich erkennbare Wurzel- und Sprossanlagen. Die Wurzelanlage ist positiv gravitrop, d.h. die Hauptwurzel wächst Richtung Erdmittelpunkt. Die Sprossanlage hingegen ist negativ gravitrop, sodass die Halmanlagen entgegengesetzt zum Erdmittelpunkt wachsen. Der gesamte Keimling ist vom Scutellum überzogen (Kirsch und Odenthal, 2008). Mehr als 50 % der Mineralstoffe und fast 90 % der Ballaststoffe befinden sich in den Randschichten des Korns (Tscheuschner, 2017).

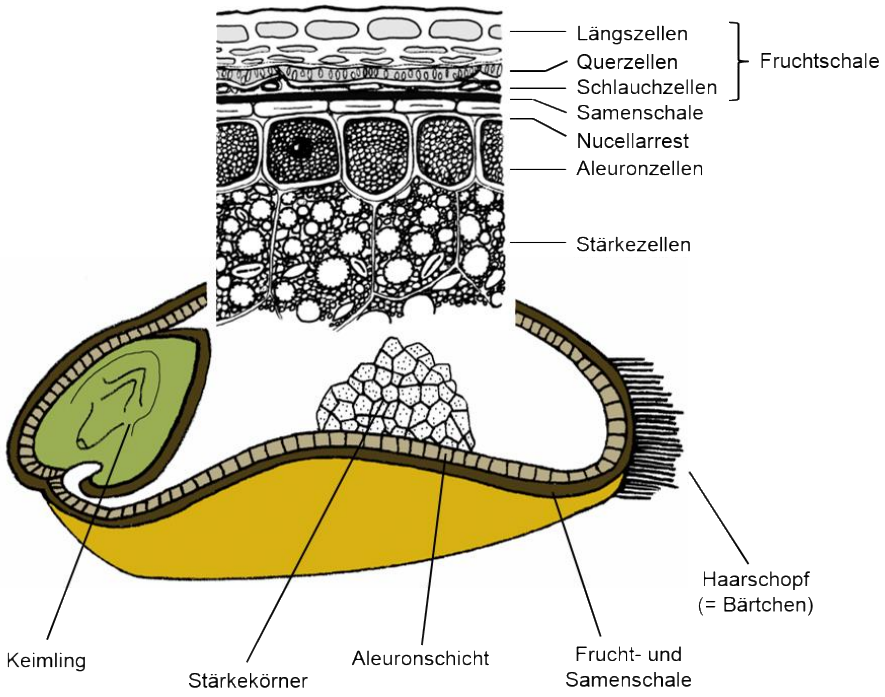


Abbildung 2: Schematischer Querschnitt durch ein Weizenkorn (Zeichnung in Anlehnung an Belitz et al. (2008) und Mueller (2016))

1.1.3 Kornhärte

Die Kornhärte des Weizens ist neben dem Proteingehalt ein wesentliches Qualitätsmerkmal und definiert als die zur Zerkleinerung der Körner erforderliche Kraft. Die Endosperm-Textur von Weichweizen (*Triticum aestivum* L.) reicht von sehr weich bis hart, wohingegen Hartweizen (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*) die härtesten Körner aller Weizenarten aufweist. Der Begriff Durum-Weizen für *T. turgidum* L. ssp. *durum* sowie die „weich"-/„hart"-Terminologie des Weizens für *T. aestivum*-Sorten ist in Nordamerika gebräuchlich. Im Gegensatz dazu werden in Europa die Bezeichnungen „weicher" und „harter" Weizen jeweils für *T. aestivum* und *T. turgidum* L. ssp. *Durum* verwendet (Delcour und Hoseney, 2010a).

Die Kornhärte des Weizens wird u.a. von genetischen Faktoren, Bodenbeschaffenheit sowie klimatischen Bedingungen beeinflusst und stellt ein charakteristisches Sortenmerkmal dar (Meuser et al., 1977, Turnbull und Rahman, 2002).

Die Kornhärte ist mit dem Proteingehalt korreliert, wobei die Härte strukturell von der Interaktion Stärke und Protein im Endospermgewebe reguliert wird. In den Endospermzellen wird bei der Protein- bzw. Stärkekornsynthese eine spezifische Packungsdichte erreicht, die u.a. von der Verteilung der Stärkekorngröße beeinflusst wird. Je größer die Stärkekörner sind, desto geringer die Packungsdichte. Ein kleinerer Durchmesser der Stärkekörner korreliert mit einer zunehmenden Oberfläche, sodass die Proteine sich gleichmäßig verteilen können. Dadurch werden die Stärkekörner so eingebaut, dass eine feste Stärke-Proteinbindung erreicht wird (Meuser et al., 1977).

Weizen mit härterem Endosperm weisen höhere Proteingehalte auf, wobei die Stärkekörner dicht gepackt in der Proteinmatrix liegen. Dabei sind Protein und Stärke nicht nur strukturell, sondern auch chemisch eng verbunden. Weizen mit weicherem Endosperm weisen häufig einen geringeren Proteingehalt auf, da sich im Endosperm zwischen den Stärkekörnern und der Proteinmatrix luftgefüllte Zwischenräume befinden. In dieser aufgelockerten Struktur ist keine geschlossene Proteinmatrix vorhanden, sodass das Protein vorwiegend aus isolierten Partikeln besteht, die kaum mit den Stärkekörnern interagieren (Barlow et al., 1973, Belderok et al., 2000).

Die Kornhärte wird zum einen durch die Zusammensetzung der Proteinmatrix reguliert und zum anderen durch Protein-Stärke-Bindungen (Anjum und Walker, 1991). Die Endospermtextur des Weichweizens ist aufgrund der diskontinuierlichen Proteinmatrix mürbe und porös (Abecassis et al., 2001). Unter den Weizenarten weist Durum (Hartweizen) die härteste Endospermtextur auf, die durch ein kompaktes Netzwerk, in dem die Stärkegranula eng miteinander verbunden sind, gekennzeichnet ist (Edwards et al., 2008). Die Stärkepartikel des Durum besitzen im Vergleich zu Weichweizen größere Mengen anhaftender Proteine (Anjum und Walker, 1991) sowie höhere Gehalte an Mineralstoffen und Fetten (Armanino et al., 2002).

Unterschiede in der Endospermtextur beeinflussen die Mehlqualität und somit die bevorzugte Verwendung. Die Kornhärte ist negativ mit der Mehlausbeute korreliert, sodass bei der Vermahlung von Weizen mit weichem Endosperm höhere Mehlausbeuten erreicht werden (Martin et al., 2001). Die Mehle weisen kleinere Partikelgrößen, geringere Gehalte an beschädigter Stärke sowie eine mäßige Wasserabsorption auf und finden v.a. bei der Keks- und Waffelherstellung Verwendung (Bonjean und Angus, 2001). Durch die starke Stärke–Protein-Interaktion erhält man bei der Vermahlung von Weizen mit hartem Endosperm Mehle mit hohen Stärkeschädigungsgraden. Diese sind aufgrund ihrer erhöhten Wasseraufnahme und dem höheren Proteingehalt bei der Herstellung von hefegelockerten Backwaren und Brot

gefragt. Mehl aus Weichweizen besitzt i.d.R. 2.0 - 4.0% beschädigte Stärke, Mehl aus Weizen mit hartem Endosperm 5.0 - 10.0% (Finney et al., 1988, Lin und Czuchajowska, 1996).
Bei der Vermahlung von Durum-Weizen zu Mehl werden durch die extrem harte Endospermtextur unvermeidbar hohe Stärkeschädigungsgrade erreicht. Aus diesem Grund wird Durum-Weizen fast ausschließlich zu Hartweizengrieß vermahlen, dessen Partikelgröße bis zu 500 µm beträgt (Dalbon et al., 1996, Posner, 2009). Hingegen weisen Mehle aus *T. aestivum* deutlich geringere Partikelgrößen zwischen 25-35 µm bei weichen Weichweizensorten bzw. 50-70 µm bei harten Weichweizensorten auf (Posner, 2009). Die Partikelgröße beeinflusst die Hydratation des Mehls dahingehend, dass kleinere Mehlpartikel eine höhere spezifische Oberfläche und folglich auch eine höhere Wasserabsorption aufweisen (Manley et al., 2011).

1.1.4 Die Qualitätsklassen des Weizens

Alle in Deutschland angebauten Weizensorten müssen vom Bundessortenamt zugelassen sein. Dabei werden die Weizensorten in bestimmte Backqualitätsgruppen eingeteilt. Die Zuordnung der Sorten zu den einzelnen Qualitätsgruppen basiert auf Grundlage von genau definierten Mindestanforderungen hinsichtlich agronomischer, technologischer und chemischer Eigenschaften (Vgl. Tabelle 2). Erfüllt z.B. eine Sorte in einer Eigenschaft nicht die festgesetzten Mindestanforderungen für eine Backqualitätsklasse, wird sie automatisch in die niedrigere Klasse eingestuft. Mit dieser Einteilung soll gewährleistet werden, dass nur Sorten mit einer insgesamt ausgewogenen Qualität auch der entsprechend höheren Qualitätsgruppe zugeordnet werden.

Tabelle 2: Mindestanforderungen für die Zuordnung von Weizensorten zu Qualitätsklassen (Bundessortenamt, 2017, Schuffenhauer et al., 2012)

Indirekte Qualitätsparameter	B-Weizen	A-Weizen	E-Weizen
	Backweizen	Qualitätsweizen	Eliteweizen
Proteingehalt	11.5 %	13.0 %	14.5 %
Fallzahl	220 s	240 s	270 s
Sedimentationswert	20	40	55
Hektolitergewicht	76 kg/hl	76 kg/hl	78 kg/hl

Das Bundessortenamt gibt jährlich eine „Beschreibende Sortenliste“ heraus, in der die zugelassenen und geschützten Sorten hinsichtlich ihrer für Anbau und Verwendung bedeutenden Eigenschaften beschrieben werden (Bundessortenamt, 2017).

1.1.5 Weizenproteine

Neben der Stärke sind Proteine die wichtigsten Inhaltsstoffe des Weizens und aus technologischer und ernährungsphysiologischer Sicht von großer Bedeutung. Die Weizenproteine sind in allen Schichten des Weizenkorns enthalten, wobei der Keimling und die Aleuronschicht relativ gesehen die höchsten Proteingehalte besitzen. Absolut gesehen enthält jedoch der Mehlkörper mit 80 % den höchsten Anteil am Gesamtprotein (Schäfer, 1985).

Bei Proteinen wird zwischen vier Strukturebenen (Primär-, Sekundär-, Tertiär-, Quartär-Struktur) unterschieden. Eine essentielle Rolle in der Proteinfunktionalität spielen die Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren innerhalb der Peptidkette, wobei in kovalente und nichtkovalente chemische Bindungen unterschieden wird. Nichtkovalente Bindungen sind Wasserstoffbrücken, van der Waals- und Ionenbindungen. Die Assoziationsenergie nichtkovalenter Bindungen ist im Vergleich zu der Energie kovalenter Bindungen sehr hoch. Kovalente Bindungen kommen hauptsächlich als Disulfidbindung zwischen den Peptidketten vor (Pomeranz, 1988).

Die Weizenproteine unterscheiden sich zum einen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung als auch in ihren physikalischen Eigenschaften, wie Löslichkeit und Dissoziation. Die Proteine können nach der 1907 von T.B. Osborne beschriebenen Methode nach Löslichkeit in vier Proteinfraktionen klassifiziert werden (Vgl. Tabelle 3):

Tabelle 3: Fraktionierung von Proteinen nach Osborne (Belitz et al., 2008)

Proteinfraktionen	Osborne-Fraktionen des Weizens	Anteil im Weizen
Albumine	Leukosin	14.7 %
Globuline	Edestin	7.0 %
Prolamine	Gliadin	32.6 %
Gluteline	Glutenin	45.7 %

Der Anteil an Albuminen und Globulinen im Weizenprotein liegt bei ca. 22 %. Diese Fraktionen kommen vor allem in den Randschichten des Weizenkorns vor. Albumine sind in Wasser löslich und besitzen eine durchschnittliche molare Masse von 12 000. Globuline sind erst in verdünnter Salzlösung löslich und besitzen eine mittlere Molmasse von ca. 25 000. Beide Fraktionen haben keine bekannte Bedeutung für die Backqualität eines Weizenmehls, leisten jedoch durch ihren erhöhten Gehalt an Lysin, Methionin und Tryptophan einen entsprechend höheren Nährwertbeitrag.

Prolamine und Gluteline machen etwa 80 % der Proteine im Weizen aus. Die Weizenprolamine werden als Gliadine und die Weizengluteline als Glutenine bezeichnet. Es handelt sich um Reserveproteine, die im Endosperm des Kornes gebildet werden.

Die Gliadine und Glutenine haben eine ähnliche Aminosäureverteilung, sie sind reich an Prolin und Glutamin und arm an basischen Aminosäuren.
Gliadine sind in wässrigen Alkoholen löslich. Die Fraktion ist aus monomeren Proteineinheiten aufgebaut, die durch **intra**molekulare Disulfidbrücken verknüpft sind. Gliadine haben eine molare Masse zwischen 30 000 – 55 000 und werden aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit im sauren pH-Bereich und ihrer N-terminalen Aminosäuresequenzen in α-, γ- und ω-Gliadine unterteilt. Im Teig sind sie für eine hohe Dehnbarkeit sowie eine hohe Viskosität verantwortlich.
Die ethanol-unlöslichen Glutenine sind hochmolekulare Polymere mit **intra**- und **inter**molekularen Disulfidbindungen, die nach Reduktion der Disulfidbindungen in wässrigen Alkoholen löslich werden. Die Gluteninfraktion wird nach elektrophoretischer Beweglichkeit ihrer Komponenten in der SDS-PAGE differenziert und besteht zu ca. 20 % aus den hochmolekularen (high-molecular-weight, HMW) Untereinheiten (schwefelarm) und zu 80 % aus den niedermolekularen (low-molecular-weight, LMW) Untereinheiten (schwefelreich). Die Gluteninuntereinheiten weisen Molmassen von 40 000 – 125 000 auf und sind sowohl für die Elastizität als auch den Dehnwiderstand des Teiges verantwortlich (Wieser, 2001).

Die Einteilung der Gliadin- und Gluteninfraktionen kann auch anhand der Molekulargewichte der einzelnen Proteintypen erfolgen.
Gliadinfraktion:

- mittelmolekulare Gruppe mit ω_5- und $\omega_{1,2}$-Gliadinen
- niedermolekulare Gruppe mit α- und γ-Gliadinen

Gluteninfraktion:

- hochmolekulare Gruppe mit x-Typ HMW-Untereinheiten (1-7) und y-Typ HMW-Untereinheiten (8-12)
- niedermolekulare Gruppen mit LMW-Untereinheiten (m-, s- und i-Typ)

Die Kleberproteine des Weizens werden durch neun Genloci auf den langen (LA) und kurzen Armen (KA) der Chromosomen des Genoms codiert. Die HMW-Untereinheiten (UE) befinden sich dabei auf den Genloci Glu-A1, Glu-B1 und Glu-D1 (LA). Da auf den Chromosomen der Gruppe 1 (1A, 1B, 1C) jeweils zwei Gene lokalisiert sind, die die HMW-UE vom Typ-x und Typ-y codieren, erfolgt eine gewisse Determinierung der Proteine. Jedoch werden nicht alle HMW-UE exprimiert, sodass die Anzahl der gefundenen HMW-UE zwischen drei und fünf liegt (Belitz et al., 2008).
Einen für die Backeigenschaften enorm wichtigen Parameter stellt aufgrund seines hohen Molekulargewichts das sogenannte Gluteninmakropolymer (GMP) dar. Wie aus Abbildung 3

hervorgeht, entspricht dieses dem hochmolekularen Teil der Glutenine und ist eines der größten, natürlich vorkommenden Biopolymere auf Proteinbasis (Weegels et al., 1996a). In Abhängigkeit von der Art und der Anzahl funktioneller Gruppen weisen Proteine sowohl hydrophile als auch hydrophobe Eigenschaften auf.

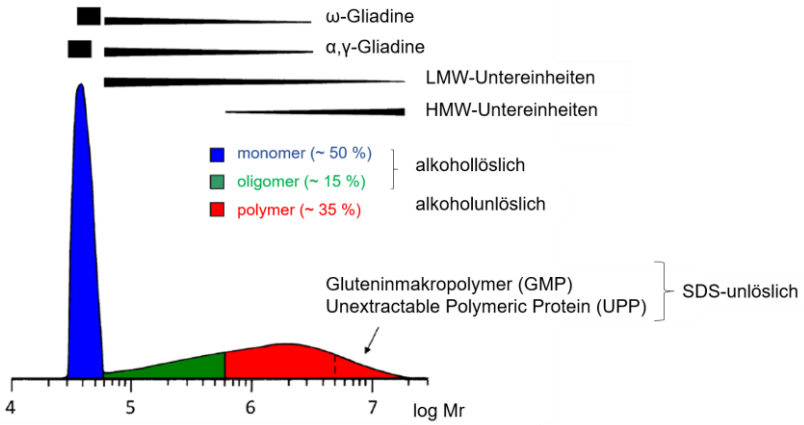


Abbildung 3: Molekulargewichtsverteilung der Kleberproteine (Koehler und Wieser, 2013)

1.1.6 Weizenkleber

Weizen nimmt innerhalb der Getreidearten eine Sonderstellung ein. Weizenmehl besitzt die einzigartige Eigenschaft, nur durch Zugabe von Wasser einen viskoelastischen und kohäsiven Teig zu bilden. Dieser Effekt ist auf den Kleber, das sogenannte Gluten, zurückzuführen. Der Kleber besteht zu 90 % aus Proteinen, zu 8 % aus Lipiden und zu 2 % aus Kohlenhydraten. Die Kohlenhydrate sind lösliche und unlösliche Pentosane, die durch Quellung einen Teil des Wassers binden.

Wie in Abbildung 4 zu erkennen, besteht der Kleber aus den Gliadinen und Gluteninen - einem sog. Zweikomponentensystem. Das System ist komplex aufgebaut und durch nicht-kovalente Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe und ionische Bindungen) sowie Disulfidbindungen verbunden. Die in Wasser und Salzlösungen unlöslichen Kleberproteine können durch Hydratisierung das Doppelte ihres Eigengewichts an Wasser binden. Der Glutengehalt sowie die Glutenzusammensetzung sind ausschlaggebend für die Backqualität von Weizenmehlen (Wieser, 2001).

Das Klebergerüst verleiht dem Teig Gashaltevermögen, sodass durch Gasbildung im Teig eine Schaumstruktur entsteht, die durch Backen zu Krume und Kruste verfestigt wird (Belitz et al., 2008).

Man vermutet, dass die Menge an HMW-Untereinheiten vom x-Typ, aber auch das Mengenverhältnis einzelner Gliadin- zu den Glutenin-Untereinheiten mit den rheologischen Eigenschaften des Klebers korreliert ist (Wieser, 1993).

Abbildung 4: Schematische Darstellung von Gluten (Wieser et al., 2014)

Ein wesentlicher Faktor für den Aufbau des Glutennetzwerks sind die Disulfidbindungen, wobei ca. 95 % des Gesamtcysteins als Disulfide vorliegt. Die Cysteinreste in den monomeren α- und γ-Gliadinen sind vorwiegend intramolekular gebunden. Hingegen bilden die HMW- und LMW-Glutenin-Untereinheiten sowohl inter- als auch intramolekulare Disulfidbindungen. Lediglich 5 % des Cysteins liegen in der Thiolform (SH-Gruppe) vor, wovon ca. 4.5 % proteingebundenes Cystein und 0.5 % niedermolekulare Thiolverbindungen (Glutathion, Cystin) darstellen (Antes und Wieser, 1999). Die Disulfidbindungen (SS-Bindungen) beeinflussen die funktionellen Eigenschaften der Weizenteige, wie beispielsweise die Elastizität und Festigkeit der Teige. Dabei sind die Disulfidbindungen entscheidend für die Teigstruktur. Die rheologischen Eigenschaften des Teiges werden auf das Verhältnis zwischen den SH-Gruppen und den SS-Gruppen zurückgeführt (Belitz et al., 2008).

1.1.7 Methoden zur Bestimmung der Backqualität von Weizenmehlen

Qualität und Quantität der Proteine sind zwei wesentliche Faktoren, um die Backeigenschaften eines Mehls zu bewerten. Die wasserunlöslichen Proteine (sog. Klebereiweiß) quellen bei der Teigherstellung, sind maßgeblich für den elastischen Teig verantwortlich und bilden das Klebergerüst. Die Kleberproteine (ca. 80 % der Gesamtmenge des Weizenproteins) bestimmen grundlegend die Teigeigenschaften, sodass quantitative und qualitative Analysen des Klebers unabdingbar sind.

Die Backqualität wird durch Backversuche erfasst, die jedoch durch ihren enormen Zeit- und Arbeitsaufwand und ihrer schwankenden Genauigkeit von Nachteil sind. Aktuelle indirekte Qualitätsparameter (Mehlkennzahlen) zur Vorhersage der Backqualität wurden von der ICC (International Association for Cereal Science and Technology) und der AACC (American Association of Cereal Chemists) zusammengefasst.

Für die Mühlen- und Backindustrie ist es heutzutage v.a. aus wirtschaftlichen und betrieblichen Gesichtspunkten von großer Bedeutung, Mehle mit spezifischen Eigenschaften für möglichst viele Produkte gezielt herzustellen und zu verarbeiten.

Als Anhaltspunkte zur Qualitätsabschätzung dienen dabei, u.a. die Analyse des Feuchtigkeitsgehaltes (ICC-Nr. 110/1 (ICC, 1976)) und die des Aschegehaltes (ICC-Nr. 104/1 (ICC, 1990)).

Zur Bestimmung des Aschegehaltes wird das Mehl in einem Verbrennungsofen bei 900 °C so lange verascht, bis der Mineralstoffrückstand zurückbleibt. Nach Bestimmung des Aschegehaltes in der Trockenmasse kann der Mineralstoffgehalt angegeben sowie die Mehltype berechnet werden (Multiplikation mit dem Faktor 1000). Da sich die Mineralstoffe vor allem im Randbereich des Weizenkorns befinden, gelangen mit steigendem Ausmahlungsgrad mehr Mineralstoffe in das Mehl. Parallel erhöht sich der Anteil an Lipiden, Ballaststoffen und Enzymen, während Kleber- und Stärkegehalt prozentual abnehmen.

Die Bestimmung des Feuchtigkeitsgehaltes ist wichtig, um eine konstante Wasserzugabe beim Anteigen bzw. bei Backversuchen zu gewährleisten. Die Lagerfähigkeit eines Mehles steht eng im Zusammenhang mit dem Feuchtigkeitsgehalt. Hohe Feuchtigkeitsgehalte (> 15 %) verkürzen die Lagerzeit eines Mehles, vermindern die Teigausbeute und die Mehle neigen zum Verklumpen.

Einen weiteren entscheidenden Qualitätsparameter stellt der Rohproteingehalt (RP-Gehalt) dar. Die Proteine, bestehend aus Kleber- und Nichtkleberproteinen, stellen die wesentlichen stickstoffhaltigen Bestandteile des Mehles dar. Der RP-Gehalt kann u.a. mittels Dumas-Analyse (ICC-Nr. 167 (ICC, 2000)) bestimmt werden. Bei dieser verbrennungsanalytischen Methode wird der Rohproteingehalt durch Multiplikation des ermittelten Gesamtstickstoffgehalts mit dem Faktor 5.7 bestimmt (Jakob et al., 1995). Nachteil ist die Miterfassung des nicht-proteinogenen Stickstoffs, der allerdings im Getreide vernachlässigbar ist. Vorteil der Rohproteinbestimmung nach Dumas ist der geringe Zeitaufwand (Seling, 2010). Weitere Methoden zur Rohproteingehaltsbestimmung stellen die Kjeldahl-Methode (ICC-Nr. 105/2 (ICC, 1994a)) und die Nah-Infrarot-Reflektions (NIR)-Spektroskopie dar.

Zur Bestimmung der rheologischen Teigeigenschaften und der Wasseraufnahme werden 10 g Mehl in den Farinograph-E (Fa. Brabender) gegeben und unter Wasserzufuhr geknetet (ICC-Nr. 115/1 (ICC, 1992)). Der sich bildendende Teigwiderstand beim Kneten wird in einem Kraft-Zeit-Diagramm (Farinogramm) aufgezeichnet. Die Wasseraufnahme [%] ist die Wassermenge, die dem Mehl zum Erreichen einer Teigkonsistenz von 550 FE zugegeben werden muss. Die Teigentwicklungszeit ist die Zeitspanne vom Beginn der Wasserzugabe bis zum Erreichen des höchsten Kurvenpunktes (optimale Knetzeit). Die Teigstabilität ist die Zeitspanne zwischen dem Punkt, an dem die obere Linie der Knetkurve die 550-FE-Linie überschreitet und dem Punkt, an dem die obere Linie der Knetkurve die 550-FE-Linie wieder unterschreitet. Dieser Wert gibt Hinweise über die Knettoleranz des Mehles. Die Teigerweichung ist der Kurvenwendepunkt nachdem die Kurve wieder abfällt, d.h. der Teig überknetet ist.

Aussagen über die Dehneigenschaften des Weizenteiges, das Gärverhalten und über das zu erwartende Brotvolumen können mittels Mikrozugversuchen getroffen werden. Dazu werden der Dehnwiderstand (R_{max}), die Dehnbarkeit (E_{max}) und die Dehnenergie (DE) in Teig- und Kleberzugversuchen an einem TA.XT plus Texture Analyzer mit Kieffer Dough & Gluten Extensibility Rig (Fa. Stable Micro Systems Ltd.) bestimmt (Koehler und Grosch, 1999). R_{max} wird als maximale Kraft des Extensogramms gemessen und zur Charakterisierung der, der Teigdehnung entgegenwirkenden, Kraft herangezogen. E_{max} des Teiges wird aus der Extensogrammlänge ermittelt. Die Verhältniszahl aus dem Quotienten R_{max}/E_{max} beschreibt das Verhalten während der Teiggare. Die DE (Fläche, die von der Kurve und x-Achse begrenzt wird) ist ein Maß für die Arbeit, die für die Dehnung des Teiges aufzuwenden ist (Kieffer et al., 1981).

Der Feuchtklebergehalt und der GlutenIndex der Mehle werden mittels Perten-Glutomatik Typ 2200 (Fa. Perten Instruments) ermittelt (ICC-Methode Nr. 137/1 (ICC, 1994b)). Man erhält den Feuchtkleber (FK) durch Auswaschen des Mehles mit NaCl-Lösung, wobei die Stärke und andere wasserlösliche Mehlbestandteile entfernt werden. Der Kleber bleibt als gequollene, elastische Masse zurück. Der FK-Gehalt eines Mehles und seine Beschaffenheit bestimmen maßgeblich das Verhalten des Teiges während des Knetens, der Gare und des Backvorgangs (Kieffer et al., 1998).

Zusätzlich kann die Glutenaggregationsfähigkeit mittels GlutoPeak Test (Fa. Brabender) ermittelt werden, wobei man in kurzer Zeit einen „rheologischen Fingerprint“ des Mehles erhält. Der Energieeintrag bei der Klebernetzwerk- bzw. Teigbildung ist über eine Drehmomentkurve abbildbar und ermöglicht Rückschlüsse auf rheologische Eigenschaften sowie Kleberqualität. Dabei werden das maximale Drehmoment (Maximum Torque, MT), die Zeit bis zum maximalen Drehmoment (Peak Maximum Time, PMT), der Aggregationsbeginn (Lift off Time, LoT) sowie die Aggregationzeit (Aggregation Time, AGT) bestimmt (Malegori et al., 2018, Marti et al., 2015).

Der wohl ausschlaggebendste Versuch zur Bestimmung der Backqualität von Weizenmehl ist der Mikro-Backtest (MBT). Dabei werden, unter gleichen Bedingungen und Berücksichtigung der Wasseraufnahme, 10 g-Brote gebacken und das Brotvolumen mittels Volumenmessgerät bestimmt. Das spezifische Brotvolumen aus einer Mehlmenge von 10 g korreliert dabei sehr gut mit den Ergebnissen eines Standardbackversuchs mit 1000 g Mehl (Kieffer et al., 1998).

1.1.8 Quantifizierung der Proteintypen und des Weizenklebers

Wichtige Anhaltspunkte für die Backqualität von Weizenmehlen liefert die Analyse der Proteinverteilung nach Osborne-Fraktionierung und Trennung der Proteinfraktionen mittels kombinierter Extraktions/Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC), bei der die Proteine auf Grundlage ihrer unterschiedlichen Löslichkeit stufenweise extrahiert werden.

In der klassischen Osborne-Fraktionierung würden die Ergebnisse der Proteinverteilung der Kleberproteintypen beeinflusst werden, sodass auf eine modifizierte Osborne-Fraktionierung durchgeführt wird, in der die Albumine und Globuline gemeinsam in Salzlösung extrahiert werden. Dabei sind Albumine gut wasserlöslich, wohingegen Globuline nur in einer wässrigen Salzlösung gelöst werden können. Die Gliadine sind überwiegend in wässrigem Ethanol löslich, wobei ein Teil der ω-Gliadine schon in reinem Wasser extrahiert wird. Im unlöslichen Rückstand befinden sich die höhermolekularen Glutenine. Für die Quantifizierung wird Mehl nacheinander zweimal mit gepufferter Natriumchlorid-Lösung (Albumine/Globuline) und dreimal mit 60 % (v/v) Ethanol (Gliadine) extrahiert. Um die Glutenine in Lösung zu bringen, werden diese zweimal mit N_2-gesättigter Reduktionslösung bei 60 °C behandelt, um die intermolekularen Disulfidbindungen zu spalten (Vgl. Abbildung 5).

Der Gehalt der Proteinfraktionen wird mittels RP-HPLC-Analyse an einer RP-C_{18}-Säule mittels externer Kalibrierung (Standard: PWG-Gliadin (van Eckert et al., 2006)) ermittelt. Die Detektion erfolgt mittels UV-Detektion bei λ = 210 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbiert die Peptidbindung aufgrund des freien π-Elektronenpaares über das gesamte CNO-Elektronensystem. Die ermittelten Absorptionsflächen stehen im linearen Zusammenhang mit der Proteinkonzentration (Wieser et al., 1998).

Eine weitere wichtige Methode ist die Analyse des Gluteninmakropolymers (GMP). Das GMP oder auch unextractable polymeric protein (UPP) ist definiert als hochmolekulares, in Natriumdodecylsulfat (SDS) unlösliches Proteinaggregat (Vgl. Abbildung 3). Bei Extraktion mit SDS in Natriumphosphatpuffer scheidet sich nach dem Zentrifugieren das GMP, eine gelartige Schicht, über der sedimentierten Stärke ab. Die Menge an GMP korreliert stark mit dem Backvolumen (Thanhaeuser et al., 2014). Die Quantifizierung erfolgt, nach SDSL-/GMP-Extraktion unter reduzierenden Bedingungen (Vgl. Abbildung 5), über Gel-Permeations-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (GP-HPLC) mit UV-Detektion bei λ = 210 nm. Die GP-HPLC ist eine Flüssig-Fest-Chromatographie an makroporösen Gelen sowie eine Größenausschlusschromatographie bei der Moleküle mit größerem Molekulargewicht zuerst eluiert werden, da sich die kleineren Moleküle in den Gelporen festsetzen (Gupta et al., 1993, Lottspeich und Engels, 2012).

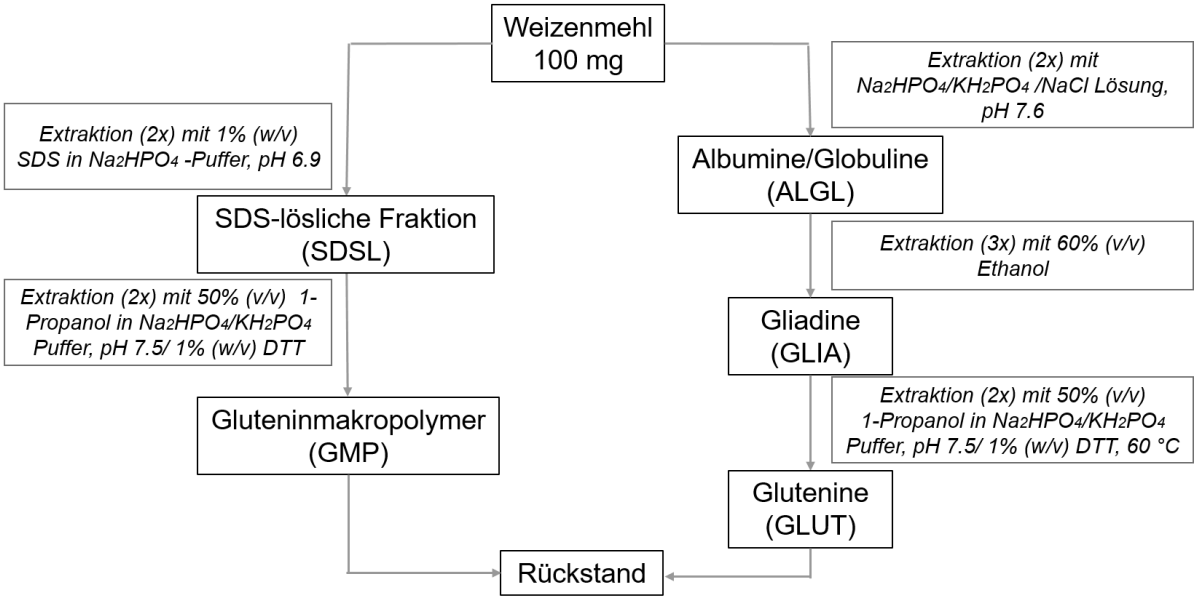


Abbildung 5: Extraktionsschema für Weizenproteine mittels SDSL/GMP-Fraktionierung (links) und modifizierter Osborne-Fraktionierung (rechts)

1.1.9 Weizenstärke

Die Stärke ist das bedeutendste Reservekohlenhydrat, welches im Weizenkorn einzig im Mehlkörper vorkommt. Die Polysaccharidmoleküle des Stärkekorns sind radial angeordnet, wobei ein Wechsel von amorphen (Amylose) und semi-kristallinen (Amylopektin) Schichten zu beobachten ist. Das Stärkekorn besteht zu etwa 25% aus linearkettiger Amylose und aus etwa 75% verzweigtem Amylopektin. Beim Erhitzen von Stärke in Wasser quellen die Körner und verkleistern. Heterobestandteile der Stärke sind Lipide, Proteine und Mineralstoffe. Die von der Stärke umgebenen Lipide hemmen die Stärkequellung und erhöhen die Verkleisterungstemperatur, sodass u.a. die Backfähigkeit beeinflusst wird (Becker und Acker, 1976, Belitz et al., 2008).

Die Weizenstärke ist in der Proteinmatrix eingebettet. Die kleineren kugelförmigen Stärkekörner sind 1-10 µm groß und machen 30-40 % der Weizenstärke aus. Die größeren, linsenförmigen Stärkekörner besitzen einen Durchmesser von ca. 15-30 µm (Evers und Lindley, 1977, Stevens und Evers, 1983).

Die Stärke beeinflusst die funktionellen Eigenschaften von Teigen und Broten hauptsächlich durch die Verkleisterung, die Retrogradation, die Quellung sowie die Viskosität, welche u.a. von diversen äußeren Faktoren abhängen. Die Stärkeretrogradation ist bei Amylose ein irreversibler Prozess, bei dem die verkleisterte Stärke nach dem Backvorgang in einen unlöslichen, mikrokristallinen Zustand übergeht und basiert auf der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und intermolekularen Bindungen. Dieser Prozess wird v.a. durch Amylose-Moleküle mit mittlerem Polymerisationsgrad (~ 80) forciert, deren Ketten sich beim Abkühlen unter Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und Wasseraustritt linear

aneinanderlagern. Durch eine Wanderung des Wassers aus Krume und Kruste wird die Brotkrume verfestigt und die Brotkruste lederartig, sodass dieser Prozess großen Einfluss auf das Altbackenwerden der Gebäcke nimmt. Die Retrogradation wird durch neutrale pH-Werte, niedrige Temperaturen (0 °C) sowie die Abwesenheit bzw. hohe Konzentrationen grenzflächenaktiver Substanzen stark begünstigt (Belitz et al., 2008, Fredriksson et al., 1998, Ribotta et al., 2004).

1.2 Vermahlung

Bei der Vermahlung werden die Weizenkörner gereinigt, anschließend die Mehl- und Schalenteile voneinander getrennt und die Mehlteilchen ausgemahlen. Der Mahlvorgang besteht aus zehn bis 20 Zerkleinerungsstufen. Der Plansichter sortiert das Mahlgut mittels Sieben unterschiedlicher Maschenweite. Die feinen Partikel werden als Mehl abgezogen, die groben Teilchen werden zurück zu den Walzenstühlen geschickt, wo sie nochmals zerkleinert werden. Die Abfolge von Mahlen und Sieben bezeichnet man als Passage. Diese wiederholen sich so oft, bis der erforderliche Trennungsgrad von Schalen- und Mehlteilchen erreicht ist. Die verschiedenen Mahlerzeugnisse (Schrot, Grieß, Dunst und Mehl) werden nach Partikelgröße separiert. Weiterhin entstehen im Mahlprozess Kleie und Keimlinge als Neben- bzw. Abfallprodukte.

Bei der traditionellen Vermahlung werden über die Struktureigenschaften sowie die Zusammensetzung des Mahlgutes, Weizenmehle zu definierten Mehltypen verarbeitet. Durch unterschiedliche Wasseraufnahmen, Kleberqualitäten, Protein- und Feuchtklebergehalte sowie Sedimentationswerte, können bestimmte Teigeigenschaften und die Backfähigkeit beeinflusst werden. Die Zusammensetzungen diverser Passagenmehle bestimmen u.a. den Mineralstoffgehalt sowie die Korngrößenverteilung. Mehle werden deshalb immer häufiger prozessiert, sodass sie inhaltsstofflich stark verändert werden (Mueller und Schneeweiß, 2001).

Durch zusätzliche thermische Behandlungen und mechanische Modifizierungen mittels Kugel- oder Prallmühlen können essentielle strukturelle und funktionelle Veränderungen der Mehleigenschaften erreicht werden. Durch bestimmte Verfahren, wie z.B. der Modifizierung der Korngrößenverteilung oder der funktionellen Mehleigenschaften (Stärkeschädigung, Glutenaggregation, Wasseraufnahme, u.a.) können neue Verwendungszwecke etabliert werden. Mechanisch modifizierte Mehle finden u.a. Verwendung als Haftmehle für unterschiedliche Lebensmittel, als Aromaträgerstoff für Getränke bzw. bei der Waffel- oder Keksherstellung (Banafa, 2004).

Bei der Prallzerkleinerung wirken höhere kinetische Energien als bei der Walzenzerkleinerung. Werden Mehle, die zuvor konventionell mit dem Walzenstuhl vermahlen wurden, mechanisch behandelt, kommt es zu einer effektiveren Zerkleinerung mit erhöhtem Feingutanteil, nachdem der Mehlkörper fast vollständig in Stärkepartikel und Protein aufgelöst vorliegt (Degant, 1996). Bei der Feinsttrennung wird das prallgemahlene Mehl mittels Windsichtung nach Partikelgröße in zwei Fraktionen separiert. Durch die Separation erhält man eine Feingutfraktion mit hohem Proteingehalt und eine Grobfraktion mit niedrigem Proteingehalt, sodass die stoffliche Zusammensetzung der Fraktionen sowie deren funktionellen Eigenschaften stark verändert werden (Zwingelberg, 1998).

Durch die Zerkleinerung während des Mahlprozesses wird die Struktur des Weizenmehles durch Modifikation der Stärke und der Proteine im Mehl maßgeblich verändert. Darüber hinaus werden die funktionellen Mehleigenschaften über Stärke- und Proteinmodifikation grundlegend beeinflusst. Die Art und der Umfang der Stärkeschädigung können u.a. durch die Vermahlung beeinflusst werden, sodass die während der Vermahlung eintretende Stärkemodifikation u.a. positiven Einfluss auf die Wasseraufnahme, das Brotvolumen und die Krustenbräunung hat. Die Wasseraufnahme der Stärke ist mit dem Ausmaß des Stärkeschädigungsgrades positiv korreliert, sodass ein hoher Anteil beschädigter Stärkekörner die Wasseraufnahme erhöht. Demgegenüber wird mit erhöhter Stärkemodifikation das Verkleisterungs- und Quellvermögen der Stärke stark verringert (Klingler et al., 1986). Eine Erhöhung des Stärkeschädigungsgrades führt in Verbindung mit starkem Gluten zu einem erhöhten spezifischen Brotvolumen, einer verbesserten Krustenbräunung sowie einer optimalen Aromabildung (Pelshenke et al., 1961).

Neben der Stärkemodifikation gibt es Hinweise, dass eine mechanische Modifizierung bei der Vermahlung auch zu einer Proteinmodifikation führen könnte. Über die möglichen Auswirkungen der Zerkleinerung auf die Proteineigenschaften liegen bislang keine Studien vor. Insofern ist es erforderlich, prozessbedingte Proteinmodifikationen nachzuweisen und deren Auswirkungen auf die Mehlfunktionalität aufzuklären, um sie in Zukunft zielgerichtet einsetzen zu können.

1.2.1 Walzenstuhl

Im Walzenstuhl *Brabender® Quadrumat® Junior* gelangen die Weizenkörner aus dem Vorratstrichter über eine verstellbare Speisevorrichtung auf die Walzen der ersten und zweiten Schroteinheit. Anschließend gelangt das Mahlgut in die „Grießauflösung“, wobei die zweite Walze der Schroteinheit gegen die Feinriffelwalze der Grießpassage arbeitet. Nach dem letzten Walzenpaar fällt das Mahlgut in den Rundsichter. Das vom Sichter sortierte Mehl fällt in die Mehlsammellade, die Kleie sammelt sich in einem separaten Kleiebehälter unter dem Sichterauslauf. Die Walzen sind dabei so eingestellt, dass ein Mehl der Type 450 – 550 entsteht. Das Mehl wird durch ein Sieb mit der Lochgröße 200 µm gesiebt (Type 550) (Brabender GmbH & Co. KG, 2017).

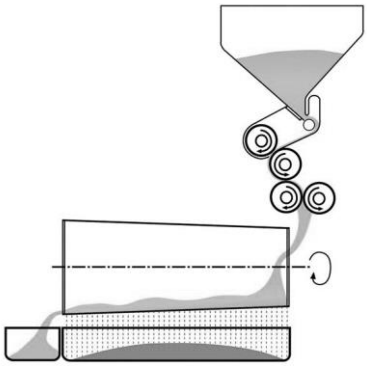


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Quadrumat® Junior (Brabender GmbH & Co. KG, 2017)

1.2.2 Kryomühle

Die verwendete *Retsch® CryoMill* ist eine speziell für Kryogenvermahlungen entwickelte Schwingmühle. Der Mahlbecher wird vor und während der Vermahlung durch ein integriertes Kühlsystem mit flüssigem Stickstoff kontinuierlich auf -196 °C gekühlt, wodurch die Probe versprödet wird. Der Mahlbehälter führt in horizontaler Lage kreisbogenförmige Schwingungen aus. Durch die Trägheit der enthaltenen Kugeln schlagen diese mit hoher Energie auf das Probengut auf, welches sich an den abgerundeten Stirnflächen des Mahlbechers befindet. Durch die Temperaturkonstanz und einer maximalen Schwingfrequenz von 30 Hz kommt es zu einer schnellen effektiven Zerkleinerung (Endfeinheit ~ 5 µm), deren Prinzip auf Prall und Reibung basiert (RETSCH GmbH, 2017a).

Bei der Kryozerkleinerung sind durch die Mahlbedingungen keine Hitzeschäden des Korns zu erwarten (Dhital et al., 2011, Wilczek et al., 2004).

Parameter wie Schwingfrequenz, Vorkühlzeit oder Mahldauer können variiert werden.

Abbildung 7: Retsch® CryoMill (RETSCH GmbH, 2017a)

1.2.3 Kugelmühle

Kugelmühlen kommen überall dort zum Einsatz, wo hohe Anforderungen an die Endfeinheit gestellt werden. Die extrem hohen Fliehkräfte der verwendeten *Retsch® Planeten-Kugelmühle PM 100* bewirken die Freisetzung sehr hoher Zerkleinerungsenergien, was sehr kurze Prozesszeiten ermöglicht.

Die Mahlbecher sind exzentrisch auf dem Sonnenrad der Kugelmühle angeordnet. Die Drehbewegung des Sonnenrades ist gegenläufig zur Drehung der Mahlbecher im Verhältnis 1:-2.

Die Mahlkugeln werden durch überlagerte Drehbewegungen, sogenannte Corioliskräfte, beeinflusst. Die Geschwindigkeitsdifferenzen zwischen Kugeln und Mahlbechern führen zu Wechselwirkungen aus Reib- und Prallkräften, wobei hohe Energien freigesetzt werden. Das Zusammenspiel dieser Kräfte bewirkt den sehr hohen und effektiven Zerkleinerungsgrad der in Kugelmühlen vermahlenen Mehle (Retsch GmbH, 2017b). Die hohen freigesetzten Energien führen allerdings auch zu einer schnelleren Erwärmung des Mahlgutes.

In der Kugelmühle *PM 100* können die Parameter Mahldauer, Drehfrequenz sowie die Größe und Anzahl der Kugeln variiert werden.

Abbildung 8: Retsch® Planeten-Kugelmühle *PM 100* (RETSCH GmbH, 2017b)

1.2.4 Prallmühle (Ultra-Zentrifugalmühle)

Die verwendete *Retsch® Ultra-Zentrifugalmühle ZM 200* wird zur schnellen Feinzerkleinerung von weichen bis mittelharten und faserigen Materialien eingesetzt.
Die Zerkleinerung erfolgt durch Prall- und Scherwirkung zwischen Rotor und feststehendem Ringsieb. Das Aufgabegut gelangt durch den Trichter auf den Rotor. Durch die Zentrifugalbeschleunigung wird es nach außen geschleudert und beim Auftreffen auf die mit hoher Geschwindigkeit umlaufenden keilförmigen Rotorzähne vorzerkleinert. Feinzerkleinert wird das Gut zwischen Rotor und Sieb. Diese zweistufige Zerkleinerung bewirkt die besonders schonende und schnelle Aufbereitung (RETSCH GmbH, 2016).

Abbildung 9: Retsch® Ultra-Zentrifugalmühle *ZM 200* (RETSCH GmbH, 2016)

In der Zentrifugalmühle *ZM 200* können die Parameter Drehfrequenz und Siebporengröße variiert werden. Die Drehfrequenz kann zwischen 6 000 und 18 000 rpm und die verwendete Sieblochgröße zwischen 80 und 500 µm variiert werden.

1.2.5 Zerkleinerungstechniken und deren Effekte auf die Stärkemodifikation

Der Begriff „Vermahlung“ bezeichnet die nacheinander ablaufenden Prozesse der Zerkleinerung und der Fraktionierung („Sichtung“), sog. Passagen. Bei der Fraktionierung werden die Mahlprodukte nach Partikelgrößen getrennt. Eine mechanische Beanspruchung findet vor allem während der Zerkleinerung statt, da hier die Kornstruktur des Getreides durch Krafteinwirkung aufgelöst werden soll. Durch den Zerkleinerungsprozess können dabei auch Struktur- und Funktionseigenschaften des Mehles über Stärke- bzw. Proteinmodifikation grundlegend beeinflusst werden. In den Mühlenunternehmen werden zum Trockenvermahlen von Weizen verschiedenste Mühlen eingesetzt: Walzenstühle kommen bei der konventionellen Zerkleinerung und Prallmühlen bei der Herstellung von Spezialmehlen zum Einsatz. Kryomühlen werden gegenwärtig lediglich im Labormaßstab für Forschungszwecke eingesetzt, wobei das Trockenmahlverfahren unter kryogenen Bedingungen (-196 °C) stattfindet. Das Mahlgut wird in Anwesenheit von Flüssigstickstoff zerkleinert, wodurch sehr kleine Partikelgrößen erzielt werden können (Dhital et al., 2011, Wilczek et al., 2004). Aufgrund

der kryogenen Bedingungen kann die rein mechanische Modifizierung auf das Stärkekorn analysiert werden, da unter diesen Bedingungen keine thermischen Einflüsse zu erwarten sind (Singh und Goswami, 1999), wobei die Molekularstruktur der Stärke durch Kryogenvermahlung nicht zwangsläufig zerstört wird (Tran et al., 2011). Meuser et al. (1978) zeigten, dass bei der Vermahlung unter kryogenen Bedingungen durch den geringeren Stärkeschädigungsgrad die funktionellen Eigenschaften der Stärke kaum beeinflusst werden. Weiterhin wurde festgestellt, dass bei der Zerkleinerung unter kryogenen Bedingungen Amylose-Ketten weniger stark gespalten werden als Amylopektin-Ketten (Dhital et al., 2011).
Bei Stärke mit einem hohen Amyloseanteil wurde bei der Kryogenvermahlung ein geringerer Modifikationsgrad bestimmt, als bei Stärke mit einem hohen Amylopektingehalt (Tamaki et al., 1997). Die Bildung von intermolekularen glykosidischen Bindungen durch mechanische Beanspruchung ist unwahrscheinlich, da hauptsächlich die innere Ketten des Amylopektins gespalten werden und die molekulare Struktur der α-D-Glucose unverändert bleibt (Meuser et al., 1978). Weiterhin gab es Theorien über eine sog. Abrasion bei der aus der Oberfläche der Stärkekörner herausragende Amylopektinmoleküle abgerieben werden (Stark und Yin, 1986).
Stiftmühlen bestehen aus zwei gegenläufig rotierender Stiftscheiben, die auf der gleichen Seite des Mahlbereichs angeordnet sind. Die Stifte werden einerseits von den Rotoren und andererseits von jeweils einem frei rotierenden Ring gehalten. In diesen Mühlen werden die Stärkekörner gebrochen und gespalten, wobei es zu einer Prallzerkleinerung kommt (Nowakowski et al., 1986).
Eine zusätzliche Möglichkeit zur Steuerung der Backfähigkeit ist die Aufbereitung von Weizenmehlen in vertikalen Rührwerkskugelmühlen (ATR). Die hierdurch erzeugten Attritionsmehle erreichen Endfeinheiten von bis zu 2 µm in Kombination mit einer hohen spezifischen Oberfläche. Im Vergleich zu Mahlerzeugnissen aus Walzenstühlen wird in den Mehlen aus Attritionsmühlen eine von bis zu 10 % erhöhte Wasseraufnahme beobachtet (Lange und Bode, 2003).
Untersuchungen zur strukturellen Stärkemodifikationen wurden vorwiegend an Prall- und Kryomühlen sowie ATR realisiert, jedoch kaum an den für die Weizenzerkleinerung etablierten Walzenstühlen. Temperaturen < 0 °C bzw. Pralleffekte werden in Walzenstühlen nicht beobachtet, sodass die Wirkung dieser Mühlen hinsichtlich der Stärkemodifikation mit den Effekten der Attritionsmühlen vergleichbar ist.
In Walzenstühlen wurde der Einfluss verschiedener Relativgeschwindigkeiten der Walzenpaare und Walzenoberflächen auf die Stärkemodifikation untersucht. Bei konstantem Förderstrom und unverändertem Mahlspalt wurden die geringste Stärkemodifikation bei grobgeriffelten Walzen und der höchste Stärkemodifikationsgrad bei glatten Walzen festgestellt. Die feingeriffelten Walzen erzeugen zwar die höchste Mehlausbeute, jedoch im Vergleich zu den glatten Walzen eine geringe Stärkeschädigung. Je höher die

Relativgeschwindigkeit der Walzen, desto stärker der Einfluss auf die Eigenschaften von Hartweizenmehlen. Eine daraus folgende erhöhte Stärkeschädigung bewirkt im Backprozess eine erhöhte Wasserbindung, die letztendlich zu einer verstärkten Saftigkeit des Brotes führt (Dexter et al., 1994, Evers et al., 1984, Evers und Stevens, 1988).

Darüber hinaus wurde der Einfluss von Kryo- und Hammermühlen auf Reiskörner untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei mittels Hammermühle gemahlenen Mehlen, Partikel mit runden Kanten und glatten Oberflächen entstehen. Das kryogen gemahlene Mehl weist dahingegen Partikel mit gezackten Kanten auf (Tran et al., 2011). Die Form der Stärkekörner hat zusätzlichen Einfluss auf den Modifikationsgrad, sodass die vorherrschenden ellipsenförmigen Körner stärkeren Veränderungen unterlagen als die runden Körner (Tamaki et al., 1997). Über den Verlust der kristallinen Stärkekörnerstruktur hinaus wurde eine Abnahme der Doppelhelices innerhalb der Stärkegranula beobachtet (Dhital et al., 2011, Liu et al., 2011, Morrison et al., 1994).

Daraus kann gefolgert werden, dass Stärkemodifikationen sowohl in den kristallinen Regionen als auch in den wenig geordneten Bereichen der Stärkekörner vorkommen. Der rückläufige Kristallisationsgrad geht möglicherweise auf die Spaltung der Amylopektin-Doppelhelices zurück (Liu et al., 2011, Morrison et al., 1994). Einige doppelhelikale Strukturen können nicht den kristallinen Bereichen zugeordnet werden (Dhital et al., 2011), sodass ein Stärkeübergang in amorphe Strukturen angenommen wird (Huang et al., 2007). Die Vermahlung mittels Kugelmühle bewirkt die Zunahme freier OH-Gruppen, die Spaltung von Wasserstoffbrückenbindungen sowie von glykosidischen Polymerbindungen (Meuser et al., 1978).

Eine Stärkemodifikation auf physikalischer (Brechen von Stärkekörnern), biochemischer (Erleichterung der Stärkehydrolysierbarkeit) und molekularer Ebene (Änderung der chemischen Struktur) erfolgt je nach Vermahlungsprinzip durch diverse Mühlentypen. Eine allgemeingültige Definition des Stärkemodifikationsgrades ist daher schwierig.

1.2.6 Zerkleinerungstechniken und deren Effekte auf die Proteinmodifikation

Die mechanische Modifizierung von Proteinen in Weizenmehl ist im Gegensatz zur mechanischen Stärkemodifizierung weitgehend unerforscht. Analysen an isolierter Stärke entsprechen nicht den realen Bedingungen im Mehl, da die Partikel in isolierter Stärke sehr viel kleiner sind als die Partikel nach der Vermahlung von Mehl. Zusätzlich bilden Proteine und weitere Zellwandbestandteile eine Schutzhülle um die Stärkekörner aus, die zu einem verringerten Anschwellen von Stärkekörnern und einem verminderten Aufreißen bereits gequollener Stärkekörner durch Ausbildung eines elastischen Netzwerks führt (Li et al., 2014).

Nach mechanischer Modifikation mittels Scheibenmühle wurde zwar ein erhöhter Stärkemodifikationsgrad nachgewiesen, aber der FK-Gehalt sowie der SDSL-Gehalt der Proteine unter nicht-reduzierenden Bedingungen waren unverändert (Barrera et al., 2007).
Hinweise auf eine Modifikation der Proteinstruktur sind die Zunahme der Nicht-Protein-Stickstoff-Verbindungen in wässriger Lösung sowie der wasserlöslichen Proteine bei steigendem Mehl-Modifikationsgrad (D'Appolonia und Gilles, 1967).
Ausgehend davon, dass es bei mechanischer Stärkemodifikation zur Spaltung glykosidischer Bindungen kommt, könnte es in gleicher Weise zur Spaltung von Peptidbindungen kommen.
Eine mögliche Folge könnte eine Erweichung des Klebers aufgrund der Depolymerisation von Kleberproteinen sein. Demgegenüber steht eine potenzielle Kleberverfestigung durch Oxidationsprozesse, die infolge der Oberflächenvergrößerung durch eine verringerte Partikelgröße denkbar ist.
Temperaturen über 55 °C ergaben in verschiedenen Mühlen (Hammer-, Kugel- und Steinmühle, Grobblechwalzwerk) hergestellten Vollkornmehlen bei erhöhter Wärmeintensität einen verminderten Gehalt an freien Gesamt-AS sowie HMW-Glutenin-UE (Prabhasankar und Haridas Rao, 2001).
Weizenkörner, die für 6 min bei 50-65 °C erhitzt und anschließend vermahlen wurden, zeigten in Kleberzugversuchen eine Abnahme der Dehnbarkeit sowie eine Zunahme des Dehnwiderstands. Die auf Wärmezufuhr zurückzuführende Kleberverfestigung wurde in Mikrobackversuchen verifiziert. Mittels Protein-Fraktionierung nach Osborne wurde gezeigt, dass sich die Gehalte der salz- (Albumine/Globuline, ALGL) und ethanol-löslichen (Gliadine, GLIA) Fraktionen verringerten, der ethanol-unlösliche Rückstand (Glutenine, GLUT) hingegen zunahm. Daraus können für die Glutenproteine hitzeinduzierte strukturelle und funktionelle Veränderungen abgeleitet werden (Kieffer und Belitz, 1993).
Eine definierte Erhitzung von Gluten bei unterschiedlichen Wassergehalten (6.9-55 %) für 30 min bei 80 °C beeinflusste die Extrahierbarkeit der Proteine in 1.5%iger SDS-Lösung immens. Eine stark verminderte SDS-Extrahierbarkeit wurde bei erhitztem Gluten mit Wassergehalten > 20 % nachgewiesen, woraus die Bildung kovalenter und nicht-kovalenter Cross-Links abgeleitet wurde. Die reduzierte SDS-Löslichkeit wurde auf die verminderte GLUT-Extrahierbarkeit durch einen erhöhten Aggregationsgrad zurückgeführt (Weegels et al., 1994b).
Bei Wassergehalten > 13 % nahm die Hydrophobizität ab, da beim Erhitzen die hydrophoben Gruppen durch Protein-Protein-Interaktionen agglomerierten. Jedoch wurden erst bei höheren Wassergehalten irreversible Änderungen in der Konformation bzw. den funktionellen Eigenschaften des Glutens festgestellt (Weegels et al., 1994a).
Die GLIA-Extrahierbarkeit aus Brot, v.a. der Kruste, mit 60 %igem Ethanol unter nicht-reduzierenden Bedingungen ist erheblich reduziert, wobei die cysteinhaltigen α- und γ-GLIA

stärker als die cysteinfreien ω-GLIA betroffen sind. Eine vollständige Extraktion der GLIA aus Brot wird nur unter reduzierenden Bedingungen und erhöhter Temperatur erreicht, wodurch es jedoch zu einer Co-Extraktion der GLUT kommt (Wieser, 1998).

Ähnliche Beobachtungen wurden bei der FK-Modifikation mit hydrostatischen Druck (0.1-800 MPa) und Temperaturen von 30-80 °C gemacht. Durch den steigenden Druck und erhöhte Temperatur gingen lediglich die cysteinreichen α- und γ-GLIA in die ethanol-unlösliche Fraktion über, nicht jedoch die Fraktion der cysteinfreien ω-GLIA. Dies weist auf die Spaltung **intra**molekularer Disulfidbrücken und deren Umlagerung zu **inter**molekularen Bindungen zwischen GLIA und GLUT hin. Eine deutliche Abnahme der ethanol-löslichen Fraktion und des Thiolgehaltes von Gluten, eine stark verringerte Kohasivität sowie eine Kleberverfestigung wurden bei hohem Druck (500 MPa) und hohen Temperaturen (70 °C) erreicht. Nur geringe Modifikationen wurden bei einem Anstieg der Temperatur von 30 °C auf 70 °C bei Atmosphärendruck (0.1 MPa) erreicht, wobei der Gehalt an ethanol-löslichen Proteinen lediglich von 67.0 % auf 62.9 % abnahm. Ebenso wurde gezeigt, dass ein Anstieg des Druckes von 0.1 MPa auf 500 MPa bei konstant niedriger Temperatur (30 °C) bereits eine Abnahme des Gehaltes an ethanol-löslichen Proteinen von 67.0 % auf 59.1 % bewirkte. Die gesamte Glutenfraktion war, abgesehen von extremer Hochdruckbehandlung, nach Reduktion der Disulfidbindungen in wässrigem Ethanol löslich. Mittels Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie wurde weiterhin eine Zunahme von α-Helices in den modifizierten GLIA festgestellt (Kieffer et al., 2007)

Mittels CD-Spektroskopie konnte die Sekundärstruktur (α-Helices, β-Faltblatt und β-Schleifen) der α-, β-, γ- und ω-GLIA untersucht werden. Dabei besitzen die ω-GLIA keine detektierbaren α-Helices bzw. β-Faltblattstrukturen, jedoch einen hohen Gehalt an β-Schleifen. Eine Hitzebehandlung führte zur Zunahme von ungeordneten Strukturen. Daher sind die ω-GLIA aufgrund starker hydrophober Bindungen stabilisiert. Die vorwiegenden Stützkräfte der α- und γ-GLIA sind hingegen nicht-kovalente Wasserstoffbrückenbindungen und kovalente Disulfidbindungen, die durch Hitze geschwächt werden (Tatham und Shewry, 1985).

Durch thermische FK-Modifikation nach Heißlufttrocknung resultierte bei Variation diverser Parameter (Trocknungstemperatur, Feuchtigkeitsgehalt, Anzahl an Trocknungszyklen) eine veränderte Viskoelastizität des Trockenklebers. Die Viskoelastizität des Klebers nahm mit steigender Trocknungstemperatur, geringerem Feuchtigkeitsgehalt und der Zunahme an Trocknungszyklen deutlich ab. Die sinkende Viskoelastizität spiegelte sich in der Zunahme der Teigentwicklungszeit sowie im verringerten spezifischen Brotvolumen wider (Meuser et al., 2002).

Insgesamt kann festgehalten werden, dass nach mechanischer und thermischer Modifikation der Mehle Proteinmodifikationen durchaus anzunehmen sind. Diese haben höchstwahrscheinlich Auswirkungen auf die funktionellen Eigenschaften der Mehle.

1.3 Puroindoline

Der Name „Puroindoline" ist aus dem griechischen Wort „πυρος" („puros"), welches „Weizen" bedeutet, und dem Wort „indoline", welches sich auf die Trp-reiche Domäne bezieht, abgeleitet (Pauly et al., 2013a).

Puroindoline (PIN) sind Weizenproteine, die an der Oberfläche der Stärkekörner lokalisiert sind und die Hauptkomponente von Friabilin darstellen, welches für einen biochemischen Marker der Härte der Weizenkörner gehalten wird. Friabilin, auch als „Anti-Haftprotein" bezeichnet, bewirkt eine schwächere Bindung zwischen den Stärkekörnern und der Proteinmatrix (Greenwell und Schofield, 1986). Um 1990 wurde entdeckt, dass Friabilin aus mehreren Proteinen zusammengesetzt ist und die Hauptkomponenten PIN A und PIN B darstellen (Jolly et al., 1993, Morris et al., 1994, Oda und Schofield, 1997). PIN sind u.a. für den Härtegrad von Weizenkörnern verantwortlich; fehlen sie, liegt eine harte Endospermtextur vor.

Symes (1965) zeigte, dass die Kornhärte nur durch ein wesentliches und einige untergeordnete Gene determiniert werden. Diese Strukturgene *Puroindolin a* (*Pina-D1), Puroindolin b (Pinb-D1)* und das *Grain-Softness-Protein* (*Gsp-1*) sind am Ende des kurzen Arms von Chromosom 5D lokalisiert und werden als „Hardness (Ha) locus" bezeichnet. Diese Gene kommen im Genom von diploiden und hexaploiden (AABBDD, 2n = 6× = 42) Weizenarten, wie z.B. dem Weichweizen (*T. aestivum*) vor. Bei tetraploiden Weizenarten (AABB, 2n = 4× = 28), wie z.B. dem Hartweizen (*T. turgidum* L. var. *durum*) werden diese Strukturgene wiederum nicht ausgebildet. Die Allele des Ha-Locus sind auf den Chromosomen 5A und 5B bei Durum vorhanden, wurden jedoch im Laufe der Evolution nicht mehr exprimiert (Bhave und Morris, 2008, Gautier et al., 2000, Giroux und Morris, 1998, Tranquilli et al., 1999).

Die Codierungssequenz der PIN beinhaltet 450 Basenpaare (ohne Introns), wobei PIN A und PIN B eine zu 70 % identische Codierungssequenz aufweisen, in der nicht codierten Sequenz 3` nur eine zu 50 % homologe Sequenz (Gautier et al., 1994). Das *Gsp-1* hat keinen Einfluss auf die Endospermtextur bzw. Kornhärte, ist jedoch in allen drei Weizengenomen (A, B und D) existent (Gollan et al., 2007, Morris, 2002, Tranquilli et al., 2002).

Die PIN weisen ein, dem Prolamin-ähnliches, Signalpeptid auf. Dieses besteht aus 20 Aminosäuren, die eine kurze positiv geladene mit einer anschließenden hydrophoben AS-Sequenz beinhaltet (Tosi, 2012).

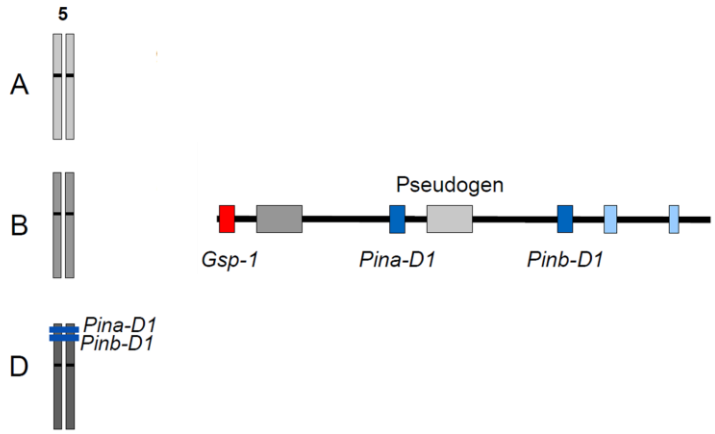


Abbildung 10: Lokalisierung und Aufbau des Hardness (Ha)-Gens, auf dem das 15 kDa-Protein Friabilin, bestehend aus Grain-Softness-Protein (*Gsp-1*), Puroindolin a (*Pina-D1*) und Puroindolin b (*Pinb-D1*), lokalisiert ist

Den Puroindolinen ähnliche Proteine wurden u.a. in Gerste (*Hordeum vulgare* L.), Roggen (*Secale cereale* L.) und Hafer (*Avena* L.) nachgewiesen. Gerste enthält die PIN-homologen Hordoindoline a (Hin A) und b (Hin B), welche auf dem kurzen Arm des Chromosoms 5H lokalisiert sind (Beecher et al., 2001). Es ist jedoch nicht eindeutig bewiesen, dass der Polymorphismus der Hordoindoline die Kornhärte der Gerste beeinflusst, da Turuspekov et al. zeigten, dass Unterschiede in der Gerstenkornhärte auch aus verschiedenen Saatkorngrößen resultieren können (Turuspekov et al., 2008). Roggen enthält die PIN-ähnlichen Secaloindoline a (Sec A) und b (Sec B). Bislang konnte kein Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus der Secaloindolin-Gene und der Kornhärte von Roggen hergestellt werden, da Roggensorten generell eine sehr weiche Endospermtextur mit geringen Abweichungen in der Kornhärte aufweisen (Simeone und Lafiandra, 2005). Hafer enthält die PIN-homologen Avenoindoline a (Ain A) und b (Ain B), welche eine zu 99.3 % bzw. zu 90.0 % identische Aminosäuresequenz zu den PIN aufweisen. Mais, Reis und Hirse besitzen keine PIN-ähnlichen Gene und eine sehr harte Korntextur (Gautier et al., 2000, Tanchak et al., 1998).

Greenwell und Schofield (1986) zeigten, dass die Endospermhärte von der Stärke der Wechselwirkung von Friabilin mit der Oberfläche der Stärkegranula abhängt. Hohe Gehalte an Friabilin werden mit weichen Stärkegranula des Weizens in Verbindung gebracht, wohingegen harte Stärkegranula mit einem geringen Friabilingehalt korrespondieren. Kein Friabilin wurde auf der Stärkeoberfläche von Durum-Weizen festgestellt. Friabilin wurde somit ursprünglich für ein „Antihaft“-Protein gehalten, welches die Haftung zwischen der Stärke und den Glutenproteinen verhindert.

Die Sequenzvariation am Kornhärtelocus Pin-D1 im Brotweizen führt je nach Ausprägung zu unterschiedlichen Phänotypen des Weizens (Vgl. Tabelle 4). Der Wildtyp ist durch die Variationen von *Pina-D1a* und *Pinb-D1a* gekennzeichnet und exprimiert einen „weichen“ Phänotyp (Doekes und Belderok, 1976). Hingegen führen Mutationen in einer der beiden *Pina-*

D1 oder *Pinb-D1* zu einer härteren Weizen-Endospermtextur (Gazza et al., 2005, Lillemo und Morris, 2000). In der Sequenzvariation *Pina-D1b* und *Pinb-D1a* führt die Gendeletion der ersten 21 Basenpaare dazu, dass die Exprimierung von PIN A unterbunden wird und ein sehr harter Phänotyp entsteht. Bei der Variation *Pina-D1a* und *Pinb-D1c* entsteht wiederum durch Punktmutation (Leu → Pro an Position 60) ein harter Phänotyp (Chen et al., 2013, Pauly et al., 2013a). Lokal am weitesten verbreitet sind Weichweizensorten mit dem Allel *Pinb-D1b*, deren Endospermtextur weicher ist als bei Weizensorten mit dem Allel PINA-null.

Tabelle 4: Korntextur von Weichweizen (*Triticum aestivum* L.), Allel-Bezeichnung und molekulare Änderung auf DNA- und Protein-Level von Puroindolin a (PIN A) und b (PIN B). Punktmutation von PIN B auf DNA-Level (fett und unterstrichen). Aufgelistet sind die meist vorkommenden Mutationen in Weichweizenarten in Europa und Nordamerika (Pauly et al., 2013a)

Korn-Textur	Allel-Bezeichnung		Molekulare Änderung	
	PIN A	PIN B	DNA-Level	Protein-Level
weich	*Pina-D1a*	*Pinb-D1a*	Wildtyp	Wildtyp
hart	*Pina-D1**b***	*Pinb-D1a*	Entfernen der ersten 21 Basenpaare	kein PINA
hart	*Pina-D1a*	*Pinb-D1**b***	**G**GC→**A**GC	Gly zu Ser an Position 46 (G46S)
hart	*Pina-D1a*	*Pinb-D1**c***	C**T**G→C**C**G	Leu zu Pro an Position 60 (L60P)
hart	*Pina-D1a*	*Pinb-D1**d***	TG**G**→AG**G**	Trp zu Arg an Position 44 (W44R)
hart	*Pina-D1a*	*Pinb-D1**e***	TG**G**→TG**A**	Trp zu vorzeitigen Stopp-Codon an Position 39
hart	*Pina-D1a*	*Pinb-D1**f***	TG**G**→TG**A**	Trp zu vorzeitigen Stopp-Codon an Position 44
hart	*Pina-D1a*	*Pinb-D1**g***	TG**C**→TG**A**	Cys zu vorzeitigen Stopp-Codon an Position 56

Puroindoline sind basische Proteine des Weizens (pI = 10), besitzen eine molare Masse von ca. 16 000, sind stark hydrophob und kationisch. PIN A (120 AS, M_r = 16 387) und PIN B (119 AS, M_r = 16 792) weisen nur eine zu 60 % homologe Aminosäuresequenz auf (Vgl. Abbildung 11), wobei PIN A fünf Trp-Reste (WRWWKWWK) und PIN B (WPTWWK) nur drei Trp-Reste innerhalb der Sequenz aufweist. Sowohl PIN A als auch PIN B enthalten zehn Cysteinreste, welche fünf intramolekulare Disulfidbindungen ausbilden (Gautier et al., 1994, UniProtKB, 2017a, UniProtKB, 2017b).

Die Gene der *Pina-D1* und *Pinb-D1* codieren endosperm-spezifische lipidbindende Proteine des Weizens mit einem spezifischen Trp-reichen Bereich, der für die starke Affinität zwischen dem *Puroindolin-D1*-Protein und polaren Lipiden verantwortlich gemacht wird (Gautier et al., 2000).

Die oberflächenaktiven Eigenschaften von Puroindolinen hängen mit ihrer starken Affinität zu Lipiden zusammen. Dabei steigt die Schaumkraft in Gegenwart von polaren Lipiden stark an (Dubreil et al., 1997, Wilde et al., 1993).

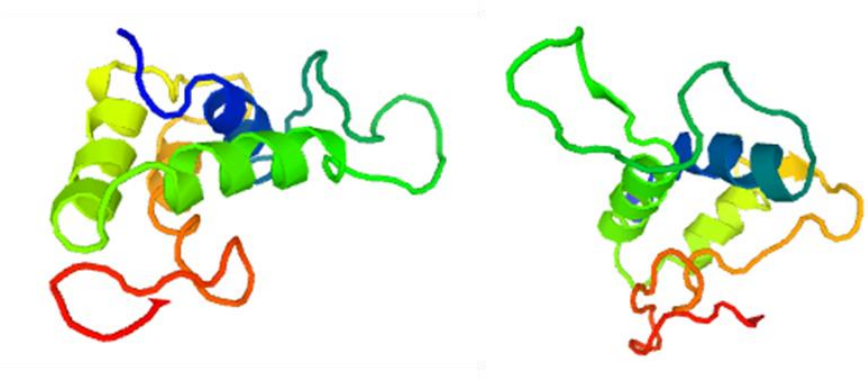


Abbildung 11: 2D-Proteinmodell von PIN A (links) und PIN B (rechts) [http://www.proteinmodelportal.org/]

Der Gehalt an polaren Lipiden auf der Oberfläche der Stärkegranula scheint dem gleichen Schema zu folgen wie der des Friabilins, da hohe bzw. geringe Gehalte polarer Lipide auf der Oberfläche der Stärkegranula in weichen bzw. harten Weichweizen vorkommen (Greenblatt et al., 1995). Die Lipide werden in Verbindung mit der Stärkegranula-Oberfläche gebracht, welche aus einer Biomembran-Lipid-Doppelschicht stammt, die den Amyloplasten umgibt, welcher die Stärke synthetisiert und diese während der Entwicklung des Getreidekorns speichert. Zwischen dem Reife- und dem Keimungsprozess wird diese Amyloplast-Lipidmembran abgebaut (Tan und Morrison, 1979). Stärkegranula ausgereifter Weizenkörner sind somit Amyloplast-Rückstände, auf denen Reste vertrockneter Membranen gefunden wurden (Barlow et al., 1973). Die Zusammensetzung der in Weizen gebundenen polaren Lipide ähnelt denen der Amyloplast-Membranen der Kartoffelknollen, sodass beide höhere Gehalte an Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), Digalactosyldiacylglycerol (DGDG) und Phosphatidylcholin (PC) aufweisen als Lipidmembranen anderer Spezies (Fishwick und Wright, 1980).

PIN bewirken u.a. Protein-Lipid-Interaktionen in Teigen bestimmter Weizenarten (*Triticum aestivum*, *Triticum spelta*, u.a.) und bilden eine ausgeprägte Grenzflächenstabilisierung um die Gasblasen in einem Teig, welche u.a. die Teigkohäsivität und das Gebäckvolumen verbessern. Weiterhin verkürzen die PIN die Teigentwicklungszeit, aktivieren Lipasen und erzeugen feine Porenstrukturen (Gan et al., 1995, Giroux und Morris, 1998).

Es wird vermutet, dass PIN und Lipide fest an der Oberfläche der Stärkegranula gebunden sind. Es wurde gezeigt, dass polare Lipide (v.a. Phospholipide) an den Wechselwirkungen zwischen Lipiden, PIN und Stärke beteiligt sind, wobei mehr als ein Mechanismus vorkommt. In Abbildung 12 ist die schematische Darstellung dieser möglichen Interaktionen zwischen den endogenen Weizenlipiden und den PIN auf der Oberfläche der Stärkegranula dargestellt. Abbildung 12.1 zeigt, dass die Lipide eine Brücke zwischen der Oberfläche der Stärkegranula und den PIN bilden könnten. In Abbildung 12.2 wiederum bilden die PIN eine Brücke zwischen der Oberfläche der Stärkegranula und den Lipiden, was aufgrund der Lipidbindung vermutlich zu Änderungen in der Konformation führt. Weiterhin gibt es Hinweise, dass lediglich eine

direkte Bindung zwischen der Oberfläche der Stärkegranula und den Lipiden, ohne Beteiligung der PIN (Abbildung 12.3) besteht. Hingegen können die PIN ohne Lipid-Interaktion keine direkte Bindung mit der Oberfläche der Stärkegranula eingehen. In einer letzten Hypothese geht man davon aus, dass eine vernetzte Bindung von der Oberfläche der Stärkegranula, den PIN und den Lipiden besteht (Abbildung 12.5). Phospholipide haben sehr wahrscheinlich, im Vergleich zu den Glycolipiden, den größeren Einfluss bei der Bindung zwischen PIN und Stärke (Abbildung 12.1 und Abbildung 12.5). Wenngleich die meisten Lipasen den PIN-Gehalt an den Stärken reduzieren, werden die PIN nur minimal von der Oberfläche entfernt. Möglicherweise können die Lipasen die PIN-gebundenen Lipidkomplexe, aufgrund sterischer Hinderung durch die PIN, nicht hydrolysieren (Pauly et al., 2014).

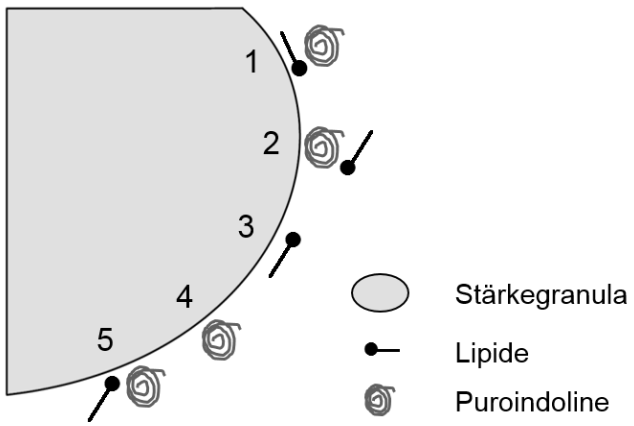


Abbildung 12: Schematische Darstellung von möglichen Interaktionen zwischen endogenen Weizenlipiden und PIN auf der Oberfläche der Stärkegranula (Zeichnung in Anlehnung an Pauly et al. (2014))

Gegenwärtig wird weithin akzeptiert, dass die PIN die genetische Grundlage der Weizenkornhärte darstellen, wobei die Veränderungen in einem der *Pina-D1*- oder *Pinb-D1*-Gene bzw. das Fehlen des *Pina-D1*-Gens mit einer zunehmenden Kornhärte korrelieren. Der Gehalt an polaren Lipiden auf der Oberfläche der Stärkegranula steht in Verbindung mit dem PIN-Gehalt. Da die PIN *in vitro* eine hohe Affinität für polare Lipide aufweisen, wird vermutet, dass diese Lipide (Rückstände der Amyloplastmembran) auch einen Einfluss auf die Weizenhärte haben. Es wird für wahrscheinlich gehalten, dass PIN durch Stabilisierung der Amyloplastmembran während der Samenreife und der Trocknung einen Einfluss auf die Korntextur haben. In Hartweizen findet eine solche Stabilisierung nicht bzw. nur in geringem Ausmaß statt, wodurch ein intensiverer Kontakt zwischen Stärke und Gluten sowie eine harte Korntextur resultieren. Schon geringe Unterschiede in der Aminosäuresequenz, wie z.B. Punktmutationen nehmen einen enormen Einfluss auf die Kornhärte. Dabei wird angenommen, dass bei den PIN-Modifikationen ein unterschiedliches Lipid-Bindungsvermögen vorliegt. Gegenwärtig ist nicht bekannt, ob dies ein direkter oder ein durch Konformationsänderungen hervorgerufener Effekt ist. Dabei würde die Aufklärung der

genauen 3D-Struktur der PIN mehr Informationen über den Mechanismus der Kornhärteentwicklung und des Lipid-Bindungsvermögen der PIN liefern (Pauly et al., 2013a).
Zur Extraktion der Puroindoline wird Weizenmehl (*Triticum aestivum*, L.) zur Isolierung der Stärkefraktion in Wasser suspendiert. Die Weizenstärke wird mit Triton X-114, einem nichtionischen Detergenz, extrahiert. Das Triton X-114 löst sich in wässrigen Puffern bei 0 °C, trennt sich jedoch bei Temperaturen über 22 °C in zwei Phasen: eine ölige untere und eine wässrige obere Phase. Während der Phasentrennung kommt es zu einer Anreicherung von hydrophilen Proteinen in der detergenzarmen, wässrigen Phase, während sich Membranproteine und PIN in der detergenzreichen Phase anreichern. Das Verhalten bei der Phasentrennung legt nahe, dass PIN durch ihren amphiphilen Charakter eine ausgeprägte Grenzflächenaktivität und starke lipidbindende Eigenschaften besitzen.
Eine Möglichkeit zum Nachweis von PIN ist die Analyse mit einem indirekten Enzym-Immuntest (enzyme linked immunoassay sorbent assay, ELISA). Eine weitere Möglichkeit ist die Analyse der Allelvariationen des nativen Ha-Locus mittels RT-PCR (Real Time-Polymerase Chain Reaction). Obwohl bekannt ist, welche PIN-Varianten in den verschiedenen Weizensorten vorliegen, sind Informationen über deren Gehalte spärlich. Eine LC-MS-Methode zur Quantifizierung von Puroindolinen in Weizenmehl existiert gegenwärtig nicht (Chen et al., 2013, Pauly et al., 2013b).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Die funktionellen Eigenschaften von Weizenmehl werden durch die Zerkleinerung während der Vermahlung über Modifikationen der Stärke im Mehl grundlegend beeinflusst. Die während der Vermahlung eintretende Stärkemodifikation hat u.a. einen positiven Einfluss auf das Brotvolumen und die Krustenbräunung. Es gibt Hinweise, dass eine mechanische Modifizierung bei der Vermahlung neben der Stärkemodifikation auch zu einer Proteinmodifikation führen könnte. Über die möglichen Auswirkungen der Zerkleinerung auf die Proteineigenschaften liegen bislang keine Studien vor. Eine umfassende Aufklärung der Mehlfunktionalität war bisher durch die nicht charakterisierte Proteinmodifikation stark eingegrenzt. Eine zielgerichtete Anwendung von funktionalisierten Weizenmehlen mit spezifischen Eigenschaften wäre dann möglich, wenn die Modifikationen auf Proteinebene gezielt über Einstellung der Prozessparameter bei der Zerkleinerung beeinflusst werden könnten. Insofern ist es erforderlich, prozessbedingte Modifikationen auf Proteinebene nachzuweisen und deren Auswirkungen auf die Mehlfunktionalität aufzuklären, um sie in Zukunft zielgerichtet einsetzen zu können.

Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Proteinmodifikationen, um Qualitätseigenschaften von Mehlen bei der Herstellung gezielt zu beeinflussen und somit bestimmte Produkteigenschaften zu erzielen. Weiterhin sollten funktionelle Veränderungen in Abhängigkeit von der Behandlung definiert werden. Zur Bestimmung der Backqualität und Charakterisierung der modifizierten Weizenmehle wurden sowohl standardisierte Backversuche, chemisch-analytische Analysen sowie rheologische Methoden herangezogen. Im Einzelnen sollte dabei die Etablierung von Analysenmethoden zur Erfassung der Proteinmodifikation sowie die Untersuchung der Auswirkungen der Proteinmodifikation auf die funktionellen Eigenschaften im Vordergrund stehen, sodass letztendlich die Proteinmodifikationen mit den technologischen Eigenschaften von Weizenmehl korreliert werden sollten.

Weiterhin sollte eine LC-MS-Methode zur Quantifizierung von Puroindolinen in Weizenmehl entwickelt werden. Puroindoline (PIN) sind Weizenproteine, die an der Oberfläche der Stärkekörner gebunden sind und die Hauptkomponente von Friabilin darstellen. Friabilin, das sog. „Anti-Haftprotein“, bewirkt eine schwächere Bindung zwischen den Stärkekörnern und der Proteinmatrix und ist ein Gemisch aus mehreren Proteinen, hauptsächlich aus PIN A und PIN B. PIN sind u.a. für den Härtegrad von Weizenkörnern verantwortlich; fehlen sie, liegt eine harte Korntextur vor. Obwohl bekannt ist, welche PIN-Varianten in den verschiedenen Weizensorten vorliegen, sind Informationen über deren Gehalte spärlich. Die Methode soll dazu dienen, Korrelationen zwischen der PIN-Konzentration und der Backqualität von Weizen aufzustellen.

3 Ergebnisse und Diskussion

Zu Beginn der Arbeit werden unter Zuhilfenahme der Beschreibenden Sortenliste des Bundessortenamtes zwei gängige deutsche Weichweizensorten (*Triticum aestivum* L.) mit großer Vermehrungsfläche und geringer Amylaseaktivität sowie mittlerem Proteingehalt ausgewählt. Es handelte sich hierbei um die Sorten Akteur (Backqualitätsklasse E) und Julius (Backqualitätsklasse A). Beide Sorten wiesen über die letzten Jahre konstant hohe Saatgut-Vermehrungsflächen auf, wobei cv. Julius im Jahr 2014 eine Vermehrungsfläche von 3674 ha und cv. Akteur eine Vermehrungsfläche von 1576 ha umfasste (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2014). Die Körner wurden mittels Walzenstuhl auf Type 550 vermahlen (Kunstmühle Buchloe) und anschließend zwei Wochen gelagert. Während dieser Mehlreifung kommt es zu hydrolytischen und oxidativen Prozessen, wie. z.B. der Abnahme des Gehaltes an freien Thiolgruppen (Wieser, 2012).

Die darauffolgende Nachvermahlung bzw. Modifikation der Basismehle erfolgte mittels Kugelmühle (KM) und Ultra-Zentrifugalmühle (ZM, Prallmühle) unter Variation entsprechender Zerkleinerungsparameter, wie Drehzahl, Sieblochgröße, Mahldauer sowie Anzahl und Größe der Kugeln. Anschließend wurden die Proteinmodifikationen über die Verteilung der Osborne-Fraktionen mittels eines kombinierten Extraktion/Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC)-Verfahrens bzw. über die SDSL/ GMP-Verteilung mittels eines kombinierten Extraktion/Gel-Permeations-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (GP-HPLC)-Verfahrens nachgewiesen. Bei der Osborne-Fraktionierung wurden die salzlöslichen Albumine/ Globuline (ALGL), die in 60 %igem Ethanol löslichen Gliadine (GLIA) sowie die unter reduzierenden Bedingungen löslichen Glutenine (GLUT) analysiert. Die Stärkeschädigung wurde in einer amperometrischen Methode mittels SDmatic bestimmt (ICC-Methode Nr. 172). Weiterhin wurde die Molekulargewichtsverteilung der Weizenproteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) unter reduzierten Bedingungen analysiert. Die Anzahldichteverteilung der modifizierten Mehle wurde an einem Partikelgrößenmessgerät (Mastersizer 300, Malvern Instruments, Malvern, Großbritannien) ermittelt. Zur weiteren funktionellen Charakterisierung wurden nach Aufnahme der Kneteigenschaften (Wasseraufnahme, Teigentwicklungszeit, Teigstabilität) im Farinographen (AACC 54-22) Mikrozugversuche mit Teig- und Feuchtklebersträngen (Dehnwiderstand, Dehnbarkeit und Dehnenergie), der Brabender GlutoPeak Test, die Bestimmung des Gluten-Indexes sowie Mikrobackversuche im 10 g-Maßstab durchgeführt. Nach dem Backen wurde das spezifische Brotvolumen (specific loaf volume, SLV) via lasergestütztem Volumenmessgerät und nach definierten Zeitintervallen die Krumentextur am Texture Profile Analyzer analysiert. Eine Übersicht der durchgeführten Analysen, unterteilt nach technologischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften, zeigt Abbildung 13.

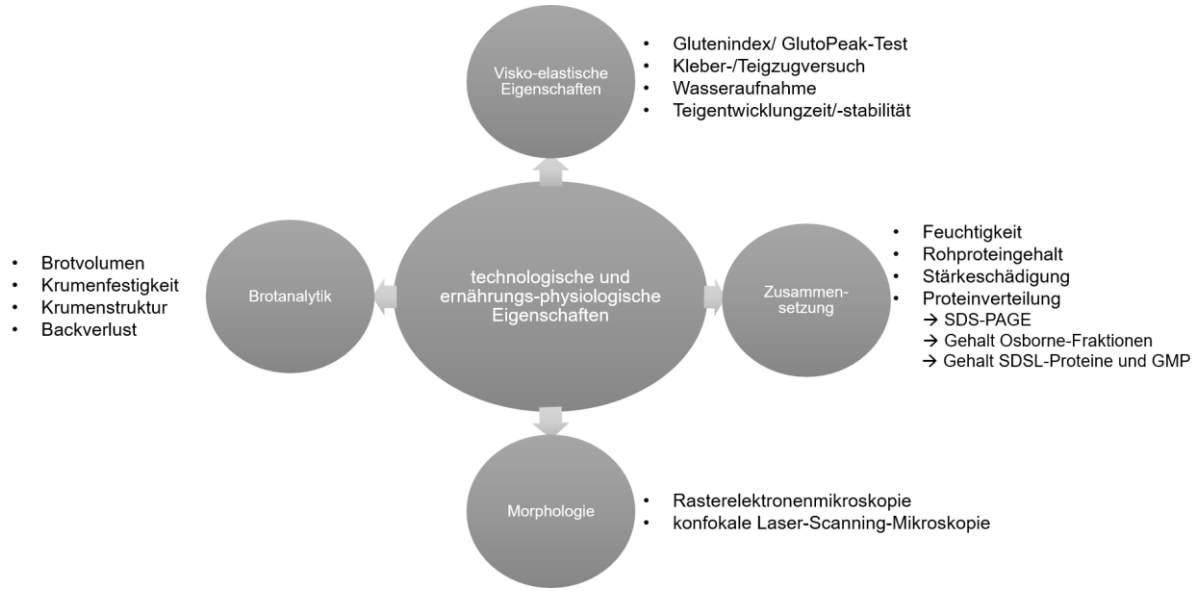


Abbildung 13: Konzeption zur Realisierung der Arbeitspakete

3.1 Grundbestimmungen

3.1.1 Rohproteingehalt nach Dumas (ICC-Standard Nr. 167)

Der Rohproteingehalt der Mehle wurde durch eine Verbrennungsanalyse nach Dumas bestimmt (Vgl. 4.2.1.3). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Rohproteingehalte der Mehle, bestimmt nach ICC-Standard Nr. 167

Mehl	Rohproteingehalt [%] [a]
Akteur 2014 (E)	10.4 ± 0.1
Julius 2015 (A)	11.3 ± 0.2

[a] *Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung*

Der durchschnittliche Rohproteingehalt für den Eliteweizen cv. Akteur von 10.4 ± 0.1 % war auffallend niedrig. Der für Eliteweizen zu erwartende Gehalt liegt bei mind. 14.5 %, also etwa 30 % höher. Auch der durchschnittliche Rohproteingehalt für den A-Weizen cv. Julius von 11.3 ± 0.2 % war relativ niedrig. Der für A-Weizen zu erwartende Rohproteingehalt liegt im Bereich zwischen 10.8 - 13.0 % (Seling, 2010) bzw. bei mindestens 13.0 % (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, 2012).

Die Rohproteingehalte der verwendeten Mehle waren für die jeweiligen Backqualitätsklassen sehr niedrig. Bei Untersuchungen von Finney und Barmore (1948), die ein großes Sortiment Weizenmehle analysierten, lagen die Rohproteingehalte zwischen 8 – 18 %. Im Gegensatz zu kommerziellen Mehlen, die häufig als Mehlmischung vertrieben werden, handelte es sich bei den Weizenmehlen cv. Akteur und cv. Julius um sortenreine Mehle. Die Mehle wurden von Züchtern bezogen, deren Ziel die Saatgutvermehrung und nicht die Herstellung von Rohstoffen für die Lebensmittelindustrie war. Daher wiesen die sortenreinen Mehle geringere Proteingehalte als kommerzielle Mehlmischungen auf.

3.1.2 Feuchtigkeitsgehalt

Der Feuchtigkeitsgehalt der Mehle wurde bestimmt, um z.B. die Mehleinwaage in der SDmatic (Stärkeschädigungsgrad) bzw. in Backtests zu korrigieren, da die meisten Standard-Analysenmethoden für Mehle mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 14.0 % definiert sind.
Der Feuchtigkeitsgehalt der Mehle wurde mittels eines elektronischen Feuchtebestimmers (Vgl. 4.2.1.2) bestimmt. Die für die Mehle cv. Akteur und cv. Julius ermittelten Feuchtigkeitsgehalte sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Feuchtigkeitsgehalte der Mehle, bestimmt mittels elektronischem Feuchtebestimmer

Mehl	Feuchtigkeitsgehalt [%] [a]
Akteur 2014 (E)	14.4 ± 0.2
Julius 2015 (A)	14.8 ± 0.1

[a] *Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung*

Ein etwas niedrigerer Feuchtigkeitsgehalt von 14.4 ± 0.2 % wurde bei cv. Akteur (E) festgestellt. Jedoch lagen beide Feuchtigkeitsgehalte der von der Kunstmühle Buchloe vermahlenen Mehle etwas über dem standardisierten, handelsüblichen Durchschnitt von 14.0 % (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2014).

3.1.3 Aschegehalt (ICC-Standard Nr. 104/1)

Als Asche wird die Menge an Mineralstoffen bezeichnet, die nach der Veraschung im Muffelofen bei 900 °C als unverbrennbarer Rückstand zurückbleibt. Über die Bestimmung des Aschegehaltes kann die Mehltype eines Mehles ermittelt werden, indem der Aschegehalt mit dem Faktor 1000 multipliziert wird. Die Mehltype 550 weist normalerweise einen Aschegehalt zwischen 0.51 % und 0.63 % in der Trockenmasse auf (DIN 10355, 2017).
Der Aschegehalt der Mehle wurde nach der ICC-Standardmethode Nr. 104/1 (ICC, 1990) bestimmt (Vgl. 4.2.1.4). Für die untersuchten Mehle wurden folgende Aschegehalte ermittelt:

Tabelle 7: Aschegehalte der Mehle, bestimmt nach ICC-Standard Nr. 104/1

Mehl	Aschegehalt i.T. [%] [a]
Akteur (E)	0.67 ± 0.02
Julius (A)	0.63 ± 0.01

[a] *Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung; bezogen auf die Trockenmasse*

Der Aschegehalt des cv. Akteur betrug 0.67 ± 0.02 % und überschritt damit den Höchstwert für Mehl der Type 550 (0.63 %), sodass das Basismehl cv. Akteur der Type 812 zugeordnet werden müsste. Der Aschegehalt der Sorte Julius war 0.63 ± 0.01 % und lag damit an der oberen Grenze der für Mehle der Type 550 definierten Gehalte.

3.2 Modifizierungen der Basismehle mittels Zerkleinerung durch verschiedene Mühlentypen

Die thermisch-mechanischen Modifikationen der auf Walzenstühlen vorvermahlenen Basismehle erfolgten mittels Planeten-Kugelmühle (*PM 100*) und Ultra-Zentrifugalmühle (*ZM 200,* beide Fa. Retsch®) unter Variation der entsprechenden Zerkleinerungsparameter.

3.2.1 Mechanische Modifikationen mittels Kugelmühle

Die Zerkleinerung des Probenmaterials erfolgt bei der Kugelmühle *PM 100* durch Druck und Reibung, was bei entsprechendem Mahlmodus eine Zerkleinerung mit geringem Abrieb bewirkt.

Die Modifikationen der Basismehle cv. Akteur und cv. Julius wurden mit definierter Einwaage (150 ± 1 g) in einem 500 mL-Mahlbecher realisiert. Die verwendeten Mahlparameter (Vgl. 4.2.2) erzeugten je nach Intensität der Behandlung eine Temperaturerhöhung im Mahlgut, welche direkt nach der Vermahlung mittels eines Infrarot-Thermometers gemessen wurde.

Generell war zu erkennen, dass mit steigender Drehzahl und Mahldauer die Temperatur des Mahlgutes nach Vermahlung kontinuierlich zunahm (Vgl. Tabelle 8). Vor allem bei den höheren Drehzahlen (500/600 rpm) stieg die Temperatur des Mahlgutes bis auf 100 °C. Gegenläufig nahm der Feuchtigkeitsgehalt bei steigender Drehzahl und Mahldauer kontinuierlich ab. Nach 20-minütiger Behandlung bei 600 rpm mit 8 Kugeln mit einem Durchmesser von 30 mm (8 x Ø 30 mm) nahm der Feuchtigkeitsgehalt des Basismehles (14.4 ± 0.2 %) um über 60 % auf 5.6 ± 0.3 % ab.

Der Parametervergleich der Kugelvariationen 8 x Ø 30 mm und 4 x Ø 40 mm zeigte, dass die Temperaturentwicklung im Mahlgut direkt nach der Vermahlung sowie der resultierende Feuchtigkeitsgehalt unabhängig von der Kugelzusammensetzung war.

Lediglich der Vergleich der Feuchtigkeitsgehalte bei höchster Umdrehungszahl von 600 rpm zeigte nach 20-minütiger Mahldauer eine deutlich stärkere Abnahme bei der Kugelvariation 8 x Ø 30 mm auf 5.6 ± 0.3 % im Vergleich der Variation 4 x Ø 40 mm auf 6.7 ± 0.1 %.

Die hohen, im Mahlgut entstehenden Temperaturen, ließen eine erkennbare Modifikation in den Proteinfraktionen erwarten, welche anschließend mittels Osborne-Fraktionierung (Vgl. 3.3.3.1) untersucht wurde.

Tabelle 8: Temperatur und Feuchtigkeitsgehalt des Mahlgutes cv. Akteur und cv. Julius nach KM-Modifikation

Anzahl/ Größe Kugeln	Drehzahl [rpm]	Zeit [min]	cv. Akteur		cv. Julius	
			Temperatur [°C][a]	Feuchtigkeit [%][a]	Temperatur [°C][a]	Feuchtigkeit [%][a]
8 x Ø 30 mm	300	5	28.8 ± 2.0	14.3 ± 0.0	-[b]	-[b]
		10	34.9 ± 2.0	14.2 ± 0.1	-[b]	-[b]
		15	38.9 ± 2.0	14.0 ± 0.0	-[b]	-[b]
		20	41.2 ± 2.0	13.9 ± 0.0	-[b]	-[b]
	400	5	37.3 ± 2.0	14.2 ± 0.0	-[b]	-[b]
		10	46.4 ± 2.0	13.7 ± 0.1	-[b]	-[b]
		15	52.4 ± 2.0	13.6 ± 0.3	-[b]	-[b]
		20	59.0 ± 2.0	13.2 ± 0.1	-[b]	-[b]
	500	5	52.3 ± 2.0	13.9 ± 0.1	52.3 ± 2.0	13.9 ± 0.2
		10	67.4 ± 1.3	12.8 ± 0.1	67.1 ± 1.3	12.6 ± 0.1
		15	75.2 ± 1.5	11.9 ± 0.1	77.2 ± 1.5	11.8 ± 0.1
		20	82.2 ± 1.6	11.4 ± 0.0	87.0 ± 1.7	11.3 ± 0.1
	600	5	63.2 ± 2.0	12.6 ± 0.1	59.5 ± 2.0	12.7 ± 0.1
		10	82.9 ± 1.6	9.9 ± 0.0	82.0 ± 1.6	9.5 ± 0.1
		15	96.2 ± 1.9	7.8 ± 0.3	91.1 ± 1.8	7.8 ± 0.1
		20	100.0 ± 2.0	5.6 ± 0.3	98.8 ± 2.0	6.8 ± 0.1
4 x Ø 40 mm	500	5	50.8 ± 2.0	13.9 ± 0.1	-[b]	-[b]
		10	63.0 ± 2.0	13.7 ± 0.2	-[b]	-[b]
		15	71.2 ± 2.8	12.6 ± 0.1	-[b]	-[b]
		20	80.2 ± 2.5	12.0 ± 0.1	-[b]	-[b]
	600	5	58.0 ± 2.0	13.6 ± 0.1	-[b]	-[b]
		10	80.4 ± 1.6	11.8 ± 0.2	-[b]	-[b]
		15	96.0 ± 1.9	8.9 ± 0.2	-[b]	-[b]
		20	100.0 ± 2.0	6.7 ± 0.1	-[b]	-[b]

[a] Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung; [b] nicht bestimmt

3.2.2 Mechanische Modifikationen mittels Zentrifugalmühle

Die Zerkleinerung des Probenmaterials erfolgte bei der Ultra-Zentrifugalmühle *ZM 200* durch Prall- und Scherwirkung. Die anfängliche Grob- und anschließende Feinzerkleinerung bewirkte eine besonders schnelle Vermahlung.

Die Modifikationen der Basismehle wurden durch die in Tabelle 61 aufgeführten Mahlparameter (Variation der Drehzahl und Sieb-Porengröße) realisiert. Wie aus Tabelle 9 hervorgeht, stieg die Temperatur mit steigender Drehzahl und geringer werdender Sieb-Porengröße kontinuierlich an. Bei der Sieb-Porengröße von 500 µm stieg die Temperatur auf maximal 36.5 ± 2.0 °C (Drehzahl: 18 000 rpm). Die relativ geringe Zunahme war auf die vorangegangene Sichtung der Basismehle auf 200 µm zurückzuführen. Das Basismehl mit einer maximalen Teilchengröße von 200 µm konnte somit fast ungehindert das Sieb durchdringen und erfuhr kaum eine Modifikation durch Prall- bzw. Scherkräfte.

Tabelle 9: Parametereinstellungen der ZM, Temperatur und Feuchtigkeitsgehalt des Mahlgutes cv. Akteur nach Modifikation

Drehzahl [rpm]	Sieb-Porengröße [µm]	Temperatur [°C] [a]	Feuchtigkeitsgehalt [%] [a]
6 000	80	76.5 ± 1.3	9.7 ± 0.1
	120	65.5 ± 1.3	10. 9 ± 0.1
	200	31.1 ± 2.0	13.7 ± 0.1
	500	25.5 ± 2.0	14.0 ± 0.1
12 000	80	113.0 ± 2.3	5.9 ± 0.1
	120	73.8 ± 1.5	9.2 ± 0.1
	200	46.9 ± 2.0	11.9 ± 0.1
	500	32.8 ± 2.0	13.7 ± 0.1
18 000	80	117.0 ± 2.3	4.5 ± 0.1
	120	103.5 ± 1.8	5.7 ± 0.1
	200	61.5 ± 2.0	10.8 ± 0.1
	500	36.5 ± 2.0	13.4 ± 0.1

[a] *Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung*

Anders bei der Verwendung des 80 µm-Siebes, bei dem es bei einer Drehzahl von 18 000 rpm zu einem Temperaturanstieg bis auf 117.0 ± 2.3 °C kam. Diese hohen Temperaturen wurden durch Modifikationen in der Kugelmühle *PM 100* (Vgl. 3.2.1) nicht erreicht.

Wie aus Tabelle 9 ersichtlich, nahm der Feuchtigkeitsgehalt im Mehl mit steigender Drehzahl und geringer werdender Sieb-Porengröße ab. Der Ausgangsfeuchtigkeitsgehalt von 14.4 ± 0.2 % sank bei der Verwendung des 500 µm-Sieb nur unwesentlich auf minimal 13.4 ± 0.1 % (Drehzahl: 18 000 rpm). Bei der intensivsten Behandlung, der Verwendung des 80 µm-Siebes und einer Drehzahl von 18 000 rpm, sank der Feuchtigkeitsgehalt auf bis zu 4.5 ± 0.1 %.

3.3 Chemisch-physikalische Untersuchungen der modifizierten Mehle

3.3.1 Bestimmung des Stärkeschädigungsgrades mittels SDmatic

Da die Osborne-Fraktionierung eine relativ zeitintensive und aufwendige Analysenmethode zur Untersuchung der Proteinfraktionen darstellt, wurde zunächst die Stärkeschädigung der mechanisch modifizierten Mehle untersucht. Diese relativ schnelle und simple Methode (AACC 76-33.01) wurde mittels SDmatic (Fa. Chopin Technologies, Deutschland) realisiert.
Das Prinzip der Methode beruht auf der schnelleren Iodabsorption geschädigter Stärke im Vergleich zu nativer Stärke. Das Mehl wurde in eine auf 35.9 °C erwärmte Lösung aus Borsäure, Kalium-Iodid und Natriumthiosulfat gegeben, sodass eine Suspension entstand. Die Iodmenge, die in einem bestimmten Zeitraum adsorbiert wurde, wurde durch amperometrische Titration bestimmt. Die Stromstärke war umgekehrt proportional zum Stärkeschädigungsgrad, sodass ein geringer Messwert einer hohen Stärkeschädigung entsprach.

3.3.1.1 Stärkeschädigung nach Modifikation in der Kugelmühle

Der Stärkeschädigungsgrad des Basismehles cv. Akteur lag bereits bei 5.1 ± 0.1 %. Wie aus Tabelle 10 zu erkennen, stieg der Schädigungsgrad mit steigender Drehzahl und zunehmender Mahldauer kontinuierlich an. Die Zunahme der Stärkeschädigung flachte jedoch nach einer Mahldauer von 10 min stark ab, sodass der Schädigungsgrad im Zeitraum von 15 - 20 min nur noch um ca. 1 % zunahm.
Beim Vergleich der Kugelvariationen wurden bei 8 x Ø 30 mm und einer Drehzahl von 500 rpm deutlich niedrigere Schädigungsgrade ermittelt, als die bei 4 x Ø 40 mm. Beim Vergleich der Kugelvariationen bei 600 rpm wurden nahezu identische Werte ermittelt. Diese Ergebnisse waren nicht mit dem Verlauf des Feuchtigkeitsgehaltes und der Temperatur im Mahlgut in Einklang zu bringen, bei denen die 4 x Ø 40 mm-Kugeln immer geringere Auswirkungen aufwiesen.
Ein beachtlicher Anstieg der Stärkeschädigung wurde schon nach kurzer Zeit bei Drehzahlen von 500 rpm bis 600 rpm beobachtet. Weiterhin ist ersichtlich, dass durch die Variation der Kugelgrößen bzw. -anzahlen nur marginale Unterschiede im Stärkeschädigungsgrad auftraten. Auch geringere Drehzahlen (300 rpm) erreichten eine deutliche Zunahme der Stärkeschädigung bis auf 7.4 % (8 x Ø 30 mm, Mahldauer: 20 min) (Vgl. Tabelle 10).
Der Ausgangsstärkeschädigungsgrad des Basismehles cv. Julius lag mit 5.7 % etwas höher als die des cv. Akteur (5.1 %). Im Vergleich nahm die Stärkeschädigung bei beiden Mehlsorten gleichermaßen zu. Dabei waren die Stärkeschädigungsgrade von cv. Akteur und cv. Julius nach einer 20-minütigen Behandlung bei 600 rpm fast identisch.

Tabelle 10: Stärkeschädigungsgrad nach AACC 76-33.01 [%] der Mehle cv. Akteur und cv. Julius nach Modifikation in der KM

Anzahl und Größe der Kugeln	Drehzahl [rpm]	Zeit [min]	Stärkeschädigungsgrad [%] [a]	
			cv. Akteur	cv. Julius
Basismehl			5.1 ± 0.1	5.7 ± 0.0
8 x Ø 30 mm	300	5	6.1 ± 0.0	-[b]
		10	7.0 ± 0.1	-[b]
		15	7.3 ± 0.1	-[b]
		20	7.4 ± 0.1	-[b]
	400	5	6.9 ± 0.1	-[b]
		10	7.3 ± 0.0	-[b]
		15	7.6 ± 0.0	-[b]
		20	7.7 ± 0.1	-[b]
	500	5	7.8 ± 0.1	7.8 ± 0.0
		10	7.9 ± 0.3	8.4 ± 0.0
		15	8.3 ± 0.2	8.6 ± 0.0
		20	8.5 ± 0.0	8.6 ± 0.1
	600	5	8.0 ± 0.1	8.1 ± 0.0
		10	8.6 ± 0.0	8.7 ± 0.0
		15	8.7 ± 0.0	8.7 ± 0.1
		20	8.8 ± 0.0	8.7 ± 0.0
4 x Ø 40 mm	500	5	8.0 ± 0.0	-[b]
		10	8.4 ± 0.0	-[b]
		15	8.7 ± 0.1	-[b]
		20	8.7 ± 0.0	-[b]
	600	5	8.3 ± 0.0	-[b]
		10	8.6 ± 0.0	-[b]
		15	8.7 ± 0.0	-[b]
		20	8.8 ± 0.0	-[b]

[a] Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung; [b] nicht bestimmt

3.3.1.2 Stärkeschädigung nach Modifikation in der Zentrifugalmühle

Wie aus Tabelle 11 zu erkennen ist, stieg der Stärkeschädigungsgrad der ZM-modifizierten Mehle mit steigender Drehzahl und Verringerung der Siebporengröße kontinuierlich an. Der maximale Schädigungsgrad von 8.5 % wurde nach Modifikation des cv. Akteur bei 18 000 rpm und einer Sieb-Porengröße von 80 µm bestimmt.

Der mittels ZM ermittelte maximale Stärkeschädigungsgrad von 8.5 % erreichte nicht die hohen Werte, die mittels KM-Behandlung induziert wurden (Vgl. 3.3.1.1).

Tabelle 11: Stärkeschädigungsgrad nach AACC 76-33.01 [%] des Mehles cv. Akteur nach Modifikation mit der ZM

Drehzahl [rpm]	Sieb-Porengröße [µm]	Stärkeschädigungsgrad [%] [a]
Basismehl		5.1 ± 0.1
6 000	80	6.5 ± 0.1
	120	5.8 ± 0.1
	200	5.7 ± 0.1
	500	5.2 ± 0.2
12 000	80	7.9 ± 0.2
	120	7.3 ± 0.1
	200	6.9 ± 0.1
	500	5.5 ± 0.1
18 000	80	8.5 ± 0.0
	120	8.3 ± 0.0
	200	7.6 ± 0.1
	500	5.7 ± 0.1

[a] *Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung*

Diskussion

Insgesamt eignet sich die SDmatic sehr gut, um erste Aussagen über den Grad der mechanischen Schädigung treffen zu können. Vorteil der SDmatic ist u.a. die Genauigkeit und die Analysendauer. Die Messung der Stärkeschädigung benötigt pro Analyse weniger als 10 Minuten. Dabei erfolgt die Messung vollkommen automatisch, wobei sich das Gerät vor jeder Messung selbst kalibriert.

Die Stärkeschädigungsgrade von cv. Akteur und cv. Julius, die mittels KM- bzw. ZM-Nachvermahlung analysiert wurden, sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt. Die Stärkeschädigung nahm mit steigender Drehzahl, längerer Mahldauer sowie geringerer Siebporengröße zu. Die erreichten Schädigungsgrade waren zwischen den beiden Weizensorten vergleichbar. Die Entwicklung des Stärkeschädigungsgrades verlief entgegengesetzt zum Feuchtigkeitsgehalt. Letzterer wurde über auf über 50 % des Ausgangswertes reduziert, während sich der Stärkeschädigungsgrad um einen Faktor von 1.5-1.7 erhöhte. In Übereinstimmung mit Tester et al. (1994) wiesen die Untersuchungen darauf hin, dass der Mahlprozess im Vergleich zum Einfluss der Weizensorte den entscheidenden Faktor der Stärkeschädigung darstellt. Es ist bekannt, dass mechanischer Stress die chemische und physikalische Funktionalität der Stärkegranula, deren Struktur und Verdaulichkeit modifiziert (Becker et al., 2001, Brites et al., 2008, Huang et al., 2007). Darüber hinaus können hohe Temperaturen und hoher Druck die Stärkeverkleisterung in Stärke-Wasser-Suspensionen auslösen (Bauer und Knorr, 2005). In diesen Versuchen wirkte die Temperatur auf ein trockenes Mehl, sodass lediglich von einer limitierten Stärkeverkleisterung

auszugehen war. Der Stärkeschädigungsgrad ist sowohl abhängig von der Art und Intensität der einwirkenden Kraft (Becker et al., 2001, Morrison et al., 1994) als auch von der Endospermhärte (Delcour und Hoseney, 2010b). Die vergleichbare Stärkeschädigung zwischen den beiden Weizensorten cv. Akteur und cv. Julius deutet auf eine ähnliche Endospermhärte der beiden Mehle. Dies wird durch die „beschreibende Sortenliste“ (Bundessortenamt, 2017) bestätigt, in der beide Weizensorten als mittelhart aufgeführt sind. Es ist somit nicht möglich, die in diesen Versuchen ermittelten Ergebnisse auf andere Weizensorten zu übertragen, die sich deutlich in der Endospermhärte von cv. Akteur bzw. cv. Julius unterscheiden.

3.3.2 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelektrophorese)

Um die Veränderungen der Proteinverteilung in den modifizierten Mehlen zu analysieren wurden die Proteine mittels einer SDS–PAGE unter reduzierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

3.3.2.1 SDS-PAGE der mittels Kugelmühle modifizierten Mehle

Die Ergebnisse für Mehl cv. Akteur nach Modifikation in der KM in der reduzierenden SDS-PAGE sind in Abbildung 14 dargestellt. Aufgetragen wurden die Aliquote der bei 500 rpm und 600 rpm behandelten Mehle in Abhängigkeit von der Mahldauer (5/10/15/20 min).
In den Proteinmustern der unterschiedlich modifizierten Mehle waren deutliche Unterschiede zu erkennen. Das Basismehl zeigte das typische Proteinmuster von Weizen, welches aus α-, γ-, ω1,2-, und ω5-GLIA sowie niedermolekularen (LMW-) und hochmolekularen (HMW)-GLUT-Untereinheiten (UE) besteht (Krause et al., 1988, Shewry et al., 1986). Die LMW-UE und GLIA-Banden von schwach modifizierten Mehlen ähnelten stark dem Basismehl. Aus Abbildung 14 ist eindeutig zu erkennen, dass es weder nach einer 5-minütigen noch nach 20-minütiger Behandlung der Mehle bei 500 rpm zu einer Veränderung der Bandenintensität bzw. -struktur im Vergleich zum Basismehl kam. Nur die bei 600 rpm modifizierten Mehle zeigten ab einer Mahldauer von 15 min verschwommene, undeutliche Banden der ω-GLIA und HMW-GS und Banden geringer Intensität der α-/γ-GLIA und der LMW-GS. Die Intensität der HMW-UE-Banden nahm mit zunehmender Mahldauer in der KM stark ab. Somit kann geschlussfolgert werden, dass hoher thermischer und mechanischer Stress zu strukturellen Veränderungen in den Proteintypen führt. Im Speziellen wurden Proteinaggregate gebildet, die nach der Reduktion nicht mehr in ein monomeres Protein überführt werden können. Es handelt sich höchstwahrscheinlich um Aggregate, die Isopeptide, Thioether oder Amin-Cross-Links enthalten. Die Isopeptidaggregate werden zwischen Glutamin- und Lysin-Resten gebildet. Die Amin-Cross-Links enthaltenen Aggregate wiederum entstehen u.a. durch beta-Eliminierung von Cystein- oder Serin-Resten zu Dehydroalanin und der Addition von S- oder N-Nukleophilen in Polypeptidketten. Einige dieser Aggregate waren offensichtlich so hochmolekular, dass diese nicht in der Lage waren, in das Gel zu diffundieren (Vgl. Abbildung 14, 600 rpm/15 bzw. 20 min).

3.3.2.2 SDS-PAGE der mittels Zentrifugalmühle modifizierten Mehle

In Abbildung 15 ist die reduzierende SDS-PAGE der mittels Zentrifugalmühle modifizierten Mehle dargestellt. Aufgetragen wurden jeweils die bei 6 000, 12 000 und 18 000 rpm behandelten Mehle von cv. Akteur in Abhängigkeit von der Siebporengröße (80 µm, 200 µm und 500 µm). Aus Abbildung 15 ist eindeutig zu erkennen, dass es im Vergleich zum unbehandelten Basismehl cv. Akteur bei keiner Modifikationsstufe zu einer Änderung der

Bandenintensität bzw. -muster kam. Die Proteinbanden waren bei jeglicher Behandlungsstufe klar erkennbar. Eine Verschiebung in höhere Molekulargewichtsbereiche wurde ebenfalls nicht beobachtet.

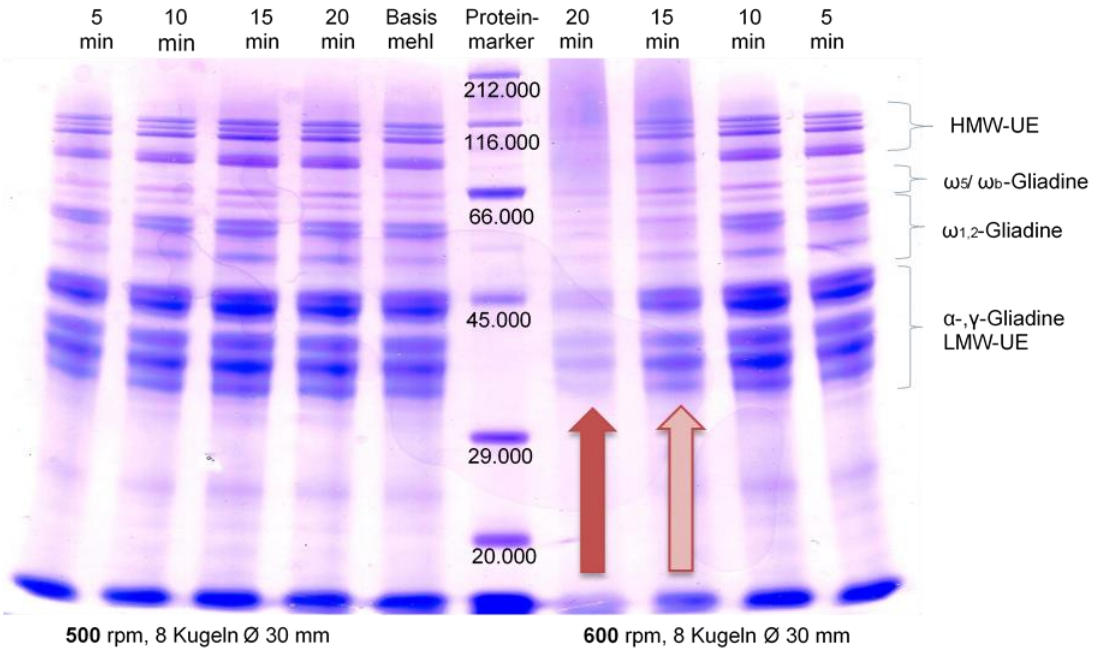


Abbildung 14: SDS-PAGE der Proteine aus Weizenmehl cv. Akteur in Abhängigkeit von der Behandlung in der KM (12%-Bis-Tris-Gel, reduzierende Bedingungen)

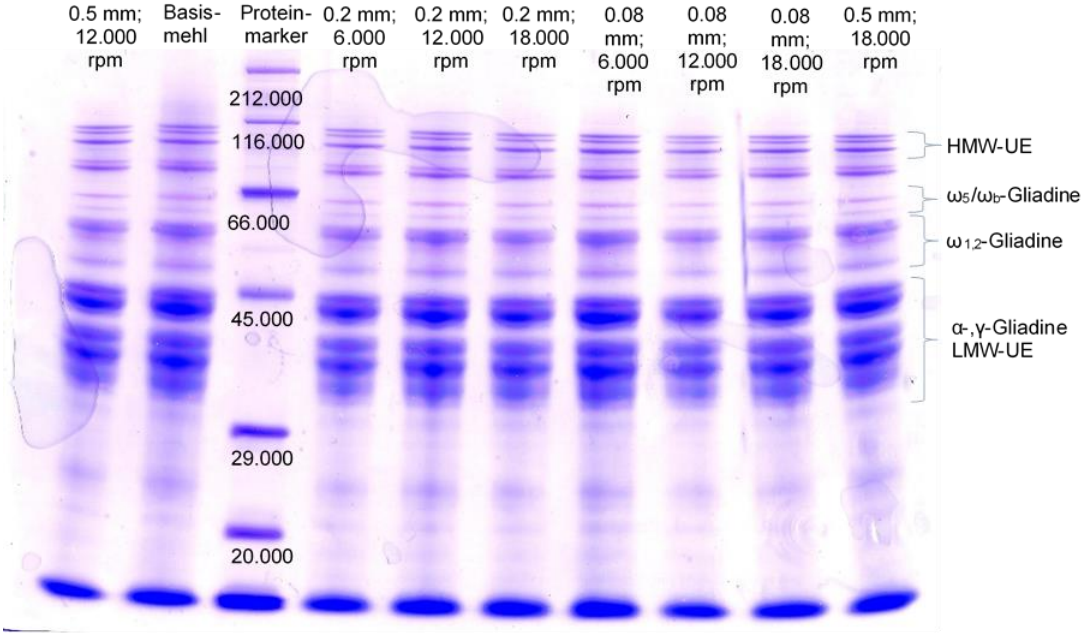


Abbildung 15: SDS-PAGE der Proteine aus Weizenmehl cv. Akteur in Abhängigkeit von der Behandlung in der ZM (12%-Bis-Tris-Gel, reduzierende Bedingungen)

Für die Weizensorte cv. Julius wurden Gele erhalten, die mit denen der Mehle von cv. Akteur vergleichbar waren.

3.3.3 Modifizierte Osborne-Fraktionierung

In dieser Arbeit wurde die Klassifizierung der Weizenproteine nach Osborne (1907) genutzt. Osborne entwarf eine löslichkeitsbasierte Klassifizierung der Weizenproteine, bei der es durch sequentielle Extraktion des Mehls zur Fraktionierung von ALGL, GLIA und GLUT kommt. ALGL sind als salzlösliche Fraktion und GLIA als ethanol-lösliche Fraktion definiert. Die verbleibenden Proteine gehören der GLUT-Fraktion an, welche als GLUT-UE in wässrigem Alkohol (50 % 1-Propanol, Tris/Harnstoff-Puffer, pH 7.6, T = 60 °C) unter reduzierenden Bedingungen (DTT) gelöst werden.

Die Charakterisierung der Proteintypen der nativen als auch der unterschiedlich modifizierten Weizenmehle des cv. Akteur und cv. Julius erfolgte hierbei nach einer modifizierten Osborne-Fraktionierung (Wieser, et al., 1998). Die quantitative Zusammensetzung der Proteinfraktionen und -typen der Mehle wurde über die Absorptionsflächen der RP-HPLC/UV-Chromatogramme (λ = 210 nm) quantifiziert und das GLIA/GLUT-Verhältnis berechnet. Die Quantifizierung erfolgte mittels externer Kalibrierung mit PWG-Gliadin (2.5 mg/mL, absoluter Kalibrierbereich: 11.6 µg - 46.6 µg).

3.3.3.1 Osborne-Fraktionierung der mittels Kugelmühle modifizierten Mehle

Die ermittelten Gehalte für die ALGL-, die GLIA- und die GLUT-Fraktionen sind in Tabelle 12 aufgeführt. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit steigender Behandlungsdauer die Gehalte der ALGL- und GLIA-Fraktionen kontinuierlich abnahmen. Hingegen stiegen die Gehalte der ethanol-unlöslichen GLUT-Fraktion bis auf das 2.7-fache des ursprünglichen Gehaltes an.

Tabelle 12: Verteilung der Osborne-Proteinfraktionen von Weizenmehl cv. Akteur in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer in der KM bei 600 rpm (8 Kugeln Ø 30 mm)

Probe	Σ ALGL [mg/g] [a]	Σ GLIA [mg/g] [a]	Σ GLUT [mg/g] [a]
Basismehl	15.0 ± 0.3	69.6 ± 0.5	38.3 ± 3.0
5 min	12.1 ± 0.8	67.7 ± 5.7	39.6 ± 1.3
10 min	4.6 ± 0.5	33.9 ± 0.5	81.3 ± 1.5
15 min	3.1 ± 0.3	5.4 ± 0.5	103.6 ± 2.0
20 min	1.4 ± 0.2	3.7 ± 0.2	81.4 ± 2.8

[a] *Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung; bezogen auf den RP-Gehalt*

In Abbildung 16 ist das RP-HPLC/UV-Chromatogramm der GLIA-Fraktion dargestellt. Es war deutlich zu erkennen, dass mit steigender Behandlungsdauer die Peakintensität kontinuierlich abnahm. Einzig nach einer Behandlungsdauer von 15 min war eine besonders starke Abnahme der Peakintensität im Elutionsbereich zwischen 14 bis 20 min zu beobachten. Die Peakintensitäten im Elutionsbereich zwischen 9-13 min veränderten sich bei Zunahme der Behandlungsdauer nur unwesentlich.

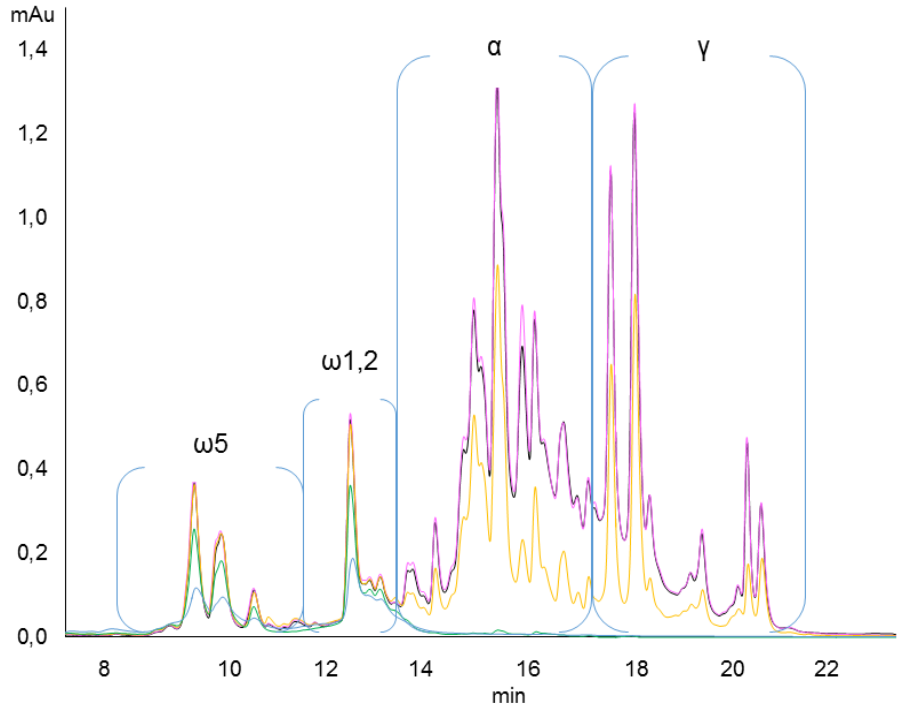


Abbildung 16: RP-HPLC/UV-Chromatogramm der GLIA-Fraktion von Mehl cv. Akteur in Abhängigkeit von unterschiedlichen Mahldauern in der KM bei 600 rpm (8 Kugeln Ø 30 mm); pink: Basismehl, schwarz: 5 min, gelb: 10 min, grün: 15 min, blau: 20 min

Tabelle 13 zeigt die Verteilung der GLIA-Typen von Mehl cv. Akteur nach Modifikationen in der KM bei 600 rpm. Nach einer 15- bzw. 20-minütigen Behandlung bei 600 rpm wurden im Bereich der α- und γ- GLIA keine Peaks mehr detektiert. Im Bereich der ω_5- bzw. $\omega_{1,2}$- GLIA war mit steigender Behandlungsdauer ebenfalls eine geringfügige Abnahme der Peakintensitäten bzw. -flächen ersichtlich, die erst ab 15-minütiger Mahldauer deutlich wurde.

Tabelle 13: Verteilung der GLIA-Typen von Weizenmehl des cv. Akteur in Abhängigkeit von unterschiedlichen Mahldauern in der KM bei 600 rpm (8 Kugeln Ø 30 mm)

Probe	ω_5-GLIA [mg/g] [a]	$\omega_{1,2}$-GLIA [mg/g] [a]	α-GLIA [mg/g] [a]	γ-GLIA [mg/g] [a]
Basismehl	5.2 ± 0.3	5.7 ± 0.3	36.4 ± 0.4	22.4 ± 1.2
5 min	5.1 ± 0.5	5.7 ± 0.5	34.7 ± 2.8	22.2 ± 1.9
10 min	4.6 ± 0.1	4.8 ± 0.2	15.0 ± 0.4	9.5 ± 0.1
15 min	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.2	0.3 ± 0.0	0.0 ± 0.0
20 min	1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.0 ± 0.0

[a] *Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung; bezogen auf den RP-Gehalt*

In Abbildung 17 ist das RP-HPLC/UV- Chromatogramm der GLUT-Fraktion von Mehl cv. Akteur nach unterschiedlichen Mahldauern in der KM bei 600 rpm dargestellt.

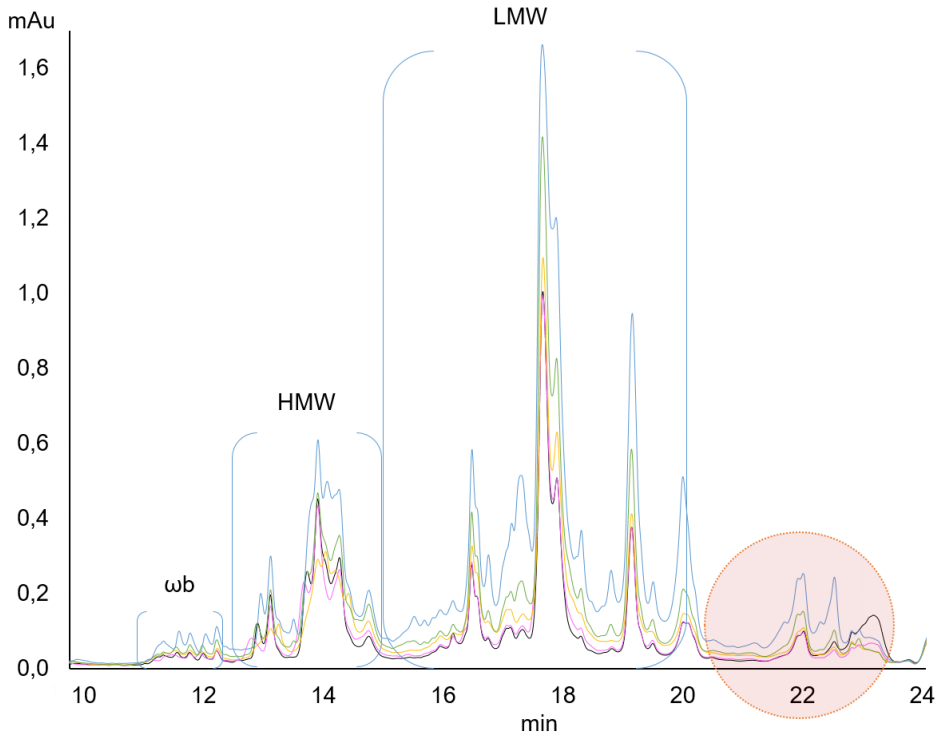


Abbildung 17: RP-HPLC/UV-Chromatogramm der GLUT-Fraktion von Mehl cv. Akteur in Abhängigkeit von unterschiedlichen Mahldauern in der KM bei 600 rpm (8 Kugeln Ø 30 mm); schwarz: Basismehl, pink: 5 min, gelb: 10 min, blau: 15 min, grün: 20 min. Die neu hinzugefügte Fraktion 4 ist mit einem Kreis gekennzeichnet.

Es ist klar erkennbar, dass mit längerer Behandlungsdauer der GLUT-Gehalt kontinuierlich anstieg. Die Peakformen waren nahezu unverändert. Auffällig ist, dass die nicht mehr zu den LMW-UE bzw. den HMW-UE gehörige Fraktion, die nach ca. 20.5 min eluiert wurde, stark zunahm. Aufgrund dieser Tatsache wurde auch diese hinzukommende Fraktion integriert und als Fraktion 4 der GLUT in die Berechnung des GLUT- und des Gesamtproteingehaltes einbezogen (Vgl. Tabelle 14, Tabelle 15).

Tabelle 14: Verteilung der GLUT-Typen von Weizenmehl des cv. Akteur in Abhängigkeit von unterschiedlichen Mahldauern in der KM bei 600 rpm (8 Kugeln Ø 30 mm)

Probe	HMW-UE [mg/g] [a]	LMW-UE [mg/g] [a]	Fraktion 4 [mg/g] [a]
Basismehl	8.8 ± 1.3	20.3 ± 1.6	2.8 ± 0.3
5 min	9.3 ± 0.7	21.2 ± 0.2	3.0 ± 0.5
10 min	15.1 ± 0.3	49.8 ± 1.4	4.1 ± 0.7
15 min	13.0 ± 0.4	69.9 ± 1.8	6.5 ± 0.4
20 min	9.0 ± 0.4	55.3 ± 2.4	6.0 ± 0.2

[a] *Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung; bezogen auf den RP-Gehalt*

Die extrahierbaren Gesamt-Kleberproteine sanken während der 20-minütigen Behandlung bei 600 rpm um über 20 % von ca. 108 mg/g auf ca. 85 mg/g. Auch das extrahierbare Gesamt-Protein nahm um etwa 30 %, von ca. 123 mg/g auf ca. 86.5 mg/g ab. Die Summe aller Fraktionen blieb annähernd konstant, sodass lediglich nach 20-minütiger Behandlung eine

geringe Abnahme festgestellt wurde. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass sich der restliche, nicht mehr extrahierbare, Proteinanteil im Rückstand befand (Vgl. Tabelle 15).
Das GLIA/GLUT-Verhältnis (Vgl. Tabelle 15) liegt bei Brotweizen im Bereich von 1.49 bis 2.30 (Wieser und Koehler, 2009). Je höher der GLIA-Anteil des Proteins ist, desto weicher bzw. flüssiger wird der Teig und desto schlechter das Gashaltevermögen. Je mehr GLUT vorhanden sind, umso fester wird der Teig. Um einen idealen Teig erhalten bzw. die optimale Ausbildung des Klebers gewährleisten zu können, ist ein ausgewogenes Verhältnis von GLIA und GLUT enorm wichtig (Wieser und Koehler, 2009). Die länger modifizierten Mehle wiesen durchweg nur sehr geringe GLIA/GLUT-Verhältnisse auf. Je länger die Mehle modifiziert wurden, desto geringer wurde das Verhältnis. Die in Tabelle 15 berechneten GLIA/GLUT-Verhältnisse lassen vermuten, dass aus den Mehlen, die einer 10-minütiger KM-Behandlung unterzogen wurden, keine verarbeitbaren Teige resultieren. Der GLUT-Anteil ist so hoch, dass wahrscheinlich ein extrem fester Teig entsteht, der keine Ausbildung des Klebers zulässt. Das Basismehl wies ein GLIA/GLUT-Verhältnis von 1.82 auf, was im mittleren Bereich des für Brotweizen üblichen Verhältnisses von 1.49 - 2.30 liegt.
Die GLIA/GLUT-Verhältnisse lassen vermuten, dass nur aus dem Basismehl und dem durch 5-minütige Behandlung erhaltenen Mehl, Teige mit guten Backeigenschaften resultieren.

Tabelle 15: Berechnete Gehalte an Gesamt-Kleberproteinen, Gesamtproteingehalte und GLIA/GLUT-Verhältnisse von Mehl cv. Akteur nach Modifikationen in der KM bei 600 rpm (8 Kugeln Ø 30 mm) und Osborne-Fraktionierung

Probe	**Σ Kleber [mg/g]**[a] (GLIA+GLUT)	**Σ Protein [mg/g]**[a] (ALGL+GLIA+GLUT)	**Σ aller Fraktionen [mg/g]**[a] (ALGL+GLIA+GLUT+RÜCK)	**GLIA/GLUT -Verhältnis**
Basismehl	107.9 ± 3.5	122.9 ± 3.8	134.2 ± 5.1	1.82
5 min	107.3 ± 7.0	119.4 ± 7.8	137.9 ± 7.0	1.71
10 min	115.2 ± 2.0	119.8 ± 2.5	134.6 ± 2.4	0.42
15 min	109.0 ± 2.5	112.0 ± 2.8	131.9 ± 1.1	0.05
20 min	85.1 ± 3.1	86.5 ± 3.3	126.6 ± 9.5	0.05

[a] *Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung; bezogen auf den RP-Gehalt von 104.0 mg/g; RÜCK = Rückstand*

Die erhaltenen Werte zeigten, dass eine 15- bis 20-minütige Behandlung die Extrahierbarkeit aller Proteinfraktionen im Teig stark beeinflusste. Dies deutet darauf hin, dass die Löslichkeit der Proteine durch mechanische und thermische Einflüsse stark abnahm, die Proteine schwerlöslich wurden und als nicht-extrahierbare Fraktionen im Rückstand verblieben.

3.3.3.2 Osborne-Fraktionierung der mittels Zentrifugalmühle modifizierten Mehle

Analog erfolgte eine modifizierte Osborne-Fraktionierung (Wieser, et al., 1998) der nach 3.2.2 mittels Zentrifugalmühle behandelten Mehle.

Die ermittelten Gehalte für die ALGL-, die GLIA- und die GLUT- Fraktion sind in Tabelle 16 aufgeführt. Es ist klar zu erkennen, dass weder mit steigender Drehzahl noch mit abnehmender Siebporengröße die Gehalte einzelnen Proteinfraktionen signifikant abnahmen. Eine leichte Abnahme war bei Verwendung einer geringeren Siebporengröße (80 µm) im Gehalt der drei extrahierbaren Proteinfraktionen erkennbar.

Tabelle 16: Verteilung der Osborne-Proteinfraktionen von Weizenmehl cv. Akteur nach ZM-Modifikation in Abhängigkeit von der Drehzahl und der Siebporengröße

Probe		Σ ALGL [mg/g][a]	Σ GLIA [mg/g] [a]	Σ GLUT [mg/g] [a]
Basismehl		15.0 ± 0.3	69.6 ± 0.5	38.3 ± 3.0
6 000 rpm	80 µm	13.7 ± 0.2	63.1 ± 0.7	37.3 ± 3.4
12 000 rpm		11.1 ± 0.4	61.9 ± 5.0	31.9 ± 6.4
18 000 rpm		10.9 ± 0.2	54.7 ± 0.6	35.0 ± 2.2
6 000 rpm	120 µm	13.2 ± 0.7	63.0 ± 0.2	34.0 ± 0.8
12 000 rpm		12.0 ± 0.2	61.3 ± 0.8	34.0 ± 0.7
18 000 rpm		10.4 ± 0.1	56.6 ± 0.6	36.7 ± 3.9
6 000 rpm	200 µm	14.1 ± 0.3	63.6 ± 1.4	39.3 ± 4.2
12 000 rpm		13.0 ± 0.2	63.2 ± 0.4	35.1 ± 1.0
18 000 rpm		12.3 ± 0.2	60.7 ± 2.3	30.7 ± 3.1
6 000 rpm	500 µm	13.8 ± 0.3	64.3 ± 3.7	35.1 ± 3.4
12 000 rpm		13.6 ± 0.3	65.1 ± 1.0	32.4 ± 3.5
18 000 rpm		13.8 ± 0.7	65.7 ± 3.0	35.7 ± 0.6

[a] Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung; bezogen auf den RP-Gehalt von 104.0 mg/g

Der extrahierbare Gehalt an Gesamt-Kleberproteinen und das Gesamt-Protein nahmen bei der Verwendung des 80 µm-Siebes und einer Drehzahl von 18 000 rpm um ca. 17 % von ca. 108 mg/g auf ca. 90 mg/g bzw. um ca. 20 % von 123 mg/g auf 100.6 mg/g ab. Die Summe aller Fraktionen blieb annähernd konstant und schwankte im Bereich von ± 10 %.

Es ist anzunehmen, dass sich der gesamte nicht mehr extrahierbare Proteinanteil im Rückstand befand. Eine klare Tendenz bei Verwendung verschiedener Siebporengrößen bzw. Drehzahlen war nicht zu erkennen.

Die mittels ZM behandelten Mehle wiesen durchweg GLIA/GLUT-Verhältnisse zwischen 1.5 und 2.0 auf (Vgl. Tabelle 17). Anhand der berechneten GLIA/GLUT-Verhältnisse müssten aus allen ZM-modifizierten Mehlen Teige mit optimal ausgebildetem Kleber resultieren, die gute backtechnologische Eigenschaften besitzen.

Tabelle 17: Berechnete Gehalte an Gesamt-Kleberproteinen, Gesamtproteingehalte und GLIA/GLUT-Verhältnisse aus der Osborne-Fraktionierung von cv. Akteur nach Modifikationen in der ZM in Abhängigkeit von der Drehzahl und Siebporengröße

Probe		Σ Kleber [mg/g][a] (GLIA+GLUT)	Σ Protein [mg/g][a] (ALGL+GLIA+ GLUT)	Σ aller Fraktionen [mg/g][a] (ALGL+GLIA+ GLUT+RÜCK)	GLIA/GLUT-Verhältnis
Basismehl		107.9 ± 3.5	122.9 ± 3.8	134.2 ± 5.1	1.82
6 000 rpm	80 µm	100.4 ± 4.1	114.1 ± 4.3	130.5 ± 2.5	1.69
12 000 rpm		93.8 ± 11.4	104.9 ± 11.5	121.3 ± 1.0	1.94
18 000 rpm		89.7 ± 2.8	100.6 ± 3.0	121.8 ± 3.2	1.56
6 000 rpm	120 µm	97.0 ± 1.0	110.2 ± 1.7	126.0 ± 3.7	1.85
12 000 rpm		95.3 ± 1.5	107.3 ± 1.7	126.0 ± 0.7	1.80
18 000 rpm		93.3 ± 4.5	103.7 ± 4.6	125.6 ± 4.0	1.54
6 000 rpm	200 µm	102.9 ± 5.6	117.0 ± 5.9	129.5 ± 3.7	1.62
12 000 rpm		98.3 ± 1.4	111.3 ± 1.6	125.3 ± 1.3	1.80
18 000 rpm		91.4 ± 5.4	103.7 ± 5.6	120.0 ± 3.9	1.98
6 000 rpm	500 µm	99.4 ± 7.1	113.2 ± 7.4	128.2 ± 2.3	1.83
12 000 rpm		97.5 ± 4.5	111.1 ± 4.8	126.6 ± 5.4	2.01
18 000 rpm		101.4 ± 3.6	115.2 ± 4.3	129.0 ± 4.4	1.84

[a] *Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung; bezogen auf den RP-Gehalt von 104.0 mg/ g; RÜCK = Rückstand*

3.3.3.3 Diskussion

In der Regel sind GLIA monomere und GLUT polymere Proteine, die durch Disulfidbindungen verknüpft sind. Dies bedeutet, das biochemisch ähnliche Proteine in Abhängigkeit von ihrem Aggregatzustand in verschiedenen Proteinfraktionen vorkommen können. Die Gehalte der Fraktionen ALGL, GLIA und GLUT von ausgewählten KM-modifizierten Mehlen sind in Abbildung 18 dargestellt. In Relation zum Rohproteingehalt stellt Gluten (GLIA + GLUT) ungefähr 85 % des Gesamtproteins dar. In ZM-modifizierten und schwach KM-modifizierten Mehlen (300/400 rpm, geringer thermischer Stress) wurden keine signifikanten Unterschiede in der Proteinverteilung innerhalb der verschiedenen Drehzahlen und Mahldauern beobachtet. Im Gegensatz dazu, wurden durch hohe mechanische und thermische Belastung (KM, 500/600 rpm) deutliche Veränderungen in der Proteinverteilung herbeigeführt. Die Abnahmen der ALGL- und GLIA-Gehalte sowie der gleichzeitige Anstieg der GLUT-Konzentration weisen auf strukturelle Änderungen in der dreidimensionalen Struktur der Weizenproteine hin, welche sehr wahrscheinlich durch die hohen Temperaturen verursacht wurden.

Ebenso hatte die Mahldauer einen signifikanten Einfluss auf die Extrahierbarkeit der Proteine, sodass der GLIA-Gehalt bei Verlängerung der Mahldauer von 5 auf 20 min (600 rpm) von 65.1 auf 3.6 mg/g abnahm. Es war ersichtlich, dass der stärkste Effekt bei einer Kombination aus hohen Drehzahlen, langer Mahldauer und resultierenden hohen Temperaturen erreicht wurde.

Des Weiteren ermöglichte die Osborne-Fraktionierung die Bestimmung der individuellen GLIA-Typen (ω_5-, $\omega_{1,2}$-, α- und γ-GLIA) sowie der LMW- und HMW-UE (Vgl. Tabelle 13, Tabelle 14). Durch Vergleich der Proteinmuster der behandelten Mehle mit den Basismehlen ließen sich durch die Modifizierung hervorgerufene qualitative Unterschiede ermitteln.

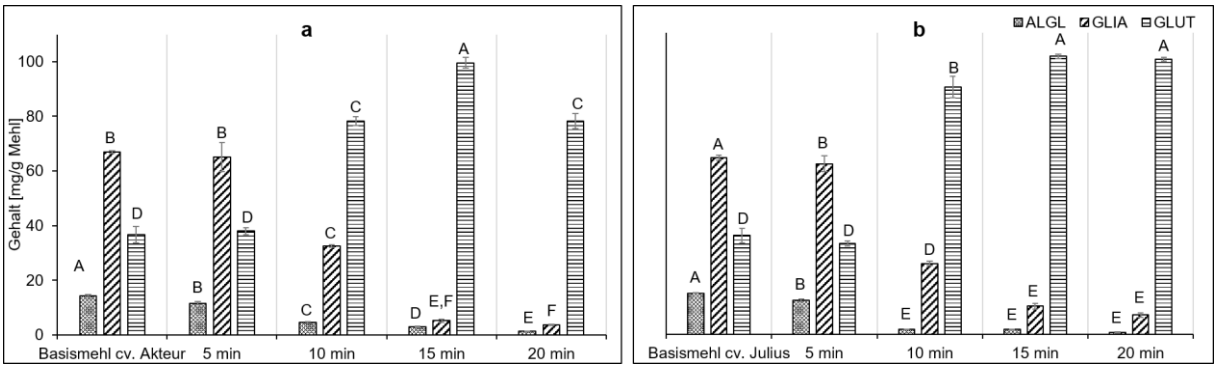


Abbildung 18: ALGL-, GLIA- und GLUT-Gehalte von nicht-modifiziertem und KM-modifizierten Mehlen bei 600 rpm in Abhängigkeit von der Mahldauer; a: Mehl cv. Akteur, b: Mehl cv. Julius; verschiedene Großbuchstaben (A-F) kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$, einfaktorielle ANOVA, Tukey´s Test) zwischen den Gehalten verschiedener Mahldauern innerhalb einer Drehzahl

Mit zunehmendem Modifikationsgrad kam es zu einer Abnahme des Gehaltes an cysteinhaltigen α- und γ-GLIA und gleichzeitig einer Zunahme des Gehaltes an co-eluierenden LMW-UE sowie einer Gruppe von Peaks, die nach den LMW-UE eluiert wurden (Fraktion 4) (Vgl. Abbildung 17). Mögliche Gründe, dass diese GLIA-Typen in die ethanol-unlösliche GLUT-Fraktion oder den unlöslichen Rückstand übergingen sind durch Kieffer et al. (2007) bei hochdruckbehandelten Gluten und durch Wieser und Koehler (2009) bei Weizenbrot beschrieben. Die Gehalte von cysteinfreien ω5- und ω1,2-GLIA-Typen blieb annähernd konstant. Dies deutet auf durch mechanische und thermische Behandlung induzierte Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen von α- und γ-GLIA mit GLUT hin. Der starke Temperatureffekt bei Drehzahlen von 500 bis 600 rpm ist in Tabelle 8 dargestellt.

Durch die Abnahme des GLIA-Gehaltes sowie der Zunahme der GLUT-Fraktion nahm das Verhältnis GLIA/GLUT mit zunehmender Behandlungsdauer und Drehzahl kontinuierlich von 1.82 auf nahezu Null ab. Normalerweise weist das GLIA/GLUT-Verhältnis bei Weizenmehlen Werte zwischen 1.49 bis 2.30 auf (Wieser und Koehler, 2009). Ein niedriges GLIA/GLUT-Verhältnis ist generell mit einer geringen Teig-Dehnbarkeit und einem hohen Dehnwiderstand von Teig verbunden (Wieser und Kieffer, 2001). Aufgrund der postulierten Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen war zu erwarten, dass die Modifikation mittels KM ebenso die mikrostrukturellen Eigenschaften der Mehle beeinflusst.

Die Protein-Modifikationen waren maßgeblich von der verwendeten Drehzahl und der Mahldauer abhängig. Die Variation der Kugeln (Kugelanzahl und -größe) spielte lediglich eine untergeordnete Rolle.

3.3.4 SDSL-/GMP-Fraktionierung

Der größte Teil der Weizenproteine geht nach Behandlung mit SDS-haltigem Natriumphosphatpuffer in Lösung (SDS-lösliche Fraktion; SDSL). Durch die Anlagerung des anionischen Tensids SDS an die Proteine weisen diese eine negative Überschussladung auf. Dadurch verändert sich die dreidimensionale Struktur und die Oberflächenhydrophobizität der Proteine. Es kommt zu einer Zerstörung der hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen und somit zu einer Auflösung der Protein-Tertiär- und -Quartärstruktur. Dabei wird die Löslichkeit der meisten Proteine erhöht, sodass die in 1 % SDS löslichen Proteine den Hauptanteil des extrahierbaren Proteins ausmachen (DuPont et al., 2008).
In der SDSL-Fraktion sind v.a. die ALGL, ein Großteil der GLIA und einige wenige SDS-lösliche GLUT enthalten. Der Extraktionsrückstand besteht aus einer unlöslichen Gelschicht, dem sogenannten Gluteninmakropolymer (GMP), welches aus dem hochmolekularen Teil der GLUT-Fraktion besteht und unter reduzierenden Bedingungen in wässrigen Alkoholen löslich ist. Es wurde die GP-HPLC als Analysenmethode herangezogen, bei der die Trennung der Proteine nach Molekülgröße erfolgt.
Während der SDS/GMP-Fraktionierung erhält man eine lösliche Fraktion (SDSL) und ein unlöslich verbleibendes Gel (GMP) (Moonen et al., 1982). Das GMP geht unter reduzierenden Bedingungen in Lösung, wobei die Protein-Unterfraktionen erhalten werden. Die unreduzierte SDSL- und die reduzierte GMP-Fraktion werden mittels GP-HPLC nach Molekülgröße getrennt und quantifiziert (Vgl. Abbildung 5). Die Kalibrierung erfolgte mittels PWG-Gliadin (2.5 mg Substanz/mL) und UV/VIS-Detektion bei λ = 210 nm. Typische Chromatogramme sind in Abbildung 19 und Abbildung 20 dargestellt. Das Basismehl cv. Akteur und cv. Julius hatten jeweils SDSL-Gehalte von 97.8 und 100.7 mg/g sowie GMP-Gehalte von 10.5 und 10.7 mg/g. Diese GMP-Gehalte waren deutlich geringer als die von Moonen et al. (1982) publizierten Werte, welche sich im Bereich zwischen 28.5 und 32.1 mg/g bewegten. Dies ist damit zu erklären, dass in der vorliegenden Arbeit GMP auf dem Proteingehalt basierte, wohingegen Moonen et al. (1982) den kompletten Trocknungsrückstand des Gels als GMP definierte. Thanhaeuser et al. (2014) verwendeten die gleiche Methode wie in dieser Arbeit. Die GMP-Konzentrationen waren daher vergleichbar.

3.3.4.1 SDSL-/GMP-Fraktionierung der mittels Kugelmühle modifizierten Mehle

Die GP-HPLC/UV-Chromatogramme der SDSL-Fraktion des Basismehls cv. Akteur und des bei 600 rpm modifizierten Mehls zeigten, dass die SDSL-Gehalte signifikant mit zunehmender Mahldauer abnahmen (Vgl. Abbildung 19).

Abbildung 19 zeigt weiterhin, dass vor allem die zwischen 6 bis 8 min eluierende Fraktion der Oligomere nach 10-minütiger Mahldauer bei 600 rpm fast vollkommen verschwand. Bei einer Drehzahl von 500 rpm war diese Verringerung erst nach 15 bis 20-minütiger Mahldauer zu beobachten. Die zwischen 8 und 15 min eluierende Fraktion der Monomeren nahm bei einer Drehzahl von 600 rpm nach kurzer Zeit stark ab. Dies deutet darauf hin, dass die Oligomere durch Neuknüpfung von Disulfidbindungen Aggregate mit hohen Molekulargewichten bildeten, nicht mehr mit SDS extrahiert wurden und somit in die GMP-Fraktion übergingen.
Die GP-HPLC/UV-Chromatogramme (Vgl. Abbildung 20) der GMP-Fraktion des Basismehls cv. Akteur und des bei 600 rpm modifizierten Mehls zeigten, dass die GMP-Gehalte entgegensetzt zu den SDSL-Gehalten mit längerer Mahldauer deutlich zunahmen.

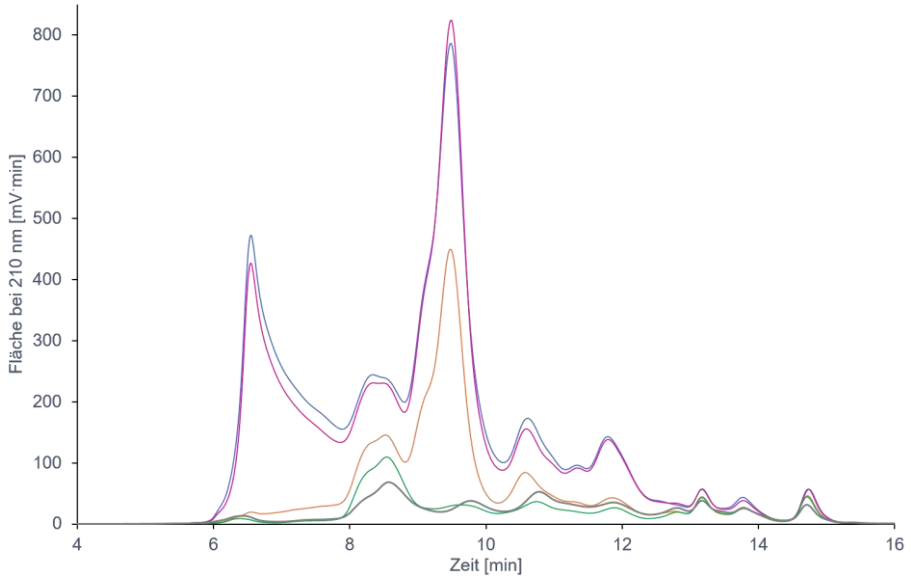


Abbildung 19: GP-HPLC/UV-Chromatogramm der SDSL-Fraktion des Mehles cv. Akteur nach KM-Modifikation bei 600 rpm und unterschiedlichen Mahldauern (8 Kugeln Ø 30 mm); blau: Basismehl, pink: 5 min, orange: 10 min, grün: 15 min, grau: 20 min

In Tabelle 18 sind die Gehalte der SDSL- und GMP-Fraktionen nach Modifikation in der KM dargestellt. Für die SDSL-Fraktionen der unterschiedlich stark modifizierten Mehle wurden Gehalte zwischen 11.1 ± 0.3 mg/g (600 rpm/20 min, cv. Akteur) und 113.8 ± 3.3 mg/g (Basismehl cv. Julius) analysiert, für die GMP-Fraktionen Gehalte zwischen 6.6 mg/g (Basismehl cv. Akteur) und 101.8 ± 2.3 mg/g (600 rpm/15 min, cv. Akteur). Für das Gesamtprotein wurden Werte im Bereich von 101.4 ± 4.2 mg/g (600 rpm/10 min, cv. Julius) und 125.9 ± 3.6 mg/g (Basismehl cv. Julius) bestimmt.
Die SDSL-/GMP-Fraktionierung zeigte bei steigender Drehzahl und zunehmender Mahldauer eine drastische Verringerung des Gehaltes der SDSL-Fraktion und einen starken Anstieg der GMP-Konzentration (Vgl. Tabelle 18). Die SDSL-Gehalte nahmen bei maximaler Modifikation (600 rpm/20 min) um ca. 90 % ab, die GMP-Fraktion stieg hingegen auf fast das 15-fache des Ausgangsgehaltes an.

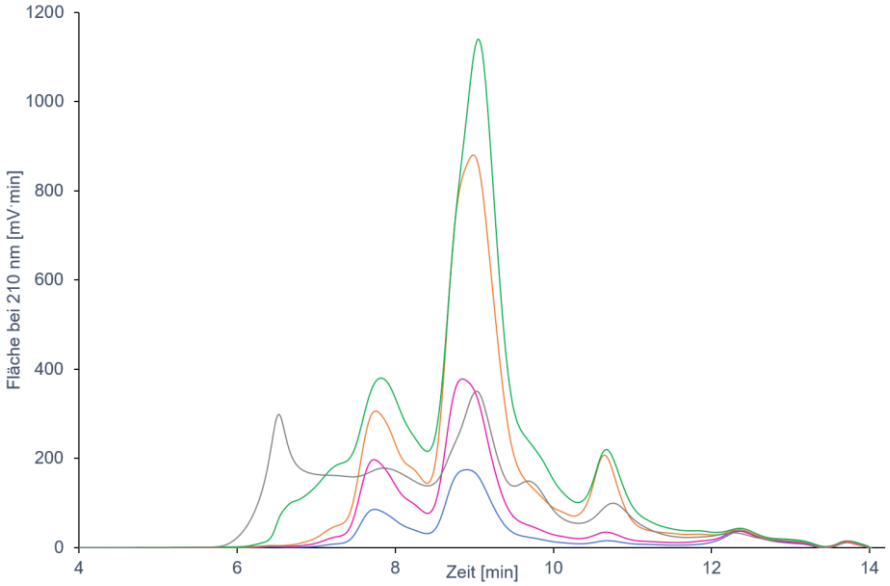


Abbildung 20: GP-HPLC/UV-Chromatogramm der GMP-Fraktion des Mehles cv. Akteur nach KM-Modifikation bei 600 rpm und unterschiedlichen Mahldauern (8 Kugeln Ø 30 mm); blau: Basismehl, pink: 5 min, orange: 10 min, grün: 15 min, grau: 20 min

Tabelle 18: Gehalt der SDS-löslichen Fraktion (SDSL) und des Gluteninmakropolymers (GMP) in Weizenmehl cv. Akteur und cv. Julius in Abhängigkeit von den Parametern bei der KM-Vermahlung

		SDSL [mg/g] [a]	GMP [mg/g] [a]	Gesamtprotein [mg/g] [a]
Basismehl cv. Akteur		101.7 ± 1.1	6.6 ± 0.0	108.3 ± 1.2
500 rpm	5 min	81.5 ± 1.1	36.0 ± 0.7	117.5 ± 1.8
	10 min	91.1 ± 2.6	26.2 ± 1.7	117.2 ± 4.3
	15 min	62.0 ± 0.9	55.2 ± 1.0	117.2 ± 2.0
	20 min	39.4 ± 0.4	74.3 ± 0.8	113.7 ± 1.2
600 rpm	5 min	89.0 ± 1.0	25.5 ± 1.0	114.5 ± 2.1
	10 min	42.2 ± 0.3	76.4 ± 1.1	118.6 ± 1.4
	15 min	12.2 ± 0.2	101.8 ± 2.3	113.9 ± 2.5
	20 min	11.1 ± 0.3	90.9 ± 2.3	102.0 ± 2.6
Basismehl cv. Julius		113.8 ± 3.3	12.1 ± 0.3	125.9 ± 3.6
500 rpm	5 min	107.0 ± 2.9	14.0 ± 0.9	121.0 ± 3.8
	10 min	99.4 ± 3.5	25.4 ± 1.6	124.8 ± 5.1
	15 min	70.4 ± 2.0	54.3 ± 0.8	124.7 ± 2.8
	20 min	37.8 ± 0.5	74.2 ± 1.6	112.0 ± 2.1
600 rpm	5 min	104.8 ± 1.2	19.0 ± 0.9	123.8 ± 2.1
	10 min	32.3 ± 1.1	69.1 ± 3.1	101.4 ± 4.2
	15 min	15.1 ± 0.3	88.5 ± 5.9	103.6 ± 6.2
	20 min	12.5 ± 0.1	93.5 ± 4.0	106.0 ± 4.1

[a] *Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung; bezogen auf den RP-Gehalt von 104.0 mg/ g*

Der GMP-Extrakt (20 min/600 rpm) wurde im Gegensatz zu den restlichen Behandlungsstufen nur mit einem Drittel des Einspritzvolumens injiziert. Ein Einspritzvolumen von 20 µL, wie in der Methode vorgesehen, hätte das Absorptionsmaximum von 1200 mV·min weit überschritten. Alle Unterfraktionen des GMP-Extraktes ($ALGL_{GMP}$, HMW_{GMP}- und LMW_{GMP}-UE) nahmen mit zunehmender Mahldauer signifikant zu (Vgl. Tabelle 19).

Ein besonders starker Anstieg war bei der $ALGL_{GMP}$-Fraktion zu beobachten, die sich um ein Vielfaches verdoppelte. Die Proteine der $ALGL_{GMP}$-Fraktion wurden vermutlich durch die thermische und mechanische Belastung so modifiziert, dass sie erst nach Reduktion wieder extrahierbar wurden. Aus Tabelle 19 ist zu erkennen, dass sich der prozentuale $ALGL_{GMP}$-Gehalt bei Behandlung mit einer Drehzahl von 500 rpm innerhalb der 20-minütigen Mahldauer im Verhältnis zu den Unterfraktionen LMW_{GMP} und HMW_{GMP} verdoppelte.

Tabelle 19: Prozentuale Verteilung der GMP-Unterfraktionen von Weizenmehl cv. Akteur nach KM-Modifikationen

		HMW_{GMP} [mg/g][a]	**LMW_{GMP}** [mg/g][a]	**$ALGL_{GMP}$** [mg/g][a]
Basismehl cv. Akteur		29.3 ± 0.3	63.5 ± 0.4	6.9 ± 0.1
500 rpm	5 min	32.6 ± 0.4	60.9 ± 0.3	6.3 ± 0.7
	10 min	31.4 ± 0.2	62.3 ± 0.3	6.3 ± 0.0
	15 min	26.7 ± 0.2	62.8 ± 0.2	10.5 ± 0.0
	20 min	24.7 ± 0.3	61.9 ± 0.4	13.4 ± 0.2
600 rpm	5 min	31.8 ± 0.1	61.9 ± 0.2	6.3 ± 0.3
	10 min	22.5 ± 0.1	66.0 ± 0.3	11.4 ± 0.1
	15 min	29.1 ± 0.1	60.8 ± 0.2	10.1 ± 0.0
	20 min	48.5 ± 0.1	41.5 ± 0.1	10.0 ± 0.2

[a] *Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung; bezogen auf den RP-Gehalt von 104.0 mg/ g*

Bei Behandlung mit einer Drehzahl von 600 rpm war eine deutliche Zunahme der HMW_{GMP}-UE zu erkennen, die innerhalb der 20-minütigen Mahldauer im Verhältnis zu den $ALGL_{GMP}$ und LMW_{GMP}-UE von 29.3 ± 0.3 % auf 48.5 ± 0.1 mg/g zunahm (Vgl. Tabelle 19).

Nach einer 15- bzw. 20-minütigen Modifikation des Basismehls bei 600 rpm war das typische Muster der HMW_{GMP}-UE nicht mehr ersichtlich. Die Peaks erschienen wesentlich früher und wurden in Form hochmolekularer Aggregate eluiert (Vgl. Abbildung 20). Diese Aggregate könnten u.a. durch die Bildung nicht-reduzierbarer Cross-Links, wie z.B. Isopeptidbindungen entstanden sein.

3.3.4.2 SDSL-/GMP-Fraktionierung der mittels Zentrifugalmühle modifizierten Mehle

In Tabelle 20 sind die ermittelten Gehalte für die SDSL- und GMP-Fraktionen des Mehls cv. Akteur nach ZM-Modifikation dargestellt. Für die SDSL-Fraktionen der modifizierten Mehle wurden Gehalte zwischen 86.4 ± 5.0 mg/g (12 000 rpm/80 µm) und 100.2 ± 4.0 mg/g (Basismehl cv. Akteur) bestimmt, für die GMP-Fraktionen Gehalte zwischen 12.9 ± 0.4 mg/g (Basismehl cv. Akteur) und 31.9 ± 0.9 mg/g (18 000 rpm/ 120 µm).

Nach ZM-Vermahlung des Mehles cv. Akteur wurden weder mit steigender Drehzahl noch mit Verringerung der Siebporengröße eine signifikante Veränderung des SDSL-/GMP-Verhältnisses erhalten (Vgl. Tabelle 20). Die SDSL-Gehalte nahmen nur bei maximaler Modifikation (18 000 rpm/80 bzw. 120 µm) im Vergleich zum Basismehl cv. Akteur um max. 10 % ab. Lediglich die GMP-Konzentration stieg maximal auf das 2.5-fache des Ausgangsgehaltes an.

Die Modifikation der Siebporengrößen von 500 bzw. 200 µm hatte kaum Einfluss auf die SDSL-/GMP-Verteilung. Grund dafür, war die Sichtung des standardisierten Basismehls cv. Akteur auf eine Partikelgröße von 200 µm, nach vorangegangener Vermahlung mittels Walzenstuhl. Eine Modifikation durch die in der ZM erzeugten, hohen Drehzahlen von 6 000 bis 18 000 rpm blieb daher aus.

Tabelle 20: Einfluss verschiedener ZM-Parameter auf die Gehalte der SDS-löslichen Fraktion (SDSL) und des Gluteninmakropolymers (GMP), bestimmt mittels SDSL/GMP-Fraktionierung von Weizenmehl cv. Akteur

		SDSL		GMP		Gesamtprotein
		[mg/g] [a]	[%] [b]	[mg/g] [a]	[%] [b]	[mg/g] [a]
Basismehl cv. Akteur		100.2 ± 4.0	96.3	12.9 ± 0.4	12.4	113.1 ± 4.4
80 µm	6 000 rpm	96.7 ± 3.8	93.0	19.5 ± 0.6	18.8	116.3 ± 4.4
	12 000 rpm	86.4 ± 5.0	83.0	24.1 ± 1.1	23.1	110.4 ± 6.1
	18 000 rpm	92.1 ± 4.4	88.6	26.4 ± 0.8	25.3	118.5 ± 5.2
120 µm	6 000 rpm	98.3 ± 2.6	94.5	18.6 ± 2.3	17.9	116.9 ± 4.9
	12 000 rpm	92.6 ± 0.5	89.0	21.4 ± 0.4	20.6	114.5 ± 0.9
	18 000 rpm	89.5 ± 3.2	86.1	31.9 ± 0.9	30.6	121.4 ± 4.1
200 µm	6 000 rpm	94.8 ± 0.5	91.1	16.2 ± 2.2	15.8	111.0 ± 2.7
	12 000 rpm	94.8 ± 1.4	91.1	16.0 ± 0.7	15.4	110.8 ± 2.1
	18 000 rpm	107.3 ± 4.2	103.2	15.1 ± 1.2	14.5	122.4 ± 5.3
500 µm	6 000 rpm	93.4 ± 0.0	89.8	16.9 ± 0.2	16.3	110.3 ± 0.2
	12 000 rpm	93.3 ± 2.0	89.7	16.5 ± 1.1	15.8	109.8 ± 3.1
	18 000 rpm	92.3 ± 1.7	88.8	16.9 ± 0.5	16.3	109.2 ± 2.2

[a] Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung, [b] bezogen auf den RP-Gehalt von 104.0 mg/ g

3.3.4.3 Diskussion

Tabelle 18 zeigt alle SDSL- und GMP-Gehalte, Abbildung 21 die Gehalte ausgewählter Mehle cv. Akteur vor und nach KM-Modifikation. Die KM-Behandlung reduzierte den SDSL-Gehalt der Basismehle unabhängig von der Mahldauer deutlich. In Abhängigkeit von der Drehzahl nahm der GMP-Gehalt zu, wobei diese Zunahme annähernd der Zunahme der GLUT-Fraktion bei der Osborne-Fraktionierung entspricht (Vgl. Tabelle 12). Diese Beobachtung war zu erwarten, da das GMP den Teil des GLUT mit dem höchsten Molekulargewicht darstellt. Die Zunahme war dabei abhängig von der Mahldauer, sodass der GMP-Gehalt bei 600 rpm/15 min sein Maximum erreichte. Eine längere Behandlungsdauer führte wiederum zu einer Abnahme des GMP-Gehaltes, was höchstwahrscheinlich auf die Bildung von nicht-reduzierbaren Cross-Links zurückzuführen war. Bei 500 rpm waren die Ergebnisse weniger eindeutig, da der GMP-Gehalt nach 20-minütiger Behandlung bei 500 rpm höher war als bei 600 rpm. Offensichtlich führte die mechanische Behandlung nicht ausschließlich zu einer verstärkten Bildung von GMP, sondern gleichzeitig zu einem teilweisen Abbau. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Weegels et al. (1996b) überein, der feststellte, dass das Einbringen mechanischer Energie während der Teigbereitung zu einer Abnahme des GMP-Gehaltes führte, welcher sich während der Teigruhe wieder erhöhte. Dieses Gleichgewicht aus GMP-Bildung und -Abbau ist, sobald Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen an Bedeutung gewinnen, in Richtung Bildung verschoben. Lagrein et al. (2008) zeigte, dass dies vor allem bei höheren Temperaturen der Fall ist.

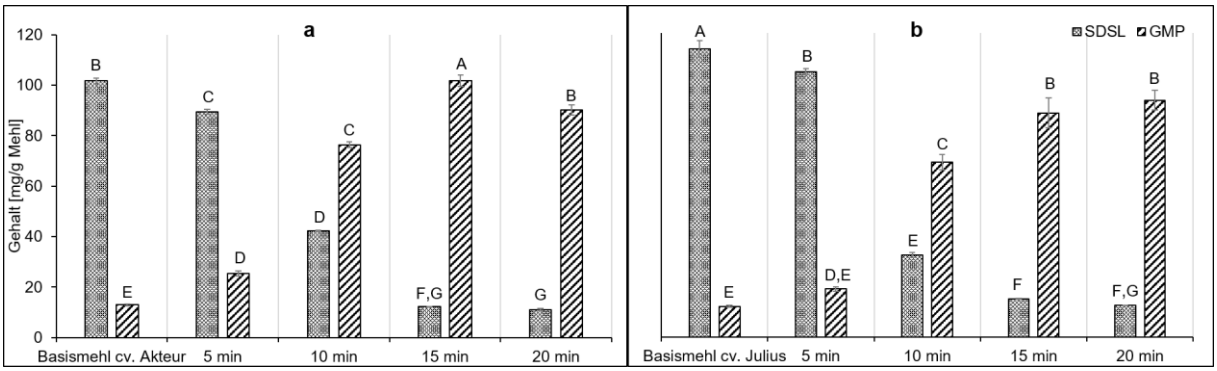


Abbildung 21: SDSL- und GMP-Gehalte von nicht-modifiziertem und KM-modifizierten Mehlen bei 600 rpm in Abhängigkeit von der Mahldauer; a: Mehl cv. Akteur, b: Mehl cv. Julius; verschiedene Großbuchstaben (A-G) kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.05$, einfaktorielle ANOVA, Tukey´s Test) zwischen den Gehalten verschiedener Mahldauern innerhalb einer Drehzahl

Die für Mehl cv. Julius erhaltenen Ergebnisse waren vergleichbar. Die Ergebnisse der SDSS/GMP-Fraktionierung sind mit denen der Osborne-Fraktionierung vergleichbar, in der die Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen ebenfalls zu einer starken Zunahme des GLUT-Gehaltes führten (Vgl. Abbildung 17). Der Thiol-Disulfid-Austausch auf molekularer Ebene deutet auf eine zusätzliche Beeinträchtigung der Strukturen im Mikro- und Nanometerbereich hin. Um

dies zu bestätigen, wurden Versuche mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung (PGV) durchgeführt.

3.3.5 Rastelektronenmikroskopische (REM)-Aufnahmen von modifizierten Mehlen

Die Rasterelektronenmikroskopie verschiedener KM- und ZM-modifizierter Mehle erfolgte mittels des Rasterelektronenmikroskops EVO MA 10 (Carl Zeiss Co., Jena, Deutschland) bei der HOSOKWA ALPINE AG in Augsburg.
Bei der REM können Oberflächenstrukturen mit < 7 – 1 000 000-facher Vergrößerung mit einer Auflösung bis zu 5 nm untersucht werden.

3.3.5.1 REM der Basismehle

In Abbildung 22 und Abbildung 23 sind die REM-Aufnahmen der Basismehle cv. Akteur bzw. cv. Julius dargestellt. Beide Abbildungen zeigten die für Mehl charakteristischen, rundlichen bis ovalen Stärkekörner, die in ein Proteinnetzwerk eingebettet vorlagen.

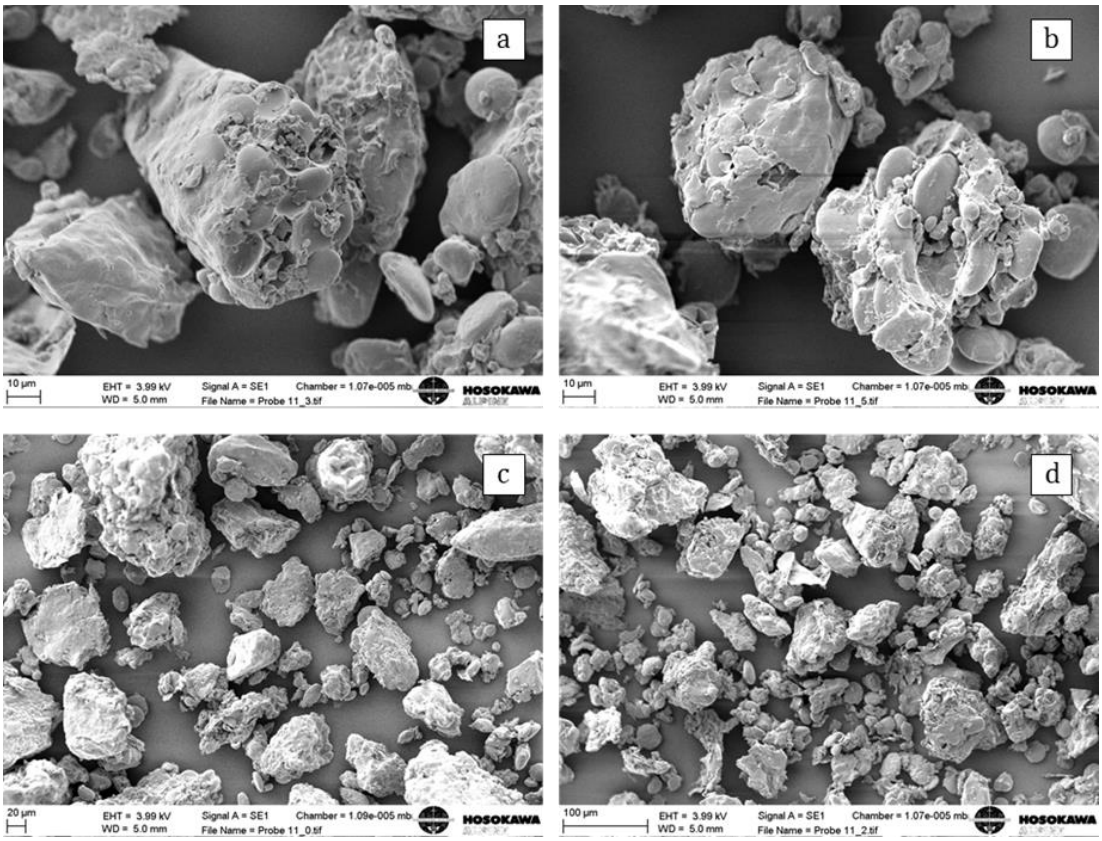


Abbildung 22: REM-Aufnahmen des Basismehles cv. Akteur; a/b: 10 µm-, c: 20 µm-, d: 100 µm-Maßstab

In den Aufnahmen im 100 µm-Maßstab (Vgl. Abbildung 22 d und Abbildung 23 d) waren sowohl auf den Stärkekörnern als auch im Proteinnetzwerk scharfkantige Strukturen zu erkennen. Diese kristallinen Strukturen waren im 10 – 20 µm-Maßstab (Vgl. Abbildung 22 a/b/c und

Abbildung 23 a/b/c) nicht ersichtlich. Die Partikel des Basismehles cv. Julius waren dabei etwas kantiger und die Stärkekörner stärker in die Proteinhülle integriert als beim Mehl cv. Akteur.

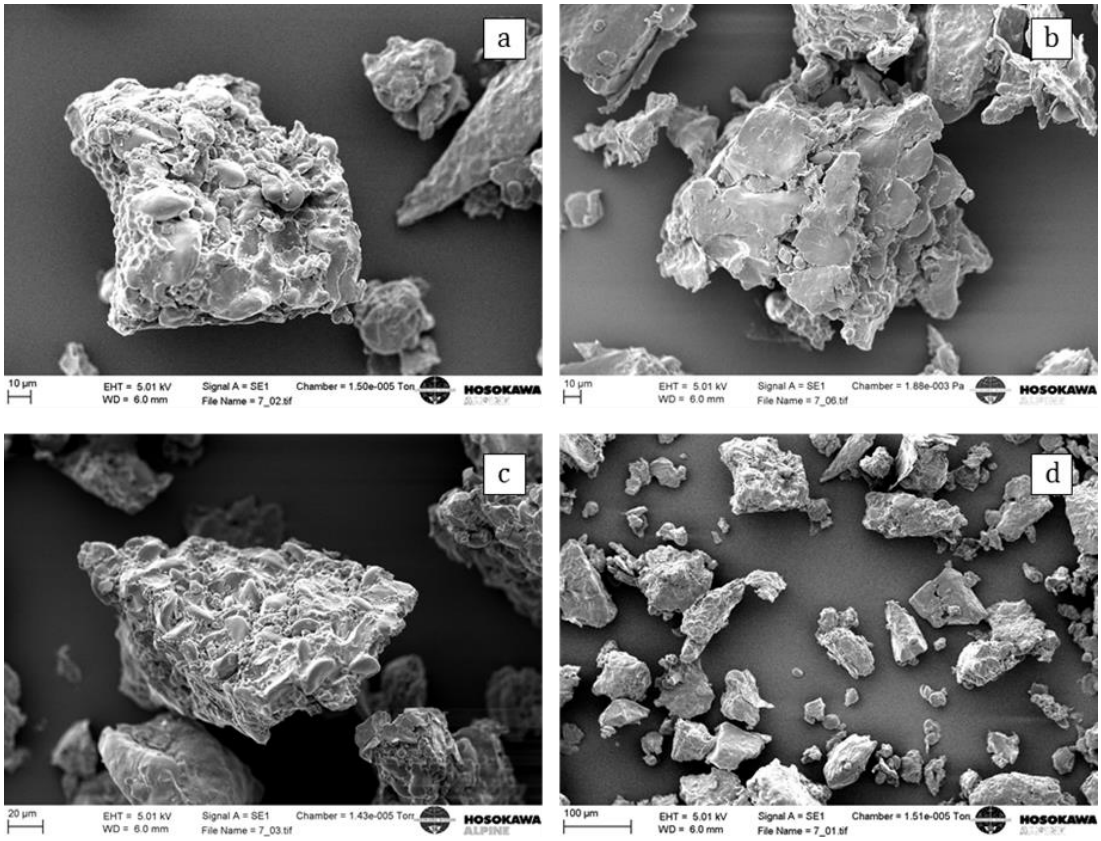


Abbildung 23: REM-Aufnahmen des Basismehles cv. Julius; a/b: 10 µm-, c: 20 µm-, d: 100 µm-Maßstab

3.3.5.2 REM-Aufnahmen der mittels Kugelmühle modifizierten Mehle

In den nachfolgenden Abbildungen sind die REM-Aufnahmen der unterschiedlich intensiv in der KM modifizierten Mehle veranschaulicht (Vgl. Abbildung 24 bis Abbildung 27).

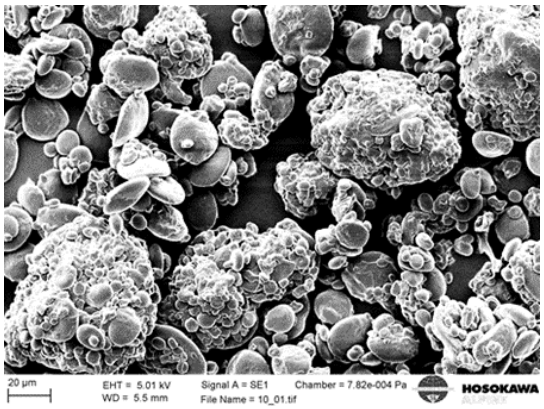


Abbildung 24: REM-Aufnahme des Mehles cv. Akteur nach KM-Modifikation (600 rpm, 5 min) im 20 µm-Maßstab

Nach 5- bis 10-minütiger Modifikationen bei 600 rpm war eine Freilegung der Stärkekörner aus der Proteinhülle ersichtlich. Vorwiegend wurden die größeren oval- bis linsenförmigen A-Typ Granula beobachtet, welche einen Durchmesser von 20-35 µm aufwiesen. Die kleineren, etwa 2-10 µm großem und sphärischem B-Typ Granula waren deutlich weniger vorhanden. Die herausgelöste, abgetrennte Proteinhülle konnte nicht isoliert identifiziert werden.

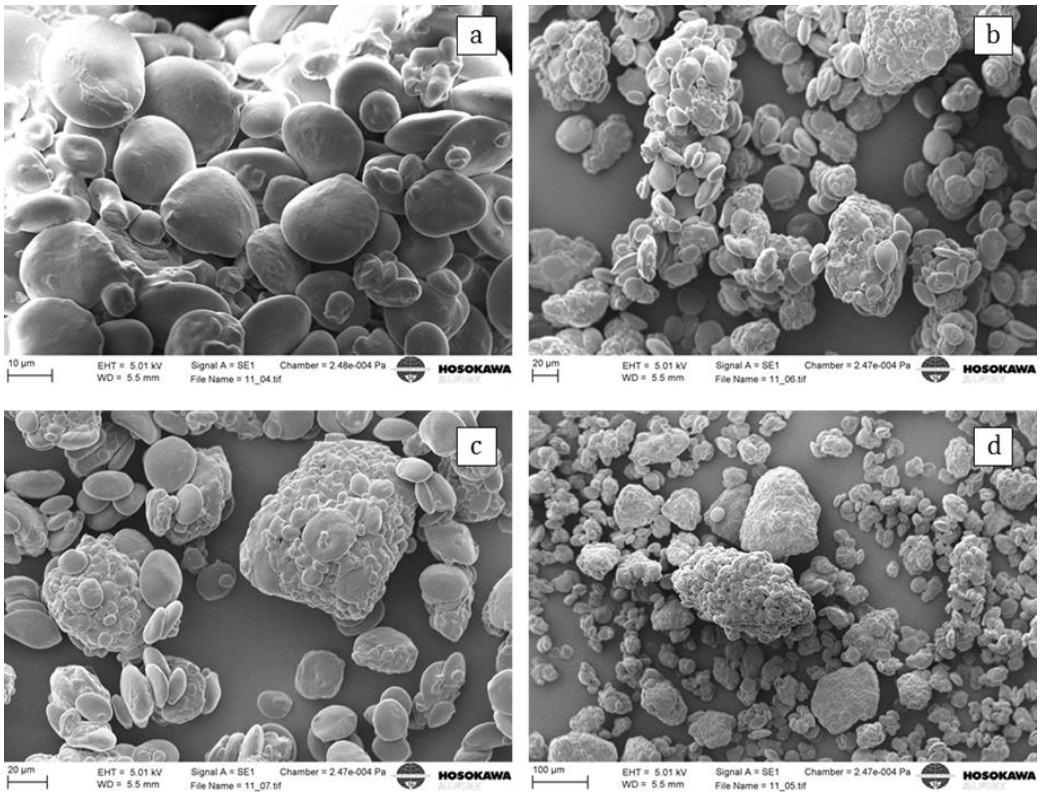


Abbildung 25: REM-Aufnahmen des Mehles cv. Akteur nach KM-Modifikation (600 rpm, 10 min); a: 10 µm-, b/c: 20 µm-, d: 100 µm-Maßstab

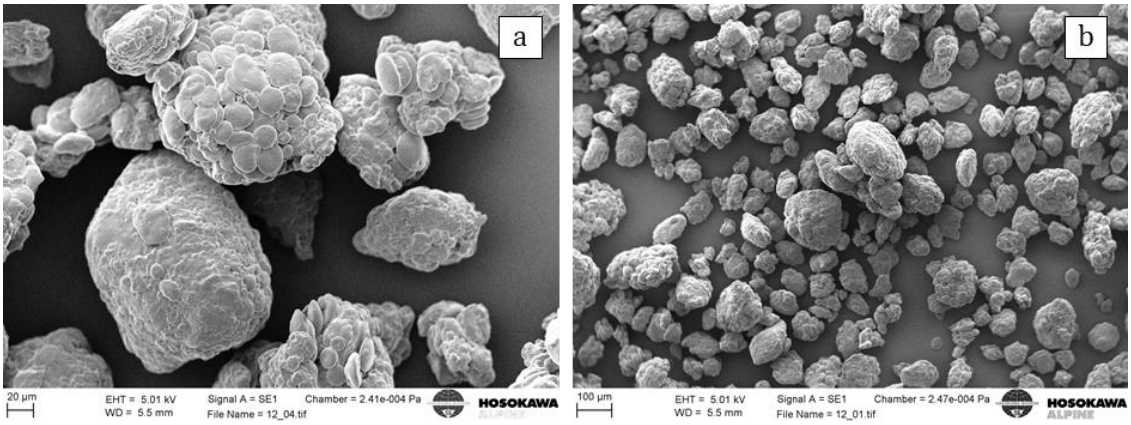


Abbildung 26: REM-Aufnahmen des Mehles cv. Akteur nach KM-Modifikation (600 rpm, 15 min); a: 20 µm-, b: 100 µm-Maßstab

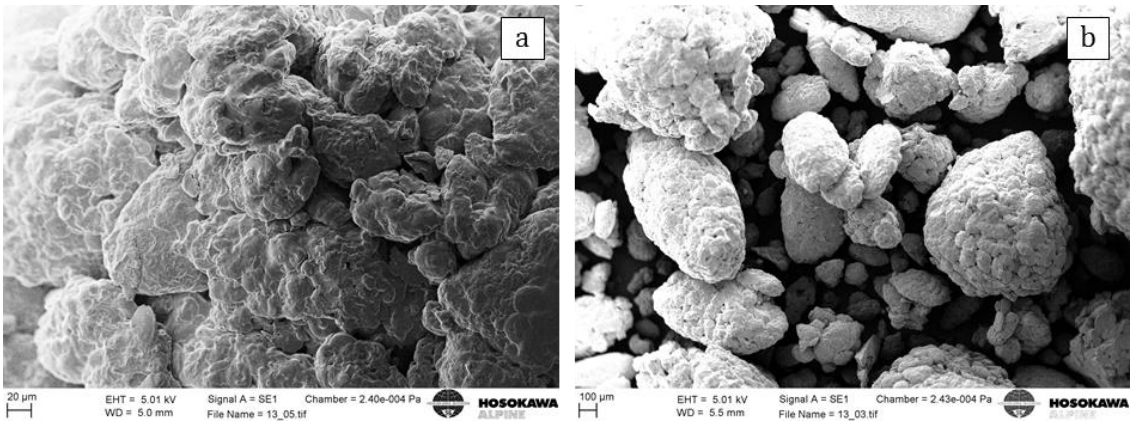


Abbildung 27: REM-Aufnahmen des Mehles cv. Akteur nach KM-Modifikation (600 rpm, 20 min); a: 20 µm-, b: 100 µm-Maßstab

3.3.5.3 REM-Aufnahmen der mittels Zentrifugalmühle modifizierten Mehle

Nachfolgend sind die REM-Aufnahmen von ZM-modifizierten Mehlen abgebildet (Vgl. Abbildung 28 und Abbildung 29).

Die Partikel des bei 6 000 rpm und einem 80 µm-Sieb modifizierten Mehls entsprachen in ihrer Form und Größe noch in etwa dem nativen Basismehl (Vgl. Abbildung 22). Lediglich bei starker Vergrößerung (Vgl. Abbildung 28 a) wurde eine leichte Ablösung der Proteinhülle um die Stärkegranula beobachtet.

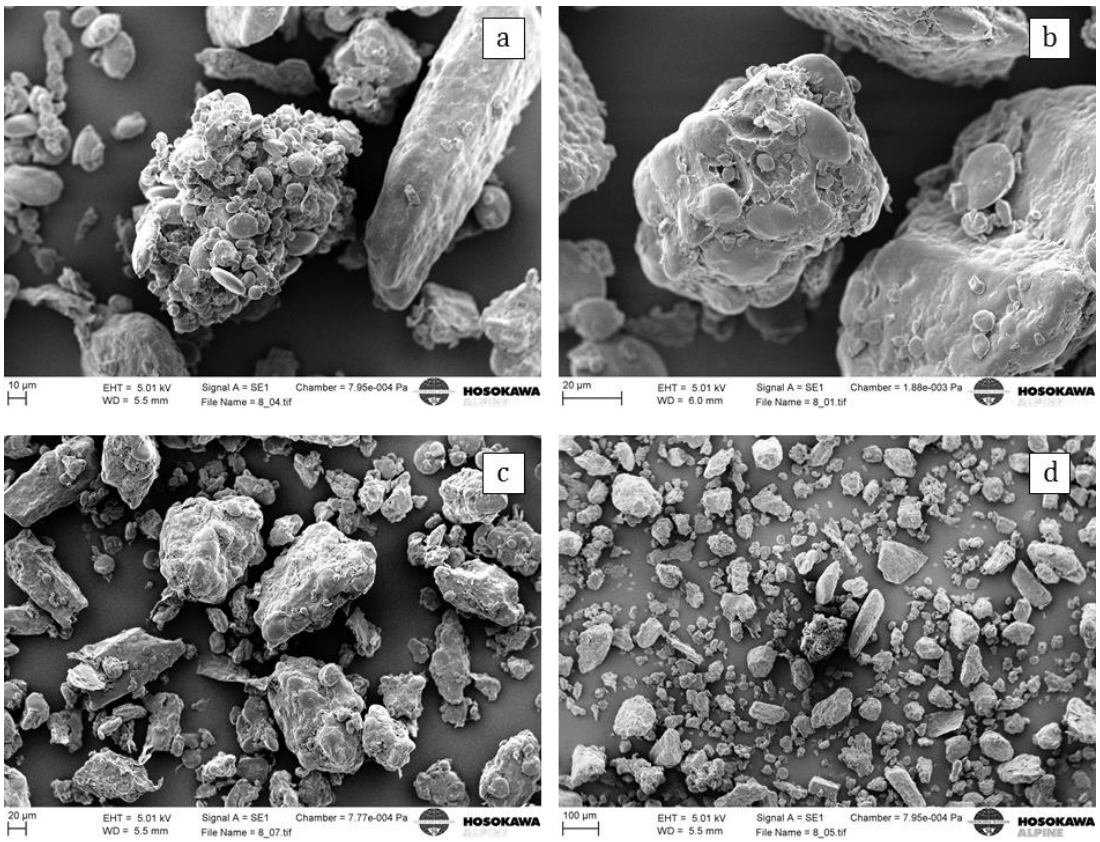


Abbildung 28: REM-Aufnahmen des Mehles cv. Akteur nach ZM-Modifikation (6 000 rpm, 80 µm); a: 10 µm-, b/c: 20 µm-, d: 100 µm-Maßstab

Bei intensiver Beanspruchung der Mehle (18 000 rpm/ 80 µm-Sieb) war eine deutliche Schädigung des Stärke-Protein-Netzwerkes ersichtlich. In Abbildung 29 a ist erkennbar, dass durch Behandlung eine Zerstörung der nativen Strukturen stattfand, sodass innerhalb des Netzwerkes Vertiefungen, Kerben und Furchen zu erkennen waren. Weiterhin wurde eine signifikante Verringerung der Partikelgröße im Vergleich zum nativen bzw. bei 6 000 rpm-modifizierten Mehl beobachtet. Eine Agglomeratbildung, wie in intensiv an der KM modifizierten Mehlen (Abbildung 27 b) zu erkennen war, wurde nach ZM-Modifikation nicht beobachtet. Auch die Schädigung der Proteinhülle sowie die Freilegung einzelner Stärkegranula-Typen, wie es nach 5- bzw. 10-minütiger KM-Behandlung der Fall war, wurde nicht beobachtet (Vgl. Abbildung 24 und Abbildung 25).

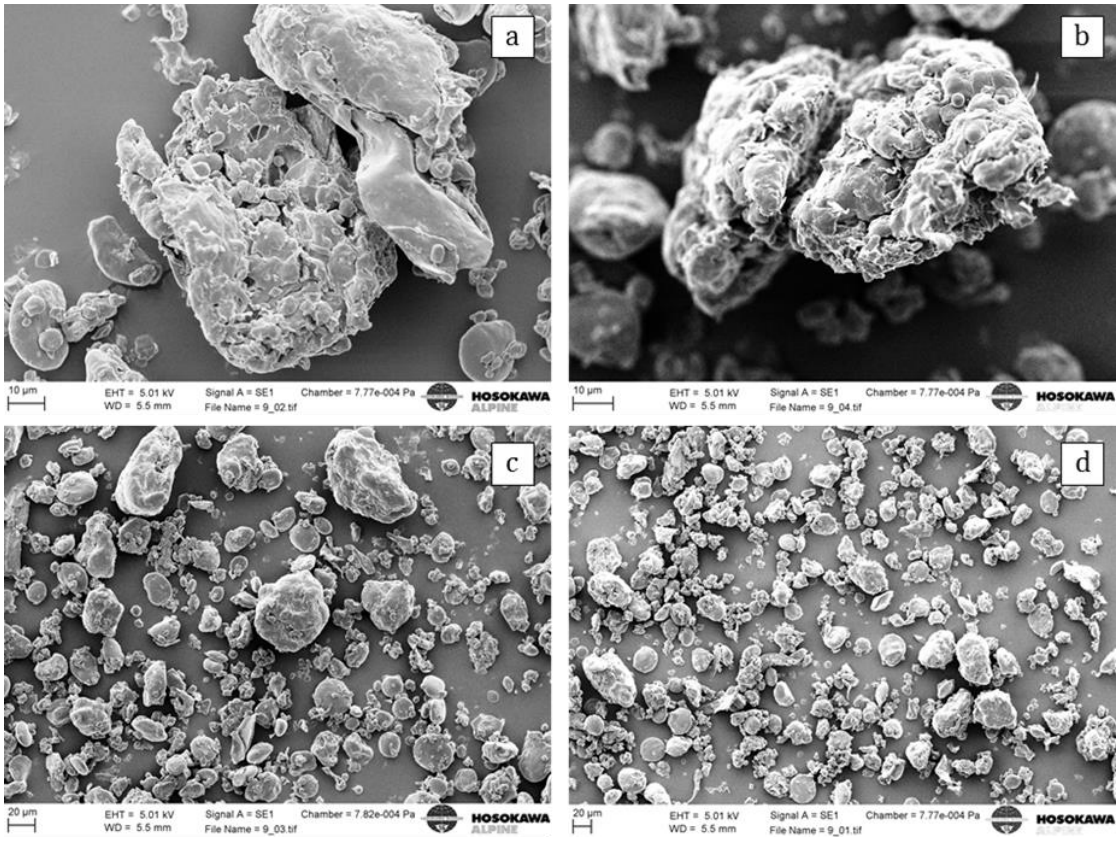


Abbildung 29: REM-Aufnahmen des cv. Akteur nach ZM-Modifikation (18 000 rpm, 80 µm); a/b: 10 µm-, c/d: 20 µm-Maßstab

3.3.5.4 Diskussion

Abbildung 22 bis Abbildung 29 zeigen die REM-Aufnahmen der nativen und der KM- bzw. ZM-modifizierten Mehle bei einer Auflösung von 20 - 100 µm. Ein hoher Modifikationsgrad in der KM (lange Mahldauer, hohe Drehzahl) beeinflusste dabei die Mikrostruktur der Mehlpartikel stark. Eine Mahldauer von 10 min (Abbildung 25) führte zu einer signifikanten Verschiebung des primären Stärke-Protein-Netzwerkes, sodass in Folge die Stärkegranula als freie Partikel vorlagen. Es wurden sowohl große linsenförmige A-Typ-Granula als auch kleinere sphärische B-Typ-Granula beobachtet, sodass die Erkenntnisse der PGV (Tabelle 21) bestätigt wurden. Die Oberfläche der Stärkepartikel wirkte nach längerer Mahldauer in der Kugelmühle flach und glatt. Die Proteine waren nicht eindeutig zuordenbar. In den Basismehlen (Abbildung 22 und Abbildung 23) war die Stärkeoberfläche eher ungleichmäßig und kantig, sodass die Partikel als kohäsive Struktur erschienen. Während der Behandlung änderte sich die Stärkegranulaoberfläche von einem ungleichmäßigen großen Partikel zu kompakten Agglomeraten, in der die Bestandteile nur schwer zu unterscheiden waren. Im Gegensatz dazu fand Tester et al. (1994) raue und klumpige Oberflächen, welche durch deformierte Granula und einem geringen Anteil unbeschädigter Granula nach Vermahlung mittels KM gebildet wurden. Mit zunehmendem Modifikationsgrad kam es zu einer Agglomeration der Mehlpartikel (Vgl. Abbildung 26 und Abbildung 27), sodass mit steigender Mahldauer insgesamt die Partikelgröße stark zunahm. Es ist anzunehmen, dass die hohen Temperaturen nach 15- bis 20-minütiger Vermahlung zu einer partiellen Stärkeverkleisterung führten. Diese Agglomeratbildung fand durch die Modifikation mittels ZM nicht statt, obwohl während der Vermahlung teilweise höhere Temperaturen auftraten. Die Ausbildung des Gluten-Netzwerkes war durch den geringen Wassergehalt kaum möglich. Im Gegensatz dazu fand Liu et al. (2011) nach intensiverer Behandlung auf der Stärkegranulaoberfläche keine Brüche und Rillen. Die Tatsache, dass kleine Fragmente von der äußeren Stärkegranulaschicht abblätterten, stimmte wiederum mit den Erkenntnissen von Liu et al. (2011) überein.

Ein maximaler Effekt wurde nach 20-minütiger Behandlungsdauer bei 600 rpm beobachtet. In der REM-Aufnahme im 20 µm-Maßstab war keine eindeutige Abgrenzung der Partikel mehr möglich, das Stärke-Protein-Netzwerk verklumpte bzw. agglomerierte bis auf max. 500 µm. Die Differenzierung von Stärke- und Proteinpartikeln war somit nicht mehr möglich.

3.3.6 Partikelgrößenverteilung (PGV)

Die Messung der Partikelgrößenverteilung (PGV) wurde am Laserbeugungs-Partikelgrößen-Messgerät *Mastersizer 3000* gekoppelt mit einer *Aero S*-Trockendispergiereinheit am Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie durchgeführt. Dabei wird die Intensität des gestreuten Lichts eines Laserstrahls gemessen, während dieser eine dispergierte Partikelprobe durchdrang. Die *Aero S* dispergiert trockene Proben durch Beschleunigung der Partikel in einer Venturidüse unter Verwendung von Druckluft. Die Partikel werden anschließend mittels einer Vakuumquelle durch die Messzelle des *Mastersizer 3000* gesogen. Je nach Partikelgröße kommt es nach Beleuchtung zu einem Beugungsmuster mit hohen Wellenbergen und engen Abständen bei großen Partikeln oder zu kleinen Wellenbergen mit größeren Abständen bei kleinen Partikeln. Die Partikelgröße Dx gibt jeweils an, welcher anzahl- bzw. volumengewichtete Anteil x [%] der Partikel unterhalb dieser Partikelgröße liegt. Der Dx (50) gibt dabei die mittlere Partikelgröße an.

Als Ergebnistyp der PGV wird zwischen Anzahldichte und Volumendichte unterschieden. Bei der Volumenverteilung bezieht sich die Partikelgröße auf das Partikelvolumen, sodass die großen Partikel mehr in den Vordergrund treten. Bei der Anzahlverteilung bezieht sich die Partikelgröße auf Anzahl der Partikel, sodass die kleineren Partikel vorstehen. Die als Ergebnistyp gewählte Anzahldichte bedeutet, dass kleine Volumen kleinerer Partikel als signifikante Anzahl von Partikeln angezeigt werden.

Die ebenfalls durchgeführte REM (Vgl. 3.3.5) sollte zeigen, wie die Mikrostruktur der Mehle durch die Nachvermahlung beeinflusst wurde. Um die REM mit quantitativen Daten zu belegen, war die Bestimmung der Partikelgröße der Mehle essentiell. Die PGV sind in Tabelle 21 (KM) und Tabelle 22 (ZM) in Abhängigkeit von Drehzahl, Mahldauer und Siebdurchmesser aufgeführt. Die Muster der PGV von verschieden KM- bzw. ZM-modifizierten Mehlen sind in Abbildung 30 bis Abbildung 32 dargestellt.

Es wurden bedeutende Unterschiede zwischen den PGV der nativen und KM-modifizierten Mehle festgestellt. Die Basismehle und die KM-modifizierten Mehle, die nur geringem thermischen Stress ausgesetzt wurden, zeigten bei der Anzahldichte eine charakteristische bimodale Verteilung der Weizenstärke (Tran et al., 2011). Zwei Stärkegranula-Fraktionen, die A-Typ- (5–60 µm) und B-Typ-Granula (1–5 µm), waren erkennbar (Vgl. Abbildung 30).

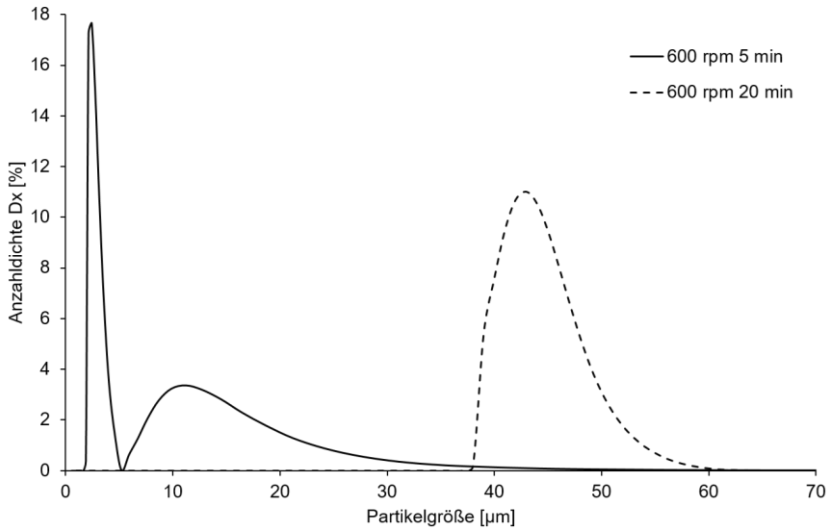


Abbildung 30: Anzahldichteverteilung Dx des Mehles cv. Akteur nach KM-Modifikationen bei 600 rpm in Abhängigkeit von der Mahldauer

In Abbildung 31 sind die Volumendichteverteilung Dx der Basismehle cv. Akteur (rot) und cv. Julius (grün) gegenübergestellt. Beide Basismehle unterschieden sich in ihrer PGV nur minimal. Dieses Verhalten spiegelte sich auch in den PGV der unterschiedlichen Modifikationsstufen beider Weizensorten wieder.

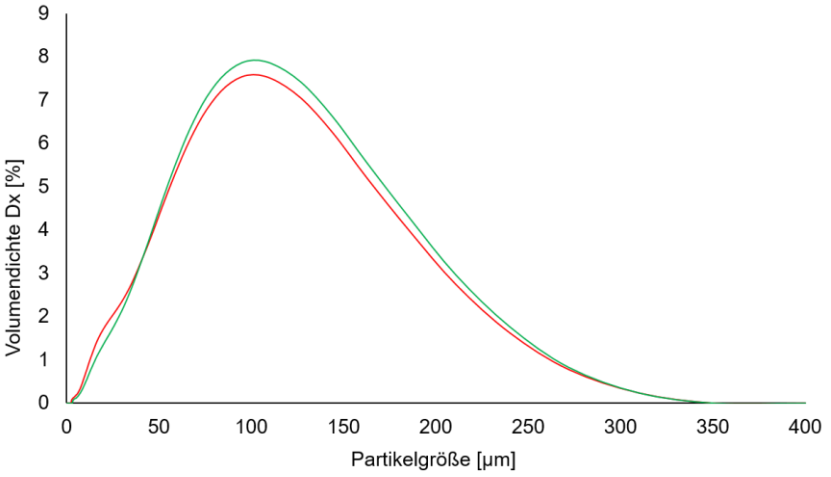


Abbildung 31: Volumendichteverteilung Dx der Basismehle cv. Akteur (rot) und cv. Julius (grün)

Die ermittelten Werte belegen, dass die ZM-Modifikation generell eine Verringerung der Partikelgröße bewirkte. Die Dx (50)-Werte wurden durch die Behandlung bei Drehzahlen von 18 000 rpm und einer Siebgröße ≤ 200 µm von 4.9 ± 0.7 µm (Basismehl) auf bis zu 2.9 ± 0.0 µm verringert (Vgl. Tabelle 22).

In Abbildung 32 ist die Volumendichteverteilung Dx des Mehles cv. Akteur nach Modifikationen in der ZM mittels 80 µm Siebporengröße in Abhängigkeit von der Drehzahl dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die Modifikationen mittels Zentrifugalfühle keine bimodale Partikelgrößenverteilung bewirkte, wie es bei der Kugelmühle der Fall war.

Tabelle 21: Anzahldichteverteilung Dx des Mehles cv. Akteur und der mittels KM-behandelten Mehle in Abhängigkeit von Drehzahl und Mahldauer (8 Kugeln Ø 30 mm)

Weizenmehl cv. Akteur		Dx (10) [µm] [a]	Dx (50) [µm] [a]	Dx (90) [µm] [a]
Basismehl		3.2 ± 0.4	4.9 ± 0.7	14.5 ± 1.5
KM 300 rpm	5 min	2.1 ± 0.0	3.4 ± 0.0	8.4 ± 0.0
	10 min	2.1 ± 0.1	3.3 ± 0.1	7.7 ± 0.4
	15 min	2.1 ± 0.1	3.3 ± 0.1	7.4 ± 0.2
	20 min	2.0 ± 0.1	3.2 ± 0.1	7.3 ± 0.1
KM 400 rpm	5 min	2.1 ± 0.0	3.3 ± 0.0	7.6 ± 0.0
	10 min	2.2 ± 0.0	3.3 ± 0.0	7.6 ± 0.1
	15 min	2.2 ± 0.0	3.3 ± 0.0	8.1 ± 0.1
	20 min	2.2 ± 0,0	3.3 ± 0.0	9.5 ± 0.1
KM 500 rpm	5 min	2.7 ± 0.0	4.2 ± 0.1	13.9 ± 0.3
	10 min	2.3 ± 0.0	3.3 ± 0.0	14.0 ± 0.2
	15 min	12.1 ± 0.3	18.3 ± 0.3	32.6 ± 0.5
	20 min	14.2 ± 0.2	21.3 ± 0.1	38.6 ± 0.1
KM 600 rpm	5 min	2.4 ± 0.1	3.3 ± 0.3	15.2 ± 0.5
	10 min	12.9 ± 0.3	19.4 ± 0.3	35.8 ± 0.6
	15 min	32.4 ± 0.6	49.9 ± 0.5	91.3 ± 0.8
	20 min	65.7 ± 7.2	114.0 ± 7.0	260.0 ± 12.0

[a] *Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Sechsfachbestimmung*

Tabelle 22: Anzahldichteverteilung Dx des des Mehles cv. Akteur und der mittels ZM-behandelten Mehle in Abhängigkeit von Drehzahl und Siebporengröße

Weizenmehl cv. Akteur		Dx (10) [µm] [a]	Dx (50) [µm] [a]	Dx (90) [µm] [a]
Basismehl		3.2 ± 0.4	4.9 ± 0.7	14.5 ± 1.5
6 000 rpm	80 µm	2.1 ± 0.1	3.1 ± 0.1	7.6 ± 0.7
	120 µm	2.3 ± 0.1	3.3 ± 0.2	9.6 ± 0.8
	200 µm	1.9 ± 0.0	2.9 ± 0.0	7.0 ± 0.0
	500 µm	3.0 ± 0.0	4.3 ± 0.1	12.8 ± 0.9
12 000 rpm	80 µm	1.9 ± 0.0	3.0 ± 0.0	6.7 ± 0.1
	120 µm	2.1 ± 0.0	3.3 ± 0.0	8.7 ± 0.1
	200 µm	2.1 ± 0.0	3.3 ± 0.0	8.6 ± 0.5
	500 µm	2.3 ± 0.0	3.5 ± 0.0	9.5 ± 0.1
18 000 rpm	80 µm	1.9 ± 0.0	2.9 ± 0.0	6.5 ± 0.1
	120 µm	1.9 ± 0.0	3.0 ± 0.0	6.4 ± 0.1
	200 µm	1.9 ± 0.0	2.9 ± 0.0	7.0 ± 0.1
	500 µm	2.2 ± 0.1	3.4 ± 0.1	8.9 ± 0.4

[a] *Mittelwert und absolute Standardabweichung aus einer Sechsfachbestimmung*

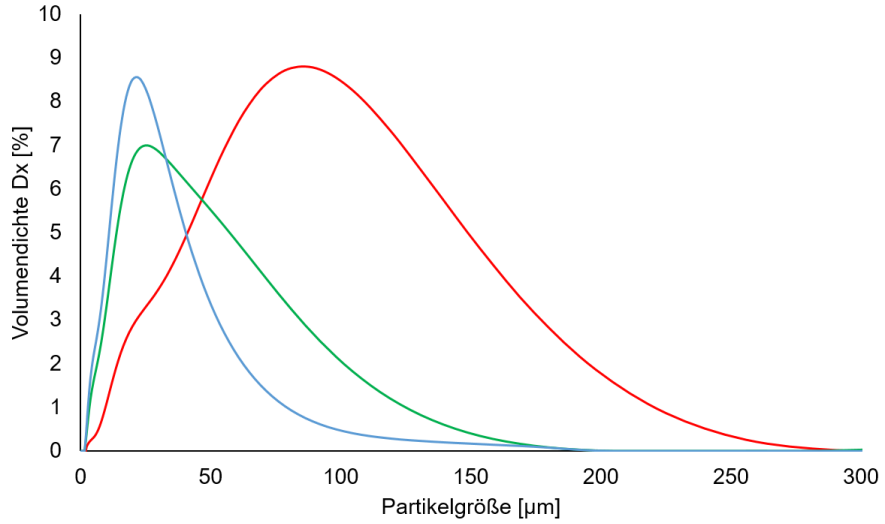


Abbildung 32: Volumendichteverteilung Dx des Mehles cv. Akteur nach ZM-Modifikationen mit einer Siebporengröße von 80 µm in Abhängigkeit von der Drehzahl (rot: 6 000 rpm, grün: 12 000 rpm, blau: 18 000 rpm)

Die Änderungen, die mittels der ZM erzielt wurden, waren im Vergleich zu den in der KM ermittelten Werten (Vgl. Tabelle 21) weniger stark ausgeprägt. Die Modifikationen führten im Gegensatz zur KM nie zu einer Bildung von größeren Agglomeraten bzw. zu einer Verschiebung in höhere Größenklassenbereiche.

3.3.6.1 Diskussion

In Übereinstimmung mit Roa et al. (2015) wurde gezeigt, dass die Nachvermahlung mittels KM eine Abnahme der Partikelgröße und ein Auseinanderbrechen der Stärkegranula in schwach modifizierten Mehlen (300 oder 400 rpm) bewirkt. Durch die 20-minütige Behandlung bei 300 rpm konnten die nativen Partikelgrößenwerte von cv. Akteur bei Dx (50) von 4.9 ± 0.7 µm auf 3.2 ± 0.1 µm gesenkt werden. Unter extremeren Bedingungen der KM-Behandlung (500 oder 600 rpm) nahmen die Durchmesser Dx (10), Dx (50) und Dx (90) mit zunehmender Behandlungsdauer (5–20 min) stark zu. Diese Erkenntnisse bestätigen die Ergebnisse von Liu et al. (2011), die zeigten, dass die unterschiedlichen Dx-Werte mit zunehmender Mahldauer signifikant ansteigen. Eine, in der KM durch hohe Drehzahlen oder lange Mahldauern bedingte, höhere Behandlungsintensität führte zu einer Verschiebung der PGV hin zu größeren Partikelgrößen, einer Angleichung der A- und B-Partikeltypen und einer Reduktion der Peakhöhen. Je enger Dx (10) und Dx (90) zusammenliegen, desto enger die PGV. Die Partikelgrößen bewegten sich zwischen 38 und 60 µm, was eine Agglomeration der Strärkegranula indiziert, sodass die Daten der PGV die REM- Beobachtungen (Vgl. Abbildung 27) bestätigten.

Die mikrostrukturellen Untersuchungen bestätigten dabei die auf Basis der quantitativen Proteinanalysen hypothetischen Effekte. Es kam zu Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen

innerhalb der Glutenproteine, was zu einer vollkommen unterschiedlichen Proteinverteilung nach intensiver KM-Modifikation führte. Die Proteinvernetzung beeinflusste die mikrostrukturelle Funktion der Mehle dahingehend, dass die Proteine auf der Partikeloberfläche in der Lage waren, sich untereinander zu vernetzen, was letztendlich zu der Agglomeration der Partikel führte. Gleiches gilt für die Stärkegranula, welche ebenfalls Proteine auf ihrer Oberfläche besitzen. Weiterhin führten die hohen Temperaturen während der KM-Modifikation zu einer Verkleisterung der Stärkemoleküle auf der Granulaoberfläche, die aufgrund des limitierenden Anteils an Wasser im Mehl nur partiell erfolgen konnte. Die Verkleisterung wurde von einem partiellen Verlust kristalliner Strukturen der Stärke und der über Wasserstoffbrückenbindungen verbunden Oberflächen, welche aus verkleisterten Material bestanden, begleitet. Es war anzunehmen, dass diese molekularen und strukturellen Änderungen die funktionellen Eigenschaften der Mehle maßgeblich beeinflussen.

3.3.7 Hauptfaktoren, die die Feuchte, Temperatur nach der Vermahlung, den Stärkeschädigungsgrad und die Partikelgröße beeinflussen

Um die Hauptfaktoren zu identifizieren, die die Feuchte, die Temperatur nach der Vermahlung, den Stärkeschädigungsgrad und die Partikelgröße Dx (50) beeinflussen, wurde eine zweifache ANOVA über alle KM-Modifikationsstufen (insgesamt 16 Proben) mit der Mahldauer (5, 10, 15, oder 20 min) und der Drehzahl (300, 400, 500, oder 600 rpm) als Faktoren durchgeführt. Die Ergebnisse für cv. Akteur sind in Tabelle 23 dargestellt.

Generell beeinflussten alle untersuchten Faktoren die Feuchte, Temperatur nach der Vermahlung, den Stärkeschädigungsgrad und die Partikelgröße Dx (50) nach der KM-Behandlung. Die mittels der zweifachen ANOVA berechneten, zugehörigen F-Werte waren stets für die Drehzahl höher (532–4413) als für die Mahldauer (158–2143). Je größer der F-Wert, desto größer der Einfluss der unabhängigen Variablen zur Prognose der abhängigen Variablen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Drehzahl einen größeren Einfluss auf die Feuchte, die Temperatur nach der Vermahlung, den Stärkeschädigungsgrad und die Partikelgröße Dx (50) hat als die Mahldauer.

Zwischen der Drehzahl und der Mahldauer wurde eine statistisch signifikante Wechselwirkung ($p \leq 0.001$) für alle Faktoren bewiesen, was zeigt, dass die unterschiedlichen Level an Drehzahlen vom Level der Mahldauern abhängig sind.

Tabelle 23: Einfluss der KM-Parameter Drehzahl und Zeit auf die Temperatur, die Feuchte, den Stärkeschädigungsgrad und die PGV (Anzahldichte) Dx (50) von Weizenmehl cv. Akteur

Drehzahl	Zeit	Temperatur [°C]						Feuchte [%]						Stärkeschädigungsgrad [%]						Dx (50) [µm]					
[rpm]	[min]	[a]	*	5	10	15	20	[a]	*	5	10	15	20	[a]	*	5	10	15	20	[a]	*	5	10	15	20
300	5	**28.8**	B	D				**14.3**	A	A				**6.1**	D	C				**3.4**	A	A			
	10	**34.9**	B		D			**14.2**	AB		A			**7.0**	C		D			**3.3**	A		B		
	15	**38.9**	A			D		**14.0**	B			A		**7.3**	B			D		**3.3**	A			C	
	20	**41.2**	A				D	**13.9**	B				A	**7.4**	A				C	**3.2**	A				C
400	5	**37.3**	D	C				**14.2**	A	A				**6.9**	C	B				**3.3**	A	A			
	10	**46.4**	C		C			**13.7**	B		B			**7.3**	B		C			**3.3**	A		B		
	15	**52.4**	B			C		**13.6**	B			B		**7.6**	A			C		**3.3**	A			C	
	20	**59.0**	A				C	**13.2**	C				B	**7.7**	A				B	**3.3**	A				C
500	5	**52.3**	D	B				**13.9**	A	B				**7.8**	C	A				**4.2**	C	A			
	10	**67.4**	C		B			**12.8**	B		C			**7.9**	C		B			**3.3**	C		B		
	15	**75.2**	B			B		**11.9**	C			C		**8.3**	B			B		**18.3**	B			B	
	20	**82.2**	A				B	**11.4**	D				C	**8.5**	A				A	**21.3**	A				B
600	5	**63.2**	D	A				**12.6**	A	C				**8.0**	B	A				**3.3**	D	A			
	10	**82.9**	C		A			**9.9**	B		D			**8.6**	A		A			**19.4**	C		A		
	15	**96.2**	B			A		**7.8**	C			D		**8.7**	A			A		**49.9**	B			A	
	20	**100.0**	A				A	**5.6**	D				D	**8.8**	A				A	**114.0**	A				A

[a] Mittelwerte einer Dreifachbestimmung; Mittelwerte mit unterschiedlichen Großbuchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb der Proben (ANOVA on ranks, Tukey-Test, $p < 0.05$)

* Vergleich für den Faktor Mahldauer innerhalb der Drehzahlen 300 rpm /400 rpm /500 rpm /600 rpm

5/10/15/20: Vergleich für den Faktor Drehzahl innerhalb der Mahldauern 5 min/10 min/15 min/20 min

3.4 Rheologie

3.4.1 Wasseraufnahme und Teigentwicklungszeiten

Die Analytik des Knetverhaltens von aus Weizenmehl hergestellten Teigen wurde in Anlehnung an die ICC-Nr. 115/1 mittels eines Farinographen (Fa. Brabender) durchgeführt (ICC, 1992). Der Knetwiderstand, der je nach Teigviskosität auf die Schaufeln wirkt, wurde als Drehmoment gemessen. In einem Drehmoment-Zeit-Diagramm wurde die Teigentwicklung als Kurve aufgezeichnet, mithilfe derer das Knetoptimum ermittelt wurde, welches den Zeitpunkt des größten Widerstands des Teiges darstellt. Dieser Zeitpunkt bestimmte auch die Wasseraufnahme (WA) des jeweiligen Mehles. Aus der Kurve konnte die Teigentwicklungszeit (dough development time, DDT) des jeweiligen Mehles abgelesen werden. Die Standardbedingungen (30 °C, 500 BE) wurden dahingehend modifiziert, dass das Teigoptimum bei einer Temperatur von 22 °C und bei 550 BE bestimmt wurde. Diese Anpassung ist darauf zurückzuführen, dass während des Knetens bei niedrigerer Temperatur die optimale Teigkonsistenz besser hervorgehoben und das Maximum leichter bestimmt werden kann (Kieffer et al., 1998). Die zum Farinograph gehörende Software registriert die Messdaten, stellt sie in einem Diagramm als Funktion der Zeit dar und berechnet die WA eines Mehls. Die durchgeführten Bestimmungen wurden im Mikromaßstab (10 g Mehl) durchgeführt (Koehler und Grosch, 1999).

Durch den Verlust an Mehlfeuchtigkeit mit zunehmender mechanischer und thermischer Modifikation war eine proportionale Zunahme der Wasseraufnahme zu erwarten. Die bei niedrig bis moderaten Drehzahlen in der KM und ZM modifizierten Mehlproben ließen sich ohne Schwierigkeiten in einem 10 g-Kneter untersuchen. Die stark KM-modifizierten Proben bei 600 rpm konnten nicht unter den gleichen Bedingungen untersucht werden, da die Proben nach 10- bis 20-minütiger Mahldauer einen sehr geringen Feuchtigkeitsgehalt aufwiesen und daher eine erhöhte Wasserzugabe benötigten, um das gewünschte Teigoptimum von 550 FE zu erreichen. Um das Fassungsvermögen des 10 g-Kneters nicht zu überschreiten, wurde die Mehleinwaage auf je 7 g reduziert. Die Wasseraufnahme wurde nachträglich anhand der jeweiligen Feuchtigkeitsgehälter und Trockenmassen korrigiert.

In Tabelle 24 sind die ermittelten WAs sowie die DDTs der nativen und KM- bzw. ZM-modifizierten Mehle dargestellt.

Tabelle 24: Wassergehalt, WA und DDT der nativen und modifizierten Weizenmehle

	Wassergehalt [%] [a]	**WA** [%]	**DDT** [min] [a]
Basismehl cv. Julius	14.2 ± 0.1	63.9	8.1 ± 0.4
Basismehl cv. Akteur	14.6 ± 0.2	59.4	5.1 ± 0.4
KM 300 rpm 5 min (A)	14.3 ± 0.2	63.7	9.3 ± 0.7
KM 300 rpm 10 min (A)	13.5 ± 0.1	64.3	7.8 ± 0.5
KM 300 rpm 15 min (A)	13.6 ± 0.1	66.6	7.9 ± 0.1
KM 300 rpm 20 min (A)	13.3 ± 0.1	68.0	6.7 ± 0.2
KM 400 rpm 5 min (A)	13.1 ± 0.2	66.1	8.6 ± 0.4
KM 400 rpm 10 min (A)	13.1 ± 0.2	69.5	10.3 ± 1.0
KM 400 rpm 15 min (A)	12.0 ± 0.0	73.4	16.4 ± 0.8
KM 400 rpm 20 min (A)	12.0 ± 0.1	75.0	18.9 ± 0.2
KM 500 rpm 5 min (A)	12.2 ± 0.1	70.6	7.9 ± 0.3
KM 500 rpm 10 min (A)	12.7 ± 0.2	74.8	16.6 ± 0.4
KM 500 rpm 15 min (A)	11.1 ± 0.1	70.5	9.1 ± 1.4
KM 500 rpm 20 min (A)	10.1 ± 0.2	74.7	10.2 ± 1.7
KM 600 rpm 5 min (A)	11.2 ± 0.1	75.1	19.5 ± 0.6
KM 600 rpm 10 min (A)	7.0 ± 0.3	87.4*	10.1 ± 0.4
KM 600 rpm 15 min (A)	7.5 ± 0.2	120.9*	7.9 ± 0.1
KM 600 rpm 20 min (A)	4.8 ± 0.0	129.9*	14.9 ± 0.2
KM 500 rpm 5 min (J)	12.7 ± 0.3	74.8	7.5 ± 0.5
KM 500 rpm 10 min (J)	11.6 ± 0.1	81.2	21.7 ± 0.3
KM 500 rpm 15 min (J)	10.6 ± 0.1	71.3	6.4 ± 0.7
KM 500 rpm 20 min (J)	10.5 ± 0.2	74.0	6.5 ± 1.5
ZM 0.5 mm 6 000 rpm (A)	13.6 ± 0.1	59.2	6.6 ± 0.3
ZM 0.5mm 12 000 rpm (A)	13.8 ± 0.1	59.7	6.9 ± 0.1
ZM 0.5mm 18 000 rpm (A)	13.4 ± 0.2	62.5	6.9 ± 0.2
ZM 0.2 mm 6 000 rpm (A)	11.9 ± 0.1	62.0	6.7 ± 0.3
ZM 0.2 mm 12 000 rpm (A)	11.5 ± 0.2	64.0	7.7 ± 0.2
ZM 0.2 mm 18 000 rpm (A)	11.0 ± 0.1	67.3	7.7 ± 0.3
ZM 0.12 mm 6 000 rpm (A)	10.6 ± 0.2	66.0	10.5 ± 0.4
ZM 0.12 mm 12 000 rpm (A)	6.2 ± 0.2	79.0	35.2 ± 2.7
ZM 0.12 mm 18 000 rpm (A)	5.7 ± 0.1	81.6	30.3 ± 0.6
ZM 0.08 mm 6 000 rpm (A)	8.6 ± 0.2	68.3	10.3 ± 1.2
ZM 0.08 mm 12 000 rpm (A)	5.4 ± 0.1	81.1	29.5 ± 2.0
ZM 0.08 mm 18 000 rpm (A)	3.6 ± 0.1	89.7	36.4 ± 1.6
ZM 0.12 mm 6 000 rpm (J)	11.6 ± 0.2	68.4	5.0 ± 0.6
ZM 0.12 mm 12 000 rpm (J)	8.9 ± 0.1	75.0	9.1 ± 1.0
ZM 0.12 mm 18 000 rpm (J)	4.6 ± 0.2	87.7	22.8 ± 2.3

[a] *Mittelwert ± absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung; A: cv. Akteur, J: cv. Julius; KM: Kugelmühle, ZM: Zentrifugalmühle; * rechnerisch angeglichen mittels der jeweiligen Feuchtigkeitsgehalte*

Anhand der Knetoptima wurde deutlich, dass es essenzielle Unterschiede in der Teigentwicklung in Abhängigkeit von dem jeweiligen Modifikationsgrad gab. Die modifizierten Mehle zeigten mit zunehmendem Schädigungsgrad einen erniedrigten Wassergehalt und eine erhöhte WA. Die DDT nahm tendenziell mit steigender Modifikation zu, wobei die Zunahmen sich innerhalb der verschiedenen Mühlentypen stark unterschieden. Die ZM-modifizierten Mehle mit Sieblochgrößen von 0.5 mm und 0.2 mm zeigten kaum Veränderungen in der WA als auch im Knetoptimum. Die stark mittels ZM-modifizierten Mehle (Porengröße: 0.12 mm und 0.08 mm) wiesen signifikant höhere WA und deutlich spätere Knetoptima auf, die bei maximal 36.4 ± 1.6 min lagen.

Die Auswirkungen der KM-modifizierten Mehle auf die DDT waren weniger einheitlich. Innerhalb der Drehzahlen von 500 - 600 rpm kam es bei cv. Akteur als auch bei cv. Julius zu Zu- und Abnahmen der Knetoptima. Diese Divergenzen sind mit den kaum zu erkennenden Kurvenmaxima zu begründen, die durch die Software nicht mehr bestimmt werden konnte. Das maximale Knetoptimum der KM-modifizierten Mehle lag mit 19.5 ± 0.6 min (600 rpm/ 5 min) deutlich unter dem maximalen Wert nach ZM-Modifikation.

Es fiel auf, dass das Basismehl des A-Weizens cv. Julius längere Zeit (8.1 ± 0.4 min) benötigte, um die optimale Teigkonsistenz zu erreichen als das Basismehl des E-Weizens cv. Akteur, welcher eine deutliche kürzere DDT von 5.1 ± 0.4 min hatte.

Abbildung 33 bis Abbildung 35 veranschaulichen den Verlauf ausgewählter Drehmoment-Zeit-Diagramme. Dabei geht aus Abbildung 33 hervor, dass cv. Akteur eine kurze Teigstabilität (ca. 12 min) aufwies, was eine schnellere Teigerweichung nach etwa 13 min zur Folge hatte. Für cv. Julius wurde die Teigerweichung erst nach ca. 20 min bestimmt (Vgl. Abbildung 34).

Die stark modifizierten Mehle erreichten kaum das festgesetzte Knetoptimum von 550 FE. Die Drehmoment-Zeit-Kurven von intensiv KM- und ZM-modifizierten Mehle verliefen stark abgeflacht, ein exaktes Optimum konnte nicht sicher ermittelt werden (Vgl. Abbildung 35).

3.4.1.1 Diskussion

Generell hat Mehl höherer Backqualität eine längere DDT, eine höhere WA und ist unempfindlicher gegenüber äußerlichem Energieeintrag als Mehl niedriger Backqualitäts-klassen. Der Teig des unmodifizierten Basismehls cv. Julius hatte im Vergleich zu cv. Akteur eine längere DDT (8.1 min zu 5.1 min) und eine höhere WA (63.9 % zu 59.4 %), was die Qualitätsunterschiede wiederspiegelte. Die Werte der WA aller modifizierter KM-Mehle (Ausnahme: 300 rpm, 5 min) waren höher als die des Basismehls. Es ist davon auszugehen, dass die durch die mechanische Behandlung geschädigte Stärke für diesen Effekt verantwortlich war. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Stärkeschädigungsgrade überein, wobei der Schädigungsgrad von stark modifizierten Mehl des cv. Akteur (600 rpm, 20 min) im Vergleich zum nativen Basismehl von 5.1 % auf 8.8 % anstieg. Die höchsten WA wurden für

die intensiv KM-behandelten Mehle mit Gehalten von 120.9 % (600 rpm, 15 min) und 129.9 % (600 rpm, 20 min) bestimmt. Diese Werte waren deutlich höher als entsprechend der verminderten Mehlfeuchte und der erhöhten Stärkeschädigung zu erwarten war. Es wurde angenommen, dass zumindest bei den intensiven Modifikationsstufen eine partielle Stärkeverkleisterung eintritt. Dies konnte in Analysen mittels Farinograph bestätigt werden, da die partiell verkleisterte Stärke bereits bei Raumtemperatur eine sehr hohe WA aufwies. Die steigende WA der stark modifizierten Mehle war daher nicht nur durch die Stärkeschädigung, sondern zusätzlich durch eine partielle Stärkeverkleisterung bedingt. Die Verlagerung der PGV zu größeren Partikeln nach intensiver Mehlmodifikation war wahrscheinlich nicht für die unproportional hohe WA dieser Mehle verantwortlich. Höchstwahrscheinlich wurde im Vergleich zu nativen Gluten die WA durch eine partielle Glutendenaturierung verringert. Die steigende WA war daher nicht auf das modifizierte Gluten zurückzuführen. Wenngleich Basismehl cv. Akteur eine höhere WA als Basismehl cv. Julius aufwies, hatten beide Mehle nach äquivalenten Modifizierungsleveln die annähernd gleiche WA. Dies zeigt, dass Unterschiede in den funktionellen Parametern durch mechanische Modifikationen ausgeglichen werden können.

In den meisten Fällen verursachte die mechanische Modifikation der Mehle nach 5-minütiger Mahldauer zunächst einen Anstieg der DDT, welcher nach intensiverer Behandlung in der KM wieder abnahm. Diese Veränderungen der funktionellen Eigenschaften können durch Veränderungen der Proteinverteilung aufgrund mechanischer Behandlung erklärt werden. Es wurde gezeigt, dass mit zunehmender Modifikation das GLIA/GLUT-Verhältnis und der GMP-Gehalt stark abnahmen. Das GLIA/GLUT-Verhältnis steht in Beziehung zur dreidimensionalen Glutenstruktur, die durch die Orientierung von Disulfidbindungen und die Beteiligung verschiedener Glutenproteintypen an der Struktur bestimmt wird. Weniger GLIA im Vergleich zum GLUT bedeutet einen stärkeren Kleber und eine langsamere WA, was wiederum eine Erklärung für die steigende DDT wäre. Intensive Modifizierung führte zu einem unausgeglichenem GLIA/ GLUT-Verhältnis (GLIA/GLUT unter 1.5 bzw. über 3.1 (Wieser und Koehler, 2009)), was in stark verzweigten GLUT-Strukturen resultierte, die nicht länger in der Lage waren, ein stabiles und kontinuierliches Gluten-Netzwerk auszubilden. Teige, die aus stark modifizierten Mehlen hergestellt wurden, erreichten somit nicht die notwendige Teigkonsistenz von 550 BU. Die funktionellen Eigenschaften der Stärke und deren Zusammenwirken mit dem Gluten-Netzwerk könnten die Kneteigenschaften ebenfalls beeinflussen. Aus makroskopischer Sicht resultieren aus Teigen mit kürzerer DDT eine verringerte Teigfestigkeit sowie eine verringerte Teigstabilität.

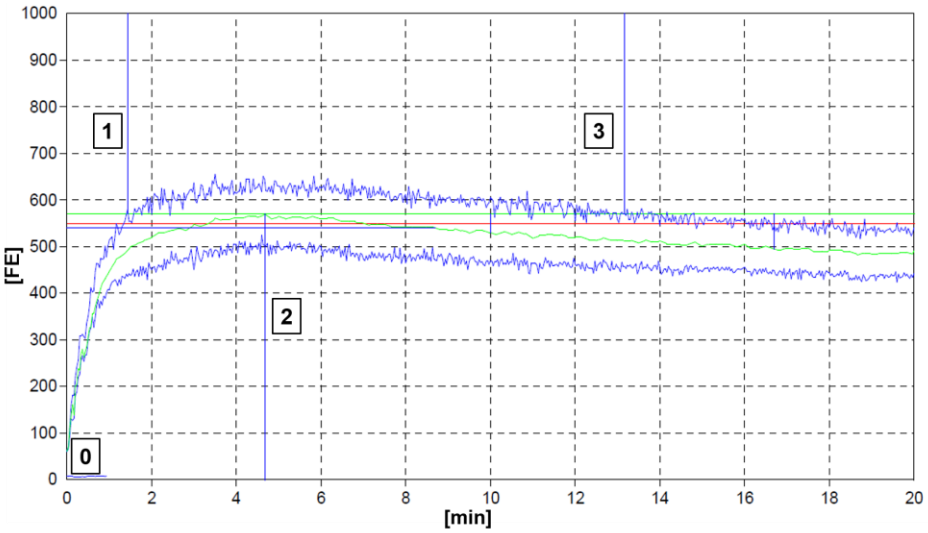


Abbildung 33: Farinogramm des Basismehles cv. Akteur, 0-2: DDT, 2: Teigoptimum, 1-3: Teigstabilität

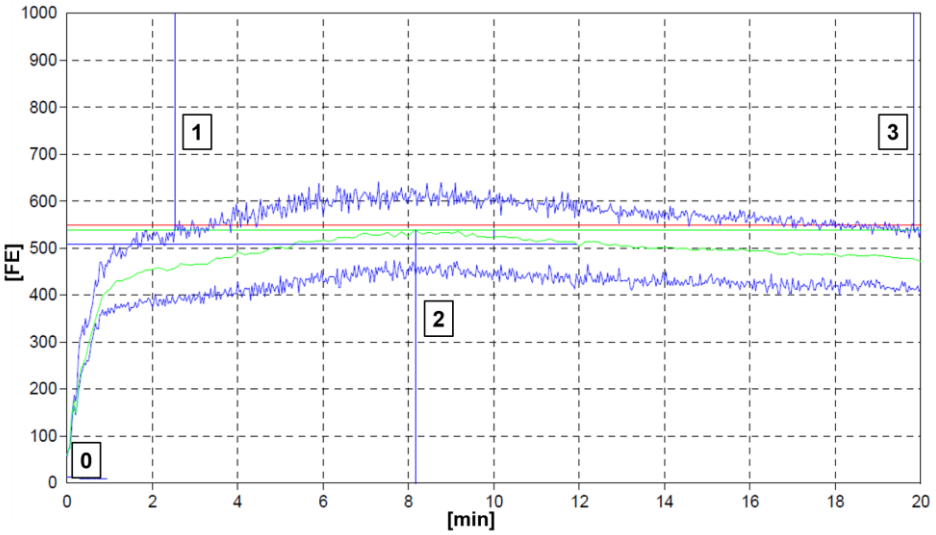


Abbildung 34: Farinogramm des Basismehles cv. Julius, 0-2: DDT, 2: Teigoptimum, 1-3: Teigstabilität

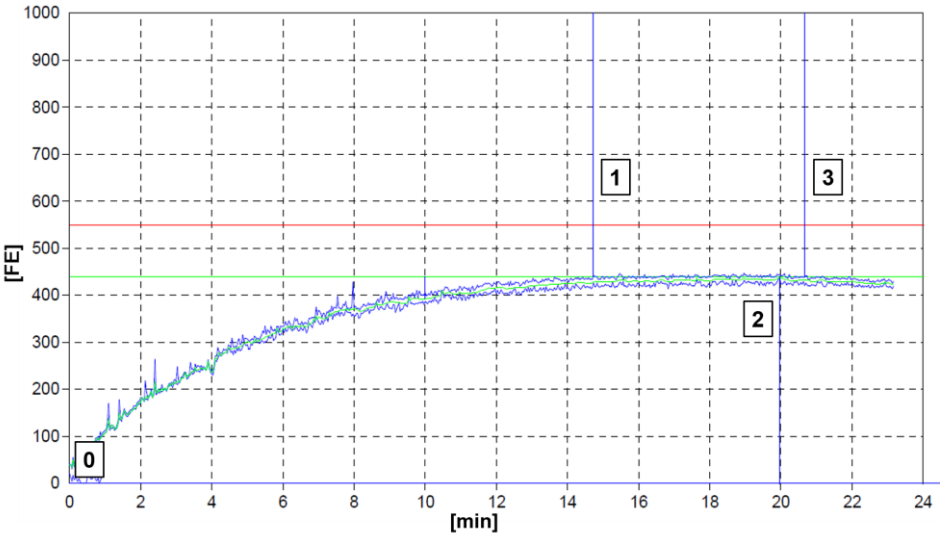


Abbildung 35: Farinogramm des KM-modifizierten Mehles cv. Akteur (600 rpm, 20 min), 0-2: DDT, 2: Teigoptimum, 1-3: Teigstabilität

3.4.2 Feuchtklebergehalt (FK) und Gluten Index (GI)

Weizenmehle zeichnen sich durch ihr Kleberbildungsvermögen aus. Während der Teigbereitung ist das Klebereiweiß in der Lage bis zum 2- bis 3-fachen seines Gewichtes an Wasser aufzunehmen. Es bildet das Teiggerüst, welches aus gequollenem GLIA und GLUT besteht, und ist verantwortlich für das Gashaltevermögen. Daher ist die Kleberbestimmung ein entscheidender Parameter zur Beurteilung der Mehlqualität.
Die Bestimmung des FK-Gehalts wurde in Anlehnung an den ICC-Standard Nr. 137/1, einer gravimetrischen Methode, durchgeführt (Vgl. 4.7.2). Dafür wurde in der „Glutomatic“ durch Auswaschen der Stärke mit Natriumchlorid-Lösung der FK isoliert. Je nach Dehneigenschaften war die Beschaffenheit des Klebers elastisch-gut dehnbar, elastisch-genügend dehnbar, elastisch-wenig dehnbar oder unelastisch.
Der FK-Gehalt hat enormen Einfluss auf das Verhalten des Teiges während des Knetens, der Gare und des Backens. Allgemein gilt, dass je höher der FK-Anteil, umso höher die Wasseraufnahme, das Gashaltevermögen und das spezifische Brotvolumen.
Bei einem hohen FK-Gehalt > 30 % kann von einem stärkeren Quellungsvermögen und einer hohen Gärtoleranz ausgegangen werden. Bei Teigen mit einem guten FK-Anteil von 27-30 % werden eine normale Teigentwicklung und Gärtoleranz erwartet. Bei einem mäßigen FK-Gehalt von 24-27 % entstehen Weizenteige mit verminderter Quellung und schwächerem Gashaltevermögen. Ein niedriger FK-Anteil < 24 % lässt Teige mit geringer Gärtoleranz und mäßiger Teigausbeute sowie mangelhaften Teig- und Backeigenschaften erwarten (Keller, 2002).
Der GI ist ein Parameter zur Bestimmung der Glutenqualität, wobei ein GI von < 30 % einer schwachen, ein GI von 30-80 % einer normalen und ein GI von > 80 % einer hohen Glutenqualität entspricht (Cubadda et al., 1992, Keller, 2002). Dabei korreliert der GI stark mit der Teigfestigkeit (Edwards et al., 2008). Die primäre Methode zur Messung des GI ist der AACC Int. 38-12A oder der ICC-Standard Nr. 137/1 (Williams et al., 2008). Der Gluten Index ist definiert als der Feuchtkleberanteil [%], der beim Zentrifugieren über einem Sieb zurückbleibt. Dafür wird der Feuchtkleber aus dem Mehl mit der Glutomatic 2200 ausgewaschen. Anschließend wird der Feuchtkleber in einer Zentrifuge durch ein Sieb gedrückt. Der relative Anteil, der dieses Sieb nicht passiert, charakterisiert den GI.

Tabelle 25 zeigt die Kleberquantität (Feuchtklebergehalt) und die Kleberqualität (Gluten Index) der mechanisch modifizierten Mehle.
Die modifizierten Mehle zeigten durchweg hohe FK-Gehalte zw. 27.8 % und 35.2 %. Nur in einer Modifikationsstufe des cv. Akteur (KM 400 rpm/ 5 min) wurde ein FK-Gehalt < 27 % bestimmt, sodass ein Teig mit schwächerem Gashaltevermögen und mäßigen Backeigenschaften zu erwarten war. Generell konnten durch die ermittelten FK-Gehalte keine

aussagekräftigen Informationen über thermische bzw. mechanische Auswirkungen auf die Funktionalität des modifizierten Mehles erhalten werden. Anhand der FK-Gehalte gab es keine Hinweise, dass stark behandelte Mehle schlechtere Teig- bzw. Backeigenschaften besitzen könnten. Die FK-Gehalte der am stärksten modifizierten Mehle konnten nicht analysiert werden, da sich der Kleber in der Glutomatic nicht mehr auswaschen ließ (Vgl. Tabelle 25).

In Bezug auf den FK-Gehalt zeigten beide Basismehle vergleichbare Gehalte, welche nur wenig durch die Behandlung in der Kugelmühle beeinflusst wurden und zwischen 29.0–33.8 % schwankten. Dies könnte mit der Spaltung von inter- und intramolekularen Bindungen innerhalb des Stärkenetzwerkes durch mechanische Einwirkung, der erhöhten Stärkelöslichkeit sowie der schlechteren Hydratation und Quellung der Stärkegranula begründet werden (Roa et al., 2015). Die Basismehle cv. Akteur und cv. Julius wiesen beide sehr hohe FK-Gehalte > 30 % auf, sodass Teige mit hoher Gärtoleranz und gutem Gashaltevermögen zu erwarten waren.

Weder die Kleberqualität (wiedergegeben als GI) noch die Kleberquantität (wiedergegeben als FK-Gehalt) von Mehl cv. Akteur wurde durch Intensivierung der mechanischen Modifikationen beeinflusst. Diese Ergebnisse suggerieren, dass das Gluten nicht allein für die funktionellen Veränderungen im Weizenmehl verantwortlich ist, sondern auf synergistische Effekte zwischen Gluten, Stärke und möglicherweise anderen Mehlbestandteilen beruht.

Für die Basismehle cv. Akteur (92.4 %) und cv. Julius (50.5 %) wurden große Unterschiede im GI festgestellt, was belegt, dass cv. Julius einen schwächeren Kleber als cv. Akteur besitzt. Mit zunehmender Behandlung bei 500 rpm stieg der GI von cv. Julius auf 96.2 % an, während sich der GI von cv. Akteur innerhalb der verschiedenen Modifikationsstufen kaum veränderte (82.3–99.2 %). Zur Beurteilung der Auswirkung der verschiedenen durchgeführten ZM- oder KM-Modifikationen ist der GI v.a. für die Sorte cv. Akteur ungeeignet. Eine Veränderung des GI durch unterschiedlich intensive Modifikationsgrade konnte nicht festgestellt werden. Durch eine starke KM- bzw. ZM-Modifikation war die Bestimmung des GI nicht mehr möglich, da sich der Kleber nicht mehr auswaschen ließ.

Tabelle 25: Einfluss verschiedener Mahlparameter auf die Feuchtklebergehalte und den Gluten Index nativer und modifizierter Weizenmehle

	Feuchtklebergehalt		Gluten Index	
	x ± SA [%] [a]	RSA [%]	x ± SA [%] [a]	RSA [%]
Basismehl cv. Julius	30.2 ± 1.1	3.52	50.5 ± 0.6	1.25
Basismehl cv. Akteur	32.2 ± 0.7	2.17	92.4 ± 0.5	0.51
KM 300 rpm 5 min (A)	31.0 ± 0.9	3.00	89.5 ± 1.1	1.23
KM 300 rpm 10 min (A)	29.9 ± 1.0	3.40	94.4 ± 0.6	0.67
KM 300 rpm 15 min (A)	30.7 ± 1.2	3.76	89.6 ± 0.7	0.76
KM 300 rpm 20 min (A)	30.3 ± 0.4	1.34	92.9 ± 0.3	0.28
KM 400 rpm 5 min (A)	26.3 ± 0.6	2.34	92.5 ± 1.6	1.74
KM 400 rpm 10 min (A)	31.8 ± 0.8	2.55	96.5 ± 0.5	0.51
KM 400 rpm 15 min (A)	31.5 ± 0.1	0.31	98.9 ± 0.4	0.42
KM 400 rpm 20 min (A)	30.9 ± 0.3	1.06	99.2 ± 0.4	0.41
KM 500 rpm 5 min (A)	30.8 ± 0.8	2.52	92.0 ± 0.8	0.85
KM 500 rpm 10 min (A)	29.0 ± 0.8	2.80	96.8 ± 0.7	0.68
KM 500 rpm 15 min (A)	- [b]	-	- [b]	-
KM 500 rpm 20 min (A)	- [b]	-	- [b]	-
KM 600 rpm 5 min (A)	30.8 ± 1.4	4.49	- [b]	-
KM 600 rpm 10 min (A)	- [b]	-	- [b]	-
KM 600 rpm 15 min (A)	- [b]	-	- [b]	-
KM 600 rpm 20 min (A)	- [b]	-	- [b]	-
KM 500 rpm 5 min (J)	33.8 ± 1.5	4.38	55.7 ± 2.0	3.53
KM 500 rpm 10 min (J)	32.8 ± 0.6	1.84	96.2 ± 0.3	0.31
KM 500 rpm 15 min (J)	- [b]	-	- [b]	-
KM 500 rpm 20 min (J)	- [b]	-	- [b]	-
ZM 0.5 mm 6 000 rpm (A)	31.4 ± 0.7	2.26	88.8 ± 0.9	0.98
ZM 0.5mm 12 000 rpm (A)	30.4 ± 1.0	3.23	87.2 ± 1.9	2.22
ZM 0.5mm 18 000 rpm (A)	30.8 ± 0.9	2.84	90.9 ± 0.4	0.39
ZM 0.2 mm 6 000 rpm (A)	31.5 ± 0.7	2.06	82.3 ± 1.2	1.46
ZM 0.2 mm 12 000 rpm (A)	30.9 ± 1.2	3.85	85.5 ± 0.9	1.05
ZM 0.2 mm 18 000 rpm (A)	31.3 ± 0.7	2.38	86.1 ± 1.6	1.86
ZM 0.12 mm 6 000 rpm (A)	31.4 ± 0.9	2.74	83.9 ± 1.2	1.38
ZM 0.12 mm 12 000 rpm (A)	29.7 ± 0.4	1.48	98.5 ± 0.5	0.49
ZM 0.12 mm 18 000 rpm (A)	27.8 ± 1.6	5.67	- [b]	-
ZM 0.08 mm 6 000 rpm (A)	33.4 ± 0.4	1.21	95.4 ± 0.9	0.99
ZM 0.08 mm 12 000 rpm (A)	30.1 ± 1.2	3.88	98.8 ± 0.2	0.23
ZM 0.08 mm 18 000 rpm (A)	- [b]	-	- [b]	-
ZM 0.12 mm 6 000 rpm (J)	31.1 ± 1.0	3.35	46.7 ± 0.5	1.03
ZM 0.12 mm 12 000 rpm (J)	35.2 ± 0.3	0.91	76.5 ± 3.3	4.37
ZM 0.12 mm 18 000 rpm (J)	- [b]	-	96.6 ± 0.9	0.97

[a] Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung; SA: absolute Standardabweichung, RSA: relative Standardabweichung;
[b] Kleber konnte nicht ausgewaschen werden; A: cv. Akteur, J: cv. Julius; KM: Kugelmühle, ZM: Zentrifugalmühle

3.4.3 Kleber- und Teigzugversuche

Die Kleber- und Teigzugversuche dienten zur Untersuchung der physikalischen Eigenschaften des Teiges bzw. des Klebers. Für die Kleberzugversuche wurde der ausgewaschene Kleber aus einem Weizenteig verwendet, der bis zum Optimum geknetet wurde (Vgl. 4.7.2). Für Teigzugversuche wurden Teigstränge analysiert. Die Teig- und Kleberstränge wurden in einen TA.XT plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, Großbritannien) eingespannt und bis zum Zerreißen des Stranges gedehnt. Dabei wurde ein Kraft-Weg-Diagramm aufgezeichnet, aus welchem die Dehnbarkeit (E_{max}) und der Dehnwiderstand (R_{max}) des aus dem Mehl ausgewaschenen Klebers abgelesen werden konnte. Weiterhin konnte die Fläche unter der Kurve, welche als Dehnenergie (DE) bezeichnet wird, und die Verhältniszahl (E_{max}/R_{max}) berechnet werden (Koehler und Grosch, 1999).

Zugversuche im Mikromaßstab liefern Informationen über das viskoelastische Verhalten von Teig und Gluten nach uniaxialer Dehnung. Dabei ist das Verhältnis von E_{max} zu R_{max} ein entscheidender Qualitätsparameter bei Mehl (Rosell et al., 2001). Die Ergebnisse der Teig- und Kleberzugversuche sind in Tabelle 26 und Tabelle 27 dargestellt. Generell zeigten Kleber-Zugversuche im Vergleich mit Teig-Zugversuchen eine höhere Standardabweichung. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass der Kleber nach Extraktion zentrifugiert wurde und mitunter Inhomogenitäten aufwies, bevor die Kleberstränge in die Teflonformen gepresst wurden.

Wie aus Tabelle 26 ersichtlich, konnten für die stärker KM- bzw. ZM-modifizierten Mehle keine Kleberzugversuche durchgeführt werden, da der Kleber sich nicht mehr auswaschen ließ. Der Dehnwiderstand der Teige aus KM-modifizierten Mehlen nahm mit steigendem Modifikationsgrad stark zu. Entgegengesetzt nahm die Dehnbarkeit bei längeren Mahldauern und höheren Drehzahlen signifikant ab. Insgesamt wurden somit relativ konstante Dehnenergien zwischen 35 N·mm und 55 N·mm bestimmt. Im Gegensatz zeigten die Kleberzugversuche der ZM-modifizierten Mehle kaum Unterschiede im Dehnwiderstand, der zwischen 0.64 N und 0.84 N bestimmt wurde. Die Dehnbarkeit nahm bei hohen Drehzahlen und geringen Sieblochgrößen ebenfalls stark ab. Allgemein wurden somit bei hohem Modifikationsgrad geringere Dehnenergien erhalten.

Tabelle 26: Einfluss verschiedener Mahlparameter auf Dehnwiderstand (R_{max}), Dehnbarkeit (E_{max}), Dehnenergie (DE) und das Verhältnis E_{max}/R_{max} von Feuchtklebern der nativen und modifizierten Mehle von cv. Akteur und cv. Julius

	R_{max} [N] [a]	E_{max} [mm] [a]	DE [N·mm] [a]	E_{max}/R_{max}
Basismehl cv. Julius	0.62 ± 0.07	177. 9 ± 11.8	49.7 ± 4.5	287
Basismehl cv. Akteur	0.51 ± 0.02	107.2 ± 18.2	38.0 ± 3.8	210
KM 300 rpm 5 min (A)	0.61 ± 0.09	95.0 ± 20.3	34.3 ± 11.6	156
KM 300 rpm 10 min (A)	0.76 ± 0.08	106.3 ± 20.6	46.9 ± 10.1	139
KM 300 rpm 15 min (A)	0.84 ± 0.10	106.3 ± 17.0	52.5 ± 12.7	126
KM 300 rpm 20 min (A)	0.90 ± 0.08	120.8 ± 2.7	54.8 ± 5.3	134
KM 400 rpm 5 min (A)	0.76 ± 0.12	102.7 ± 18.7	44.7 ± 15.3	135
KM 400 rpm 10 min (A)	0.58 ± 0.03	91.1 ± 18.2	35.7 ± 10.4	157
KM 400 rpm 15 min (A)	1.10 ± 0.15	69.0 ± 7.6	49.8 ± 3.5	63
KM 400 rpm 20 min (A)	0.89 ± 0.05	88.9 ± 8.6	49.8 ± 3.5	100
KM 500 rpm 5 min (A)	0.88 ± 0.07	112.8 ± 4.9	55.1 ± 6.9	128
KM 500 rpm 10 min (A)	1.12 ± 0.10	54.1 ± 8.8	36.0 ± 5.3	48
KM 500 rpm 15 min (A)	1.18 ± 0.08	63.7 ± 14.5	40.1 ± 8.0	54
KM 500 rpm 20 min (A)	- [b]	- [b]	- [b]	- [b]
KM 600 rpm 5 min (A)	- [b]	- [b]	- [b]	- [b]
KM 600 rpm 10 min (A)	- [b]	- [b]	- [b]	- [b]
KM 600 rpm 15 min (A)	- [b]	- [b]	- [b]	- [b]
KM 600 rpm 20 min (A)	- [b]	- [b]	- [b]	- [b]
KM 500 rpm 5 min (J)	0.56 ± 0.04	123.4 ± 14.03	42.9 ± 7.2	220
KM 500 rpm 10 min (J)	0.64 ± 0.09	70.2 ± 7.8	26.8 ± 5.3	110
KM 500 rpm 15 min (J)	0.88 ± 0.07	112.8 ± 4.9	55.1 ± 6.9	128
KM 500 rpm 20 min (J)	1.12 ± 0.10	54.1 ± 8.8	36.0 ± 5.3	48
ZM 0.5 mm 6 000 rpm (A)	0.72 ± 0.03	96.8 ± 8.4	41.5 ± 4.4	134
ZM 0.5mm 12 000 rpm (A)	0.74 ± 0.04	132.4 ± 11.8	53.6 ± 8.9	179
ZM 0.5mm 18 000 rpm (A)	0.73 ± 0.08	119.6 ± 17.8	48.7 ± 12.4	164
ZM 0.2 mm 6 000 rpm (A)	0.72 ± 0.09	101.7 ± 17.6	42.9 ± 11.0	141
ZM 0.2 mm 12 000 rpm (A)	0.81 ± 0.02	115.0 ± 4.1	52.4 ± 3.5	142
ZM 0.2 mm 18 000 rpm (A)	0.84 ± 0.03	89.2 ± 5.7	41.9 ± 2.5	106
ZM 0.12 mm 6 000 rpm (A)	0.73 ± 0.03	104.4 ± 5.3	40.2 ± 6.0	143
ZM 0.12 mm 12 000 rpm (A)	0.67 ± 0.01	74.5 ± 7.3	31.3 ± 3.8	111
ZM 0.12 mm 18 000 rpm (A)	0.64 ± 0.16	39.3 ± 5.3	15.9 ± 5.3	61
ZM 0.08 mm 6 000 rpm (A)	0.71 ± 0.06	92.3 ± 8.7	42.7 ± 8.7	130
ZM 0.08 mm 12 000 rpm (A)	0.68 ± 0.10	58.2 ± 5.6	23.3 ± 5.6	86
ZM 0.08 mm 18 000 rpm (A)	- [b]	- [b]	- [b]	- [b]
ZM 0.12 mm 6 000 rpm (J)	0.73 ± 0.03	104.4 ± 5.3	40.3 ± 6.0	143
ZM 0.12 mm 12 000 rpm (J)	0.67 ± 0.01	74.5 ± 7.3	31.3 ± 3.8	111
ZM 0.12 mm 18 000 rpm (J)	- [b]	- [b]	- [b]	- [b]

[a] Mittelwert ± absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung; [b] Kleber konnte nicht ausgewaschen werden; A: cv. Akteur, J: cv. Julius; KM: Kugelmühle, ZM: Zentrifugalmühle

Tabelle 27: Einfluss verschiedener Mahlparameter auf Dehnwiderstand (R_{max}), Dehnbarkeit (E_{max}), Dehnenergie (DE) und das Verhältnis E_{max}/R_{max} von Teigen der nativen und modifizierten Mehle von cv. Akteur und cv. Julius

	R_{max} [N] [a]	E_{max} [mm] [a]	DE [N·mm] [a]	E_{max}/R_{max}
Basismehl cv. Akteur	0.25 ± 0.01	79.5 ± 6.6	15.1 ± 1.8	318
Basismehl cv. Julius	0.14 ± 0.02	89.9 ± 8.8	10.3 ± 0.6	642
KM 300 rpm 5 min (A)	0.28 ± 0.01	60.6 ± 3.6	13.1 ± 0.8	216
KM 300 rpm 10 min (A)	0.34 ± 0.03	49.6 ± 6.1	13.4 ± 1.3	146
KM 300 rpm 15 min (A)	0.38 ± 0.03	38.8 ± 1.0	11.9 ± 0.6	114
KM 300 rpm 20 min (A)	0.38 ± 0.01	38.1 ± 1.4	11.5 ± 1.3	100
KM 400 rpm 5 min (A)	0.30 ± 0.01	57.1 ± 4.7	14.2 ± 1.1	190
KM 400 rpm 10 min (A)	0.26 ± 0.02	48.9 ± 4.0	9.3 ± 0.6	188
KM 400 rpm 15 min (A)	0.36 ± 0.02	30.1 ± 2.5	7.7 ± 0.5	84
KM 400 rpm 20 min (A)	0.37 ± 0.01	28.2 ± 0.5	7.5 ± 0.3	76
KM 500 rpm 5 min (A)	0.32 ± 0.01	43.8 ± 4.3	10.6 ± 1.0	137
KM 500 rpm 10 min (A)	0.33 ± 0.04	30.7 ± 1.6	7.0 ±0.6	93
KM 500 rpm 15 min (A)	0.20 ± 0.01	15.0 ± 1.4	2.1 ± 0.2	75
KM 500 rpm 20 min (A)	0.16 ± 0.01	14.2 ± 0.7	1.6 ± 0.1	89
KM 600 rpm 5 min (A)	0.25 ± 0.02	28.2 ± 8.8	5.0 ± 0.5	113
KM 600 rpm 10 min (A)	0.12 ± 0.01	12.7 ± 2.2	1.1 ± 0.1	106
KM 600 rpm 15 min (A)	0.10 ± 0.01	14.3 ± 1.3	1.0 ± 0.1	143
KM 600 rpm 20 min (A)	0.10 ± 0.01	10.9 ± 2.1	0.8 ± 0.1	109
KM 500 rpm 5 min (J)	0.24 ± 0.01	52.0 ± 4.5	9.9 ± 0.4	217
KM 500 rpm 10 min (J)	0.25 ± 0.02	34.8 ± 4.0	6.4 ± 0.7	139
KM 500 rpm 15 min (J)	0.17 ± 0.01	15.1 ± 0.9	1.8 ± 0.1	89
KM 500 rpm 20 min (J)	0.16 ± 0.01	14.5 ± 0.7	1.7 ± 0.1	91
ZM 0.5 mm 6 000 rpm (A)	0.30 ± 0.01	59.6 ± 5.9	14.5 ± 1.7	199
ZM 0.5mm 12 000 rpm (A)	0.29 ± 0.03	66.0 ± 7.1	15.3 ± 1.3	228
ZM 0.5mm 18 000 rpm (A)	0.28 ± 0.02	64.4 ± 9.4	14.2 ± 2.2	230
ZM 0.2 mm 6 000 rpm (A)	0.30 ± 0.03	64.1 ± 5.8	15.3 ± 1.3	214
ZM 0.2 mm 12 000 rpm (A)	0.28 ± 0.02	62.6 ± 5.8	13.7 ± 0.9	224
ZM 0.2 mm 18 000 rpm (A)	0.33 ± 0.03	45.3 ± 5.8	11.3 ± 1.2	137
ZM 0.12 mm 6 000 rpm (A)	0.23 ± 0.01	72.9 ± 4.4	13.3 ± 1.0	317
ZM 0.12 mm 12 000 rpm (A)	0.27 ± 0.02	28.7 ± 2.6	6.5 ± 0.7	106
ZM 0.12 mm 18 000 rpm (A)	0.20 ± 0.01	35.5 ± 1.9	5.5 ± 0.4	178
ZM 0.08 mm 6 000 rpm (A)	0.26 ± 0.02	63.9 ± 9.7	12.9 ± 1.3	246
ZM 0.08 mm 12 000 rpm (A)	0.20 ± 0.01	35.1 ± 7.7	5.6 ± 0.5	176
ZM 0.08 mm 18 000 rpm (A)	0.13 ± 0.01	26.8 ± 7.3	2.9 ± 0.2	206
ZM 0.12 mm 6 000 rpm (J)	0.14 ± 0.01	93.0 ± 11.2	10.4 ± 0.6	664
ZM 0.12 mm 12 000 rpm (J)	0.26 ± 0.01	46.6 ± 5.7	8.9 ± 0.9	179
ZM 0.12 mm 18 000 rpm (J)	0.13 ± 0.02	30.0 ± 2.8	3.2 ± 0.4	231

[a] Mittelwert ± absolute Standardabweichung aus einer Neunfachbestimmung; A: cv. Akteur, J: cv. Julius; KM: Kugelmühle, ZM: Zentrifugalmühle

Die Kleber aus Mehlen cv. Julius verhielten sich ähnlich zu den untersuchten Klebern des Referenzmehles cv. Akteur. Generell wies das Basismehl cv. Julius im Vergleich zum Referenzmehl höhere Ausgangswerte für den Dehnwiderstand, die Dehnbarkeit sowie die Dehnenergie auf. Die abweichende Ausgangscharakteristik ist in Abbildung 36 dargestellt, welche v.a. die wesentlich kürzere Dehnbarkeit des Klebers von cv. Akteur im Vergleich zu cv. Julius erkennen ließ.

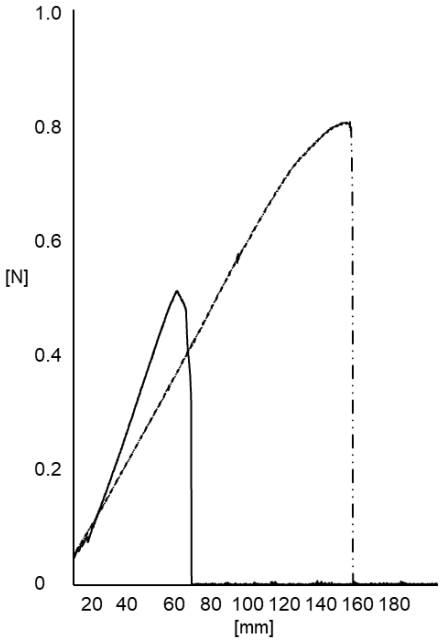


Abbildung 36: Kleber-Extensogramme der Basismehle cv. Akteur (-) und cv. Julius (-···-)

Auch bei den Teigen aus ZM-modifizierten Mehlen ließen sich in den Extensogrammen der entsprechenden Kleber geringe Unterschiede erkennen, sodass mit Abnahme der Sieblochgröße eine Zunahme des Dehnwiderstands und eine Abnahme der Dehnbarkeit bei höherer Standardabweichung beobachtet werden konnte.

Tabelle 27 veranschaulicht die Ergebnisse der Zugversuche mit Teigen aus modifizierten Mehlen. Anders als bei den Kleberzugversuchen konnten auch für die stark modifizierten Mehle Teigzugversuche durchgeführt werden.

Die KM- und ZM-modifizierten Mehle unterschieden sich allgemein bezüglich der Parameter Dehnwiderstand, Dehnbarkeit und Dehnenergie im Ausmaß des Modifikationseffekts. Die KM-Behandlung hatte deutlich größere Auswirkungen auf das Dehnverhalten der Teige als die ZM-Behandlung. Mit steigendem Modifikationsgrad wurde durch die KM-Behandlung eine Verringerung des Dehnwiderstandes und der Dehnbarkeit erreicht. Im Vergleich zum Basismehl wurden bei der KM-Modifikation ab einer Drehzahl von 400 rpm und Mahldauern > 10 min deutlich kleinere Dehnenergien bestimmt und weiterhin durch eine moderate Modifikation (300-500 rpm) der Dehnwiderstand erhöht (Vgl. Tabelle 27).

Die ZM-behandelten Mehle zeigten nur bei maximaler Modifikation (18 000 rpm, 0.08 mm) eine Verringerung des Dehnwiderstandes. Ebenso war die Dehnbarkeit bei moderater Behandlungsintensität relativ konstant in Bereichen zwischen 60-70 mm. Lediglich bei Drehzahlen über 12 000 rpm und Sieblochgrößen kleiner 0.12 mm nahm die Dehnbarkeit der Teige auf unter 40 mm ab. Die Dehnenergie war bei moderaten Modifikationsgraden relativ konstant und lag zwischen 13-15 N·mm, wohingegen die Dehnenergien stark modifizierter Mehle auf minimal 2.9 N·mm abnahmen.

Die relativen Standardabweichungen der Teigzugversuche lagen unterhalb 15 % und waren deutlich geringer als die der Kleberzugversuche.

Analog zu den Kleberzugversuchen wurde auch bei den Teigzugversuchen für das Basismehl cv. Akteur ein deutlich höherer Dehnwiderstand und eine geringere Dehnbarkeit ermittelt als für den Teig aus dem Basismehl cv. Julius. Insgesamt wurde bei den Teigsträngen des cv. Akteur (15.1 ± 1.8 N·mm) eine deutlich höhere Dehnenergie, also die Fläche unter der sog. Kieffer-Kurve, bestimmt, als für Teigstränge des cv. Julius (10.3 ± 0.6 N·mm).

Der Verlauf der Dehnenergie nach Modifikation in der KM in Abhängigkeit von der Mahldauer und der Drehzahl war vergleichbar (Vgl. Abbildung 37). Die Dehnenergie nahm mit steigender Behandlungsdauer und höheren Drehzahlen auf minimal 0.8 ± 0.1 N·mm ab, was im Vergleich zum nativen Mehl einer Abnahme um 95 % entspricht.

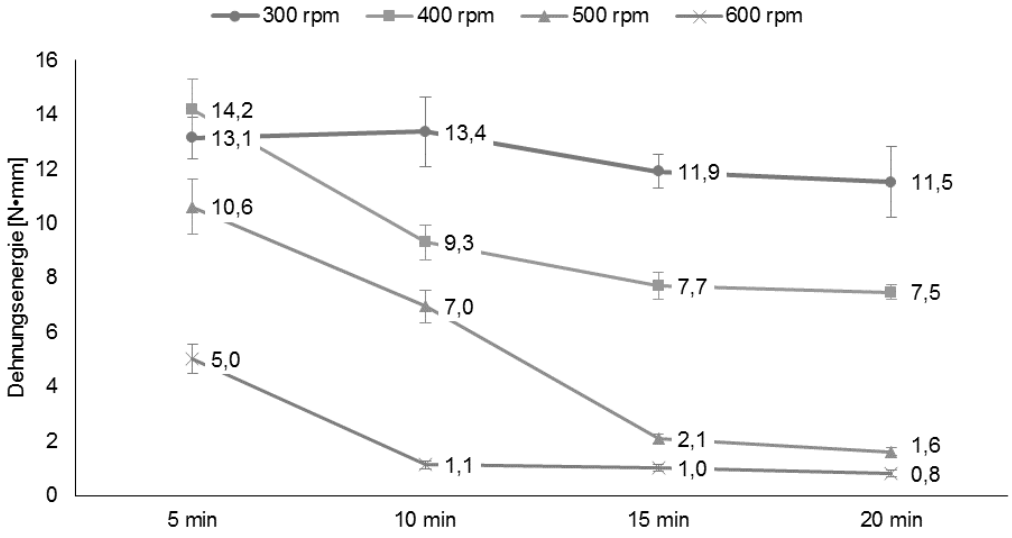


Abbildung 37: Dehnenergien der Teige KM-modifizierter Mehle cv. Akteur in Abhängigkeit von Drehzahl und Mahldauer

Auch nach ZM-Modifikation nahm die Dehnenergie ab. Deutliche Effekte wurden jedoch erst bei Drehzahlen über 12 000 rpm und Siebdurchmessern kleiner 0.12 mm erzielt. Moderate Behandlungen führten kaum zu einer merklichen Änderung der Energien (Vgl. Abbildung 38). Durch Verringerung der Sieblochgröße von 0.50 mm auf 0.08 mm konnten bei einer Drehzahl

von 18 000 rpm deutliche Effekte in Dehnwiderstand und Dehnbarkeit beobachtet werden, sodass sich die Werte dieser Parameter ungefähr halbierten (Vgl. Tabelle 27).

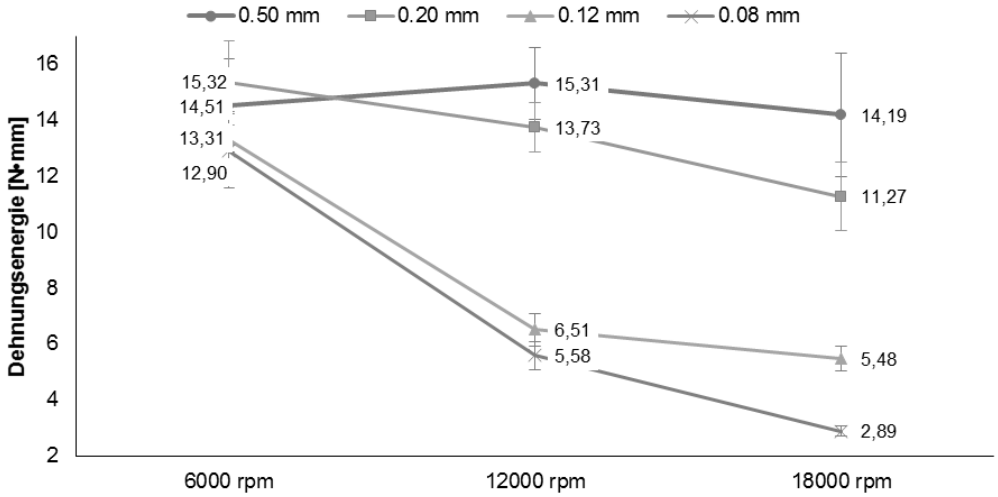


Abbildung 38: Dehnenergien der Teige ZM-modifizierter Mehle cv. Akteur in Abhängigkeit von Drehzahl und Sieblochgröße

3.4.3.1 Diskussion

Beim Vergleich der beiden Mehle aus den Weizensorten cv. Akteur und cv. Julius wurden die gleichen Tendenzen innerhalb der Modifikationsstufen festgestellt. Trotz unterschiedlicher Ausgangswerte der Dehnenergien der nativen Basismehle wurde mit steigendem Modifikationsgrad eine bei beiden Mehlsorten gleichmäßige Abnahme beobachtet.

Je größer der Wert des Dehnwiderstandes bzw. desto kleiner die Dehnbarkeit, desto fester war der Kleber bzw. der Teig. In den Kleberzugversuchen wurden für die Flächen unter der Kieffer-Kurve, berechnet aus Dehnwiderstand und Dehnbarkeit, Werte im Bereich zwischen 23.3 - 55.1 N·mm bestimmt. Im Falle der Teigzugversuche wurden deutlich geringere Dehnenergien zwischen 0.8 - 15.1 N·mm ermittelt. Insgesamt wiesen die Dehnenergien der Kleberzugversuche viel höhere Standardabweichungen (max. 35 %) als bei den Teigzugversuchen (max. 15 %) auf. Grund dafür waren Inhomogenitäten in den Klebersträngen nach der Zentrifugation. Die Teige wirkten vom äußeren Erscheinungsbild hingegen homogen, was im Einklang mit den Ergebnissen weiterer systematischer Zugversuch-Studien von Teig und Kleber im Mikromaßstab steht (Scherf und Koehler, 2018, Scherf et al., 2016). Wie erwartet, wurden für Kleber 4.7- bzw. 2.2-fach höhere E_{max}/R_{max}-Verhältnisse als für Teig ermittelt. Somit hatte die mechanische Behandlung sowohl auf die Teigeigenschaften als auch auf die Klebereigenschaften einen negativen Einfluss.

Je höher die DE, desto höher die Gärtoleranz und das Gebäckvolumen. Die DE von Teig nahm mit zunehmender Behandlungsdauer und Drehzahl von 15.1 N·mm (cv. Akteur) auf 0.8 N·mm (600 rpm, 20 min) ab und manifestiert diesen negativen Einfluss. Gleiche Resultate wurden

bei Teig-Zugversuchen mit cv. Julius erzielt. Aus Mehlen mit sehr niedrigen DE resultiert i.d.R. ein niedriges Gebäckvolumen. Diese kleberschwachen Mehle sollten nur bei kurzen bzw. festen Teigführungen verwendet werden (Keller, 2002).

Nach intensiver mechanischer Behandlung ließ sich der Kleber nicht mehr aus den Teigen auswaschen, wodurch die Kleber-Zugversuche heterogene Ergebnisse ergaben. In stark modifizierten Proben war der resultierende Kleber nach dem Auswaschen verklumpt und inhomogen, was auf eine mangelnde Kleberqualität hinweist. Demgegenüber war der Feuchtklebergehalt in schwach bzw. moderat modifizierten Proben vergleichbar (Tabelle 26). Die sich ändernden Dehneigenschaften von Kleber und Teig basieren somit auf den Unterschieden in der Kleber-Struktur und der Kleber-Zusammensetzung. Das E_{max}/R_{max}-Verhältnis nahm mit zunehmender Behandlungsintensität von 318 (Teig des Basismehls cv. Akteur) auf 76 (400 rpm, 20 min) deutlich ab. Das E_{max}/R_{max}-Verhältnis des Mehles cv. Julius (642) war deutlich höher als das Verhältnis des Mehles cv. Akteur (318). Wie bereits von Luo et al. (2017) beschrieben, sollte der Quotient von E_{max} zu R_{max} in einem ausgeglichenen Verhältnis liegen, da bei zu hohen Verhältniszahlen steife Teige mit geringerer Dehnbarkeit und Qualität vorliegen. Die beobachteten Effekte der Dehneigenschaften bei Weizenteigen nach Modifikation in der Kugelmühle sind auf die Glutenproteine zurückzuführen. Lonkhuijsen et al. (1992) und Fido et al. (1997) zeigten, dass ein hoher Anteil an γ-GLIA einen positiven Einfluss auf die Teig-Dehnbarkeit hat. Dies bestätigten die Ergebnisse der modifizierten Osborne-Fraktionierung (Vgl. 3.3.3), bei der gezeigt wurde, dass moderat behandeltes Mehl (500 rpm, 5 min) im Vergleich zu stark modifizierten Mehl (600 rpm, 20 min) einen höheren Gehalt an γ-GLIA (22.5 mg/g) aufwies. In den stark modifizierten Mehlen wurden keine γ-GLIA mehr identifiziert.

3.4.4 GlutoPeak Test (GPT)

Die Methode dient, neben der Bestimmung des Feuchtklebergehaltes und des Gluten Indexes, zur Schnellbestimmung der Kleberqualität.

Der GlutoPeak Test wurde nach Marti et. al (2015) durchgeführt (Vgl. 4.7.4). Das mechanische Einwirken des Rührflügels bei einer Drehzahl von 3 000 U/min und einer Temperatur von 30 °C ermöglicht die Bildung des Klebernetzwerks aus dem Mehl und einer $CaCl_2$-Lösung. Der Widerstand wird im Gerät registriert und bewirkt einen Anstieg der Drehmomentkurve. Durch weitere Rotation des Rührflügels wird der Kleber wieder abgebaut. Die Daten werden im zugehörigen Programm in einem Drehmoment-Zeit-Diagramm dargestellt. Das Diagramm zeigt einen charakteristischen Kurvenverlauf, wobei nach dem Anteigen der Probe bei Mehlen mit starkem Kleber das Drehmoment schnell zu einem Maximum ansteigt und durch die weitere Rotation des Rührflügels wieder abnimmt (Vgl. Abbildung 39). Die relevanten Parameter sind das maximale Drehmoment (MT, Maximum Torque) in Brabender Units [BU] und der Zeitpunkt des maximalen Drehmoments (PMT, Peak Maximum Time) [s]. Weiterhin wurde der Zeitpunkt an dem die Aggregation beginnt, die sog. Lift off Time (LoT) [s] bestimmt. Durch die Differenz zwischen PMT und LoT konnte die Aggregationszeit (AGT) [s] berechnet werden.

Hartweizenmehle haben häufig höhere MT und längere PMT als Weichweizenmehle (Lu und Seetharaman, 2014, Marti et al., 2015). Mehle mit schwächerem Kleber zeigen eine spätere Reaktion (Keksmehle) oder die Bildung eines Peaks bleibt aus (Waffelmehle). Starke Kleber sind durch hohe, frühe Peaks gekennzeichnet, während schwache Kleber flachere Kurven ergeben und dadurch spätere Peaks entstehen.

Die Ergebnisse des GlutoPeaks korrelieren dabei mit Qualitätsparametern, wie dem spezifischen Volumen des Brotes, der Wasseraufnahme, der Dehnenergie des Teiges und dem Glutengehalt des Mehles (Huen et al., 2018).

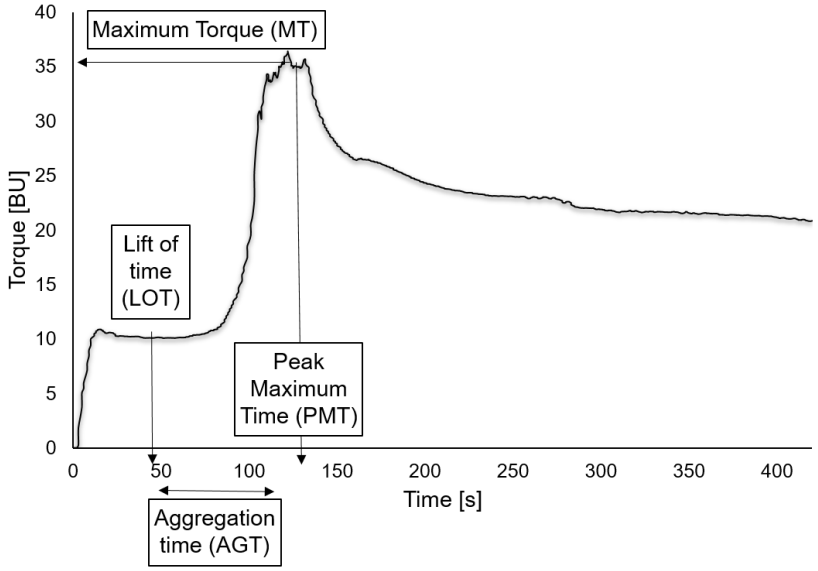


Abbildung 39: Auswertepunkte der Diagramme des GlutoPeak Tests

Die GPT-Ergebnisse (PMT, MT, LoT, AGT) der unterschiedlich behandelten Mehle sind in Tabelle 28 dargestellt. Die erhaltenen Werte geben Anhaltspunkte über die Qualität eines Weizenklebers, müssen jedoch in Verbindung mit den Kurvenläufen der GlutoPeak-Diagramme betrachtet werden. Abbildung 40 stellt die Aggregationsprofile der Basismehle sowie der 10 min bei verschiedenen Drehzahlen (300–600 rpm) in der KM behandelten Mehle dar.

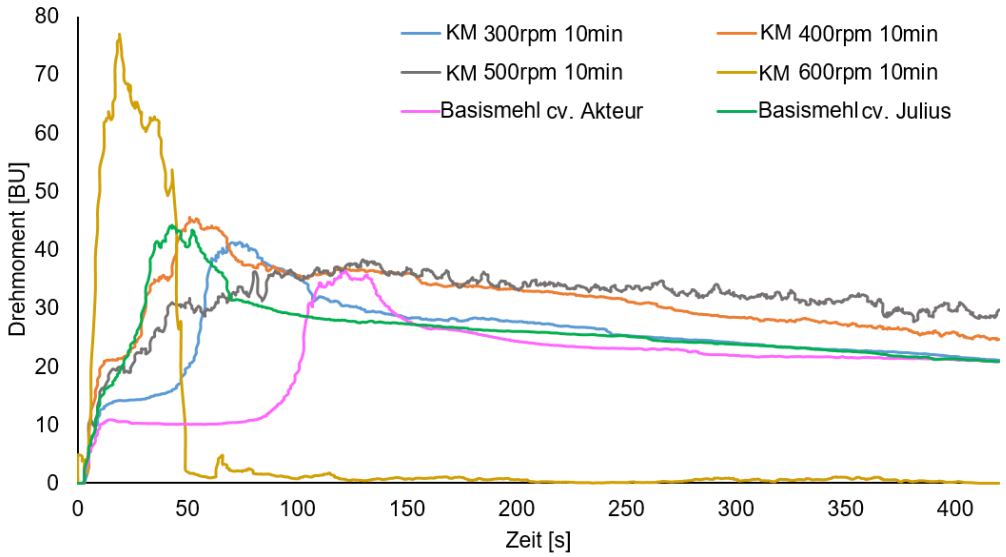


Abbildung 40: GlutoPeak Profile der Mehle von cv. Akteur (Basismehl bzw. KM/10 min bei 300-600 rpm) und Basismehl cv. Julius

Die Basismehle der beiden Weizensorten können anhand der Kurvenform bis zum Erreichen des MT unterschieden werden. Weizenmehl des cv. Akteur zeigte eine lange Aggregationszeit (57.5 s) und einen langsamen Anstieg der Konsistenz. Darüber hinaus zeigten die hohen Werte der PMT (123 s) und des MT (36.3 BU), dass der Kleber zur Ausbildung des Netzwerkes eine lange Aggregationszeit sowie einen hohen Energieeintrag benötigte. Das Mehl war während längerem Mixen bei hoher Geschwindigkeit stabil und zeigte nur eine geringe Abnahme des Drehmomentes 15 s nach Erreichen des Peakmaximums (4.6 BU). Der Kleber aus cv. Akteur war insgesamt wesentlich stabiler gegenüber anhaltender mechanischer Behandlung als derjenige aus dem Weizenmehl cv. Julius, welcher einen schnelleren Anstieg der Konsistenz (35.0 s), eine geringe PMT (43.3 s) und einen starken Drehmomentabfall aufwies.

Zunehmende mechanische Behandlung des Mehls von cv. Akteur bei 600 rpm führte zu einem Drehmomentanstieg von 39.7 BU (5 min) bis zu 71.7 BU (10 min) (Vgl. Tabelle 28). Für die schwach modifizierten Mehle (z.B. bei 300 rpm) wurde ein deutlich geringerer Drehmomentanstieg beobachtet, der im Bereich zwischen 39.3 BU (5 min) und 54.0 BU (20 min) lag. Die PMT des Weizenmehls cv. Akteur nahm mit zunehmenden Modifikationsstufen stark ab. Auch geringe Behandlungsintensitäten (z.B. bei 300 rpm) führten

zu einer Abnahme des PMT von 91.7 s (5 min) auf 55.7 s (20 min). Ein weiterer Anhaltspunkt war der MT, welcher die Glutenstabilität charakterisiert. Je geringer der Unterschied zwischen MT und PMT, desto stabiler ist das Gluten-Netzwerk. Der Unterschied zwischen MT und PMT von intensiv modifizierten Mehlen war deutlich höher, als bei schwach modifizierten Mehlen. Bei einer Drehzahl von 500 rpm in der KM schwankten die Unterschiede von MT zu PMT von Mehl cv. Julius zwischen 9.7 BU (5 min) bis zu 38.6 BU (20 min). Die Abnahme der LoT, AGT und PMT bei Intensivierung der Behandlung steht voraussichtlich in Zusammenhang mit der verschlechterten Ausbildung und Stabilität des Kleber-Netzwerkes, was bereits in den Mikrozugversuchen diskutiert wurde. Bei stark modifizierten Mehlen (400 rpm, 20 min) wurde kein Peak mehr gebildet, der Verlauf der GlutoPeak-Kurve war stark abgeflacht. Aus dem bei 500 rpm für 20 min lang modifizierten Basismehl bildete sich beim GlutoPeak Test kein richtiger Teig, da die Masse zu fest für den im Gerät vorhandenen Rührflügel war. Die Kurve des GlutoPeak flachte daher schon nach ca. 200 s auf das Nullniveau ab. Intensiv modifiziertes Mehl zeigte eine beachtliche Schwankung in den GPT-Werten, welche durch inhomogene Kleber entstanden, die nicht in der Lage waren ein stabiles Netzwerk zu entwickeln. Abbildung 40 zeigt die zügige Zu- und Abnahme des MT bei stark modifizierten Mehlen (600 rpm, 10 min), bei denen die PMT, AGT sowie LoT nicht exakt bestimmt werden konnten.

Mit zunehmender KM- und ZM-Modifikation nahmen die PMT kontinuierlich ab, die MT stiegen tendenziell leicht an. Die LoT hingegen nahm, abgesehen von einigen Ausnahmen (ZM 0.5 mm), stark ab. Auch bei der AGT wurde größtenteils eine signifikante Verringerung der Aggregationszeiten festgestellt. Insgesamt war es nicht möglich, eine einheitliche Tendenz innerhalb der Modifikationsgrade zu beschreiben.

Auch durch eine moderate ZM-Behandlung (0.2 mm, 18 000 rpm) konnte eine Verschiebung der PMT nach vorn (53.0 s) sowie die Zunahme des MT auf 50.7 BU beobachtet werden, was wiederum eine Verbesserung der Klebereigenschaften erwarten ließ. Durch eine weitere Verringerung der Sieblochgröße auf 0.12 mm bzw. 0.08 mm entstanden Mehle, bei denen kein zusammenhängender Kleber gebildet wurde, sodass die Kurvenverläufe des GlutoPeak Tests kaum auswertbar waren. Ein typischer Kurvenverlauf, wie er bei den Basismehlen oder den weniger stark modifizierten Mehlen entstand, konnte nicht aufgenommen werden, sodass die erhaltenen Werte kaum aussägekräftig waren.

Tabelle 28: PMT, MT, LoT und AGT von Broten aus nativen und modifizierten Weizenmehlen, bestimmt mittels Brabender GlutoPeak Test

	PMT [s] [a]	**MT** [BU] [a]	**LoT** [s] [a]	**AGT** [s] [a]
Basismehl cv. Julius	46.3 ± 3.5	43.3 ± 0.6	11.3 ± 1.5	35.0 ± 2.6
Basismehl cv. Akteur	123.0 ± 6.6	36.3 ± 0.6	65.3 ± 1.2	57.7 ± 5.7
KM 300 rpm 5 min (A)	91.7 ± 6.8	39.3 ± 0.6	51.0 ± 1.7	40.7 ± 5.1
KM 300 rpm 10 min (A)	71.3 ± 2.5	42.7 ± 1.5	11.0 ± 1.0	60.3 ± 2.1
KM 300 rpm 15 min (A)	56.3 ± 3.5	52.0 ± 1.0	15.3 ± 0.6	41.0 ± 3.6
KM 300 rpm 20 min (A)	55.7 ± 4.9	54.0 ± 2.0	13.3 ± 3.5	42.3 ± 3.2
KM 400 rpm 5 min (A)	58.7 ± 8.3	47.3 ± 1.2	14.3 ± 0.6	44.3 ± 8.7
KM 400 rpm 10 min (A)	54.3 ± 8.5	46.3 ± 0.6	13.7 ± 1.5	40.7 ± 7.2
KM 400 rpm 15 min (A)	105.1 ± 59.8	41.7 ± 2.3	40.8 ± 32.9	64.3 ± 29.2
KM 400 rpm 20 min (A)	136.7 ± 21.2	39.2 ± 1.2	24.3 ± 2.3	112.3 ± 22.2
KM 500 rpm 5 min (A)	49.3 ± 3.2	51.7 ± 6.4	18.0 ± 1.7	31.3 ± 1.5
KM 500 rpm 10 min (A)	97.3 ± 40.5	40.0 ± 1.7	25.5 ± 20.9	82.8 ± 25.7
KM 500 rpm 15 min (A)	11.7± 2.3	36.7 ± 5.0	6.3 ± 2.1	5.3 ± 3.5
KM 500 rpm 20 min (A)	-	-	-	-
KM 600 rpm 5 min (A)	163.0 ± 7.0	39.7 ± 1.5	49.7 ± 31.4	113.3 ± 38.0
KM 600 rpm 10 min (A)	-	-	-	-
KM 600 rpm 15 min (A)	-	-	-	-
KM 600 rpm 20 min (A)	-	-	-	-
KM 500 rpm 5 min (J)	51.3 ± 42.2	49.3 ± 4.7	6.3 ± 0.6	45.0 ± 42.5
KM 500 rpm 10 min (J)	192.0 ± 76.6	41.3 ± 0.6	12.3 ± 0.6	179.6 ± 76.2
KM 500 rpm 15 min (J)	12.3 ± 1.7	35.8 ± 4.6	6.8 ± 1.0	5.5 ± 1.7
KM 500 rpm 20 min (J)	17.5 ± 6.5	40.3 ± 9.8	7.0 ± 2.5	11.7 ± 6.0
ZM 0.5 mm 6 000 rpm (A)	121.3 ± 3.8	36.3 ± 1.5	86.7 ± 3.1	34.7 ± 2.1
ZM 0.5 mm 12 000 rpm (A)	129.0 ± 0.0	34.3 ± 0.6	90.0 ± 1.0	39.0 ± 1.0
ZM 0.5 mm 18 000 rpm (A)	97.0 ± 6.7	36.7 ± 0.6	61.0 ± 4.6	36.7 ± 2.5
ZM 0.2 mm 6 000 rpm (A)	98.7 ± 2.5	38.3 ± 0.6	63.3 ± 3.2	12.3 ± 0.6
ZM 0.2 mm 12 000 rpm (A)	58.0 ± 3.5	45.3 ± 1.5	17.3 ± 4.2	40.7 ± 1.2
ZM 0.2 mm 18 000 rpm (A)	53.0 ± 7.0	50.7 ± 0.6	17.7 ± 4.0	35.3 ± 7.0
ZM 0.12 mm 6 000 rpm (A)	82.3 ± 6.0	43.7 ± 0.6	44.0 ± 1.0	38.3 ± 5.7
ZM 0.12 mm 12 000 rpm (A)	147.7 ± 55.1	39.7 ± 3.2	73.7 ± 25.4	74.0 ± 32.9
ZM 0.12 mm 18 000 rpm (A)	163.2 ± 39.5	41.2 ± 2.9	21.2 ± 17.6	142.0 ± 54.5
ZM 0.08 mm 6 000 rpm (A)	58.7 ± 3.5	51.3 ± 2.1	16.0 ± 2.6	42.7 ± 3.8
ZM 0.08 mm 12 000 rpm (A)	94.3 ± 74.1	42.3 ± 5.1	39.0 ± 29.5	55.3 ± 44.9
ZM 0.08 mm 18 000 rpm (A)	-	-	-	-
ZM 0.12 mm 6 000 rpm (J)	37.0 ± 2.0	51.0 ± 1.0	12.3 ± 4.2	24.7 ± 5.0
ZM 0.12 mm 12 000 rpm (J)	53.5 ± 72.8	20.5 ± 27.6	13.3 ± 1.5	60.7 ± 42.1
ZM 0.12 mm 18 000 rpm (J)	72.8 ± 159.8	27.6 ± 4.0	64.7 ± 65.3	107.3 ± 141.0

[a] *Mittelwert ± absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung; PMT: Peak Maximum Time; MT: Maximum Torque; LoT: Lift off Time; AGT: Aggregation Time; A: cv. Akteur; J: cv. Julius; KM: Kugelmühle; ZM: Zentrifugalmühle*

3.4.5 Backversuche im Mikromaßstab - Mikrobacktest (MBT)

Die Bestimmung des Brotvolumens ist ein äußerst wichtigstes Kriterium für die Qualitätsbeurteilung eines Mehles, da dieser Parameter die Backqualität am besten widerspiegelt. Die Backversuche wurden in Anlehnung an Thanhaeuser et al. (2014) bzw. Selmair und Koehler (2008) durchgeführt. Hierbei wurde jedes Mehl individuell bis zum Knetoptimum im Farinographen angeteigt. Nur aus optimal entwickelten Teigen können hohe Backvolumina entstehen.

Das spezifische Brotvolumen wurde eine Stunde nach Ende des MBT lasergestützt mittels einem VolScan Profiler (Stable Micro Systems Ltd, Godalming, Großbritannien) bestimmt.

Die spezifischen Brotvolumina (SLV) sind in mL/g Teig angegeben, also das Brotvolumen [mL] bezogen auf das Gewicht des Teiglings [g] nach dem Rundwirken, sodass als Grundlage vergleichbare Bedingungen herrschen. Die Dreifachbestimmung wurde jeweils am selben Tag durchgeführt, um möglichen Schwankungen (Luftfeuchte, Raumtemperatur, Ofenfunktion) entgegenzuwirken.

3.4.5.1 MBT der Basismehle und der modifizierten Mehle

Die SLV aus den Teigen der nativen und modifizierten Mehle sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Die spezifischen Volumina der MBT-Brote aus den Basismehlen cv. Akteur (3.34 ± 0.18 mL/g) bzw. des cv. Julius (3.35 ± 0.15 mL/g) waren nahezu identisch. Mit jeglicher KM- bzw. ZM-Modifikation nahm das SLV kontinuierlich ab. Vor allem die intensive KM-Behandlung bei 600 rpm führte zu SLV unter 1.0 mL/g, sodass nach 15-minütiger Behandlung Brote mit nur 0.86 ± 0.01 mL/g (15 min) erhalten wurden. Durch die ZM-Behandlung wurde ein minimales SLV von 1.35 ± 0.03 mL/g (0.08 mm; 18 000 rpm) erhalten.

Die Präzision des MBT war sehr hoch, da die relativen Standardabweichungen bzw. Streuung, bis auf eine Ausnahme (ZM 0.12 mm; 12 000 rpm) unter 9 % lagen (Vgl. Tabelle 29).

Die Form der Mini-Brote aus den Basismehlen unterschied sich visuell deutlich. Die MBT-Brote aus dem nativen Mehl des cv. Akteur waren höher und runder, die des cv. Julius eher flach und breit. Die Krustenbräunung der MBT-Brote aus beiden Basismehlen war relativ gleichmäßig und optisch ansprechend (Vgl. Abbildung 41).

Tabelle 29: Spezifisches Brotvolumen (SLV) von Broten aus nativen und modifizierten Weizenmehlen, hergestellt mittels MBT, bestimmt mittels VolScan Profiler

	SLV [mL/g] [a]	**RSA** [%] [a]
Basismehl cv. Julius	3.35 ± 0.15	4.49
Basismehl cv. Akteur	3.34 ± 0.18	5.39
KM 300 rpm 5 min (A)	2.75 ± 0.14	4.96
KM 300 rpm 10 min (A)	2.60 ± 0.13	4.88
KM 300 rpm 15 min (A)	2.41 ± 0.10	4.19
KM 300 rpm 20 min (A)	2.18 ± 0.11	5.11
KM 400 rpm 5 min (A)	2.50 ± 0.08	3.05
KM 400 rpm 10 min (A)	2.03 ± 0.14	6.95
KM 400 rpm 15 min (A)	1.78 ± 0.15	8.58
KM 400 rpm 20 min (A)	1.65 ± 0.10	6.06
KM 500 rpm 5 min (A)	2.15 ± 0.14	6.57
KM 500 rpm 10 min (A)	1.71 ± 0.08	4.44
KM 500 rpm 15 min (A)	1.09 ± 0.01	0.92
KM 500 rpm 20 min (A)	0.95 ± 0.02	1.61
KM 600 rpm 5 min (A)	1.71 ± 0.11	6.40
KM 600 rpm 10 min (A)	0.94 ± 0.08	8.03
KM 600 rpm 15 min (A)	0.86 ± 0.01	0.67
KM 600 rpm 20 min (A)	0.94 ± 0.03	3.69
KM 500 rpm 5 min (J)	2.03 ± 0.09	4.51
KM 500 rpm 10 min (J)	1.60 ± 0.06	3.44
KM 500 rpm 15 min (J)	1.05 ± 0.03	2.39
KM 500 rpm 20 min (J)	1.01 ± 0.02	1.71
ZM 0.5 mm 6 000 rpm (A)	3.28 ± 0.28	8.59
ZM 0.5mm 12 000 rpm (A)	3.08 ± 0.16	5.07
ZM 0.5mm 18 000 rpm (A)	2.86 ± 0.10	3.43
ZM 0.2 mm 6 000 rpm (A)	3.15 ± 0.16	4.93
ZM 0.2 mm 12 000 rpm (A)	2.82 ± 0.07	2.36
ZM 0.2 mm 18 000 rpm (A)	2.66 ± 0.16	6.12
ZM 0.12 mm 6 000 rpm (A)	2.86 ± 0.08	2.67
ZM 0.12 mm 12 000 rpm (A)	1.61 ± 0.19	11.83
ZM 0.12 mm 18 000 rpm (A)	1.66 ± 0.12	7.00
ZM 0.08 mm 6 000 rpm (A)	2.75 ± 0.06	2.22
ZM 0.08 mm 12 000 rpm (A)	1.54 ± 0.09	6.05
ZM 0.08 mm 18 000 rpm (A)	1.35 ± 0.03	1.86
ZM 0.12 mm 6 000 rpm (J)	3.18 ± 0.08	2.52
ZM 0.12 mm 12 000 rpm (J)	2.38 ± 0.09	3.59
ZM 0.12 mm 18 000 rpm (J)	1.43 ± 0.02	1.51

[a] *Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung ± absolute Standardabweichung, RSA: relative Standardabweichung*
A: cv. Akteur, J: cv. Julius; KM: Kugelmühle, ZM: Zentrifugalmühle

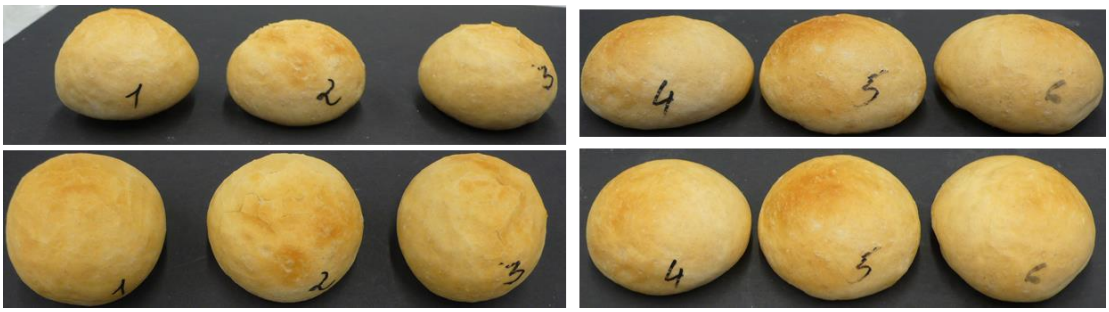


Abbildung 41: An- und Aufsicht der MBT-Brote aus Mehlen der Basismehle cv. Akteur (links) und cv. Julius (rechts)

Auffällig war, dass es mit zunehmender Modifikation zu keiner Krustenbräunung kam. Einerseits konnte durch das geringere Quellvermögen und das somit geringere Brotvolumen die Heizquelle im Backofen zu weit entfernt gewesen sein. Andererseits lag die Vermutung nahe, dass durch die starke Vermahlung mittels KM aufgrund der Maillard-Reaktion keine freien Zucker mehr vorlagen bzw. die normalerweise während der Teigphase aktiven endogenen Enzyme inaktiviert wurden, sodass die Krustenbräunung stark reduziert wurde. Weiterhin war die Oberfläche der MBT-Brote der stärker modifizierten Mehle stark rissig und somit optisch nicht ansprechend (Vgl. Abbildung 42 D/E).

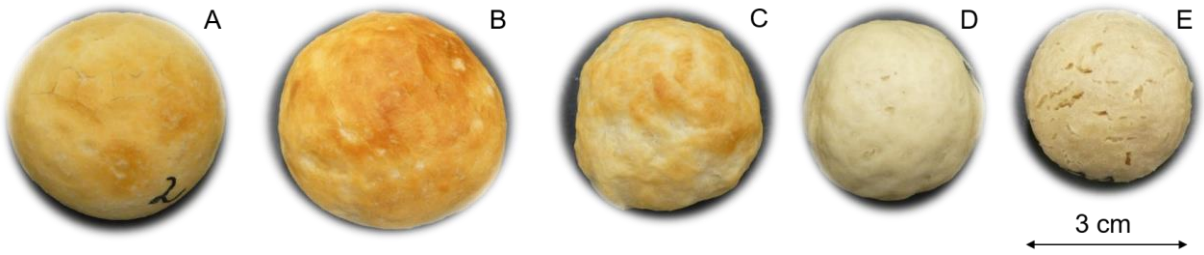


Abbildung 42: Aufsicht der 10 g-MBT-Brote cv. Akteur; A: Basismehl, B: modifiziertes Mehl bei 300 rpm, 10 min; C: modifiziertes Mehl bei 400 rpm, 10 min; D: modifiziertes Mehl bei 500 rpm, 10 min; E: modifiziertes Mehl bei 600 rpm, 10 min

Gleiches konnte für die MBT-Brote der mittels ZM modifizierten Mehle beobachtet werden, sodass die Brote der stark behandelten Mehle wenig gebräunt und leicht rissig waren (nicht dargestellt). Die Auswirkungen der ZM-Modifikation waren im Vergleich zur KM-Modifikation jedoch nicht so drastisch.

3.4.5.2 MBT von Mehlmischungen (Basismehl mit Zusätzen von modifizierten Mehlen)

Durch mechanische Modifizierung von Weizenmehlen bei der Vermahlung mittels KM konnte gezeigt werden, dass ein hoher Modifikationsgrad (hohe Drehzahl, lange Mahldauer) zu einer Verfestigung der Teige führte. Diese erhitzungsbedingte Verfestigung wurde in Mikrobackversuchen (4.7.6) und Krumentexturanalysen (4.7.7) bestätigt. Dabei erzielten

intensive Behandlungen von Weizenmehl generell einen negativen Effekt auf die funktionellen Eigenschaften, während geringe Modifikationen zu einer Verbesserung bestimmter Qualitätsmerkmale, wie z.B. der Krustenbräunung führten. Daher wurde der Ansatz gewählt, gering mechanisch modifiziertes Mehl als funktionellen Zusatz zur Verbesserung der Teigeigenschaften bzw. der Backfähigkeit der Basismehle zu verwenden. Dafür wurden jeweils 5-20 % gering modifizierte Mehle (300 rpm, 5/10 min) dem unbehandelten Mehl zugesetzt und das SLV von daraus hergestellten Broten (Vgl. Tabelle 30) bestimmt.

Tabelle 30: Spezifisches Brotvolumen (SLV) von 10 g-Broten aus Weizenmehlmischungen cv. Akteur, hergestellt mittels MBT, bestimmt mittels VolScan Profiler

	Basismehl	KM-modifiziertes Mehl	SLV [mL/g] [a] *
1	100 %	**0%**	4.40 ± 0.25 [A]
2	90 %	**10 %** 300 rpm 10 min	4.36 ± 0.21 [A,B]
3	80 %	**20 %** 300 rpm 10 min	3.79 ± 0.21 [B]
4	95 %	**5 %** 300 rpm 5 min	4.45 ± 0.21 [A]
5	92.5 %	**7.5 %** 300 rpm 5 min	5.00 ± 0.23 [A]
6	90 %	**10 %** 300 rpm 5 min	4.65 ± 0.28 [A]
7	80 %	**20 %** 300 rpm 5 min	4.50 ± 0.19 [A]

*SLV: spezifisches Brotvolumen; [a] Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung ± absolute Standardabweichung; * verschiedene Großbuchstaben innerhalb der Spalten geben signifikante Unterschiede (p<0.05) zwischen den SLV an*

Die ermittelten SLV zeigten, dass Zusätze von leicht modifizierten Mehlen zu einer Erhöhung des Gebäckvolumens führten und, wie aus Abbildung 43 zu erkennen, die eine optisch ansprechende Krustenbräunung aufwiesen. Dabei wurde bei dem Zusatz von 7.5 % modifizierten Mehl (300 rpm, 5 min) das höchste SLV (5.00 ± 0.23 mL/g) erreicht, welches sich deutlich vom SLV des Brotes aus 100 % nativem Mehl (4.40 ± 0.25 mL/g) unterschied.

Abbildung 43: Aufsicht der 10 g-MBT-Brote cv. Akteur ohne und mit Zusatz mechanisch modifizierter Mehle; 1: Basismehl; 4: 5 % 300 rpm/5 min; 5: 7.5 % 300 rpm/5 min; 6: 10 % 300 rpm/5 min; 7: 20 % 300 rpm/5 min

Weiterhin wurden Backversuche im 50 g-Maßstab durchgeführt (Vgl. Abbildung 44). Auch hierbei wurde bei dem Zusatz von 7.5 % modifizierten Mehl (300 rpm, 5 min) das maximale SLV (3.36 mL/g) erreicht, welches sich signifikant vom SLV aus dem Brot aus 100 % nativen

Mehl (2.66 mL/g) unterschied. Bei weiterer Erhöhung des Zusatzes an modifiziertem Mehl (10 %) nahm das SLV wieder ab.

Aus Abbildung 44 ist ersichtlich, dass durch Zusatz von modifizierten Mehlen zum Basismehl die Krustenbräunung im Vergleich zur Referenz (Abbildung 44-1) zunahm. Je höher der Zusatz, desto intensiver die Krustenbräunung.

Abbildung 44: Aufsicht auf die 50 g-Brote cv. Akteur ohne und mit Zusatz mechanisch modifizierter Mehle; 1: Basismehl; 2: 5 % 300 rpm/5 min; 3: 7.5 % 300 rpm/5 min; 4: 10 % 300 rpm/5 min

3.4.5.3 Diskussion

Die mittels MBT erhaltenen SLVs sind in Tabelle 29 (Basismehle und modifizierte Mehle) und Tabelle 30 (cv. Akteur; Basismehl mit modifiziertem Mehl als funktioneller Zusatz) dargestellt. Das resultierende Brotvolumen wurde für die unterschiedlich modifizierten Mehle mit der jeweiligen optimalen Wasserzugabe bestimmt. Eine zunehmende Behandlungsintensität führte zu einer starken Abnahme des SLV. Abbildung 42 veranschaulicht den negativen Einfluss der zunehmenden Behandlungsintensität auf das Aussehen der 10 g-Brote. Die folgenden Rückschlüsse können aus den Ergebnissen der Backversuche gezogen werden: (i) jegliche Art von Modifikation führte zu einer Abnahme des SLV und (ii) schonende Behandlung (300 rpm, 5–10 min) führte zu einem verbesserten äußeren Erscheinungsbild, d.h. die Brote waren gleichmäßig gebräunt und wiesen eine ansprechende Form auf. Wie bereits durch Hackenberg et al. (2017) beschrieben, könnte dieser Effekt auf eine verstärkte Hydratation während der Teigentwicklung zurückzuführen sein. Diese Beobachtungen decken sich mit den Erkenntnissen von Barak et al. (2013), die eine erhebliche Abnahme des SLV als Folge eines verringerten Gashaltevermögens des Klebers beobachteten. Dies korreliert mit der verminderten Kleberfunktionalität, die vermutlich auf partielle Denaturierung zurückzuführen

ist. In diesem Fall korreliert die zunehmende Wasserabsorption nicht mit einer verbesserten Backfähigkeit. Es scheint, dass die (selektive) Denaturierung des Klebers durch die Wasserabnahme während der mechanischen Modifikation begünstigt wurde. Der zunehmende Anteil von zur Teigbildung zugesetztem Wasser war offensichtlich nicht in der Lage, den partiell denaturierten Kleber auf das Level des Wassergehalts des Basismehls zu rehydratisieren. Aus diesem Grund kam es bei Broten aus modifizierten Mehlen zur Abnahme des SLV. Daraus kann geschlossen werden, dass die Anpassung der Menge des zugesetzten Wassers nicht das nativ gebundene Wasser ersetzen kann, welches während der intensiven mechanischen Modifikation verdunstete. Je höher das SLV, umso höher war das Verhältnis HMW-GS zu LMW-GS sowie der Anteil an hochmolekularen Polymeren. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Dhaka et al. (2015), welche beschrieben, dass HMW-GS im Vergleich zu LMW-GS eine erhöhte Teigfestigkeit bedingen. Nach Austausch von 5–20 % unmodifizierten Mehl cv. Akteur mit schwach modifizierten Mehlen (300 rpm, 5/10 min), konnte eine Zunahme des SLV (Tabelle 29) beobachtet werden. Die resultierenden Brote zeigten eine visuell ansprechende Krustenbräunung. Der Zusatz von 7.5 % schwach modifiziertem Mehl (300 rpm, 5 min) ergab das größte SLV, welches sich signifikant vom SLV des Basismehls unterschied. Die visuellen und statistischen Unterschiede im Brotvolumen der am stärksten “funktionalisierten” Mehle (80/20 oder 90/10 zusammengesetzt mit nativem Mehl) spiegelten sich nicht im SLV wieder. Die Unterschiede des SLV waren durch den höheren Anteil und die größeren Gasblasen in der Brotkrume geringer als beim absoluten Brotvolumen. Höhere Gehalte an schwach modifizierten Mehlen (10–20 %) führten zu keinem weiteren Anstieg des SLV. Außerdem wurde beobachtet, dass der Zusatz von stärker behandelten Mehlen (> 300 rpm, länger als 5 min) generell zu einer Verringerung des SLV führte.

3.4.6 Krumentextur

Nach der Messung des spezifischen Volumens der MBT-Brote wurde deren Krumentextur bestimmt. Die Textur wurde 1 h und 24 h, sofern die Brotgröße es ermöglichte, nach dem Backvorgang bestimmt. Die Krumenmessung erfolgte mittels des TA.XT plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd, Godalming, Großbritannien). Im zugehörigen Programm (Texture Analyzer Exponent 6.1.5.0) wurden die Messungen jeweils in einem Kraft-Weg- und Kraft-Zeit-Diagramm dargestellt. Auf der Abszisse wurde die Zeit [s] bzw. der Dehnweg [mm] und auf der Ordinate der Dehnwiderstand [N] aufgetragen. Anschließend wurden die Parameter Härte [N/g], Spannkraft und Kohäsivität berechnet.

Ein entscheidender Parameter ist die Krumenhärte (Hardness). Dieser wurde anhand der ersten maximalen Kompression im Kraft-Weg-Diagramm ermittelt (Vgl. Abbildung 45) und gibt Auskunft über die Festigkeit des Brotes. Die Festigkeit bzw. die Härte einer Probe ist abhängig von der Konsistenz und hat bei der Gesamtbetrachtung einer Texturprofilanalyse (TPA) den größten Einfluss auf die Bewertung einer Brotkrume in Bezug auf die Frischhaltung, über die Aussagen durch die Krumenmessung nach 24 h gemacht werden kann. Die Spannkraft (Resilience) beschreibt die Anfangselastizität der Brote und wird im Kraft-Zeit-Diagramm aus den Flächenverhältnissen der ersten Kompression ermittelt (Vgl. Abbildung 45). Die jeweilige Oberflächen-Beschaffenheit nimmt großen Einfluss auf diesen Parameter. Während klebrige bzw. klumpige Krumen höhere Werte aufweisen, kommt es bei weichem Brot eher zu einer verminderten Spannkraft. Die Kohäsivität (Cohesiveness) ist die Differenz zwischen der Fläche des ersten Messzyklus (Fläche zwischen 1 und 3) und dem Flächenverhältnis der zweiten Kompression (Fläche zwischen 4 und 6) in einem Kraft-Zeit-Diagramm (Vgl. Abbildung 45). Somit wird die Fähigkeit der Krume getestet, inwieweit sie der Deformation der ersten Kompression standhält, und der innere Zusammenhalt wird charakterisiert. Dieser Parameter wird genutzt, um das Mundgefühl beim Beißen des Brotes nachzuempfinden (Winopal, 2009).

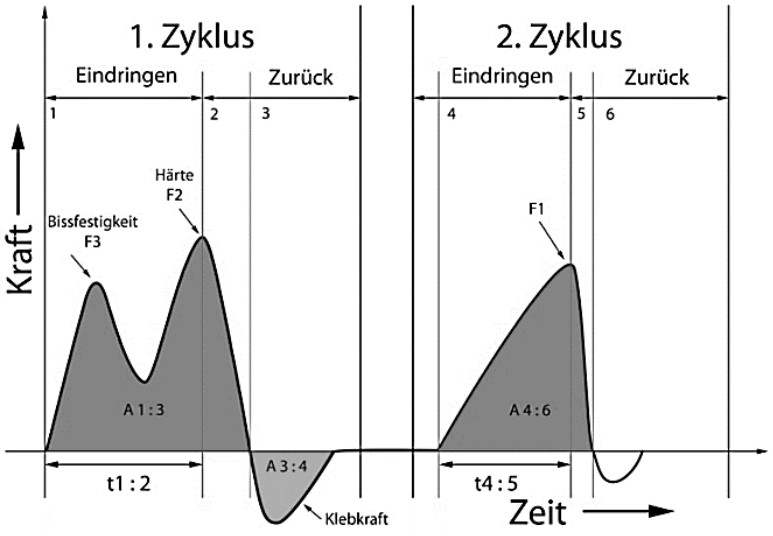


Abbildung 45: Schematische Auswertung des TPA (Winopal, 2009)

Die Krumentexturanalyse wurde durchgeführt, um die Krumenhärte zu bestimmen, die einen entscheidenden Qualitätsparameter darstellt und großen Einfluss auf die Haltbarkeit der Brote hat (Baker und Ponte, 1987).

3.4.6.1 Krumentextur der Basismehle und der modifizierten Mehle

In Tabelle 31 sind die ermittelten Werte der Härte, Spannkraft und Kohäsivität der Krumen aufgelistet. Die Krume des Basismehls cv. Akteur wies eine Festigkeit von 0.55 ± 0.12 N/g auf. Die Krumenhärte der KM-modifizieren Proben nahm mit steigender Mahldauer und Drehzahl auf maximal 2.24 ± 0.40 N/g (500 rpm, 20 min) stark zu. Die ZM-Modifikation war vergleichbar mit den ermittelten Werten der KM-Behandlung, sodass die Festigkeit der Krume nach 24 h sowie mit steigendem Modifikationsgrad zunahm. Die Auswirkungen waren jedoch nicht so drastisch wie die Zunahmen in der KM.

Die Spannkraft stagnierte durch moderate Behandlung bei Werten von ca. 0.11 – 0.12, nahm jedoch bei stark modifizierten Proben (> 500 rpm, 15 min) deutlich ab. Ebenso wurde diese Abnahme der Spannkraft nach 24 Stunden beobachtet. Die Spannkraft der Brote nach ZM-Behandlung nahm im Gegensatz zu den Broten mit zunehmender KM-Modifikation leicht zu. Vergleicht man das stark behandelte Mahlgut der jeweiligen Mühlen fällt auf, dass durch intensive KM-Modifikation Agglomerate entstanden (Vgl. Abbildung 27, Tabelle 21). Im Gegensatz dazu wurde das Mahlgut der ZM feiner, die Partikelgröße wurde stark verringert (Vgl. Abbildung 29, Tabelle 22). Diese Tatsachen weisen auf Auswirkungen auf die Krumentextur bzw. die Spannkraft hin.

Die Kohäsivität wies ähnliche Tendenzen auf. Erst durch hohe Modifikationsgrade wurde eine sichtliche Zunahme der Kohäsivität beobachtet. Es zeigte sich, dass die Krume durch hohe Festigkeit und verminderte Spannkraft nicht mehr in der Lage war, wiederholter Kompression standzuhalten. Die Kohäsivität der ZM-behandelten Mehle zeigte mit steigendem Modifikationsgrad kaum Veränderungen. Die Werte lagen alle in einem Bereich zwischen 0.91 – 1.00. Die Form der Krume war auch nach zweimaligem Eindrücken kaum deformiert. Gleichermaßen zeigte die Messung nach 24 Stunden eine Abnahme der Kohäsivität.

Beim Vergleich der Basismehle cv. Akteur und cv. Julius wurde festgestellt, dass die Krume von cv. Julius härter war und eine höhere Spannkraft aufwies. Die Tendenzen bei den jeweiligen Modifikationsparametern Härte, Spannkraft und Kohäsivität der Krumen war jedoch bei beiden Sorten gleich.

Tabelle 31: Härte, Spannkraft und Kohäsivität von Brotkrumen aus 10 g Weizenmehl in Abhängigkeit von der mechanischen Modifikation des Basismehles (1 h nach dem Backprozess)

	Härte [N/g] [a]	**Spannkraft** [a]	**Kohäsivität** [a]
Basismehl cv. Julius	0.71 ± 0.14	0.17 ± 0.01	0.98 ± 0.02
Basismehl cv. Akteur	0.55 ± 0.12	0.11 ± 0.00	1.00 ± 0.02
KM 300 rpm 5 min (A)	0.87 ± 0.15	0.11 ± 0.00	0.96 ± 0.04
KM 300 rpm 10 min (A)	0.73 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.84 ± 0.05
KM 300 rpm 15 min (A)	0.75 ± 0.06	0.12 ± 0.02	0.95 ± 0.08
KM 300 rpm 20 min (A)	1.03 ± 0.13	0.12 ± 0.00	0.95 ± 0.01
KM 400 rpm 5 min (A)	0.64 ± 0.05	0.12 ± 0.01	0.95 ± 0.11
KM 400 rpm 10 min (A)	0.91 ± 0.09	0.13 ± 0.01	0.96 ± 0.05
KM 400 rpm 15 min (A)	0.88 ± 0.44	0.12 ± 0.01	0.98 ± 0.08
KM 400 rpm 20 min (A)	1.57 ± 0.25	0.12 ± 0.00	0.92 ± 0.01
KM 500 rpm 5 min (A)	0.93 ± 0.26	0.12 ± 0.01	0.95 ± 0.03
KM 500 rpm 10 min (A)	1.08 ± 0.34	0.13 ± 0.00	0.99 ± 0.03
KM 500 rpm 15 min (A)	1.63 ± 0.67	0.08 ± 0.01	0.86 ± 0.11
KM 500 rpm 20 min (A)	2.24 ± 0.40	0.06 ± 0.01	1.24 ± 0.02
KM 600 rpm 5 min (A)	1.25 ± 0.18	0.12 ± 0.01	0.94 ± 0.02
KM 600 rpm 10 min (A)	1.85 ± 0.19	0.11 ± 0.02	1.03 ± 0.59
KM 600 rpm 15 min (A)	1.31 ± 0.19	0.10 ± 0.01	1.52 ± 0.14
KM 600 rpm 20 min (A)	1.10 ± 0.30	0.09 ± 0.00	2.07 ± 0.43
KM 500 rpm 5 min (J)	1.11 ± 0.07	0.12 ± 0.00	0.98 ± 0.02
KM 500 rpm 10 min (J)	1.47 ± 0.15	0.13 ± 0.00	0.98 ± 0.04
KM 500 rpm 15 min (J)	1.73 ± 0.40	0.11 ± 0.01	1.18 ± 0.29
KM 500 rpm 20 min (J)	1.32 ± 0.40	0.10 ± 0.00	1.08 ± 0.18
ZM 0.5 mm 6 000 rpm (A)	0.71 ± 0.07	0.11 ± 0.01	0.95 ± 0.02
ZM 0.5mm 12 000 rpm (A)	0.88 ± 0.16	0.11 ± 0.01	0.97 ± 0.03
ZM 0.5mm 18 000 rpm (A)	0.97 ± 0.51	0.11 ± 0.01	0.93 ± 0.01
ZM 0.2 mm 6 000 rpm (A)	0.78 ± 0.19	0.11 ± 0.01	1.00 ± 0.05
ZM 0.2 mm 12 000 rpm (A)	0.79 ± 0.20	0.11 ± 0.00	0.98 ± 0.05
ZM 0.2 mm 18 000 rpm (A)	0.93 ± 0.21	0.11 ± 0.01	0.93 ± 0.04
ZM 0.12 mm 6 000 rpm (A)	0.68 ± 0.10	0.11 ± 0.01	0.98 ± 0.04
ZM 0.12 mm 12 000 rpm (A)	1.32 ± 0.28	0.12 ± 0.00	0.94 ± 0.04
ZM 0.12 mm 18 000 rpm (A)	1.46 ± 0.09	0.12 ± 0.00	0.94 ± 0.04
ZM 0.08 mm 6 000 rpm (A)	0.78 ± 0.09	0.12 ± 0.00	0.96 ± 0.01
ZM 0.08 mm 12 000 rpm (A)	1.50 ± 0.41	0.12 ± 0.10	0.91 ± 0.05
ZM 0.08 mm 18 000 rpm (A)	1.64 ± 0.11	0.14 ± 0.00	0.98 ± 0.01
ZM 0.12 mm 6 000 rpm (J)	0.63 ± 0.07	0.12 ± 0.00	0.97 ± 0.01
ZM 0.12 mm 12 000 rpm (J)	1.71 ± 0.09	0.12 ± 0.10	0.97 ± 0.03
ZM 0.12 mm 18 000 rpm (J)	1.70 ± 0.44	0.13 ± 0.00	0.91 ± 0.02

[a] *Mittelwert ± absolute Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung; A: cv. Akteur, J: cv. Julius; KM: Kugelmühle, ZM: Zentrifugalmühle*

3.4.6.2 Krumentextur von Mehlmischungen (Basismehl mit Zusätzen von modifizierten Mehlen)

In Tabelle 32 sind die ermittelten Werte der Krumenhärte der Brote (50 g-Maßstab) 1 h bzw. 24 h nach dem Backvorgang aufgeführt, in Tabelle 33 die Spannkraft und die Kohäsivität 1 h bzw. 24 h nach dem Backen. In Abbildung 46 sind die entsprechenden Querschnitte der Brote mit bzw. ohne Zusatz von modifizierten Mehlen dargestellt.

Tabelle 32: Krumenhärte von Broten aus 50 g Mehl cv. Akteur, 1 h bzw. 24 h nach dem Backprozess, in Abhängigkeit von der Zusatzmenge schwach KM-modifizierter Weizenmehle cv. Akteur

	KM-modifiziertes Mehl	Härte [N/g] * [a]	
		1 h	**24 h**
1	**0 %**	1.1 ± 0.3 ^{B}	2.0 ± 0.3 ^{A,B}
2	**5 %** 300 rpm 5 min	1.7 ± 0.2 ^{A}	2.5 ± 0.7 ^{A}
3	**7.5 %** 300 rpm 5 min	1.8 ± 0.6 ^{A}	1.3 ± 0.7 ^{B}
4	**10 %** 300 rpm 5 min	1.3 ± 0.2 ^{A,B}	2.4 ± 0.6 ^{A}

*KM: Kugelmühle; [a] Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung ± absolute Standardabweichung; * verschiedene Großbuchstaben innerhalb der Spalten geben signifikante Unterschiede (p<0.05) zwischen den Werten an*

Dabei fällt auf, dass die Brotkrume mit 7.5 % bzw. mit 10 % Zusatz von schwach modifiziertem Mehl cv. Akteur (Abbildung 46-3/-4) eine sehr feinporige Krumenstruktur im Vergleich zu dem Brot aus dem Basismehl (Abbildung 46-1) aufwies, deren Struktur deutlich grobporiger war. Die Festigkeit der Krume mit 5 % bzw. mit 7.5 % Zusatz war nach 1 h signifikant höher, als die deutlich weichere Krume aus dem Basismehl (Tabelle 32). Die Krumenhärte nahm erwartungsgemäß nach 24 h signifikant zu (Ausnahme: Brot mit 7.5 % Zusatz). Dies konnte auf das Altbackenwerden von Brot zurückgeführt werden, wobei eine Reihe von biochemischen und physikalischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielen.

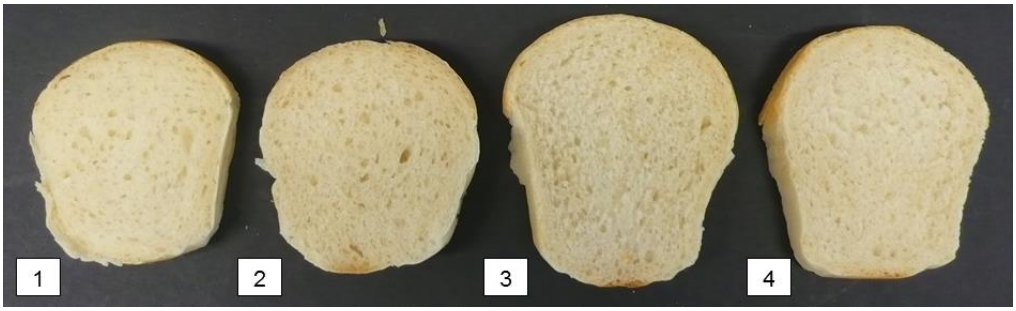


Abbildung 46: 50 g-Brote cv. Akteur; 1: Basismehl; 2: 5 % 300 rpm/5 min; 3: 7.5% 300 rpm/5 min; 4: 10 % 300 rpm/5 min

Wesentliche Einflussfaktoren sind die Retrogradation der verkleisterten Stärke, die „Wanderung“ von Wasser von der Krume zur Kruste, sowie die Verdunstung von Wasser (Schünemann und Treu, 2002, Young, 2012).

Wie aus Tabelle 33 ersichtlich, nahmen bei allen Krumen der verschiedenen Modifikationsstufen sowohl die Spannkraft als auch die Kohäsivität 24 h nach dem Backvorgang ab. Die Werte innerhalb der Modifikationsstufen unterschieden sich kaum, die Abnahmen fanden in annähernd gleichem Ausmaß statt.

Tabelle 33: Spannkraft und Kohäsivität von Broten aus 50 g Mehl cv. Akteur, 1 h bzw. 24 h nach dem Backprozess, in Abhängigkeit von der Zusatzmenge schwach KM-modifizierter Weizenmehle cv. Akteur

	KM-modifiziertes Mehl	Spannkraft * [a]		Kohäsivität * [a]	
		2 h	**24 h**	**2 h**	**24 h**
1	**0%**	0.10 ± 0.00^{A}	0.08 ± 0.00^{A}	0.96 ± 0.03^{A}	0.86 ± 0.04^{A}
2	**5 %** 300 rpm 5 min	0.09 ± 0.00^{A}	0.07 ± 0.01^{A}	0.92 ± 0.03^{A}	0.86 ± 0.03^{A}
3	**7.5 %** 300 rpm 5 min	0.09 ± 0.01^{A}	0.08 ± 0.01^{A}	0.94 ± 0.04^{A}	0.90 ± 0.05^{A}
4	**10 %** 300 rpm 5 min	0.10 ± 0.00^{A}	0.08 ± 0.01^{A}	0.93 ± 0.04^{A}	0.89 ± 0.04^{A}

*KM: Kugelmühle; [a] Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung ± absolute Standardabweichung; * verschiedene Großbuchstaben innerhalb der Spalten geben signifikante Unterschiede (p<0.05) zwischen den Werten an*

3.4.6.3 Diskussion

Die signifikant geringere Krumenhärte der Brote aus dem Basismehl cv. Akteur (0.55 ± 0.12 N/g) im Vergleich zu Broten aus dem Basismehl cv. Julius (0.71 ± 0.14 N/g) könnte durch den höheren Gehalt an HMW-GS in Mehl des cv. Akteur (Vgl. 3.3.3.1) begründet werden, was wiederum zu besseren rheologischen Eigenschaften (Baker und Ponte, 1987) und demnach zu einer verminderten Krumenhärte führt. Unabhängig von dem Grad der Behandlung wurden keine signifikanten Unterschiede ($p < 0.05$) innerhalb der verschiedenen Mahldauern bei 300-400 rpm in der Spannkraft und der Kohäsivität der Brotkrumen 1 h nach dem Backprozess analysiert. Die statistische Auswertung der Spannkraft ergab signifikante Unterschiede zwischen den Mehlen des cv. Akteur und cv. Julius hergestellten Broten, die bei 500 rpm 5 - 20 min behandelt wurden. Das Verhalten der Spannkraft (Regenerationsfähigkeit der Krume nach Komprimierung) war bei beiden Weizenarten sehr ähnlich. Die Krumenhärte und Kohäsivität der Brote stiegen mit Intensivierung des Modifikationsgrades kontinuierlich an. Dennoch wiesen Brote aus moderat behandelten Mehlen (bis zu 500/600 rpm, 5/10 min) 1 h nach dem Backprozess im Vergleich zu Broten aus intensiv behandelten Mehlen eine signifikant höhere Spannkraft auf. Die am stärksten modifizierten Mehle ließen die Kohäsivität im Vergleich zu schwach oder moderat behandelten Mehlen (bis zu 600 rpm, 10 min) deutlich ansteigen. Dabei hielten Brotkrumen aus intensiv behandelten Mehlen einer Deformation der Krume länger stand als wenig bzw. moderat modifizierte Mehle (Tabelle 31). Generell ist eine hohe Kohäsivität in Brot erwünscht, da eine bindige Krume während des Kauens leichter einen Brei bildet (Boz und Karaoğlu, 2013).

Die Krumenhärte ist einer der entscheidendsten Parameter beim Altbackenwerden der Brote (Persaud et al., 1990). Gray und Bemiller (2003) zeigten, dass das Altbackenwerden ein komplexer Prozess ist, bei dem es zu Änderungen in der Stärke, des Glutens sowie der polaren Lipide kommt. Sie vermuteten, dass der Verlust von Hydratationswasser aus dem Glutennetzwerk die partielle Kristallisation des Amylopektins ermöglicht. Folglich zeigte sich in den 24 h-Lagertests der Brote, dass die aus intensiv behandelten Mehlen hergestellten Brote deutlich schneller an Frische verloren (1.41 N/g) als die Kontrollbrote (0.55 N/g). Jegliche mechanische Modifikation scheint einen negativen Einfluss auf Brotqualität zu haben, sodass u.a. eine erhöhte Krumenfestigkeit resultiert.

Übereinstimmende Beobachtungen wurden für die Parameter Spannkraft und Kohäsivität (gemessen 1 h nach dem Backprozess) der Brote aus “funktionalisiertem” Mehl (Tabelle 33) gemacht. Dabei waren innerhalb der unterschiedlichen Zusatzlevels im Vergleich zum Kontrollbrot keine signifikanten Unterschiede ($p < 0.05$) feststellbar. Im Gegensatz dazu, zeigten die Brotkrumen mit “funktionellen” Inhaltsstoffen eine signifikant höhere Festigkeit. Diese Beobachtung war auffällig, da in der Regel ein erhöhtes SLV mit einer verminderten Krumenhärte assoziiert ist. Das erhöhte SLV ist durch eine erhöhte Wasserabsorption der Mehlmischung aufgrund des erhöhten Anteils an geschädigter Stärke aus dem zugesetzten modifizierten Mehl erklärbar. Eine hohe Wasserabsorption ist häufig mit einem erhöhten Brotvolumen assoziiert (Goesaert et al., 2009). Zwei mögliche Erklärungen sind hierbei denkbar: (i) Der erhöhte Gehalt an geschädigter Stärke im funktionalisiertem Mehl führt nach dem Backen zu einem höheren Stärkeverkleisterungsgrad, was wiederum einen höheren Anteil an rekristallisierter Amylose beim Abkühlvorgang im Vergleich zum Kontrollbrot impliziert. Makroskopisch würde sich dieser Prozess in einer erhöhten Krumenfestigkeit manifestieren. (ii) Geringe mechanische Modifikationen führt zu einer partiellen Entfaltung der Glutenproteine, wodurch die Thiolgruppen, die ursprünglich im nativen, funktionellen Protein eingeschlossen waren, freigelegt werden. Während des Backprozesses induzieren die freigelegten Thiolgruppen eine Thiol-Disulfid-Austauschreaktion innerhalb der Glutenproteine. Diese Reaktion führt zu einer Bildung von Proteinsträngen, die im Vergleich zu den Kontrollbroten eine deutlich erhöhte Festigkeit aufweisen.

3.4.7 Korrelation der analytischen und rheologischen Parameter mit dem SLV

Das Brotvolumen wird üblicherweise als der wichtigste Qualitätsparameter des Brotes angesehen (Weegels et al., 1996b). Daher wurden sowohl die analytischen als auch die rheologischen Parameter mit dem SLV (bestimmt mittels MBT) über eine lineare Pearson-Korrelation korreliert (Vgl. Tabelle 34). Die SLVs korrelieren dabei mit 14 der 27 Parameter. Auffällig ist, dass keiner der GPT Parameter (PMT, MT, LoT, AGT) mit dem SLV korrelierte. Im Gegensatz dazu, zeigten die Gehalte von ALGL ($r = 0.921$, $p < 0.001$***), GLIA ($r = 0.831$, $p < 0.001$***) und GLUT ($r = -0.893$, $p < 0.001$***) die höchsten Korrelationen mit dem SLV. In Übereinstimmung mit Thanhaeuser et al. (2014) wurde gezeigt, dass der Gehalt an GLIA und GLUT einen entscheidenden Faktor bei der Backqualität von Weizenmehl darstellen. Wie erwartet, korrelierte der Glutengehalt ($r = -0.019$, $p = 0.928$) nicht mit dem SLV, da dieser innerhalb der Behandlungsstufen nahezu identisch war. Der entscheidende Faktor für die Backqualität war das Verhältnis von GLIA/GLUT ($r = 0.946$, $p < 0.001$***), sodass der Gehalt der verschiedenen Proteinfraktionen einen größeren Effekt auf das SLV als der Gehalt an extrahierbaren Glutenproteinen hatte. Ein möglicher Grund stellte der relativ hohe Anteil an nicht-extrahierbaren Proteinen (7.2–10.4 %) der modifizierten Mehle dar, die aus den hochmolekularen Proteinaggregaten resultierten, welche nach Reduktion unlöslich blieben. Die Gehalte an GMP ($r = -0.859$, $p < 0.001$***) und SDSL ($r = 0.840$, $p < 0.001$***) waren ebenfalls hoch mit dem MBT-Volumen korreliert. Erwartungsgemäß korrelierte die Summe von GMP und SDSL ($r = 0.345$, $p = 0.099$) nicht mit dem SLV. Dies ist durch eine mögliche signifikante Änderung der nativen GMP- und SDSL-Struktur nach intensiver Behandlung erklärbar. Es wird vermutet, dass Teile der SDSL-Fraktion in die GMP-Fraktion übergehen. Diese Erkenntnisse sind nur teilweise durch Don et al. (2005) bestätigt, welche aufzeigten, dass Hitzestress zu einem Anstieg des GLUT-Gehaltes führt und im Gegensatz zu den hier analysierten Ergebnissen auch zu einer Hitze-induzierten Abnahme des GMP-Gehaltes. R_{max} korrelierte nicht mit dem SLV. Ein steigendes Verhältnis E_{max} zu R_{max} bei Teig resultierte jedoch in einem höheren SLV (Tabelle 34). Die Dehn-Parameter E_{max} (Kleber), E_{max} (Teig) und EE (Teig) zeigten mittlere bis starke Korrelationen mit dem SLV ($0.724 < r < 0.943$, $p < 0.001$***). Weiterhin korrelierte das MBT-Volumen nicht mit dem Gluten Index ($r = -0.467$, $p = 0.014$*), mit dem FK-Gehalt ($r = 0.140$, $p = 0.476$), der Teigentwicklungszeit ($r = -0.429$, $p = 0.008$**), sowie den Krumentextur-Parametern Spannkraft ($r = 0.277$, $p = 0.098$) und Kohäsivität ($r = -0.506$, $p = 0.01$). Dennoch zeigte die Wasserabsorption im Farinographen eine mittlere Korrelation ($r = -0.741$, $p < 0.001$***).

Tabelle 34: Korrelationskoeffizienten des spezifischen Brotvolumens bestimmt mittels Mikrobacktest (MBT) mit analytischen und rheologischen Parametern des nativen Mehls und KM-gemahlener Mehle (500-600 rpm, 5 - 20 min) des cv. Akteur sowie die Signifikanzlevel der Korrelationen

	Parameter	Korrelations-koeffizient (r)[a]	Signifikanz-level (P)[b]
Mikrofarinograph	Wasserabsorption	**- 0.741**	**< 0.001*** **
	Teigentwicklungszeit	- 0.429	**0.008** **
Gluten	Dehnwiederstand R_{max}	- 0.422	**0.025***
	Dehnbarkeit E_{max}	**0.724**	**< 0.001** **
	Dehnenergie EE	0.358	0.061
	Verhältnis E_{max}/R_{max}	**0.615**	**< 0.001*** **
Teig	Dehnwiederstand R_{max}	0.445	**0.005** **
	Dehnbarkeit E_{max}	**0.943**	**< 0.001*** **
	Dehnenergie EE	**0.940**	**< 0.001*** **
	Verhältnis E_{max}/R_{max}	**0.615**	**< 0.001*** **
Glutomatic	Feuchtklebergehalt	0.140	0.476
	Gluten Index	- 0.467	**0.014***
GlutoPeak-Parameter	Peak Maximum Time (PMT)	- 0.033	0.857
	Maximum Torque (MT)	0.081	0.661
	Lift off time (LoT)	0.329	0.066
	Aggregation Time (AGT)	- 0.291	0.107
Krumentextur	Härte (1 h)	**- 0.801**	**< 0.001*** **
	Spannkraft (1 h)	0.277	0.098
	Kooähäsivität (1 h)	**- 0.506**	**0.001** **
SDS/GMP-Fraktionierung	Gehalt SDSL-Fraktion[c]	**0.840**	**< 0.001*** **
	GMP-Gehalt [c]	**-0.859**	**< 0.001*** **
	Summe von SDSL und GMP	0.345	0.099
Osborne-Fraktionierung	ALGL-Gehalt[d]	**0.921**	**< 0.001*** **
	GLIA-Gehalt [d]	**0.831**	**< 0.001*** **
	GLUT-Gehalt [d]	**-0.893**	**< 0.001*** **
	Glutengehalt [e]	0.019	0.928
	GLIA/GLUT	**0.946**	**< 0.001*** **

[a] *Korrelationskoeffizienten (r) einer linearen Pearson-Korrelation: 0.0 < r ≤ ±0.54, keine Korrelation; ±0.54 < r ≤ ±0.67, schwache Korrelation; ±0.67 < r ≤ ±0.78, mittlere Korrelation; and ±0.78 < r ≤ ±1.0, starke Korrelation*

[b] *Signifikanzlevel: *, signifikant (P ≤ 0.05);**, hoch signifikant (P ≤ 0.01); ***, sehr hoch signifikant (P ≤ 0.001)*

[c] *bestimmt mittels Gelpermeations-HPLC*

[d] *bestimmt mittels Reversed-Phase-HPLC*

[e] *Summe der GLIA und GLUT*

3.5 Puroindoline (PIN)

3.5.1 Extraktion der PIN

Die Puroindoline (PIN) wurden in Anlehnung an Blochet et al. (1993) und Pauly et al. (2012) aus Weizenstärke cv. Akteur extrahiert. Zur Extraktion der Proteine wurde ein Tris-HCl-Puffer (100 mM, pH 7.8, 5 mM EDTA, 0.1 M KCl) verwendet, dem im zweiten Extraktionsschritt 4 % Triton X-114 zugesetzt wurden.

Das Detergenz Triton X-114 löst sich in wässrigen Puffern bei 0 °C, trennt sich jedoch bei Temperaturen über 22 °C in zwei Phasen: eine Triton X-114-reiche ölige untere Phase und eine Triton X-114-arme wässrige obere Phase. Bei der Phasenseparierung kommt es zu einer Anreicherung von hydrophilen Proteinen in der detergenzarmen, wässrigen Phase. Die hydrophoben Proteine, d.h. auch die PIN, reichern sich hingegen in der detergenzreichen Phase an (Bordier, 1981). Die Proteinpellets wurden in der Vakuumzentrifuge unter reduziertem Druck ausgefällt und getrocknet (Vgl. Abbildung 47).

Abbildung 47: Extrahierte, vakuumgetrocknete Proteinpellets

3.5.2 Optimierung der PIN-Extraktion

Da die in der Literatur beschriebene Methode jedoch sehr zeitintensiv ist, eine hohen Arbeitsaufwand mit sich bringt und für eine effiziente Routinemethode nicht effektiv genug ist, wurden Alternativen gesucht, die einen zweckmäßigeren Arbeitsablauf ermöglichen.

Zuerst wurde die Methode dahingehend optimiert, dass auf den zweiten Extraktionsschritt mit 0.06 % Triton X-114 verzichtet wurde, da während der zweiten Extraktion nicht signifikant mehr PIN extrahiert wurden. Weiterhin wurden die Proteine in der detergenzreichen Phase nicht mit Diethylether und Ethanol (1:3, v/v) über Nacht bei -20 °C ausgefällt, reextrahiert und ein weiteres Mal über Nacht ausgefällt, sondern unter reduziertem Druck (8 mbar, 30 °C) für 3 h getrocknet. Dies bedeutete zum einen eine enorme Zeitersparnis sowie den Verzicht auf den

gesundheitsschädlichen und hochentzündlichen Diethylether (F^+, Xn). Die PIN-Ausbeuten verringerten sich dadurch nicht.

Weiterhin wurde die Methode in Ansatz 1 (Vgl. 4.8.1) dahingehend modifiziert, dass eine Stärkeisolierung aus dem Mehl vorausging, da die PIN stärkeassoziiert vorliegen (Pauly et al., 2012). Die damit verbundene Stärke-Auswaschung an der Glutomatic mit anschließender 2-tägiger Trocknung im Vakuum-Trockenschrank (T = 50 °C) erbrachte zwar eine deutlich höhere Extraktionsausbeute der PIN jedoch einen zusätzlichen Arbeitsschritt, der die Methode darüber hinaus verlängerte. Weiterhin war nach der Stärkeextraktion die Phasenseparierung in eine hydrophobe untere Phase und eine hydrophile obere Phase kaum sichtbar. Im Mehl enthaltene, nicht wasserlösliche Carotine und Luteine sowie ein hoher Anteil biogener Pflanzenstoffe verleihen der hydrophoben Phase eine gelbliche Farbe, welche bei der Stärkeextraktion im Kleber verblieb. Folgend wurden verschiedene Lebensmittelfarbstoffe mit dem Ziel getestet, die Phasentrennung in der Matrix Mehl in der Stärke zu simulieren. Getestete Farbstoffe, die jeweils als 0.0005 %ige Lösung im Zuge des Triton-X114-Zusatzes zugegeben wurden, waren E100 (Curcumin), E101a (Riboflavin-5-phosphat), E102 (Tatrazin), E103 (Chrysoin S), E104 (Chinolingelb), Buttergelb, Naptholgelb S, Carotin und Lutein. Insgesamt stellte sich Lutein als geeignet heraus, da hiermit die Phasenseparierung mittels Triton-X114 am besten zu erkennen war (Vgl. Abbildung 48).

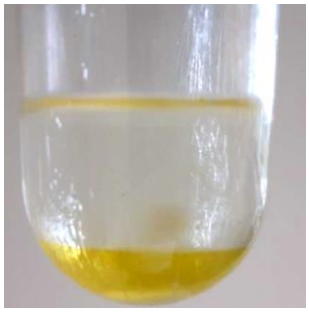


Abbildung 48: Phasenseparierung mittels Triton X-114 (4 %) und Lutein (0.0005 %)

Daraufhin wurde in Ansatz 2 auf das Auswaschen verzichtet und anstelle dieser das Mehl mit den Osborne-Extraktionslösungen der ALGL-, GLIA- und GLUT-Fraktionen aufgeschlämmt. Es zeigte sich, dass mit Hilfe der ALGL-Extraktionslösung die beste Trennung von Stärke und Kleber erfolgte. Die wasser- bzw. salzlöslichen Albumine und Globuline wurden abdekantiert und die Kleber-Gelschicht von der Stärkeschicht vorsichtig mit einem Spatel abgekratzt. Anschließend wurde der Rückstand im Vakuumtrockentrockenschrank bei 50 °C für 48 h getrocknet. Die Extraktion des Rückstandes mit 4 % Triton X-114 und 0.0005 % Lutein wurde beibehalten. Insgesamt wurde die PIN-Ausbeute leicht verbessert (5 %), sodass dieser Extraktionsansatz als Standard übernommen wurde.

3.5.3 Überprüfung der Reinheit des isolierten PIN-Extraktes mittels SDS-PAGE

Zur Untersuchung der Reinheit des isolierten PIN-Extraktes wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurde aus den getrockneten Proteinpellets eine wässrige Lösung (4.5 mg Substanz/mL) hergestellt, die im Anschluss mit Probenpuffer inkubiert und auf ein 12 % Bis-Tris-Gel aufgetragen wurde. Die PAGE wurde unter nichtreduzierenden Bedingungen und mit einem MES- Elektrodenpuffer (pH ~ 6.2) durchgeführt.

Der MES-Puffer wird für die Auftrennung kleiner bis mittelgroßer Proteine empfohlen, da die Proteine in diesem Medium schneller durch das Gel wandern können als größere Proteine und folglich die Auftrennung im niedermolekularen Bereich verbessert wird.

Zusätzlich zu den PIN-Extrakten wurde ein Marker aufgetragen, der aus Proteinen bekannter Molekülgröße besteht und die Abschätzung der Molekulargewichte der Proteine in den Proben ermöglicht.

Es wurden je 1-8 µL des wässrigen Extraktes (4.5 mg/mL) sowie 5 µL des Proteinmarkers auf das Gel aufgetragen.

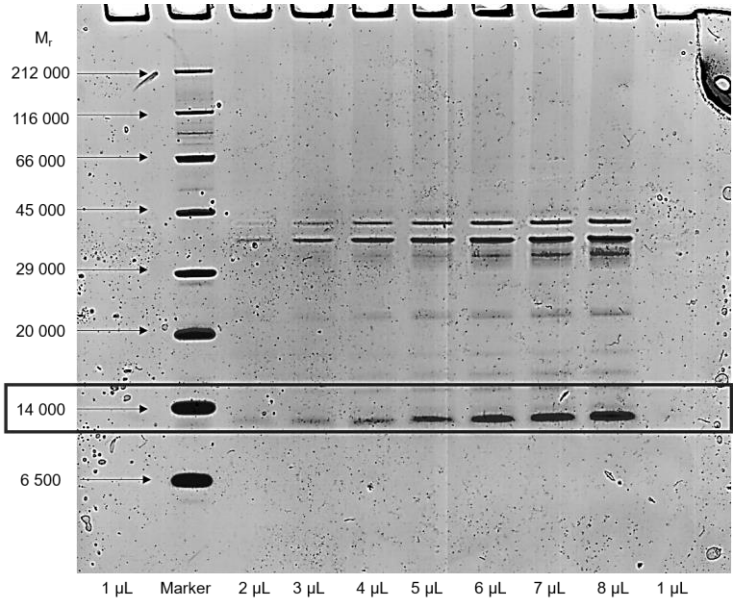


Abbildung 49: Nichtreduzierende 12%-Bis-Tris-SDS-PAGE des PIN-Extraktes (4.5 mg/mL)

Der Extrakt zeigte auf dem Gel ab einer Auftragsmenge von 3 µL eine signifikante Bande im Bereich von ca. 13 000. Diese Bande konnte dem Puroindolin A zugeordnet werden, welches eine molare Masse von 12 700 besitzt (UniProt Knowledgebase, 2017a).

Weiterhin waren deutliche Banden im Bereich von 30 000-43 000 erkennbar. Bei diesen Bande könnte es sich um die niedermolekularen α-GLIA (MW ca. 32.000) und γ-GLIA (MW 38 000-42 000) sowie den LMW-GLUT-UE, welche eine Molmasse von 36 000-44 000 aufweisen, handeln (UniProt Knowledgebase, 2017b).

Im Bereich der HMW-GLUT-UE, welche ein Molgewicht von 95 000-135 000 besitzen, wurden im Extrakt keine Banden detektiert.

3.5.4 Überprüfung der Extraktzusammensetzung mittels LC-ESI$^+$-QToF-MS

Zunächst wurde der isolierte PIN-Extrakt aus Weizenstärke mittels LC-ESI$^+$-QToF-MS analysiert, um die Zusammensetzung des Extraktes zu bewerten und die exakte molare Masse von PIN A und PIN B zu bestimmen. Durch die Bestimmung der exakten Molekülmassen wurde die Qualität der PIN-Extraktion bestätigt.

Im dem erhaltenen Base-Peak-Chromatogramm (Vgl. Abbildung 50) wurden in dem Signal mit einer Retentionszeit von 5.6 min nach Deconvolutierung die exakten Massen von PIN A und PIN B erhalten (Vgl. Tabelle 35).

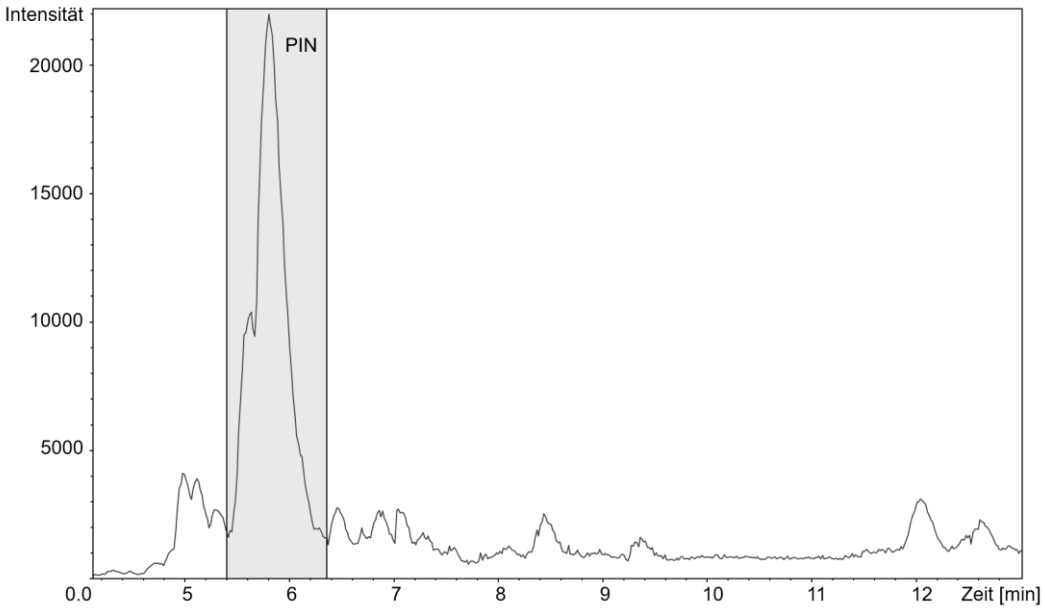


Abbildung 50: Base-Peak-Chromatogramm des mit LC-ESI$^+$-QToF-MS analysierten PIN-Extraktes

Die Zuordnung der monoisotopischen Massen zu PIN A bzw. PIN B erfolgte mit Hilfe der Datenbank UniProtKB (Protein Knowledgebase), der zentralen europäischen Datenbank für Protein-Sequenzen, die sich u.a. aus SwissProt zusammensetzt, welche ausschließlich auf rezensierte Proteinsequenzen zurückgreift. Für PIN A (PUIA_WHEAT, P33432) wurden die molekularen Massen 12 741-12 744 Da (Position 29-146) ermittelt, die abhängig von der untersuchten Weizensorte sind und auf den Daten von Day et al. (2006) basieren. Die ermittelten Massenunterschiede zu der primären (12 748 Da) bzw. zu der untergeordneten Isoform (12 918 Da) (Vgl. Tabelle 35) sind mit der natürlichen Varianz innerhalb der Sorten erklärbar. Die in den Studien von Day et al. (2006) verwendeten Weizensorten (cv. Riband, cv. Hereward, cv. Soissons) dienten auch als Datenbasis für die molekularen Massen von PIN B (PUIB_WHEAT, Q10464), welche mit 13 045-13 106 Da (Position 30-148) bestimmt wurden. Die für cv. Akteur ermittelten monoisotopischen Massen von PIN B von 13 079 Da bzw. 13 081 Da lagen innerhalb der ermittelten natürlichen Varianz der von Day et al. (2006) bestimmten Molmassen der primären Isoformen, welche mittels MALDI-TOF-MS bzw. ES-MS

analysiert wurden. Die unterschiedliche Fragmentierungstechnik von LC-ESI$^+$-QToF-MS und MALDI-TOF-MS stellen dabei eine mögliche Ursache für die geringen Abweichungen der Molmassen zu den Literaturdaten dar.

Tabelle 35: Komponentenanalyse des mit LC-ESI$^+$-QToF-MS analysierten PIN-Extraktes

Monoisotopische Masse $[M+H]^+$	Mittlere Masse $[M+H]^+$	Relative Häufigkeit der Sequenzvariation [%]	Zuordnung PIN
12 917.9	12 918.7	90.7	PIN **A**
12 747.8	12 748.3	53.4	PIN **A**
13 081.0	13 081.0	36.6	PIN **B**
12 847.5	12 847.5	35.9	PIN **A**
13 078.9	13 079.3	21.1	PIN **B**

Die ermittelten monoisotopischen Massen von PIN A bzw. PIN B für cv. Akteur bestätigen ebenfalls die Daten von Gautier et al. (1994), der mittels ESI-MS-Analyse für cv. Capitole molare Massen für PINA von 12 759 Da (115 AS) und PIN B von 13 602 Da (119 AS) ermittelten.

Der N-Terminus beginnt i.d.R. mit einem Signalpeptid, welches mit dem Endoplasmatischen Retikulum interagiert und bei der Reifung der Proteine entfernt wird. Das folgende Propeptid, welches generell keine biologische Funktion hat, wird ebenfalls bei der Reifung bzw. durch Aktivierung autokatalytisch abgespalten. Ein weiteres Propeptid liegt am C-Terminus der Proteine vor. Das eigentliche reife Protein besteht aus einer Polypeptidkette im ausgereiften Zustand, welche die aktive biologische Form des Proteins darstellt. Die molaren Massen der ungereiften PIN A bzw. PIN B-Proteine (mit Signal- und Propeptiden) sind daher deutlich höher (16 387 Da bzw. 16 792 Da).

3.5.5 Entwicklung einer LC-MS-Methode zur PIN-Quantifizierung

Zur Entwicklung einer LC-MS-Methode zur Quantifizierung von PIN A und PIN B mussten die isolierten PINs zunächst durch enzymatische Hydrolyse gespalten werden. Durch LC-MS/MS-Messungen wurden im Anschluss charakteristische Peptide (sog. Marker- bzw. Leitpeptide) identifiziert, welche anschließend mittels Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse (SIVA) per LC-MS/MS quantifiziert wurden.

Auswahl eines geeigneten Enzyms

Zu Beginn der Methodenentwicklung musste ein geeignetes Enzym gewählt werden, welches nicht zu viele Peptidbindungen spaltet, da sehr kleine Peptide (< 7 AS) nicht charakteristisch sind. Weiterhin sollten reaktive Aminosäuren (Met, Cys, Trp, Asn, Gln) im Peptid vermieden werden. Insbesondere bei den schwefelhaltigen Aminosäuren Cys und Met kann es zu

Oxidationsprozessen kommen. Gln und Asn hingegen sind aufgrund möglicher Deamidierung von Nachteil. Reaktive Aminosäuren waren jedoch bei der Auswahl der Markerpeptide nicht vollständig vermeidbar, da oftmals keine spezifischen Markerpeptide ohne diese Aminosäuren gebildet werden.

Mit Hilfe der Online-Datenbank UniProt Knowledgebase (UniProt Knowledgebase, 2017c) und dem PeptideCutter (ExPASy PeptideCutter tool) wurden PIN A und PIN B mit verschiedenen Enzymen in silico hydrolysiert und die Spaltpeptide miteinander verglichen. In Frage kommende Enzyme waren u.a. Thermolysin, Chymotrypsin und Trypsin.

Das Enzym Chymotrypsin spaltet hochspezifisch die C-terminale Peptidbindung der aromatischen Aminosäuren Phe, Tyr und Trp und weniger spezifisch die C-terminale Peptidbindung der Aminosäuren Leu, Met and His (ExPASy PeptideCutter tool).

Die theoretische Hydrolyse der PIN mittels Datenbank ergab, dass Chymotrypsin nur drei geeignete Spaltpeptide für PIN A und zwei geeignete Spaltpeptide für PIN B erzeugt. Idealerweise sollten die Markerpeptide eine Länge zwischen sieben und 20 Aminosäuren aufweisen. Zu große Peptide (> 20 AS) sind aufgrund komplexer Massenspektren weniger gut zur Quantifizierung geeignet. Kleine Peptide mit einer Länge < 7 Aminosäuren sind wenig charakteristisch im MS/MS, da sie meist nur wenige, einfach geladene Fragmentionen bilden.

Thermolysin wurde zur enzymatischen Hydrolyse von Weizenproteinen eingesetzt, da es sich in früheren Arbeiten zur Partialhydrolyse und anschließender Identifizierung von Cystinpeptiden in Kleberproteinen durchgesetzt hatte (Koehler et al., 1991, Koehler et al., 1993). Thermolysin ist ein relativ unspezifisches Enzym. Die Spaltung der Peptidbindungen erfolgt bevorzugt N-terminal an Stellen mit „voluminösen“ und aromatischen Resten, wie den hydrophoben Aminosäuren Ile, Leu, Val, Ala, Phe und Met (ExPASy PeptideCutter tool).

Die theoretische Hydrolyse der PIN ergab, dass Thermolysin sehr viele kleine Spaltpeptide (Peptide aus zwei bis vier AS) erzeugte, die sich aus den oben genannten Gründen nicht als Markerpeptide eigneten.

Das Enzym Trypsin spaltet hochspezifisch die C-terminale Peptidbindung der Aminosäure Arg (R) und etwas weniger spezifisch die C-terminale Peptidbindung von Lys (K). Keine Spaltung erfolgt bei einem C-terminal zur Spaltstelle gelegenen Prolin (P)(ExPASy PeptideCutter tool).

Mittels Datenbank konnten in der theoretischen Hydrolyse für PIN A fünf spezifische Markerpeptide und für PIN B acht spezifische Markerpeptide ermittelt werden, welche jeweils aus sieben bis 20 Aminosäuren bestehen. Diese charakteristischen Peptide eigneten sich somit als Markerpeptide.

In Tabelle 36 und Tabelle 37 sind theoretischen Spaltpeptide dargestellt, welche als sog. Markerpeptide in Frage kamen.

Tabelle 36: Theoretisch vorhergesagte isotypische Markerpeptide für PIN A [PUIA_WHEAT (P33432)] nach in silico Hydrolyse mit Trypsin (ExPASy PeptideCutter tool)

Position im Protein	Peptide	Peptidlänge	Monoisotopische Masse $[M+H]^+$
67-73	DFPVTWR	7	920.036
86-98	GGCQELLGECCSR	13	1354.534
95-103	LGQMPPQCR	9	1029.240
115-134	CNIIQGSIQGDLGGIFGFQR	20	2123.414
148-164	CNQGPPCNIPGTIGYYW	17	1883.126

Tabelle 37: Theoretisch vorhergesagte isotypische Markerpeptide für PIN B [PUIB_WHEAT (Q10464)] nach in silico Hydrolyse mit Trypsin (ExPASy PeptideCutter tool)

Position im Protein	Peptide	Peptidlänge	Monoisotopische Masse $[M+H]^+$
57-67	LSSCKDYVMER	11	1330.537
71-79	DFPVTWPTK	9	1090.244
82-89	GGCEHEVR	8	885.950
97-106	QLSQIAPQCR	10	1143.326
117-125	LGGFLGIWR	9	1018.226
133-139	AQSLPSK	7	729.831
141-148	CNMGADCK	8	840.983
148-154	FPSGYYW	7	919.004

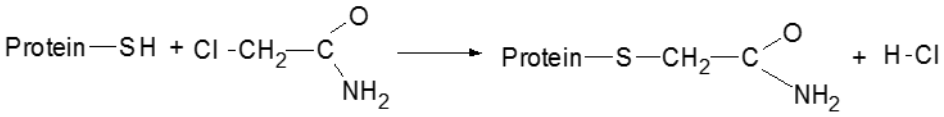
In den folgenden Tests wurde untersucht, welche Peptide nach enzymatischer Hydrolyse des PIN-Isolates tatsächlich detektierbar und als charakteristische Markerpeptide geeignet waren. Die AS-Sequenz des Peptids muss dazu für das jeweilige Protein charakteristisch sein, d.h. sie darf in keinem anderen Protein vorkommen. Zum anderen muss die Sequenz im Hydrolysat des Mehls vorkommen und in ausreichender Intensität bestimmbar sein.

3.5.6 Tryptische Hydrolyse des PIN-Isolates

Der Hydrolyse des PIN-Isolates gingen eine Reduktion der Proteine mit Tris(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) sowie eine Alkylierung mit Chloracetamid (CAA) voraus.

TCEP wird vor allem zur selektiven Reduktion von Disulfidbrücken in cystinhaltigen Proteinen eingesetzt. Die Reaktion verläuft irreversibel, da TCEP selbst keine Disulfidbrücken ausbilden kann, die anschließend wieder mit den Cysteinresten reagieren würde (Burns et al., 1991).

Durch Reduktion der Disulfidbrücken liegt das Protein in entfalteten und gestreckten Polypetidketten vor. Da die nach der Reduktion gebildeten SH-Gruppen innerhalb des Proteins erneut oxidiert werden und sich Disulfidbrücken bilden können, folgte eine Alkylierung mit CAA. Die Cysteine reagieren nach dem folgenden Schema irreversibel zum stabilen S-Carboxyamidomethylcystein:



Da Cystein als Thiolation reagiert, ist für die Alkylierung ein alkalischer pH-Wert notwendig. Bei zu hohen pH-Werten besteht indes auch die Möglichkeit, dass CAA mit den Aminogruppen in den Seitenketten der Aminosäuren Histidin und Lysin oder mit dem N-Terminus von Peptiden reagiert (Boja und Fales, 2001). Die Hydrolyse mit vorangegangener Reduktion und Alkylierung wurde in Anlehnung an Rombouts et al. (2013) durchgeführt.

Das PIN-Isolat wurde nach Reduktion und Alkylierung mit Trypsin bei 37 °C und pH=7.8 für 24 h inkubiert. Hierbei wurde das Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:40 gewählt. Die Reaktion wurde mittels TFA-Zugabe gestoppt und die Lösung bis zur Trockne eingedampft. Das Hydrolysat wurde per LC-MS/MS mit Ion Trap-Detektion analysiert (Vgl. 4.8.7) und die Daten zum einen manuell und weiterhin mit einer automatischen Datenbankrecherche ausgewertet.

3.5.7 LC-MS-Analyse der Hydrolysate mit Ion Trap-Detektion (CID-Modus)

Das Ziel der LC-MS-Analyse war die Identifizierung von charakteristischen Peptiden, die sich zur Quantifizierung von PIN A und PIN B eignen. Diese sogenannten Markerpeptide müssen die in 3.5.4 beschriebenen Anforderungen erfüllen.

Die Ionisierung der Analyten fand in einer ESI-Quelle statt. Zur Strukturaufklärung der Cystinpeptide wurde die klassische stoßinduzierte Dissoziation (CID) verwendet, bei der durch die induzierte Fragmentierung die Peptide bevorzugt zwischen dem Carbonylkohlenstoff und dem Amidstickstoff gespalten werden und hauptsächlich b- und y-Fragmente entstehen (Hesse et al., 2005).

Die Nomenklatur der Fragmente erfolgte hierbei nach Roepstorff und Fohlman (1984) bzw. Biemann (1990). Befindet sich die Ladung am C-terminalen Fragment, so wird das Ion nach Biemann (1990) als x-, y-oder z-Fragment bezeichnet. Fall sich die Ladung am N-terminalen Fragment befindet, handelt es sich um a-, b- oder c-Fragmente.

Die Ladung eines Fragments befindet sich am N- oder am C-Terminus, wobei unerheblich ist, ob sich die Ladung an der Fragment-Seitenkette, am N- oder C-terminalen Fragment befindet. Es wird davon ausgegangen, dass einfach geladene y-Ionen als Ammonium-Gruppe ($NH3^+$) und b-Ionen als Carbenium-Gruppe (CO^+) geladen sind (Lottspeich und Engels, 2012).

Aus den erhaltenen Spektren wurde mittels der Biotools-Software (Bruker Daltonics) eine Liste der monoisotopischen Massen der Peptide (MS) und der jeweiligen Fragmente (MS^2) erstellt. Die Identifizierung der Peptide erfolgte unter Zuhilfenahme der Datenbank „NCBIprot“ (National Center for Biotechnology Information) und der Software Mascot®.

Die Software-Anwendung BioTools von Bruker Daltonics® benutzt bereits die prozessierten Massenspektren von Peptiden aus einem enzymatisch hydrolysierten Protein. Mit diesem Massenspektrum (Peak-Liste) kann erneut ein Peptidabgleich mit den bereits beim PeptideCutter ermittelten Peptiden vollzogen werden.

Im Anschluss wurden die aufgeführten Kriterien angewendet, sodass sich aus einer Vielzahl von identifizierten Peptiden eine Auswahl von möglichen Markerpeptiden ergab.

In Tabelle 38 und Tabelle 39 sind die monoisotopischen Massen der mittels Universal Protein Resource (UniProt) (UniProt Knowledgebase, 2017c) theoretisch vorhergesagten Markerpeptide für PIN A bzw. PIN B nach tryptischer Hydrolyse in den verschiedenen Ladungszuständen (1+, 2+, 3+) aufgeführt. Als „fixed modification" wurde Carbamidomethyl (C) gesetzt, da standardmäßig eine Denaturierung der Proteine durch Aufspaltung der Disulfidbrücken und nachfolgender Carbamidomethylierung der Cysteinreste erfolgte. Grundlage der identifizierten Peptide waren folgende Voreinstellungen in der Mascot-Software:

- Suchtyp: MS/MS Ion Search
- Taxonomie: Viridiplantae (green plants)
- Enzym: Trypsin
- Feste Modifikation: Carbamidomethyl (C)
- Variable Modifikation: Oxidation (M)
- Messwert: monoisotopisch
- Masse des Proteins: unbeschränkt
- Peptid-Massetoleranz: ± 1 Da (# ^{13}C = 1)
- Fragment-Massetoleranz: ± 0.5 Da
- Ladungszustand: 1+, 2+ and 3+
- Max. verpasste Spaltungen: 1

Tabelle 38: Monoisotopische Massen der theoretisch vorhergesagten Markerpeptide für PIN A [PUIA_WHEAT (P33432)] nach in silico Hydrolyse mit Trypsin und Alkylierung

Peptidsequenz	Monoisotopische Massen		
	$[M+H]^+$	$[M+H]^{2+}$	$[M+H]^{3+}$
-.DVAGGGGAQQCPVETK.L + Carbamidomethyl (C)	1516.71	758.85	506.24
K.DFPVTWR.W	920.46	460.73	307.49
K.GGCQELLGECCSR.L + 3 Carbamidomethyl (C)	1525.62	763.31	509.21
R.LGQMPPQCR.C + Carbamidomethyl (C)	1086.52	543.76	363.11
R.CNIIQGSIQGDLGGIFGFQR.D + Carbamidomethyl (C)	2180.09	1090.55	727.83
R.CNQGPPCNIPGTIGYYW.- + 2 Carbamidomethyl (C)	1996.87	998.94	666.29

Tabelle 39: Monoisotopische Massen der theoretisch vorhergesagten Markerpeptide für PIN B [PUIB_WHEAT (Q10464)] nach in silico Hydrolyse mit Trypsin und Alkylierung

Peptidsequenz	Monoisotopische Massen		
	$[M+H]^{+}$	$[M+H]^{2+}$	$[M+H]^{3+}$
K.LSSCKDYVMER.C + Carbamidomethyl (C)	1387.63	694.32	463.22
K.DFPVTWPTK.W	1090.56	545.78	364.19
K.GGCEHEVR.E + Carbamidomethyl (C)	943.40	472.20	315.14
K.QLSQIAPQCR.C + Carbamidomethyl (C)	1200.62	600.81	400.88
R.LGGFLGIWR.G	1018.58	509.80	340.20
R.AQSLPSK.C	730.41	365.71	244.14
K.CNMGADCK.F + 2 Carbamidomethyl (C)	955.34	478.17	319.12
K.FPSGYYW.-	919.40	460.20	307.14

Nach der tryptischen Hydrolyse wurden im Extrakt die in Tabelle 40 dargestellten Peptide für PIN A und die in Tabelle 41 dargestellten Peptide für PIN B identifiziert. Für PIN A konnten somit alle möglichen vorhergesagten Peptide zugeordnet werden, für PIN B vier der acht möglichen vorhergesagten Markerpeptide.

Tabelle 40: Identifizierte Markerpeptide für PIN A

Peptidsequenz	Retentionszeit	*m/z*
DVAGGGGAQQCPVETK + Carbamidomethyl (C)	32.8 min	732.7
DFPVTWR	27.6 min	462.4
GGCQELLGECCSR + 3 Carbamidomethyl (C)	34.8 min	759.2
LGQMPPQCR + Carbamidomethyl (C)	45.2 min	1087.1
CNIIQGSIQGDLGGIFGFQR + Carbamidomethyl (C)	45.3 min	1092.1
CNQGPPCNIPGTIGYYW + 2 Carbamidomethyl (C)	28.2 min	666.9

Tabelle 41: Identifizierte Markerpeptide für PIN B

Peptidsequenz	Retentionszeit	*m/z*
LSSCKDYVMER + Carbamidomethyl (C)	28.2 min	694.7
DFPVTWPTK	31.2 min	549.3
GGCEHEVR + Carbamidomethyl (C)	55.5 min	472.6
CNMGADCK + 2 Carbamidomethyl (C)	25.3 min	479.8

Aufgrund der geringen Anzahl spezifischer, isotypischer Markerpeptide, konnten nicht alle Auswahlkriterien berücksichtigt werden, da nahezu alle Markerpeptide reaktive Aminosäuren (C, N und Q) besitzen. Je mehr verfügbare Peptide eines Proteins zur Quantifizierung vorhanden sind, umso valider die Quantifizierung. Aus wirtschaftlichen Gründen war es nicht möglich, alle identifizierten Peptide für die Quantifizierung synthetisieren zu lassen. Basierend auf den höchsten Signalintensitäten wurden jeweils drei Markerpeptide für PIN A bzw. PIN B

ausgewählt (Vgl. Tabelle 42). Diese Peptide (mind. 20 mg) wurden im Anschluss bei GenScript (Hongkong, PR China) mit einer vorgegebenen Reinheit > 90 % synthetisiert erworben.

3.5.8 LC-MS/MS-Methodenentwicklung mit markierten und unmarkierten Peptiden

Aus den synthetisierten Peptiden wurden jeweils Stammlösungen (1 mg/mL) hergestellt, welche verdünnt, reduziert und alkyliert wurden. Im Anschluss erfolgte die Detektion per TripleQuad-Tandem-Massenspektrometrie (Vgl. 4.8.8). Diese MS-Technik ist für die Quantifizierung besser geeignet, als die zuvor für die Identifizierung verwendete MS an einer Ionenfalle.

Um das Fragmentierungsmuster der Peptide erstmals zu bestimmen, wurden die jeweiligen reduzierten und alkylierten Peptidlösungen durch Direkteinlass („Loop“) am TripleQuad-MS/MS injiziert. Aufgrund zu starker Rückstände von TCEP und CAA, sowie Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Ionen wurde die Detektion mittels TripleQuad-MS/MS nach vorangegangener flüssigkeitschromatographischer Trennung vorgezogen.

Anhand dieser Daten wurden nachfolgende Methodenoptimierungen, wie z.B. die Säulenauswahl und die Kollisionsenergie vorgenommen (Vgl. 3.5.8.3 bis 3.5.8.7).

Wie bereits Müller et al. (2017) zeigte, wurde in verschiedenen Ansätzen mit CAA (2-Chloroacetamid) bei pH 8.5 eine deutlich bessere Alkylierung als mit IDAM (2-Iodacetamid) erreicht. Weiterhin zeigte Schnatbaum et al. (2016) das die hohe Reaktivität von IDAM zu einer "Überalkylierung" führt und außer Thiolgruppen auch andere nukleophile funktionelle Gruppen alkyliert werden können.

Tabelle 42: Ausgewählte Markerpeptide für PIN A und PIN B, Sequenz und theoretische Precursor-Masse des nativen und alkylierten Peptids für die Quantifizierung mittels MS/MS an einem Triple-Quadrupol MS

	Peptidsequenz	Position im Protein	Peptidlänge	Precursor *m/z* (nativ)	Precursor *m/z* (alkyliert)
PIN **A-1**	GGC*QELLGEC*C*SR	86-98	13	677.3	759.2
PIN **A-2**	DVAGGGGAQQC*PVETK	29-44	16	735.9	787.4
PIN **A-3**	C*NIIQGSIQGDLGGIFGFQR	115-134	20	707.9	727.8
PIN **B-1**	DFPVTWPTK	71-79	9	545.8	545.8
PIN **B-2**	GGC*EHEVR	82-89	8	443.0	472.2
PIN **B-3**	C*NMGADC*K	141-148	8	420.5	478.2

**C = Carbamidomethylierung*

3.5.8.1 Strukturformeln der ausgewählten Markerpeptide

Im Anhang in Abbildung 72 bis Abbildung 77 sind die Strukturformeln der alkylierten Peptide dargestellt.

3.5.8.2 LC-MS/MS- Spektren der Markerpeptide

Für Peptid PIN A-1 (Vgl. Abbildung 51) konnte das Precursor-Ion (M^{2+}) bei der optimierten CE (22 V) als intensivster Peak bestimmt werden. Auch ein Großteil der y-Fragmente (y_4, y_6, y_7, y_8, y_9 und y_{10}) und einige b-Fragmente (b_8, b_9, b_{11} und b_{12}) konnten detektiert werden.

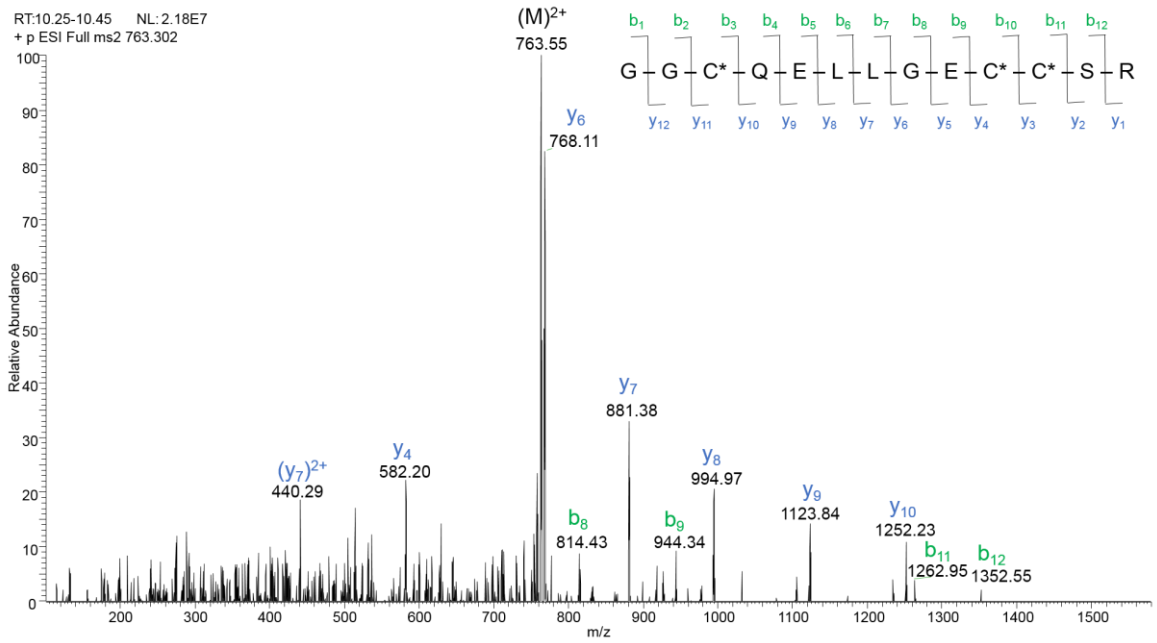


Abbildung 51: LC-MS/MS Spektrum von Peptid PIN A-1 (*C = Carbamidomethylierung)

Auch für Peptid PIN A-2 (Vgl. Abbildung 52) wurde das Precursor-Ion (M^{2+}) bei der optimierten CE (23 V) als intensivster Peak bestimmt. Hierbei wurden fast ausschließlich y-Fragmente (y_2, y_3, y_5, y_6, y_7, y_8, y_9, y_{10}, y_{11}, y_{12}, y_{13} und y_{14}) und lediglich zwei b-Fragmente (b_{11}, b_{14}) in ausreichender Intensität detektiert.

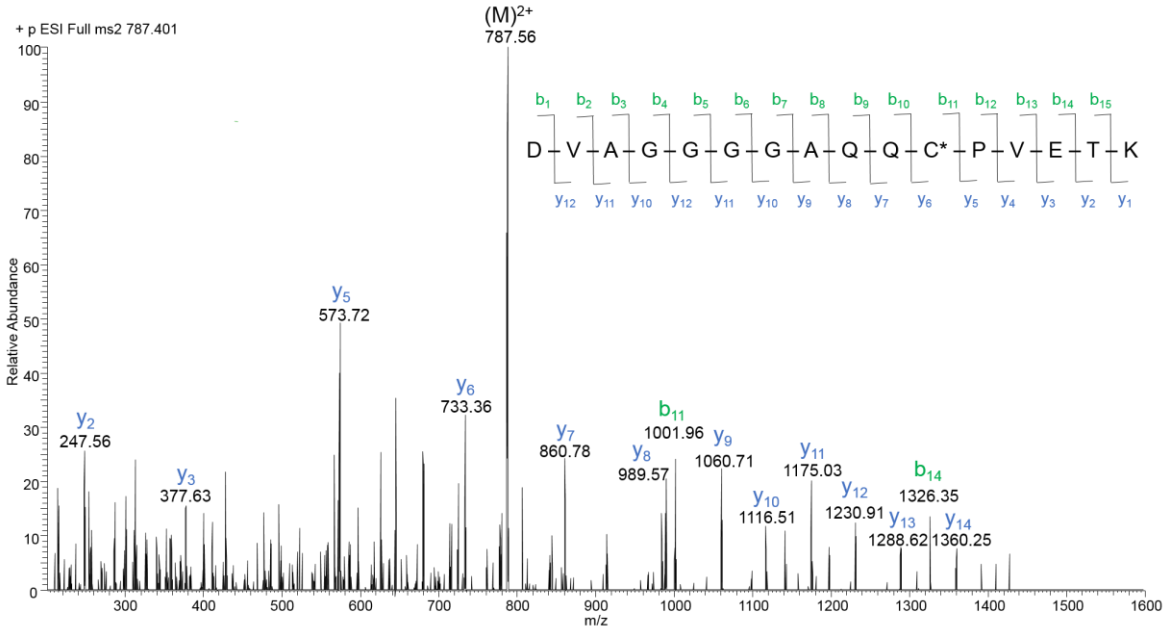


Abbildung 52: LC-MS/MS Spektrum von Peptid PIN A-2 (*C = Carbamidomethylierung)

Für Peptid PIN A-3 (Vgl. Abbildung 53) wurde aufgrund der hohen Masse das Precursor-Ion (M^{3+}) bei der optimierten CE (14 V) als intensivster Peak ermittelt. Hierbei wurden im Gegensatz zu den restlichen Peptiden mehr b-Fragmente (b_3, b_5, b_{11}, b_{12}, b_{14} und b_{15}) als y-Fragmente (y_2, y_4, y_5, y_8 und $(y_{17})^{2+}$) erhalten.

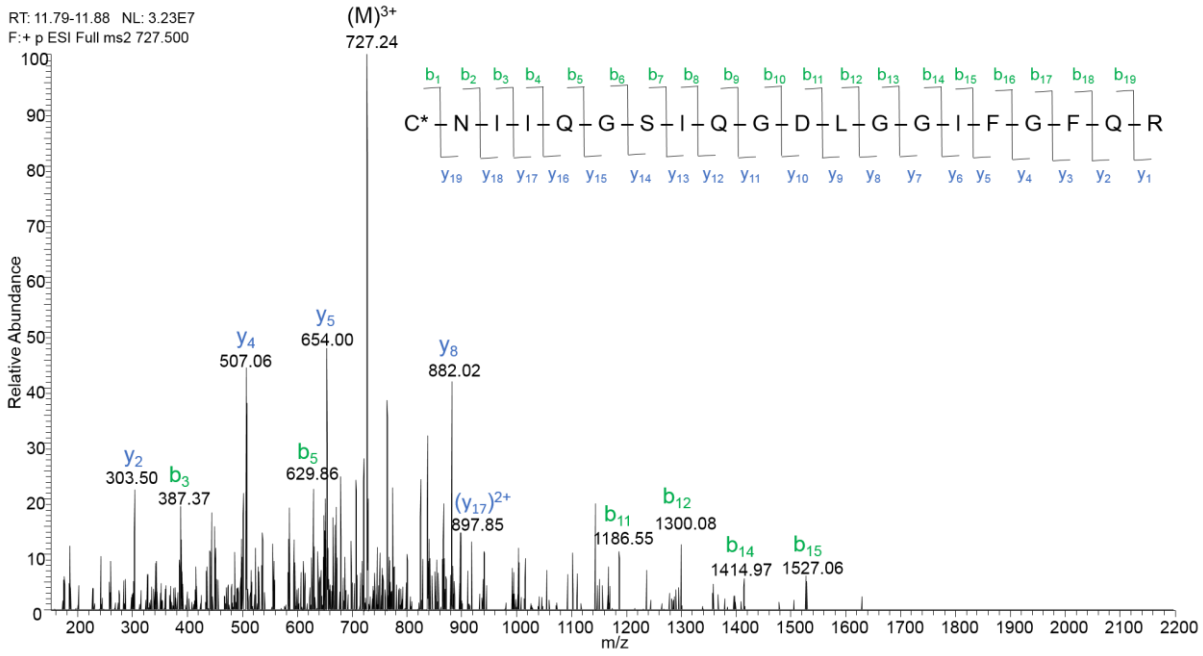


Abbildung 53: LC-MS/MS Spektrum von Peptid PIN A-3 (*C = Carbamidomethylierung)

Einzig für Peptid PIN B-1 (Vgl. Abbildung 54) wurde bei der optimierten CE (12 V) nicht das Precursor-Ion (M^{2+}) als intensivster Peak bestimmt, sondern das y-Fragment $(y_7)^{2+}$. Weiterhin wurde ein Großteil der y-Fragmente (y_3, y_4, y_5, y_6 und y_7) detektiert. b-Fragmente konnten im Spektrum nicht zugeordnet werden.

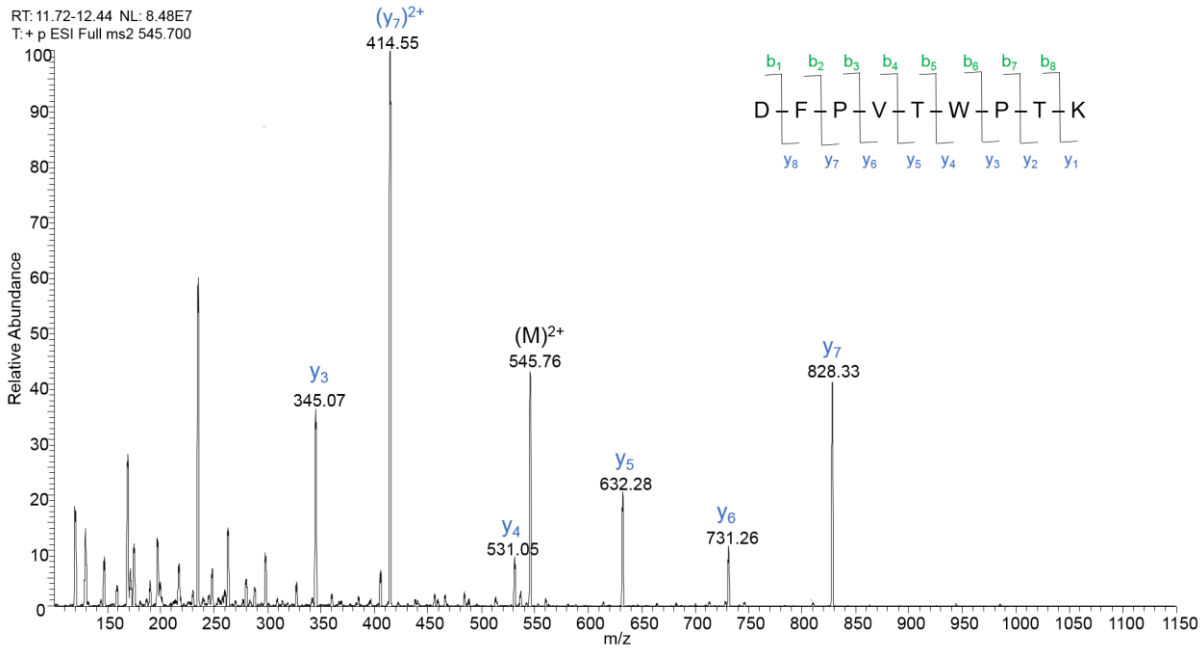


Abbildung 54: LC-MS/MS Spektrum von Peptid PIN B-1

Auch für Peptid PIN B-2 (Vgl. Abbildung 55) wurde das Precursor-Ion (M^{2+}) bei der optimierten CE (16 V) als intensivster Peak bestimmt. Darüber hinaus wurden ausschließlich y-Fragmente (y_1, y_2, y_3, y_4, y_5 und y_6) und keine b-Fragmente ermittelt.

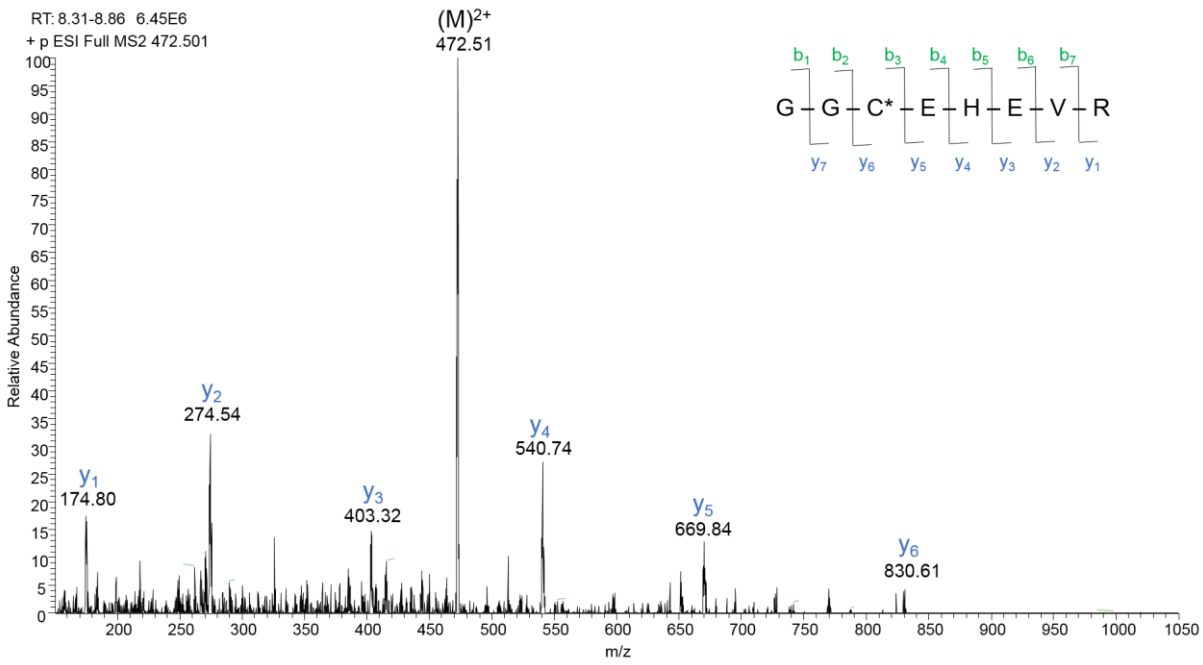


Abbildung 55: LC-MS/MS Spektrum von PIN B-2 (*C = Carbamidomethylierung)

Für Peptid PIN B-3 (Vgl. Abbildung 53) wurde bei der optimierten CE (12 V) das Precursor-Ion (M^{2+}) als intensivster Peak und das $(M\text{-}H_2O)^{2+}$ als zweitintensivster Peak ermittelt. Weiterhin wurden zwei b-Fragmente (b_3 und b_6) sowie vier y-Fragmente (y_2, y_4, y_5 und y_6) detektiert.

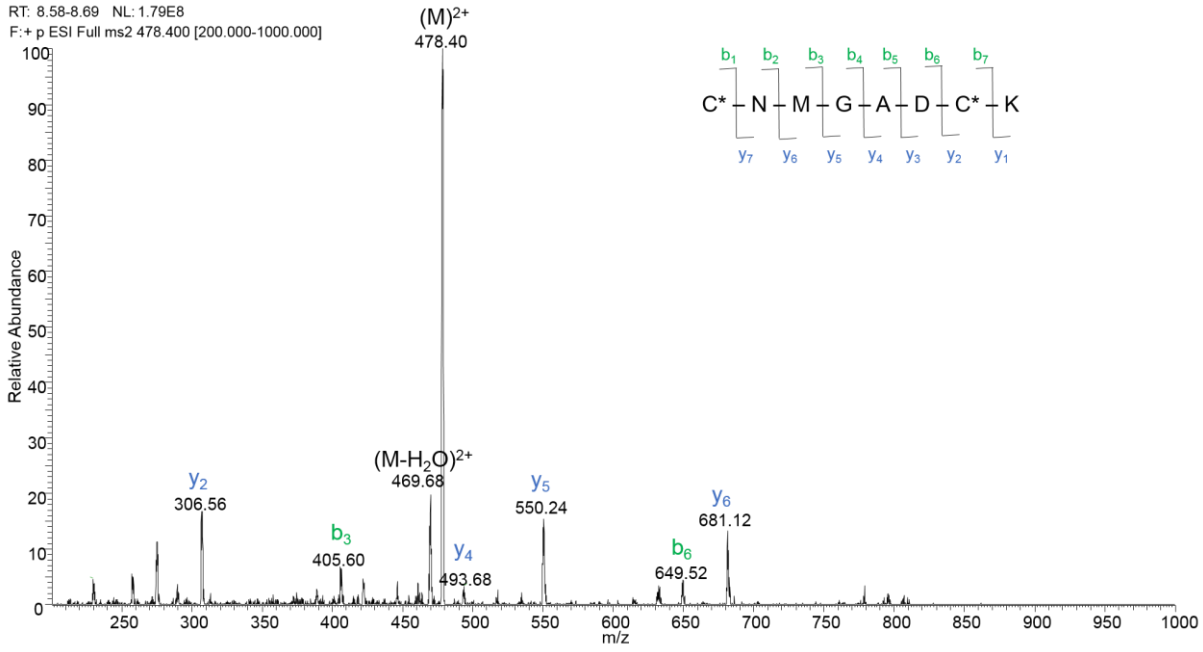


Abbildung 56: LC-MS/MS Spektrum von Peptid PIN B-3 (*C = Carbamidomethylierung)

3.5.8.3 Test verschiedener Kollisionsenergien (CE)

Um eine möglichst große Empfindlichkeit für den Nachweis und die Quantifizierung der Peptide zu gewährleisten, wurden für den empfindlichsten Übergang zur Quantifizierung des Analyten (Quantifier) und einen zusätzlichen Massenübergang zur Bestätigung (Qualifier) der Einfluss verschiedener CE auf die resultierende Peakfläche untersucht. Dazu wurde die CE im Q2 variiert, um maximale Intensitäten der Produktionen zu erreichen. Es wurde mit geringen CEs begonnen, bei denen das intakte Precursor-Ion zu sehen war. Durch die sukzessive Erhöhung der CE erhöhte sich der Anteil der Fragment-Ionen im Verhältnis zum intakten Precursor-Ion. Es wurden Kollisionsenergien im Bereich von 4 V bis 40 V getestet. Die CE, welche im Screening die größte absolute Peakfläche erzielte, wurde einem Feintuning unterzogen. Durch kleinere Abstufungen der CE wurde getestet, ob eine CE, die sich geringfügig von der im Screening ermittelten CE unterschied, zu einer weiteren Intensitätssteigerung führte.

In Tabelle 43 sind die jeweiligen CE für die ausgewählten Übergänge angegeben. Es wurde darauf geachtet, dass mind. ein Masse-zu-Ladungsverhältnis (*m/z*) der Fragment-Ionen höher als das des Precursor-Ions war, da im höheren *m/z*-Bereich weniger Störfragmente zu erwarten waren.

Tabelle 43: Optimierte Kollisionsenergien (CE) für die jeweiligen Übergänge von Precursor zu Fragmenten der Markerpeptide

Peptid	Precursor	**Fragment 1 - Quantifier**	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4
PIN A-1	763.6	***m/z* = 768.4** 22 V	*m/z* = 994.4 24 V	*m/z* = 582.0 20 V	*m/z* = 881.3 24 V
PIN A-2	787.4	***m/z* = 573.4** 23 V	*m/z* = 733.3 21 V	*m/z* = 989.5 21 V	*m/z* = 861.5 17 V
PIN A-3	727.5	***m/z* = 654.5** 14 V	*m/z* = 881.8 16 V	*m/z* = 767.6 16 V	*m/z* = 1167.5 20 V
PIN B-1	546.0	***m/z* = 414.5** 12 V	*m/z* = 828.4 12 V	*m/z* = 632.3 16 V	*m/z* = 731.3 16 V
PIN B-2	472.4	***m/z* = 274.4** 16 V	*m/z* = 540.6 16 V	*m/z* = 403.2 14 V	*m/z* = 175.1 22 V
PIN B-3	478.4	***m/z* = 550.4** 12 V	*m/z* = 307.1 14V	*m/z* = 681.7 12 V	*m/z* = 422.6 12V

Im Anschluss wurde eine Mischung der Peptide in unterschiedlichen Konzentrationen mit den in Tabelle 43 ermittelten Übergängen und den angegebenen CE untersucht. Weiterhin wurde ein PIN-Isolat aus Weizenmehl hergestellt und dieser nach Reduktion, Alkylierung und in silico Hydrolyse mit Trypsin analysiert. Sowohl im Peptidgemisch als auch im PIN-Isolat waren alle Quantifier Fragmente nachweisbar.

3.5.8.4 Säulentests

Zusätzlich wurden Tests durchgeführt, bei denen verschiedenste HPLC-Säulen auf optimale Signalintensität und bestmögliche Peakform geprüft wurden. Die getesteten Säulen sind in Tabelle 44 aufgelistet.

In Abbildung 57 und Abbildung 58 sind die Säulentypen Acclaim™ 300, Synergi™ Fusion-RP und Aqua® C18 im Vergleich dargestellt.

Abbildung 57 zeigt dabei den Massenübergang *m/z* 546.0 → 414.4 von Peptid PIN B-1, wobei mit allen drei Säulentypen schmale Peaks mit hohen Intensitäten erreicht wurden. Dabei wurde für den Übergang *m/z* 546.0 → 414.4 mit der Acclaim™ 300 eine 1.5-fach höhere Signalintensität als mit der Aqua® C18 und eine 2.0-fach höhere Intensität als mit der Synergi™ Fusion-RP erfasst.

Abbildung 58 stellt den Massenübergang *m/z* 472.4 → 274.4 von Peptid PIN B-2 dar. Auch in diesem Beispiel konnten für alle Säulentypen hohe Peak-Intensitäten bestätigt werden. Doch, wie in Tabelle 44 beschrieben, wurde im Vergleich für Peptid PIN B-2 und Peptid PIN A-3 (nicht dargestellt) mit der Acclaim™ 300 nur eine unbefriedigende Peakform erreicht.

Die Phenomenex Säulen „Aqua®“, „Synergi™ Fusion“ und „Aeris PEPTIDE“ stellten sich am geeignetsten heraus. Deswegen wurde die Säule „Aqua®“ bei nachfolgenden Messungen als Standard verwendet, gängige Alternativen stellten aber auch die „Synergi™ Fusion“ und „Aeris PEPTIDE“ dar. Auch die Kinetex®-Säulen, die eine sehr hohe Anzahl an Trennböden aufweisen und von der Performance zwischen der einer HPLC- und einer UHPLC-Säule liegen, stellte eine mögliche Alternative dar.

In Abbildung 59 ist ein Overlay der MRM-Chromatogramme der Mischung der sechs Markerpeptide dargestellt, wobei jeweils der Massenübergang des Precursors zum Quantifier-Fragment ausgewählt wurde. Alle Übergänge wurden in hoher Intensität und akzeptablen Peakformen detektiert, die weder zum Fronting bzw. Tailing neigten.

Tabelle 44: Vergleich verschiedener HPLC-Säulen zur Peptidquantifizierung

Säule	Typ	Empfohlene Verwendung	Bemerkung
Aqua® 5 µm C18 125 Å- Phenomenex	Stationäre Phase: C18 Basismaterial: Fully Porous Silica	Trennung von Small Molecules und Biomolecules	alle Peptide zeigen gute Peakform in geeigneter Signalintensität
Synergi™ Fusion-RP 4 µm C18 80 Å - Phenomenex	C18 Phase mit eingebetteter polarer Gruppe	Trennung von Mischungen polarer und unpolarer Verbindungen	alle Peptide zeigen gute Peakform in geeigneter Signalintensität
Aeris PEPTIDE 3.6 µm XB-C18 - Phenomenex	Basismaterial: Core-shell Silica mit hoher Hydrophobizität	hydrophile Proteine; Selektivität für Peptid-Mapping	alle Peptide zeigen gute Peakform in geeigneter Signalintensität
Synergi™ Polar- RP 4 µm C18 80 Å - Phenomenex	Ether-verknüfte Phenylphase mit polarem Endcapping	Trennung von polaren, aromatischen Verbindungen	Peakform von Peptid PIN B-2 wesentlich schlechter
Synergi™ Max RP 4 µm C8 80 Å - Phenomenex	dicht gebundene C12 Phase mit alternativer hydrophoben Selektivität	Trennung von basischen Verbindungen bei neutralem pH	generell schlechte Peakform, kleine Peakflächen
Acclaim™ 300- Thermo Scientific	Hochleistungs-C18 auf Kieselgel mit 300 Å-Poren (pH-Bereich: 2,5 - 7,5)	hochauflösende Trennung von Proteinen und Peptiden	Peakform von Peptid 3/5 etwas schlechter als bei Fusion RP
Kinetex® 2.6 µm C18 100 Å Phenomenex	Stationäre Phase: C18 mit TMS endcapping Basismaterial: Core-shell Silica	Trennung von hydrophoben Verbindungen	gute Trennung & Peakform
Kinetex® 2.6 µm C8 100 Å- Phenomenex	Stationäre Phase: C8 mit TMS endcapping Basismaterial: Core-shell Silica	Trennung von hydrophoben Verbindungen	gute Trennung & Peakform
Jupiter® 5 µm C18 300 Å- Phenomenex	Stationäre Phase: C18 Basismaterial: Fully Porous Silica	Trennung von hydrophoben Proteinen > 10,000 Da	ungeeignet, schlechte Peakform, niedrige Signalintensitäten
XBridge BEH C18, 130Å, 3.5 µm- Waters	funktionell gebundene BEH-Partikel ermöglichen größtmögliche pH- Stabilität und sehr geringes Säulenbluten	Trennung von Peptiden	gute Trennung & Peakform
Pursuit XRs 5 µm C18 100 Å - Agilent Technologies	optimiertes, hochreines Kieselgel mit 2.8 µm Partikelgröße (bis zu 1000 bar möglich)		Peakform von Peptid 3 wesentlich schlechter
Luna® 3 µm C18 100 Å- Phenomenex	Stationäre Phase: C18 with TMS endcapping Basismaterial: Fully Porous Silica (chemisch gebundene Octadecylsilylphase mit hoher Hydrophobizität, sehr gute Methylengruppenselektivität)	Trennung von hydrophoben Verbindungen	gute Trennung & Peakform

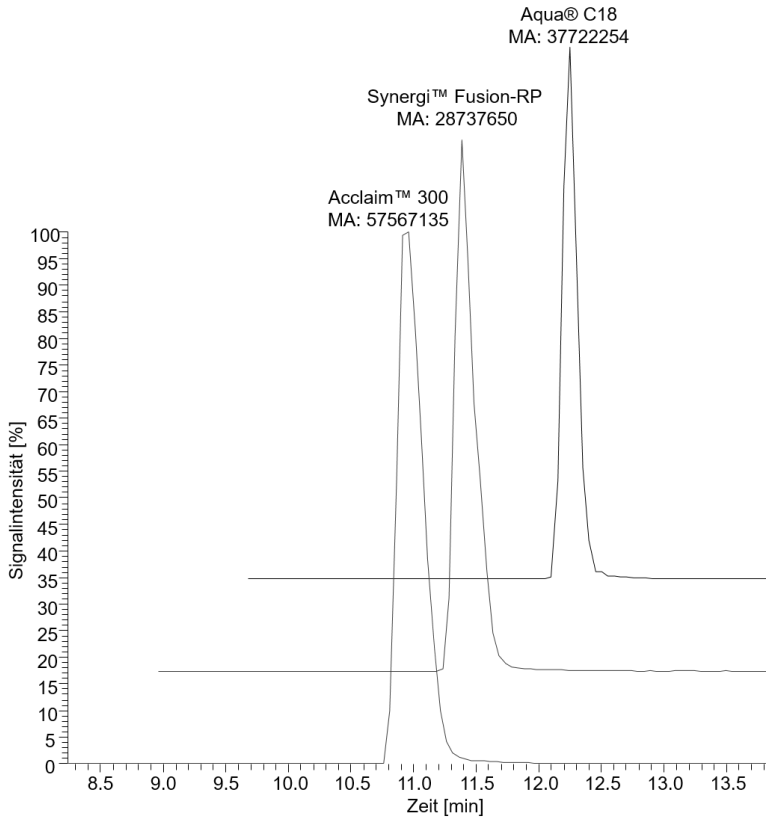


Abbildung 57: Vergleich unterschiedlicher Säulentypen (Acclaim™ 300 / Synergi™ Fusion-RP/ Aqua® C18) für die Auftrennung von Peptid PIN B-1. Dargestellt ist der Massenübergang *m/z* 546.0 → 414.5.

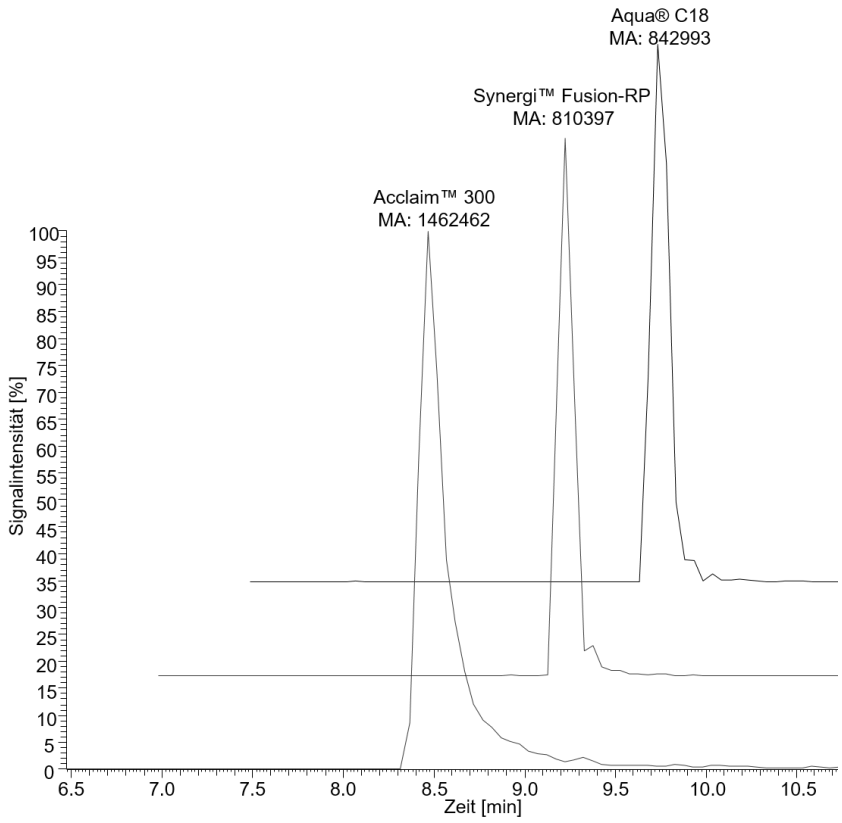


Abbildung 58: Vergleich unterschiedlicher Säulentypen (Acclaim™ 300 / Synergi™ Fusion-RP/ Aqua® C18) für die Auftrennung von Peptid PIN B-2. Dargestellt ist der Massenübergang *m/z* 472.4→ 274.4.

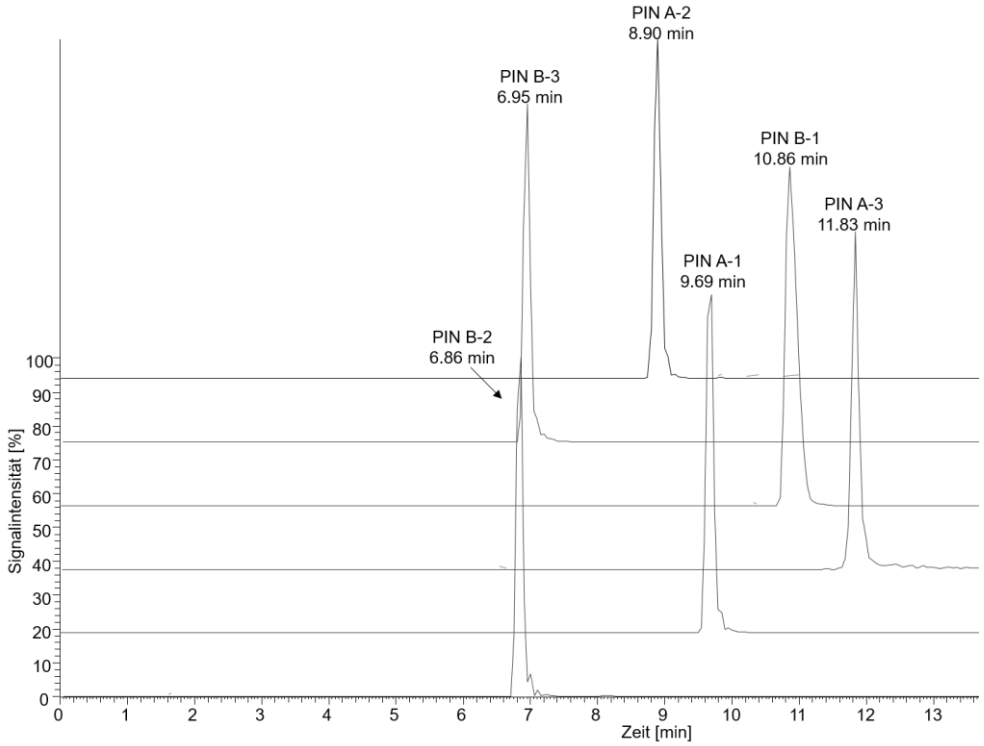


Abbildung 59: Peptidmischung am jeweiligen Quantifier-Massenübergang bei optimierter CE (Aqua®C18)

3.5.8.5 Test unterschiedlicher Gradienten

Standardmäßig wurde folgender Multistep-Gradient („Gradient ab Minute 3“) eingesetzt:

1.0 min – 3.0 min	0 % ACN (0.1 % HCOOH)
3.0 min → 16.0 min	90 % ACN (0.1 % HCOOH)
16.0 min – 21.0 min	90 % ACN (0.1 % HCOOH)
21.0 min → 23.0 min	0 % ACN (0.1 % HCOOH)
23.0 min – 37.0 min	0 % ACN (0.1 % HCOOH)

Um eine weitere Verbesserung der Empfindlichkeit zu erreichen, wurde der Gradient dahingehend verändert, dass bereits ab der ersten Minute auf ACN als Fließmittel umgespült wurde bzw. der Gradientenstart mit 90 % ACN/10 % H_2O erfolgte. Bei diesen Modifikationen kam es teilweise zu deutlichen Verschlechterung der Peptidempfindlichkeit bzw. der chromatographischen Detektierbarkeit. (Vgl. Massenübergang *m/z* 472.4 → 274.4 des Peptids PIN B-2; Abbildung 60). Der standardmäßige Gradient (s.o.) konnte somit nicht optimiert werden.

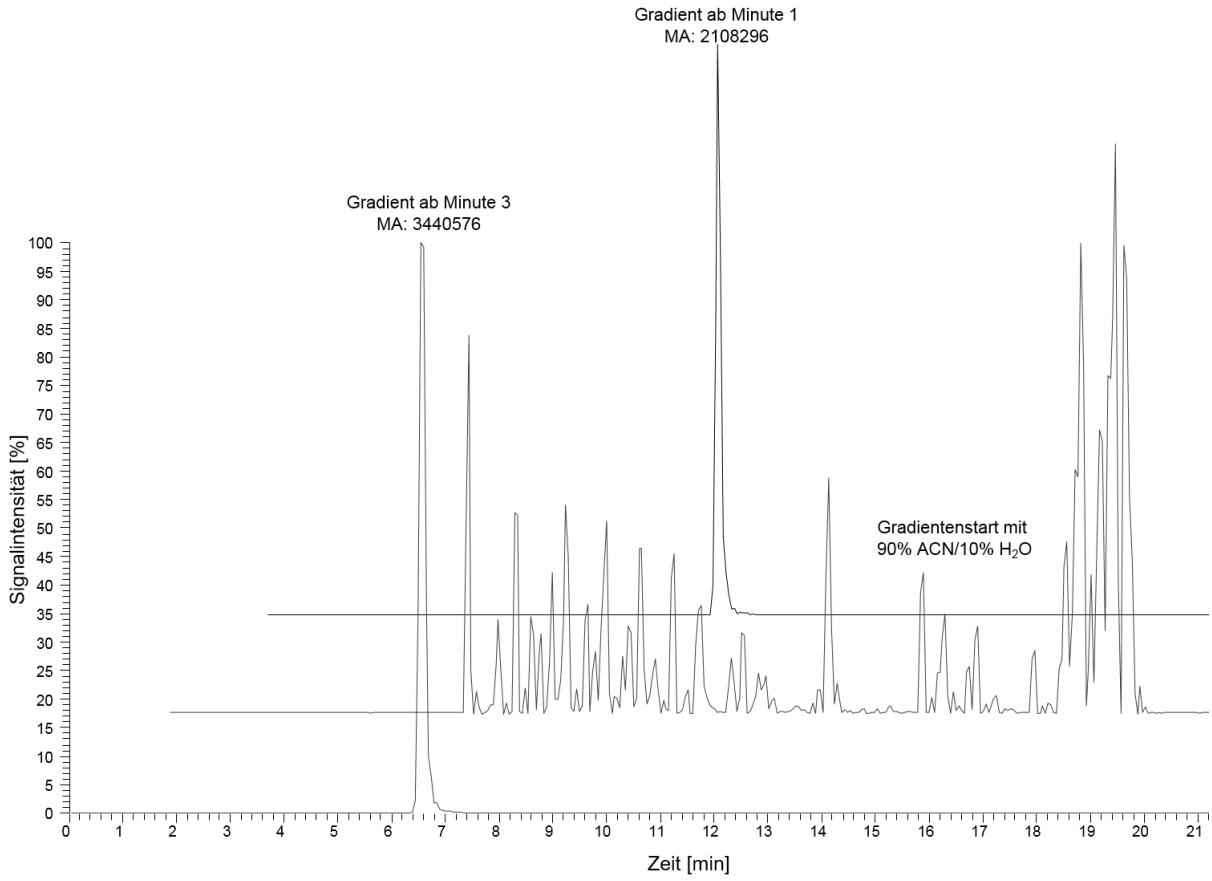


Abbildung 60: Vergleich unterschiedlicher Gradienteneinstellungen (Standard / Gradient ab Minute 1/ Gradientenstart mit 90 % ACN) am Massenübergang *m/z* 472.4→ 274.4 (Peptid PIN B-2)

3.5.8.6 Test unterschiedlicher Peakbreiten

Um eine Erhöhung der Empfindlichkeit zu erreichen, wurden u.a. unterschiedliche Peakbreiten (Peak Width, PW) getestet. Dabei handelt es sich um den Massenbereich, mit dem das Precursor-Ion durch den Quadrupol 1 gefiltert wird. Um einen Empfindlichkeitsgewinn zu erreichen, können die PW sowohl im Quadrupol 1 (Q1) als auch im Quadrupol 3 (Q3) variiert werden, wobei standardmäßig eine PW von 0.7-0.8 u eingestellt ist. Getestet wurden PWs im Bereich von 0.7 u bis 2.0 u. Bei den Tests zeigte sich, dass eine PW von 0.7 bzw. 0.8 u eine generelle Abnahme der Empfindlichkeit bewirkte, wobei Peptid PIN A-2 und Peptid PIN A-3 am stärksten betroffen waren. Als optimale PW für Q1 und Q3 wurde letztendlich eine PW von 1.6 ermittelt, bei der alle Peptide einen Empfindlichkeitsgewinn verzeichneten. Am Beispiel des Massenüberganges *m/z* 546.0 → 414.4 von Peptid PIN B-1 war die Signalintensität bei der PW = 1.6 um das 1.3-fache höher als bei einer PW = 2.0 bzw. um das 2.4-fache höher als bei einer PW = 1.2 (Vgl. Abbildung 61).

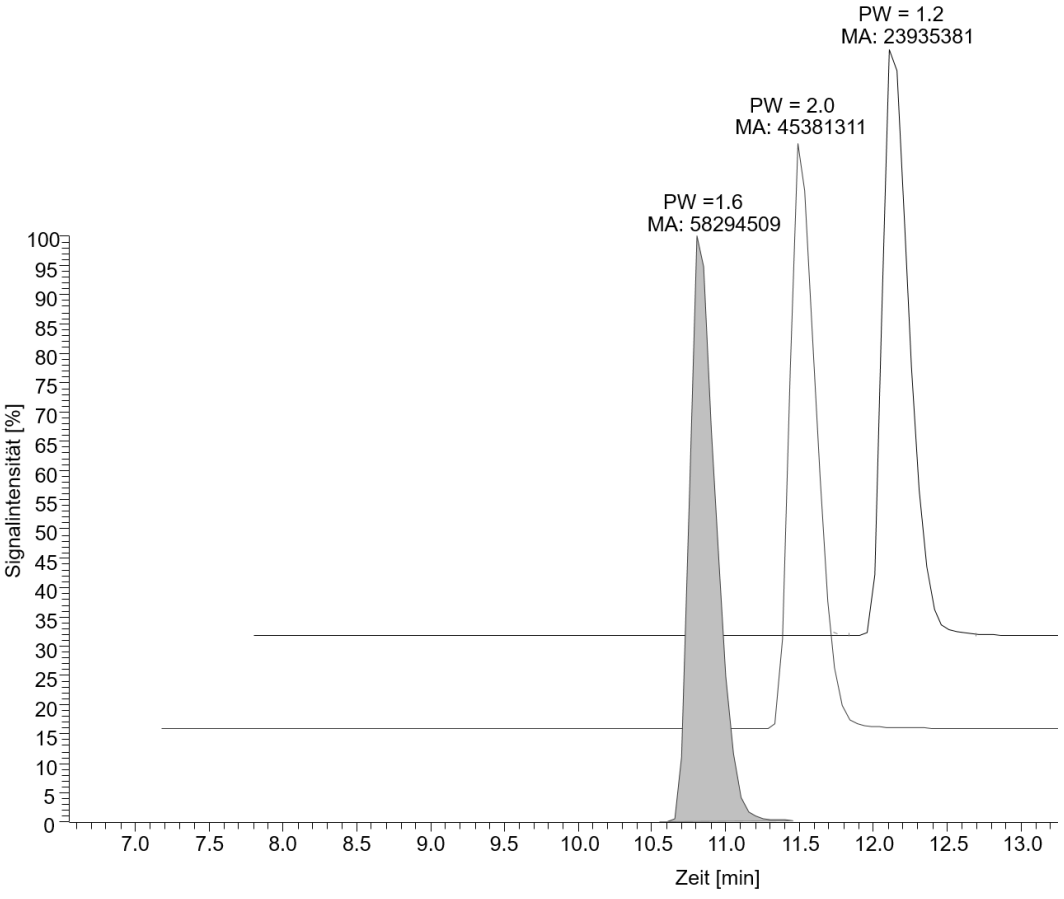


Abbildung 61: Vergleich unterschiedlicher Peakbreiten (PW 1.2/PW 1.6/ PW 2.0) am Massenübergang *m/z* 546.0 → 414.5 von Peptid PIN B-1

3.5.8.7 Test unterschiedlicher Scan Times

Die Scan Time (auch: Dwell Time) ist die Zeit, die für die Analyse jedes einzelnen Übergangs notwendig ist, also die Zeit während der ein MS lediglich ein Ion misst und detektiert. Die Scan Time beeinflusst sowohl die Anzahl möglicher Übergänge als auch die Sensitivität. Eine Erhöhung der Scan Time erhöht auch die Sensitivität, führt jedoch gleichzeitig zu einer längeren cycle-time, so dass weniger Übergänge gleichzeitig gemessen werden können (Yocum und Chinnaiyan, 2009).

Somit besitzt, neben der CE, die Scan Time einen erheblichen Einfluss auf die Empfindlichkeit einer Multi-Reaction-Monitoring (MRM)-Methode. Durch Optimierung der individuellen Scan Time kann ein zusätzlicher Intensitätsgewinn erreicht werden. Daher wurden alle Quantifier und Qualifier-Übergänge mit unterschiedlich langen Scan Times gescannt (0.05-0.20 s) und die Intensität der resultierenden Peakflächen sowie die Anzahl der Peak-Datenpunkte ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass bei einer Scan-Time von 0.2 s zu wenige Datenpunkte pro Peptid erreicht wurden. Bei den Scan Times von 0.1 s und 0.05 s erschienen schmale, gut aufgelöste Peaks mit ausreichender Datenpunktanzahl. Die Signalintensität war bei der Scan Time von 0.1 s ungefähr um das 2.8-fache höher als bei der Scan Time von 0.2 s (Vgl. Abbildung 62).

Im Full-MS ist die Scan Time meist etwas höher, da bei zu geringer Scan Time eine Signalunterdrückung die Folge wäre. Ist die Scan Time im MRM-Modus zu gering, wäre die Anzahl an Peak-Datenpunkten unzureichend.

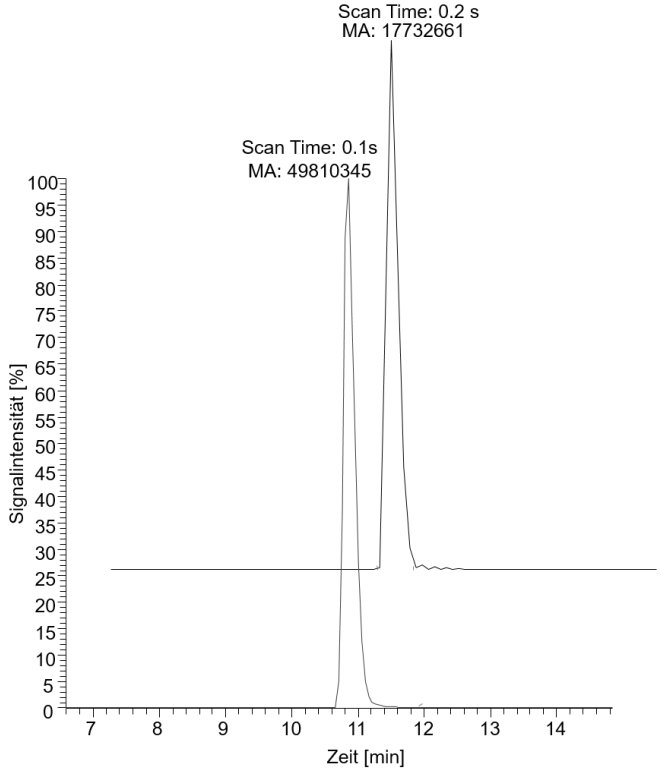


Abbildung 62: Vergleich unterschiedlicher Scan Times (ST 0.1 s/ 0.2 s) am Massenübergang *m/z* 546.0 → 414.4 (Peptid PIN B-1)

3.5.8.8 Auswahl der isotopenmarkierten Standards

Eine häufig angewandte Methode zur Quantifizierung mittels MS ist der Einsatz der isotopenmarkierten Spezies der Analyten als interne Standards. Die Verwendung von isotopenmarkierten Analyten stellt sowohl für die Quantifizierung als auch für die Qualifizierung eine sicherere Methode im Vergleich zur externen Kalibrierung dar, da Matrixeinflüsse weitgehend ausgeschlossen werden können.

Bei der Auswahl der isotopenmarkierten Standards mussten geeignete Markierungsstellen ausgewählt werden. Die am häufigsten verwendeten Substitute stellen dabei $^{12}C \rightarrow {}^{13}C$, $^{14}N \rightarrow {}^{15}N$ und $^{1}H \rightarrow {}^{2}H$ dar. Ein besonderes Augenmerk musste darauf geworfen werden, dass sich die Isotopen-Massenbereiche des unmarkierten und des markierten Precursor-Ions keinesfalls überlagerten. Dazu mussten sich alle Peptide ($[M+H]^+$)/($[M+H]^{2+}$) mindestens um 10 bzw. 5 Masseneinheiten unterscheiden. Die geläufigsten Aminosäuren zur Stabilisotopenmarkierung sind in Tabelle 45 aufgeführt:

Tabelle 45: Meist verwendete Aminosäuren zur Stabilisotopenmarkierung bei Peptiden (JPT Peptide Technologies GmbH)

Aminosäure	Einbuchstabencode	Isotop	Massendifferenz
Alanin	A	U-$^{13}C_3$, U-^{15}N	+4 Da
Arginin	R	U-$^{13}C_6$, U-$^{15}N_4$	+10 Da
Leucin	L	U-$^{13}C_6$, U-^{15}N	+7 Da
Lysin	K	U-$^{13}C_6$, U-$^{15}N_2$	+8 Da
Phenylalanin	F	U-$^{13}C_9$, U-^{15}N	+10 Da
Prolin	P	U-$^{13}C_5$, U-^{15}N	+6 Da
Valin	V	U-$^{13}C_5$, U-^{15}N	+6 Da

Auf dieser Grundlage wurden die in Tabelle 46 aufgeführten, internen Standards ausgewählt und im Anschluss bei peptides&elephants (Henningsdorf, Deutschland) synthetisiert erworben. PIN A-3 war jedoch nicht in der vorgegebenen Reinheit (95 %) synthetisierbar, sodass im Folgenden lediglich mit zwei Markerpeptiden PIN A-1 und PIN A-2 gearbeitet wurde.

Tabelle 46: Stabilisotopenmarkierte Standards mit Masse-zu-Ladungsverhältnissen der unmarkierten und markierten Precursor-Ionen

Nr.	Peptid	Unmarkiertes Precursor-Ion (*m/z*)	Markiertes Precursor-Ion (*m/z*)	Δ *m/z*
PIN A-1	GGCQELLG$^{\#}$ECCSR$^{\#}$	763.6 $^{(2+)}$	770.1 $^{(2+)}$	6.5
PIN A-2	DVAGGGGAQQCPV$^{\#}$ETK$^{\#}$	787.4 $^{(2+)}$	794.4 $^{(2+)}$	7
PIN A-3	CNIIQGSIQGDLGGIFGF$^{\#}$QR$^{\#}$	727.5 $^{(3+)}$	734.2 $^{(2+)}$	$6.\bar{6}$
PIN B-1	DFPVTWP$^{\#}$TK$^{\#}$	546.0 $^{(2+)}$	553.0 $^{(2+)}$	7
PIN B-2	GGCEHEV$^{\#}$R$^{\#}$	472.4 $^{(2+)}$	480.4 $^{(2+)}$	8
PIN B-3	CNMGA$^{\#}$DCK$^{\#}$	478.4 $^{(2+)}$	484.4 $^{(2+)}$	6

A$^{\#}$ = Ala ($^{13}C_3$; ^{15}N); F$^{\#}$ = Phe ($^{13}C_9$; ^{15}N); G$^{\#}$ = Gly ($^{13}C_2$; ^{15}N); K$^{\#}$= Lys ($^{13}C_6$; $^{15}N_2$); P$^{\#}$ = Pro ($^{13}C_5$; ^{15}N); R$^{\#}$ = Arg ($^{13}C_6$; $^{15}N_4$); V$^{\#}$ = Val ($^{13}C_5$; ^{15}N)

Allgemein erfolgt der Einsatz eines internen Standards über Probendotierung. In Verbindung mit der MS werden isotopenmarkierte Standards bevorzugt, da diese fast identische Eigenschaften in Bezug auf Chromatographie und Ionisation aufweisen (Stokvis et al., 2004, Rombouts et al., 2013, Boja & Fales, 2001). Diskriminierungserscheinungen können auch hierbei nicht ausgeschlossen werden, sind jedoch häufig vernachlässigbar.

3.5.9 Bestimmung der Peptidreinheit

3.5.9.1 Bestimmung mittels quantitativem fluorometrischen Peptid-Assay

Das „Pierce™ Quantitative Fluorometric Peptide Assay“ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) ist ein sensitives Mikroplatten-Assay zur Konzentrationsmessung von synthetischen Peptiden und Peptidmischungen tryptischer Verdaue. Die Assay-Reagenzien umfassen einen Peptid-Assay-Puffer und einen Peptid-Digest-Assay-Standard für die quantitative Messung der Peptidkonzentrationen.

Die Quantifizierung fand über ein amino-reaktives Fluoreszenzdetektionsreagenz statt, welches spezifisch den N-Terminus der Peptide markiert. Die fluoreszenzmarkierten Peptide wurden bei einer Extinktionswellenlänge von 390 nm und einer Emissionswellenlänge von 475 nm detektiert. Das Assay erzeugte dabei einen linearen Response mit steigender Peptidkonzentration über einen Arbeitsbereich von 5-1 000 µg/mL.

In Tabelle 47 sind die Responsegeraden der Peptid-Standardkurven (Fluoreszenz vs. µM) aufgelistet.

Tabelle 47: Responsegeraden und Bestimmtheitsmaß R^2 der Analyt (A)-, internen Standard (IS)- und Standardkurven (Fluoreszenz vs. µM)

Peptid	Responsegerade	Bestimmtheitsmaß
Standard	y = 157085 x – 629.16	R^2 = 0.9991
PIN A-1 A	y = 24.28 x – 268.66	R^2 = 0.996
PIN A-2 A	y = 78.81 x – 202.93	R^2 = 0.9992
PIN B-1 A	y = 84.35 x – 531.74	R^2 = 0.9982
PIN B-2 A	y = 71.67 x + 623.01	R^2 = 0.9973
PIN B-3 A	y = 65.22 x + 3209.1	R^2 = 0.9859
PIN A-1 IS	y = 45.06 x – 174.53	R^2 = 0.9981
PIN A-2 IS	y = 67.33 x + 902.16	R^2 = 0.9946
PIN B-1 IS	y = 71.15 x + 667.54	R^2 = 0.994
PIN B-2 IS	y = 67.70 x + 565.04	R^2 = 0.9989
PIN B-3 IS	y = 71.13 x + 4159.5	R^2 = 0.9845

Aus dem Anstieg und dem Achsenabschnitt der Standardkurve wurden die Gehalte der Analyt- und IS-Peptide in µmol berechnet und anschließend über Formel 1 in µg/mL angegeben. Die Bestimmtheitsmaße waren bei allen Peptiden sehr hoch, sodass davon ausgegangen werden

kann, dass die Fluoreszenz die Peptide mit zunehmender Konzentration im analysierten Arbeitsbereich proportional detektiert hat.

Formel 1: Konzentrationsberechnung aus dem Pierce Quantitativen Fluorometrischen Peptidassay

Konzentration (µg/mL) = molare Masse des Peptids (Da) × Konzentration (µM) /1000

Da die Achsenabschnitte gegenüber der Steigung extrem groß sind, könnte es bei geringen Konzentrationen zur Berechnung falscher Gehalte kommen (Vgl. Tabelle 47).
In Tabelle 48 sind die berechnete Peptidgehalte der Analyten (A) und Internen Standards (IS) aufgeführt. Die A-Peptidgehalte lagen zwischen 28.2 % (PIN A-1) und 95.6 % (PIN B-1). Für die Peptide von PIN A-2 IS, PIN B-1 IS, PIN B-2 IS und PIN B-3 IS wurden gute Reinheiten zwischen 59.2 % und 95.2 % bestimmt. Dabei auffällig waren vor allem die sehr niedrigen Gehalte von PIN A-1 A bzw. PIN A-1 IS (38.9 %). Die IS wiesen, mit Ausnahme von Peptid PIN B-1, eine durchweg höhere Reinheit im Vergleich zu den A auf. Der PIN B-1 A bzw. der PIN B-1 IS war jeweils das einzige Peptid mit zwei aromatischen Aminosäuren.

Tabelle 48: Berechnete Peptidgehalte der Analyten (A) und Internen Standards (IS)

Analyt	Peptidgehalt A [%]	Interner Standard	Peptidgehalt IS [%]
PIN A-1 - GGCQELLGECCSR	28.2	PIN A-1 - GGCQELLG$^{\#}$ECCSR$^{\#}$	38.9
PIN A-2 - DVAGGGGAQQCPVETK	91.6	PIN A-2 - DVAGGGGAQQCPV$^{\#}$ETK$^{\#}$	95.2
PIN B-1 - D**F**PVT**W**PTK	95.6	PIN B-1 - D**F**PVT**W**P$^{\#}$TK$^{\#}$	73.6
PIN B-2 - GGCEHEVR	58.6	PIN B-2 - GGCEHEV$^{\#}$R$^{\#}$	59.2
PIN B-3 - CNMGADCK	47.0	PIN B-3 - CNMGA$^{\#}$DCK$^{\#}$	72.2

$^{\#}$: stabilisotopenmarkierte AS, fett gedruckt: aromatischen AS

3.5.9.2 Bestimmung mittels RP-HPLC/UV

Anschließend wurden die IS jeweils als Kalibrierstandard für die nichtmarkierten Analytpeptide verwendet. Dazu wurde eine Stammlösung in einer Konzentration von annähernd 0.5 mg/mL hergestellt, mit TCEP reduziert und anschließend mit CAA alkyliert. Die Alkylierung führte dabei zu einer deutlich verbesserten Stabilität. Die Messung dieser Standards erfolgte mittels RP-HPLC bei einer UV-Absorption von 210 nm, wobei verschiedene Volumina IS mit bekannter Konzentration injiziert wurden. Man setzte voraus, dass sich die markierten und unmarkierten Standards bei der Detektion homolog verhalten, sodass weiterhin Stammlösungen der Analyten (c = 0.5 mg/mL) hergestellt wurden. Die reduzierten und alkylierten A-Standards wurden im Anschluss auch mittels Dreipunktmessung in der RP-HPLC/UV injiziert. Die Verhältnisse von A:IS sind in Tabelle 49 dargestellt.

Tabelle 49: Vergleich der Verhältnisse von A:IS mittels fluorometrischer und UV-spektroskopischer Bestimmung

Peptid	Verhältnis A:IS (fluorometrisch)	Verhältnis A:IS (RP-HPLC/UV)
PIN A-1	72.5 %	83.6 ± 0.6 %
PIN A-2	96.2 %	108.6 ± 4.5 %
PIN B-1	129.9 %	95.8 ± 0.6 %
PIN B-2	99.0 %	96.7 ± 4.4 %
PIN B-3	65.1 %	105.8 ± 4.3 %

Die Verhältnisse von A zu IS, die mittels RP-HPLC bestimmt wurden, zeigten weniger Unterschiede in den Peptidgehalten, als die Werte die mittels fluorometrischen Kit analysiert wurden. Auch aus den Chromatogrammen (Vgl. Abbildung 63 und Abbildung 64) ist zu erkennen, dass A und IS fast gleiche chromatographische Eigenschaften aufwiesen. Lediglich die Peakintensität des IS von Peptid PIN A-1 war deutlich höher als die des Analyten.

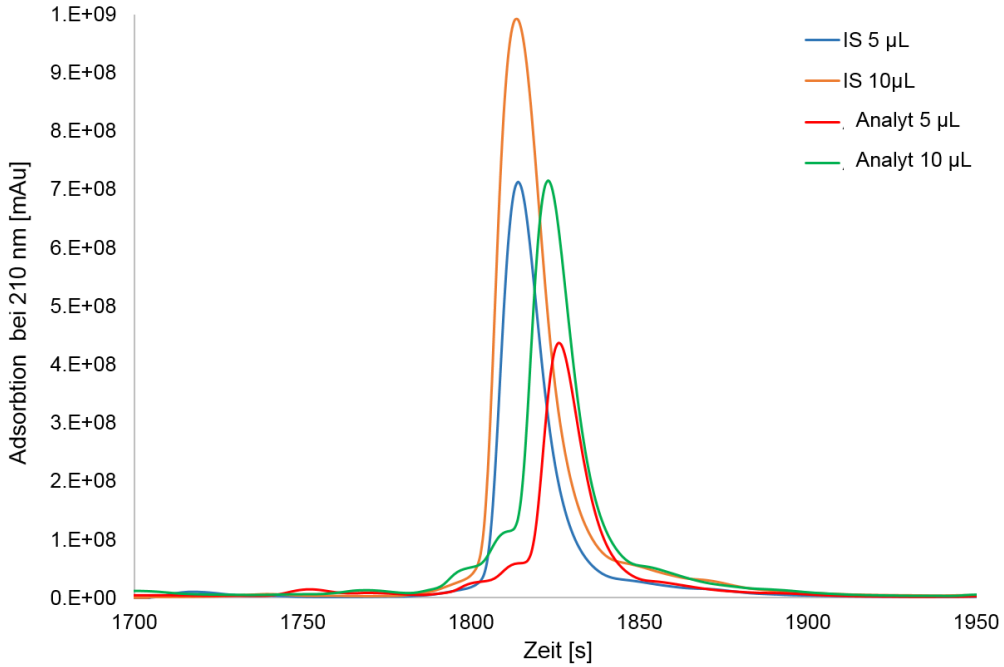


Abbildung 63: RP-HPLC/UV Chromatogramm von Peptid PIN A-1 (GGCQELLGECCSR)

Aus Abbildung 64 ist zu erkennen, dass Analyt und IS des Peptids PIN A-2 in der Peakform sowie der Peakintensität ein gleiches chromatographisches Profil aufwiesen. Lediglich die Retentionszeiten des IS waren leicht nach hinten verschoben.

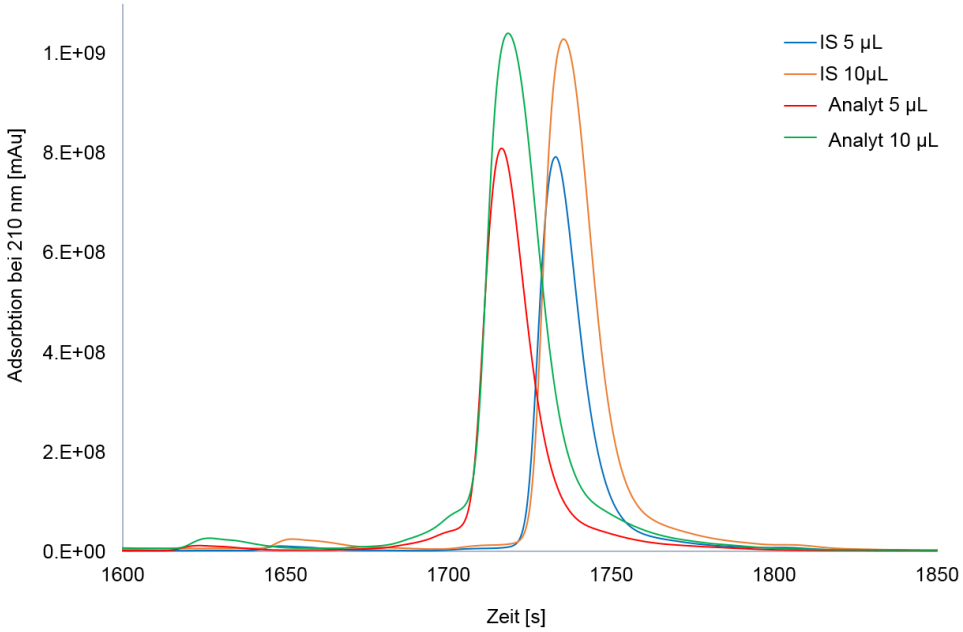


Abbildung 64: RP-HPLC/UV Chromatogramm von Peptid PIN A-2 (DVAGGGGAQQCPVETK)

Letztendlich wurde als Quantifizierungsmethode der Peptidkonzentrationen das quantitative fluorometrische Peptid-Assay herangezogen, da dieses aufgrund seiner Spezifikationen, wie einer hohen Sensitivität (exakte Bestimmung ab 5.0 µg/mL Peptidkonzentration) und Robustheit (validierter Peptid-Digest-Assay-Standard für verbesserte Reproduzierbarkeit der Quantifizierung).

3.5.10 Skyline-Software

Zur Auswertung der massenspektrometrischen Messungen am TSQ-Vantage wurde die Skyline-Software (Skyline 4.1, MacCoss Lab, Department of Genome Science, University of Washington) verwendet. Dazu wurden die Aminosäuresequenzen von PIN A und PIN B und das Weizen-Proteom [148 642 Ergebnisse, Reviewed: 465 (Swiss Prot), Unreviewed: 148 177 (TrEMBL)] als FASTA-Dateien aus UniProtKB heruntergeladen. Das Weizen-Proteom wurde in Skyline als „background proteome“ definiert und enthält alle in Datenbanken erfassten Weizen-spezifische Peptide. Weiterhin wurden die FASTA-Dateien von PIN A und PIN B importiert.
Die gesamten Übergänge wurden in drei LC-MS/MS-Methoden exportiert, wobei die CEs der Übergänge von Skyline vordefiniert wurden. Die erfolgten LC-MS/MS-Läufe wurden anschließend in Skyline importiert und die für die Peptide charakteristischen Spuren ausgewertet.

Folgende Einstellungen wurden in Skyline gesetzt:

- Enzym: Trypsin (KR I P)
- Max. fehlende Spaltstellen: 0
- Min. Peptidlänge: 8
- Max. Peptidlänge: 18
- Ausschluss N-terminaler AS: 10
- Modifikationen: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)
- Max. neutrale Abspaltungen: 1
- Max. variable Modifikationen: 3

Folgende Einstellungen wurden für die Übergänge (Transitions) gewählt:

- Precursor-Masse: monoisotopisch
- Produktionen-Masse: monoisotopisch
- Kollisionsenergie: TSQ-Vantage
- Precursorladungen: 2, 3
- Produktionenladungen: 1, 2
- Ionentypen: b, y
- Precursor *m/z* Ausschluss: 0.5 *m/z*
- Min. *m/z*: 50 *m/z*
- Max. *m/z*: 1 200 *m/z*
- Methodentoleranz der Treffer: 0.6 *m/z*

Die Ergebnisse der Skyline-Auswertung sind im folgenden Abschnitt (3.5.11) dargestellt.

3.5.11 Methodenvalidierung

Der Validierungsumfang einer jeden Methode richtet sich nach den individuellen Bedürfnissen in dem angestrebten Anwendungsbereich und wird durch die Festsetzung der Validierungsparameter bestimmt.

3.5.11.1 Bestimmung der Blindmatrices

Um für die Validierung die nötigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zu definieren, musste zuvor eine analyt-freie Matrix bestimmt werden. Dazu wurden Mehle verschiedener Spezies (Emmer, Einkorn, Durum) analysiert, die als Blindmatrix idealerweise keine Störsignale im Elutionsbereich der Analyten aufweisen.
Wie aus Abbildung 67 zu erkennen, wies Emmer im Elutionsbereich des Peptids PIN B-1 ein relativ starkes Störsignal auf, das auch bei Vergleich der absoluten Peakflächen (Vgl. Abbildung 65) zu erkennen war. Noch deutlichere Störsignale wurden bei Peptid PIN B-2 (Vgl. Abbildung 66) beobachtet, bei dem Emmer fast 20 % der Peakintensität von Weichweizen erreichte. Ähnliche Störsignale wurden auch bei Peptid PIN A-1, PIN A-2 und PIN B-3 beobachtet. Durum hingegen zeigte im Bereich der Peptid-Analytsignale kaum Signale, die über das normale Grundrauschen hinausgingen (Vgl. Abbildung 67 - Abbildung 66). Einkorn wiederum zeigte bei Peptid PIN A-1, PIN A-2 und PIN B-1 deutliche Störsignale (nicht dargestellt). Weiterhin war zu erkennen, dass im Elutionsbereich der IS bei keiner Matrix Störsignale erschienen. Da Durum insgesamt die niedrigsten Störsignale im Bereich der PIN-Peptide aufwies, wurde Durum als Blindmatrix definiert und für nachfolgende Bestimmungen der LoQ und LoD genutzt.

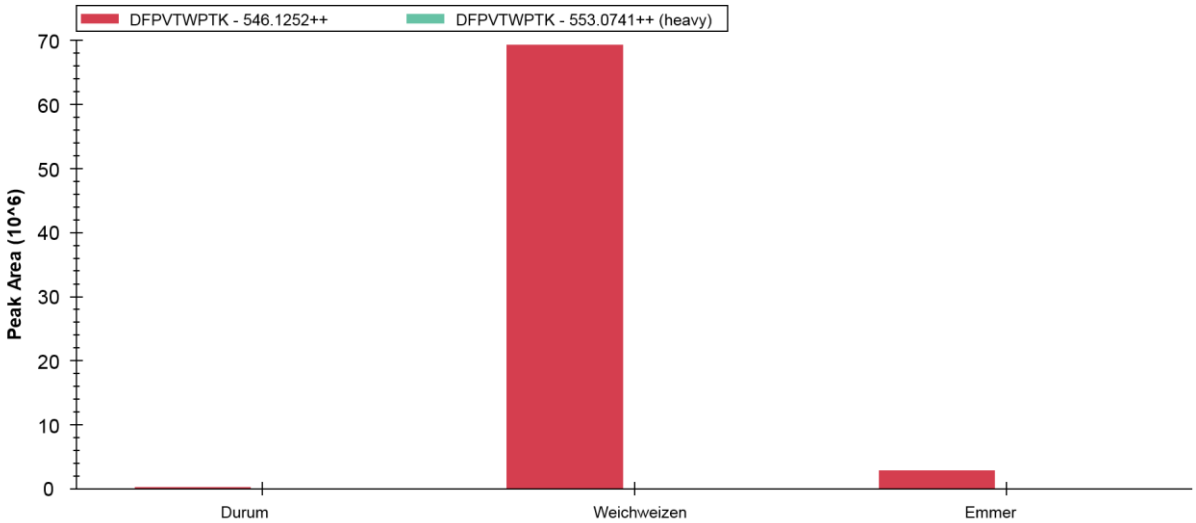


Abbildung 65: Vergleich der Peakflächen von Peptid PIN B-1 (DFPVTWPTK, *m/z* =546.1) aus Durum, Weichweizen und Emmer

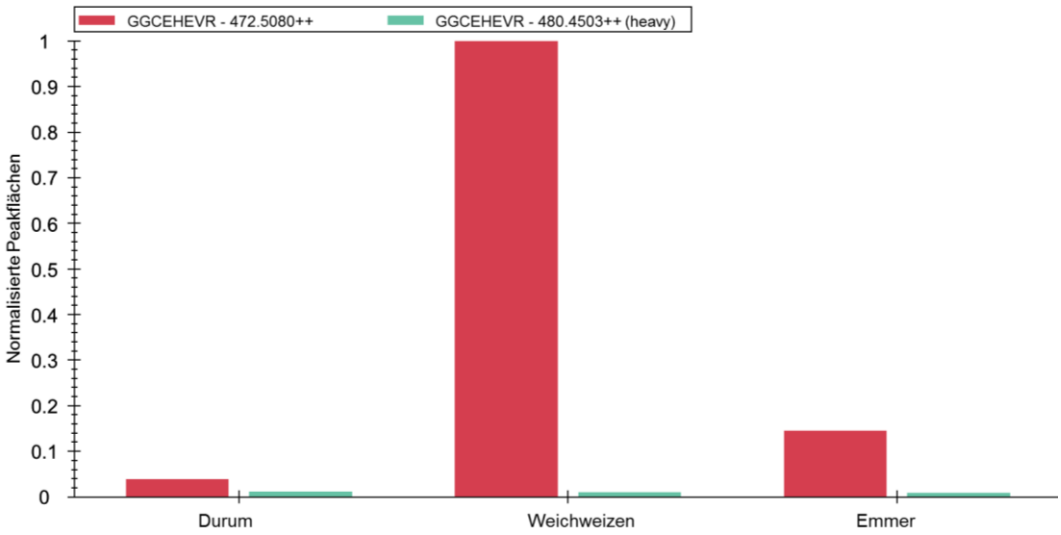


Abbildung 66: Vergleich der normalisierten Peakflächen von Peptid PIN B-2 (GGCEHEVR, *m/z*=472.5) aus Durum, Weichweizen und Emmer

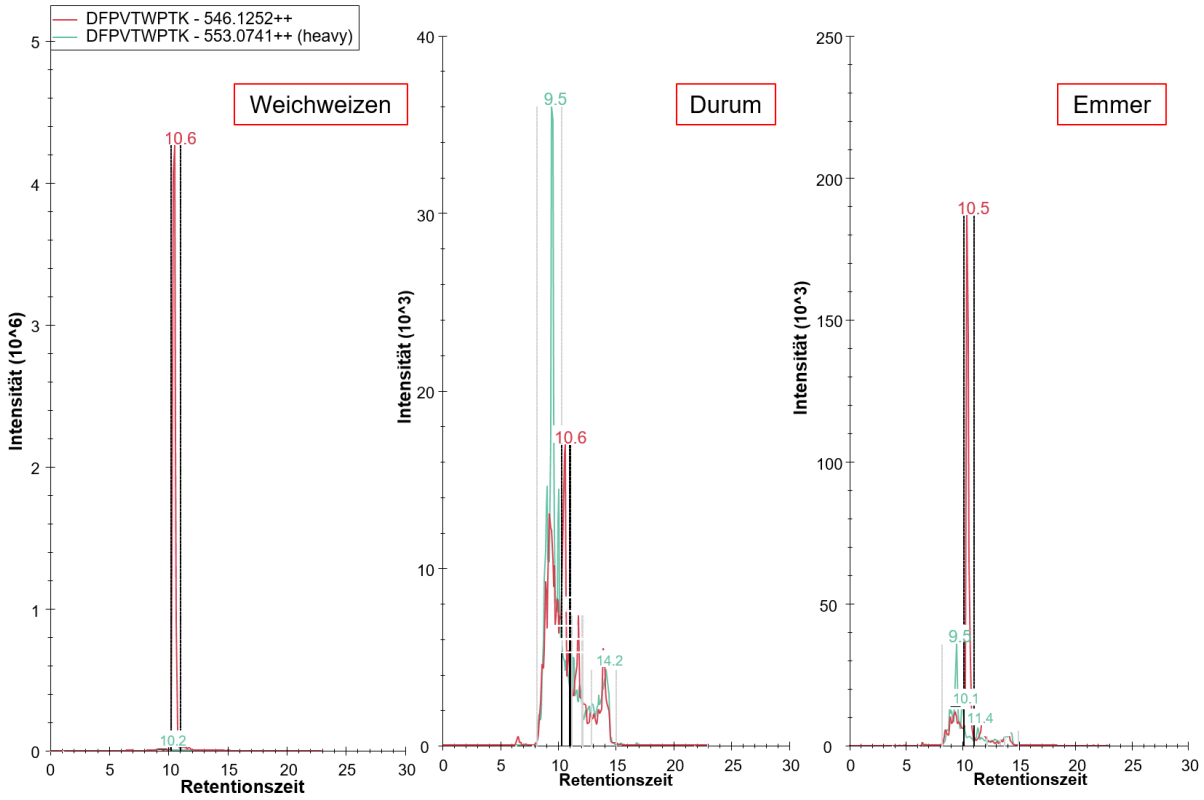


Abbildung 67: Chromatogramme des Precursors von Peptid PIN B-1 (DFPVTWPTK, *m/z* = 546.1) aus Weichweizen, Durum und Emmer. Die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen (Intensität) ist zu beachten.

3.5.11.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) ist die geringste Konzentration des Analyten in einer realen Probe, die qualitativ noch bestimmt werden kann. Die Bestimmungsgrenze (Limit of Quantification, LoQ) ist die Konzentration des Analyten, bei der 90 %iger Sicherheit bei gegebener Präzision und Richtigkeit quantitativ bestimmt werden kann. Die standardmäßige Berechnung über das Signal-/Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis) ist bei einer massenspektrometrischen MRM-Methode nicht geeignet. Daher wurde das LoD und LoQ der Methode wurden in Anlehnung an Vogelgesang und Hädrich (1998) ermittelt.

Durum wurde in 3.5.11 als geeignete analyt- und interferenzfreie Matrix definiert. Daraufhin wurde die extrahierte „Durumstärke“ mit 0.20-0.01 µg (2.0-0.1 µg/mL) Mischstammlösungen (MSL) der Analyten und internen Standards in sechs verschiedenen Konzentrationsleveln versetzt und wie unter 4.8.2 bis 4.8.5 beschrieben, aufgearbeitet. Die Analyse jedes zugesetzten Konzentrationslevels erfolgte in einer Dreifachbestimmung. Entsprechend der Empfehlung von Vogelgesang und Hädrich (1998) waren die Standardabweichungen an LoD und LoQ kleiner als 20 %.

Das LoD und das LoQ wurden mittels der prozentualen Peakflächenverhältnisse zueinander bestimmt. Dieses Peakflächenverhältnis sollte zur Qualifizierung bzw. Quantifizierung immer konstant zueinander sein. Die Verhältnisse der verschiedenen Precursor-zu-Fragment-Übergänge unterschieden sich im niedrigen Konzentrationsbereich zum Teil deutlich. Einzelne Übergänge wurden teilweise nicht mehr von der Skyline-Software als solche erkannt.

Zur Berechnung des LoD bzw. des LoQ wurde die zudotierte Konzentration herangezogen, in der die geforderten Kriterien (konstante Peakflächenverhältnisse) noch erreicht wurden. Für das LoD wurde diese Konzentration dann mit dem Faktor 3 multipliziert, für das LoQ mit dem Faktor 10.

Für die Peptide wurden in der Weizenstärke sehr gute Nachweisgrenzen < 3 µg/g als auch Bestimmungsgrenzen < 10 µg/g ermittelt, wobei für Peptid PIN A-1 die niedrigsten LoD bzw. LoQ bestimmt wurden (Vgl. Tabelle 50)).

Tabelle 50: Nachweis (LoD)- und Bestimmungsgrenzen (LoQ) der PIN-Peptide in Weizenstärke

Peptid	**LoD** [µg/g]	**LoQ** [µg/g]
PIN A-1	0.08	0.25
PIN A-2	0.18	6.01
PIN B-1	2.77	9.23
PIN B-2	0.90	3.00
PIN B-3	1.29	4.31

3.5.11.3 Responsegeraden

Zur Differenzierung von Analyt und internem Standard (IS) wurden die zugehörigen charakteristischen *m/z*-Spuren massenspektrometrisch detektiert. Zur Kompensation der unterschiedlichen Detektierbarkeit von Analyt und IS sowie einer eventuell unvollständigen Isotopenmarkierung der IS wurden die Responsefaktoren ermittelt.

Zur Ermittlung der Responsegeraden wurden jeweils Stammlösungen der Analyten (A) sowie der internen Standards (IS) von PIN A-1, PIN A-2, PIN B-1, PIN B-2 und PIN B-3 mit einer Konzentration von ca. 1 mg/mL hergestellt. Im Anschluss wurden aus den A sowie den IS Mischstammlösungen (MSL) mit einer Konzentration von ca. 100 µg/mL hergestellt, die anschließend mit TCEP reduziert und mit CAA alkyliert wurden (finale Konzentration: 20 µg/mL).

Aus diesen reduzierten und alkylierten A-MSL bzw. IS-MSL wurden im Anschluss folgende Verdünnungen hergestellt: 9+1, 4+1, 3+1, 1+1, 1+3, 1+4 und 1+9 (v/v). Die jeweiligen Lösungen wurden anschließend am TSQ-Vantage massenspektrometrisch analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels Skyline-Software. Die erhaltenen Flächenverhältnisse (Verhältnis A:IS) wurden in Excel exportiert und gegen das Stoffmengenverhältnis von A:IS aufgetragen.

Tabelle 51: Responsegeraden mit Korrelationskoeffizient R^2 der Peptide sowie niedrigstes und höchstes Flächenverhältnis von Analyt (A) zu internen Standard (IS)

	Responsegerade	R^2	Niedrigstes Flächenverhältnis A: IS	Höchstes Flächenverhältnis A: IS
PIN A-1	y = 0.634 x + 0.027	0.9927	0.024	1.409
PIN A-2	y = 0.819 x + 0.049	0.9995	0.150	8.478
PIN B-1	y = 0.737 x + 0.123	0.9951	0.114	8.126
PIN B-2	y = 0.899 x + 0.084	0.9951	0.173	9.548
PIN B-3	y = 1.176 x - 0.023	0.9993	0.054	2.579

Im Idealfall beträgt der Wert der Abszisse (Anstieg der Geraden) genau 1, da in der Theorie A und IS fast identische Eigenschaften in Bezug auf Chromatographie und Ionisation aufweisen. Für den Geradenanstieg bzw. die Steigung der Geraden wurden Werte zwischen 0.6341 und 1.1758 bestimmt. Auch bei regelmäßiger Wiederholung der Responsegeraden-Messung wurde im Zeitraum von 4 Wochen keine signifikante Veränderung des Achsenanstieges beobachtet. Die zu messenden Mischungen wurden während dieses Zeitraums im -80 °C-Gefrierschrank gelagert, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Peptide über diesen Zeitraum bei -80 °C-Lagerung stabil waren. Die Lagerung bei RT bzw. im Kühlschrank zeigte, dass die Peptide lediglich 7 bzw. 14 Tage stabil waren. Daher waren Messungen unter diesen Lagerungsbedingungen über einen längeren Zeitraum nicht reproduzierbar. Die Lagerung im Gefrierschrank bei -20 °C wurde nicht überprüft.

Der prozentuale Anteil der Peakflächen der einzelnen Precursor-Fragment-Übergänge sollte über die gesamte Verdünnungsreihe immer annähernd gleich sein. In Abbildung 68 ist der prozentuale Peakflächenvergleich von Peptid PIN B-1 dargestellt, aus dem ersichtlich ist, dass sich die prozentuale Verteilung der Übergänge zueinander nicht veränderte. Dabei war in allen Verdünnungen der intensivste Übergang mit einem Anteil von über 60 % Precursor (*m/z* = 546.0, 2+) zu Fragment *m/z* = 414.7 (2+), gefolgt von dem Übergang zu Fragment *m/z* = 828.5 (+) mit etwa 20 %. Diese gleichmäßige Peakflächenverteilung konnte bei allen anderen Peptiden bestimmt werden.

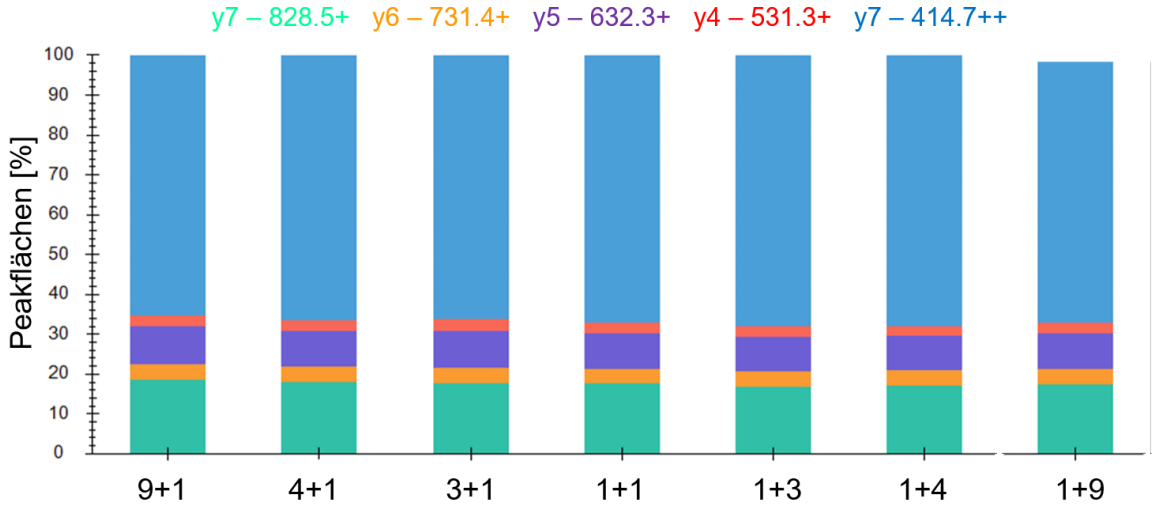


Abbildung 68: Prozentualer Peakflächenvergleich der Precursor-Fragment-Übergänge von Peptid PIN B-1 (DFPVTWPTK, *m/z*=546.1) der jeweiligen Verdünnungen (9+1, 4+1, 3+1, 1+1, 1+3, 1+4, 1+9; A+IS, v/v)

3.5.11.4 Präzision

Die Methodenpräzision beschreibt die zufällige Streuung der Analysenergebnisse. Durch die Ermittlung der Präzision wird nachgewiesen, dass die erhaltenen Messwerte unter spezifischen Analysebedingungen reproduzierbar sind.

Sie wird durch eine Mehrfachbestimmung (i.d.R. 6-fach) der gesamten Analyse ermittelt. Dabei wird zwischen Wiederholpräzision/Wiederholbarkeit (ein Labor, ein Gerät, ein Analytiker) und Vergleichspräzision/Vergleichbarkeit/Reproduzierbarkeit (mehrere Labore, mehrere Geräte, mehrere Analytiker) unterschieden. Während dieser Methodenvalidierung wurde ausschließlich die Wiederholpräzision analysiert.

Zur Ermittlung der Intra-day-Präzision wurden sechs Proben der gleichen Weizensorte aufgearbeitet und zweifach injiziert. Die Inter-day-Präzision wurde an drei Tagen anhand der Mittelwerte derselben Weizenprobe (n=6, zweifach injiziert) überprüft. Aus den in Tabelle 52 aufgeführten Variationskoeffizienten lässt sich eine gute Intra-day- (< 6 %) und Inter-day-Präzision (< 10 %) der Methode ableiten.

Tabelle 52: Intra-day- und Inter-day-Präzision [RSD (%)] der Quantifizierung der PIN-Peptide

Peptid	Intra-day [1] [%]	Inter-day [2] [%]
PIN A-1	3.6	5.2
PIN A-2	4.9	7.0
PIN B-1	3.1	4.9
PIN B-2	5.8	9.4
PIN B-3	5.0	8.6

[1] sechs Proben, Doppelinjektion; [2] Mittelwert von sechs Proben, Doppelinjektion an 3 Tagen

3.5.11.5 Linearität

Die Linearität der Methode gibt an, inwiefern das massenspektrometrische Signal auch unter Matrixeinfluss direkt proportional zur Konzentration des Analyten ist. Eine Methode ist in einem bestimmten Konzentrationsbereich linear, wenn das Analytsignal direkt proportional zu der Analytkonzentration in der Probe ist. „Direkt proportional" bedeutet nicht sicher, ob eine lineare Abhängigkeit zwischen Analytsignal und –konzentration besteht.

Die Methodenlinearität wurde durch die Ermittlung der Korrelationskoeffizienten R^2 der Responsegeraden bestimmt. Um für die Bestimmung der Analyten geeignet zu sein, musste die Responsegerade mindestens einen Wert von $R^2 = 0.98$ aufweisen. Zur Ermittlung der Linearität wurden die reduzierten und alkylierten MSL der Responsegeraden sukzessive verdünnt (0.001 – 10 µg/g) und anschließend mittels LC-MS/MS vermessen. Die erhaltenen Peakflächen wurden gegen die Konzentration aufgetragen und eine lineare Regression mit den Datenpunkten durchgeführt.

In Tabelle 53 sind die linearen Bereiche der Analyten (matrixfrei) aufgeführt. Man kann davon ausgehen, dass die Analyten in realen Proben in einem engeren, aber höheren Konzentrationsbereich linear detektierbar sind, da die MS-Detektion durch Ionensupression in Matrix beeinflusst wird.

Tabelle 53: Lineare Bereiche und zugehörige Korrelationskoeffizienten R^2 der Analyten bei matrixfreier Analyse von Peptiden

Peptid	Linearer Bereich		R^2
	untere Grenze	obere Grenze	
PIN A-1	0.014 µg/g	2.82 µg/g	0.9951
PIN A-2	0.092 µg/g	9.16 µg/g	0.9948
PIN B-1	0.0096 µg/g	9.56 µg/g	0.9925
PIN B-2	0.059 µg/g	5.86 µg/g	0.9964
PIN B-3	0.047 µg/g	4.70 µg/g	0.9890

Peptid PIN B-1 zeigte schon ab dem ppb- (parts per billion) Bereich ein lineares Verhalten zwischen Analytsignal und Analytkonzentration mit konstanten prozentualen Peakflächenverteilungen der Übergänge von Precursor zu Fragment. Wie aus Abbildung 69 zu erkennen ist, änderte sich diese Verteilung bei Peptid PIN A-1 schon im wesentlich höheren Konzentrationsbereich, sodass ein wesentlich kleinerer linearer Bereich ermittelt wurde.

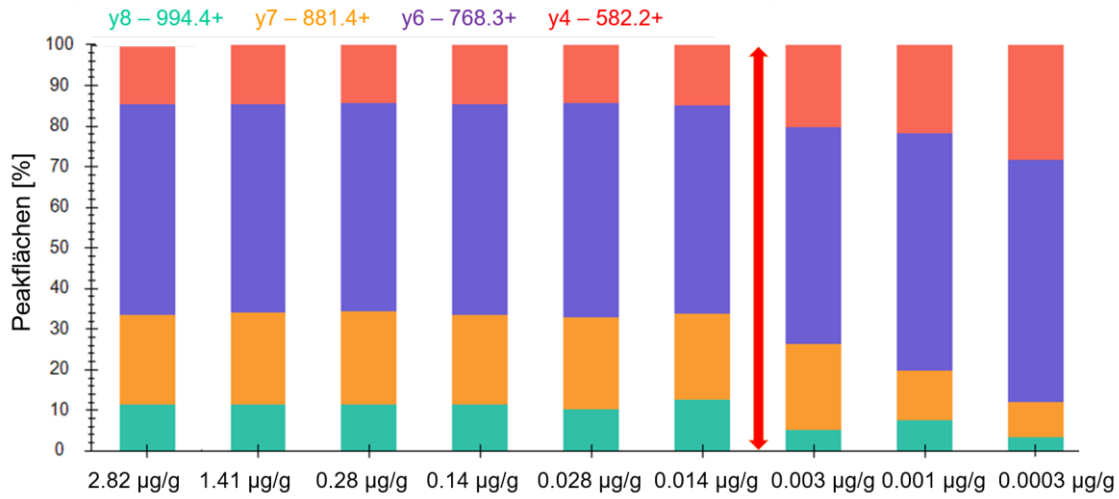


Abbildung 69: Prozentualer Peakflächenvergleich der Precursor-Fragment-Übergänge von Peptid PIN A-1 (GGCQELLGECCSR, *m/z*=763.3) der jeweiligen Verdünnungen. Der Doppelpfeil markiert die Konzentration, unterhalb derer keine lineare Beziehung zwischen Konzentration und Peakfläche vorlag.

3.5.11.6 Robustheit

Eine Methode ist robust, wenn durch Änderung der Versuchsbedingungen das Ergebnis nicht bzw. nur unwesentlich verfälscht wird. Als robust gilt der Bereich, in dem das Ergebnis von der Änderung mehrerer Parameter unabhängig ist. Dabei wurde u.a. die systematische Variation der Einflussparameter untersucht.

Die Methode wurde dahingehend auf ihre Robustheit getestet, dass unterschiedliche Extraktionszeiten, -temperaturen und die Dauer der tryptischen Hydrolyse variiert wurden. Bei Variation der Hydrolysezeit (20 h/24 h/30 h) wurden keine wesentlichen Unterschiede in der Peptidausbeute beobachtet, die Gehalte unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Hydrolysezeit wurde daher bei 24 h belassen.

Weiterhin wurde die Extraktionszeit mit Triton-X114 variiert (30 min, 60 min, 90 min). Hierbei wurde festgestellt, dass die verkürzte Extraktionszeit von 30 min die Extraktionsausbeute deutlich reduzierte (-20 %). Eine Verlängerung der Extraktion auf 90 min bewirkte hingegen keine signifikante Zunahme der Extraktionsausbeute, sodass die Extraktionszeit bei 60 °C belassen wurde.

Die Extraktion mit Triton-X114 soll laut Literatur (Bordier, 1981) bei 0 °C stattfinden. Die Temperaturen wurden dahingehend variiert, dass die Extraktion ebenfalls bei Raumtemperatur (22 °C) und bei 37 °C stattfand. Hierbei zeigte sich, dass die Extraktionsausbeute stark

abnahm (-30 % bzw. -60 %). Die Extraktionstemperatur wurde dahingehend unverändert bei 0 °C (auf Eis) belassen.

3.5.12 Messung von Proben

Mit der neuen Methode wurden die PIN A- und PIN B-Gehalte in einem Sortiment von acht verschiedenen Weizensorten (Vgl. Tabelle 54) untersucht. Diese wurden so gewählt, dass Vertreter aller vier in Europa vorkommenden PIN-Sequenzvarianten enthalten waren. Die in Europa am häufigsten vorkommende Mutation am *Pinb-D1*-Gen ist die „b"-Variante, welche durch eine Punktmutation (Glycin → Serin-Substitution an Position 46) gekennzeichnet ist und im Probensortiment durch cv. Akteur und cv. Julius vertreten war.

Tabelle 54: Probensortiment zur PIN-Analyse mit Sequenzvarianten an dem Pina-D1- und Pinb-D1-Loci und deren Auswirkungen auf den PIN-Gehalt

Weizensorte	*Pina-D1*	*Pinb-D1*	Auswirkung	Korntextur
Jubilar	a	a	Wildtyp	weich
Kanzler	a	a	Wildtyp	weich
Caribo	a	a	Wildtyp	weich
Julius	a	b	reduzierter PIN B-Gehalt	hart
Akteur	a	b	reduzierter PIN B-Gehalt	hart
JB Asano	a	c	Fehlen von PIN B	hart
Dekan	a	d	reduzierter PIN B-Gehalt	hart
Ritmo	a	d	reduzierter PIN B-Gehalt	hart

Die Proben wurden nach 4.8.1 bis 4.8.5 aufgearbeitet und anschließend massenspektrometrisch am TSQ Vantage vermessen. Aus den zugehörigen Responsegeraden wurde anschließend der Peptidgehalt in den Proben berechnet. Aus den molaren Massen von PIN A und PIN B und den molaren Massen der Peptide folgte mittels eines individuellen Faktors die Hochrechnung der Peptidkonzentration auf die Proteinkonzentration in den Weizenproben (Vgl. Tabelle 55).

Tabelle 55: Berechnungsgrundlage zur Berechnung der Protein- aus den Peptidkonzentrationen

Peptid	molare Masse [g/mol]	PIN/ molare Masse[1] [g/mol]	Anteil Peptid/Protein	Faktor
PIN A-1	1354.6	**A** /12747	10.6 %	9.4
PIN A-2	1516.7	**A**/ 12747	11.9 %	8.4
PIN B-1	1090.6	**B**/ 13081	8.3 %	12.0
PIN B-2	886.4	**B**/ 13081	6.8 %	14.8
PIN B-3	841.3	**B**/ 13081	6.4 %	15.5

[1] molare Masse bezieht sich auf das Protein ohne Pro- und Signalpeptid

Die berechneten PIN-Gehalte aus den jeweiligen, PIN A- bzw. PIN B-spezifischen Peptiden sind in Tabelle 56 dargestellt. Die berechneten PIN A- bzw. PIN B-Gehalte der Weizenproben aus den einzelnen Peptiden unterschieden sich deutlich. Dies ist u.a. auf eine mögliche unvollständige Alkylierung bzw. tryptische Hydrolyse zurückzuführen, wodurch keine vollständige Carbamidomethylierung der Cysteine erfolgte (als stabiles S-Carboxyamidomethylcystein) und die optimale Entfaltung des Proteins für die nachfolgende Hydrolyse nicht gegeben war. Mögliche Spaltstellen im Protein wurden nicht gespalten, was zu einer Unterbestimmung des Peptidgehalts führte. Eine weitere Ursache kann die unterschiedlich gute massenspektrometrische Detektierbarkeit der einzelnen Peptide sein.

Tabelle 56: Berechnung der PIN-Gehalte aus den Peptiden

Weizensorte	**Gehalt PIN A** berechnet aus **PIN A-1** [µg/g Mehl]	**Gehalt PIN A** berechnet aus **PIN A-2** [µg/g Mehl]	**Gehalt PIN B** berechnet aus **PIN B-1** [µg/g Mehl]	**Gehalt PIN B** berechnet aus **PIN B-2** [µg/g Mehl]	**Gehalt PIN B** berechnet aus **PIN B-3** [µg/g Mehl]
Jubilar	570.3	201.7	230.0	277.5	461.3
Kanzler	502.7	150.9	206.5	175.9	388.2
Caribo	410.6	118.4	179.0	142.8	357.6
Julius	451.3	164.4	70.2	< LoD	330.3
Akteur	394.7	145.3	36.0	< LoD	277.0
JB Asano	512.1	193.7	< LoD	< LoD	110.8
Dekan	330.8	121.7	82.5	< LoD	203.2
Ritmo	355.4	132.2	54.2	< LoD	186.9

Die Berechnung der PIN A- bzw. PIN B-Gehalte basierte jeweils auf dem Peptid, welches PIN A- und PIN B-spezifisch ab den geringsten Konzentrationen linear analysierbar war. Zur Berechnung von PIN A wurde Peptid PIN A-1 (GGCQELLGECCSR) herangezogen und für PIN B Peptid PIN B-1 (DFPVTWPTK). Der berechnete Gesamt-PIN-Gehalt ist in Tabelle 57 angegeben.

Aus den ermittelten Werten konnten die vorhergesagten Phänotypen bzw. Korntexturen aus Tabelle 4 bestätigt werden. Die analysierten PIN-Wildtypen, die sich durch eine weiche Korntextur auszeichnen, enthielten teilweise doppelt so hohe PIN-Gehalte, wie die Weizenarten mit PIN-Sequenzvariationen. Dass der *Pinb-D1c*-Typ kein PIN B enthält, wurde ebenso aufgezeigt.

Tabelle 57: Gesamtgehalte PIN in sortenreinen Weizenmehlen

Weizensorte	**Gehalt PIN A** (berechnet aus **PIN A-1**) [µg/g Mehl]	**Gehalt PIN B** (berechnet aus **PIN B-1**) [µg/g Mehl]	**Gesamtgehalt PIN (PIN A+PIN B)** [µg/g Mehl]
Jubilar	570.3	230.0	800.3
Kanzler	502.7	206.5	709.2
Caribo	410.6	179.0	589.6
Julius	451.3	70.2	521.5
Akteur	394.7	36.0	430.7
JB Asano	512.1	< LoD	512.1
Dekan	330.8	82.5	413.3
Ritmo	355.4	54.2	409.6

Die PIN A-Gehalte, der Weizenarten mit Sequenzvariationen, lagen in einen recht engen Bereich zwischen 330.8 - 512.1 µg/g, die PIN B-Gehalte lagen alle unterhalb 100 µg/g. Die PIN A-Gehalte der Wildtypen waren tendenziell etwas höher und erreichten Werte von max. 686.6 µg/g. Der Gesamt-PIN-Gehalt verschiedener Weizenarten schwankte innerhalb der Sequenzvariationen ebenfalls nur in sehr engen Bereichen zwischen 409.6 - 512.1 µg/g, sodass innerhalb dieser Variationen kaum Unterschiede in der Kornhärte bzw. dem Stärkeschädigungsgrad zu erwarten waren.

Dies konnte durch Studien des Bayerischen Landesamtes für Landwirtschaft (Mohler et al., 2012) belegt werden, die zeigten, dass die Kornhärte und die Mehlstärkeschädigung innerhalb der Sequenzvariationen (*Pinb-D1b-d*) im Vergleich zum Wildtyp (*Pinb-D1a*) keine signifikanten Unterschiede aufzeigten (Vgl. Abbildung 70). Beim Backvolumen wurden für alle genetischen PIN-Varianten annähernd gleiche Volumen bestimmt, die lediglich für *Pinb-D1b* und *Pinb-D1c* leicht erhöht waren. Dies widerspricht den Vermutungen, dass ein hoher PIN-Gehalt eine ausgeprägte Grenzflächenstabilisierung um die Gasblasen in Teig bewirkt, welche u.a. das Brotvolumen erhöht (Bordier, 1981, Gan et al., 1995).

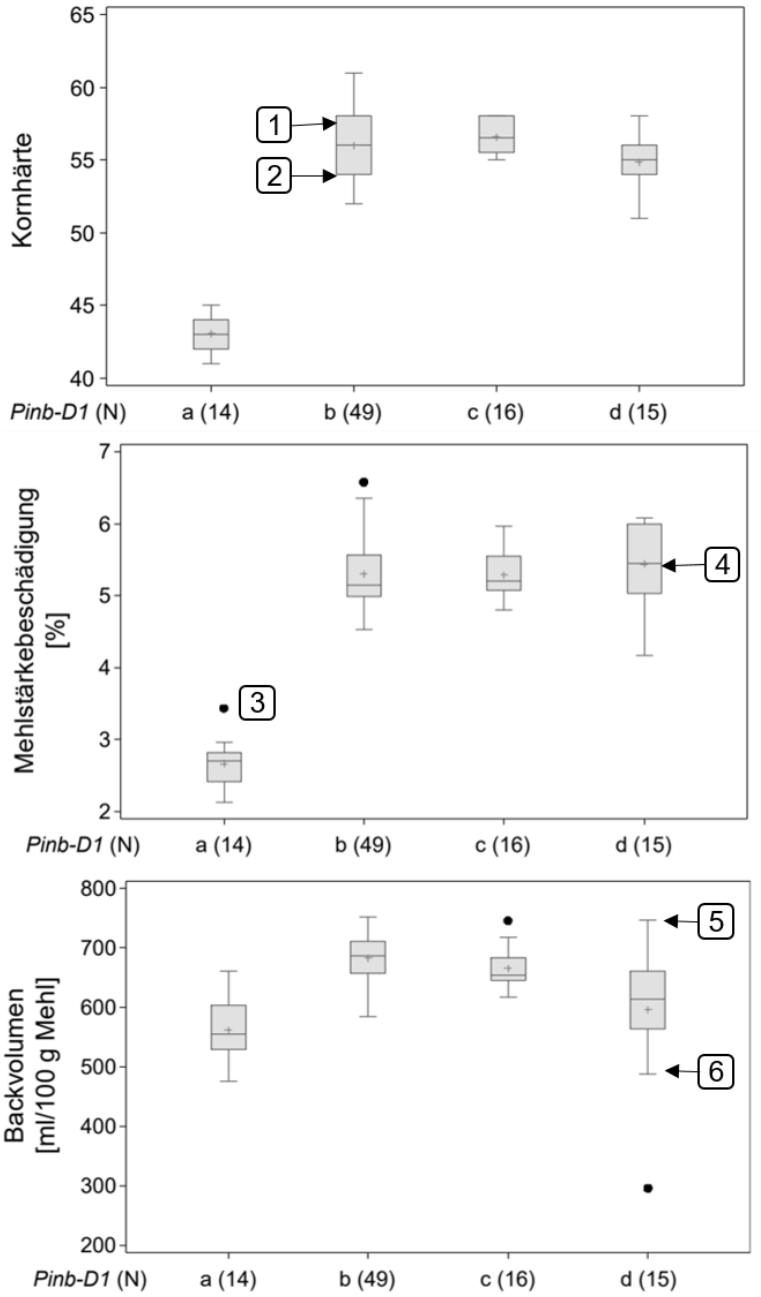


Abbildung 70: Kornhärte, Mehlstärkebeschädigung und Backvolumen von *Pinb-D1*-Varianten (Mohler et al., 2012); 1: 75% Quantil, 2: 25% Quantil, 3: Ausreißer, 4: Median, 5: Maximum, 6: Minimum

4 Experimentelle Angaben

4.1 Chemikalien, Reagenzien und Materialien

Für alle chemischen Analysen wurde Reinstwasser verwendet, welches aus einem Wasseraufbereitungssystem (Arium 611 AF, Sartorius, Göttingen, Deutschland) gewonnen wurde. Falls nicht anders angegeben, handelte es sich bei der Qualität der Chemikalien immer um „pro analysi“ (p.a.). Die verwendeten Materialien und Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

GenScript, Hong Kong, China:
unmarkierte Peptidstandards:

- GGCQELLGECCSR
- DVAGGGGAQQCPVETK
- CNIIQGSIQGDLGGIFGFQR
- DFPVTWPTK
- GGCEHEVR
- CNMGADCK

IG-PFLANZENZUCHT (München, Deutschland):
Weichweizen Akteur (2014), Weichweizen Julius (2015)

Kastenmüller (Martinsried, Deutschland):
Glutomaticsiebe (Polyamid, 88 µm)

Landeszuchtanstalt Universität Hohenheim (Hohenheim, Deutschland):
Durum Auradur (2013), Emmer Osiris (2013), Einkorn Tifi (2013), Weichweizen Lear (2015), Weichweizen JB Asano (2015)

Leco Instrumente GmbH (Mönchengladbach, Deutschland):
Tin foil cubs (Zinnfolien)

peptides & elephants GmbH (Henningsdorf, Deutschland)
isotopenmarkierte Peptidstandards:

- GGCQELL[$^{13}C_2$;^{15}N]GECCS[$^{13}C_6$;$^{15}N_4$]R

- DVAGGGGAQQCP[$^{13}C_5$;^{15}N]VET[$^{13}C_6$;$^{15}N_2$]K
- CNIIQGSIQGDLGGIFG[$^{13}C_9$;^{15}N]FQ[$^{13}C_6$;$^{15}N_4$]R
- DFPVTW[13C5;15N]PT[$^{13}C_6$;$^{15}N_2$]K
- GGCEHE[13C5;15N]V[$^{13}C_6$;$^{15}N_4$]R
- CNMG[13C3;15N]ADC[$^{13}C_6$;$^{15}N_2$]K

Peter Kölln GmbH & Co. KGaA (Elmshorn, Deutschland):
Kokosfett „Palmin“

Prolamin Working Group (Freising, Deutschland):
PWG-GLIA (93.1 % Protein)

SERVA (Heidelberg, Deutschland):
Coomassie Brilliant Blue G250, Phenolrot

Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland):
Aceton (LiChrosolv), Ameisensäure (98-100 %, v/v), 2-Chloracetamid (CAA, ≥ 98 %), 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS), Methanol (LiChrosolv), 1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglycol (Triton™ X-114), Tris(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid (TCEP, 0.5 M, pH 7.0), Trifluoressigsäure (99 %), Trypsin aus Rinderpankreas

Thermo Fisher Scientific Europe (Erembodegem, Belgium):
NuPAGE™ Novex™ 10 % Bis-Tris [Bis-(2-hydroxyethyl)-amino-tris-(hydroxymethyl)-methan-HCl]-Protein Gele, 1.0 mm, 10-well/ 12-well, PageRuler™ Unstained Protein Ladder

VWR Merck (Darmstadt, Deutschland):
Acetonitril (LiChrosolv), L-(+)-Ascorbinsäure, Coomassie Brilliant Blau R-250, Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Dithiothreitol (DTT), Eisessig, Ethanol, Ethylendiamintetraessigsäure Tetranatriumsalz Hydrat (EDTA Na-Salz, ≥ 98.0 %), Harnstoff, 2-Iodacetamid (IDAM, ≥ 98 %), Kaliumdihydrogenphosphat, Lutein, Natriumchlorid, Natriumdodecylsulfat (SDS), 1-Propanol (LiChrosolv), 2-Propanol (LiChrosolv), Saccharose, Salzsäure (32 %, w/w), Trichloressigsäure, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), Wasser (LiChrosolv)

Wieninger (Passau, Deutschland):
Frischhefe

4.2 Gewinnung und Charakterisierung des Probenmaterials

4.2.1 Charakterisierung der Mehle

4.2.1.1 Mehlgewinnung

Als Basismehl wurde das auf Type 550 vorvermahlene Mehl cv. Akteur der Kunstmühle Buchloe definiert.

4.2.1.2 Bestimmung des Feuchtigkeitsgehaltes

Die Bestimmung des Feuchtigkeitsgehaltes der Mehle erfolgte mit dem elektronischen Infrarot-Feuchtebestimmer Sartorius Moisture Analyzer MA35 mit IR-Dunkelstrahler (Sartorius Mechatronics, Göttingen, Deutschland). Zur Bestimmung wurden jeweils 3.5 ± 0.1 g Mehl eingewogen. Das Trocknungsverfahren (bei 100 °C, bis zur Gewichtskonstanz) der Mehle vollzog sich unter Verwendung von Infrarotstrahlung zur Probenerwärmung.

4.2.1.3 Bestimmung des Rohproteingehalts nach Dumas (ICC-Standard Nr. 167)

Der Rohproteingehalt wurde gemäß der ICC-Standardmethode Nr. 167 (ICC, 2000) verbrennungsanalytisch nach Dumas bestimmt. Hierfür wurden je 100 mg Mehl bzw. 30 mg Proteinisolate in Zinnfolien eingewogen und mittels eines Stickstoffanalysators (Leco TruSpec Nitrogen Analyzer FP-328, LECO, Kirchheim, Deutschland) der Stickstoffgehalt in einer Dreifachbestimmung ermittelt. Zur Kalibrierung wurde Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) verwendet. Bei der Berechnung des Rohproteingehaltes wurde der Stickstoffgehalt mit dem Faktor 5.7 für Weizenprotein multipliziert (ICC-Nr. 105/2) (ICC, 1994a).

Tabelle 58: Geräteparameter des Leco TruSpec Nitrogen

Analysenparameter		
Verbrennungsgas:		Sauerstoff
Trägergas:		Helium
Verbrennungstemperatur:		950 °C
Programm	**Zeit [s]**	**Ofendurchfluss**
Verbrennungszeitraum (Feststoffe)	25	Hoch
	40	Mittel
	30	Hoch

4.2.1.4 Bestimmung des Aschegehaltes (ICC-Nr. 104/1)

Ein Mehl Type 550 soll laut DIN 10355 einen Mindestmineralstoffgehalt von 0.51 % und einen Höchstmineralstoffgehalt von 0.63 % in der Trockenmasse aufweisen (DIN 10355, 2017).
Der Aschegehalt wurde gemäß der ICC-Standardmethode Nr. 104/1 (ICC, 1990) ermittelt. Dafür wurde das Mehl im Muffelofen bei 900 °C verascht und bis zur Massenkonstanz geglüht. Der Rückstand wurde ausgewogen und aus der Gewichtsdifferenz der Aschegehalt bezogen auf die Trockenmasse berechnet.

Der Aschegehalt [%] der Trockensubstanz errechnet sich nach folgender Gleichung:

$$w = \frac{(b-a) \times 100}{M} \times \frac{100}{100 - F}\ [\%]$$

a = Gewicht des leeren Veraschungstiegels [g]

b = Gewicht des Veraschungstiegels mit dem Glührückstand [g]

M = Gewicht des eingewogenen Mehles [g]

F = Feuchtigkeitsgehalt des Mehles [%]

4.2.1.5 SDmatic - Amperometrische Methode zur Messung der Stärkeschädigung (AACC 76-33.01)

1.0 ± 0.1 g Mehl wurde auf dem SDmatic-Löffel abgewogen. In den integrierten Probenbecher der SDmatic wurde eine Lösung aus je 120 mL dest. H_2O, 3.0 g Kaliumiodid, 3.0 g Borsäure und 1 Tropfen Natriumthiosulfat-Lösung überführt. Nach Eingabe der exakten Einwaage und des Wassergehalts wurde die etwa 10-minütige Messung gestartet, wobei durch Eintauchen des Messkopfes die Lösung auf die richtige Temperatur erhitzt und durch die elektrochemische Reaktion Iodionen in Übereinstimmung mit dem Mehlgewicht produziert wurden. Eine anschließende Messung ermittelte den genauen Betrag der Iodionen. Nachfolgend wurde das Mehl hinzugefügt und absorbierte die Iodionen. Durch die Resorption der Iodionen verringerte sich die gemessene Stromstärke, deren Restwert nach 300 s gemessen wurde. Die Absorption der Iodionen entsprach dem Grad der Stärkeschädigung.
Der Messbereich (AACC 76-33.01) der SD-Matic lag bei einer Präzision von ± 13 % zwischen 4 - 9 % Stärkeschädigung.

4.2.1.6 Bestimmung der Partikelgröße

Partikelgrößenmessgerät: **Mastersizer 3000**

Probenmaterial:	Suspensionen, Emulsionen, Trockenpulver
Prinzip:	Laserlichtstreuung
Analyse:	Mie- und Fraunhofer-Streuung
Partikelgröße:	0.01 – 3 500 µm
Messgenauigkeit:	> 0.6 %
Präzision:	< 0.5 % Abweichung
Reproduzierbarkeit:	< 1 % Abweichung

Trocken-Dispergiereinheit: **Aero S**

Dispergierdruck:	0 – 4 bar
Präzision der Druckeinstellung:	+/- 0.1 bar
Genauigkeit der Druckeinstellung:	+/- 0.03 bar
Bereich der Zufuhrrate:	0 – 58 m/s^2
Max. Partikelgröße:	3 500 µm
Mindestzeit zwischen Messungen:	< 60 s

Gerätesoftware: **Mastersizer v3.40**

Probe:	Partikelart:	Nicht-Kugelförmig	
	Material:	Polystyrol-Latex	
	Brechungsindex:	1.59	
	Absorptionsindex:	0	
	Dichte [g/cm^3]:	1.05	
Messung:	Hintergrundmessdauer:	10 s	
	Probenmessdauer:	10 s	
	Anzahl der Messungen:	3	
	Lichtabschattung:	Untergrenze:	1 %
		Obergrenze:	8 %
Probendispersion:	Druckluft:	2 bar	
	Transportrate:	25-65 %	
Datenverarbeitung:	Analyse-Modell:	Universal	
	Ergebnis:	unterer Größenbereich:	0.05 µm
		oberer Größenbereich:	1 000 µm
	Ergebnistyp:	Anzahldichteverteilung	

4.2.2 Mechanische Modifikationen mittels Planeten-Kugelmühle *PM 100*

Das walzenstuhl-vermahlene Mehl wurde an Anlehnung die Richtwerte (Vgl. Tabelle 59) mit definierter Einwaage (150 g ± 1 g) in einen 500 mL-Mahlbecher überführt.

Tabelle 59: Richtwerte für Materialmenge und Kugeln zur Mahlbecherfüllung (RETSCH GmbH, 2017b)

Mahlbecher-volumen	Probenmenge	Aufgabe-korngröße	Kugelfüllung (Stück)			
			10 mm	20 mm	30 mm	40 mm
500 mL	75 – 220 ml	< 10 mm	100	25	8	4

Für den verwendeten Mahlbecher gab es die zwei folgenden, zur Verfügung stehenden Kombinationsmöglichkeiten: acht Mahlkugeln mit einem Durchmesser von je 30 mm bzw. vier Mahlkugeln mit einem Durchmesser von je 40 mm. Die Mahldauer variierte zwischen fünf und 20 Minuten, die Drehzahl zwischen 300 rpm und 600 rpm (Vgl. Tabelle 60).

Tabelle 60: Parametereinstellungen der Kugelmühle *PM 100*

Anzahl und Größe der Kugeln	Drehzahl [rpm]	Zeit [min]
8 x Ø 30 mm	300	5
		10
		15
		20
	400	5
		10
		15
		20
	500	5
		10
		15
		20
	600	5
		10
		15
		20
4 x Ø 40 mm	500	5
		10
		15
		20
	600	5
		10
		15
		20

Die relevanten Leistungsmerkmale der zur Verfügung stehenden *PM 100* (Fa. Retsch) sind nachfolgend aufgelistet:

Aufgabegut:	weich, hart, spröde, faserig (trocken oder nass)
Zerkleinerungsprinzip:	Prall, Reibung
Drehrichtungsumkehr:	keine
Drehzahlverhältnis:	1 : -2
Max. Drehzahl der Mahlbecher:	1300 rpm
Wirksamer Sonnenraddurchmesser:	141 mm

4.2.3 Mechanische Modifikationen mittels Ultra-Zentrifugalmühle *ZM 200*

Die Modifikationen der Basismehle mittels Zentrifugalmühle wurden mit den in Tabelle 61 aufgeführten Mahlparametern (Variation in Drehzahl und Sieb-Porengröße) realisiert.

Tabelle 61: Parametereinstellungen der Zentrifugalmühle *ZM 200*

Drehzahl [rpm]	Sieb-Porengröße [µm]
6 000	80
	120
	200
	500
12 000	80
	120
	200
	500
18 000	80
	120
	200
	500

Die relevanten Leistungsmerkmale der zur Verfügung stehenden *ZM 200* (Fa. Retsch) sind nachfolgend aufgelistet:

- Zerkleinerungsprinzip: Prall, Scheren
- Aufgabegut: weich, mittelhart, spröde, faserig
- Rotorumfangsgeschwindigkeit: 31-93 m/s
- Rotordurchmesser: 99 mm
- Material der Mahlwerkzeuge: rostfreier Stahl
- Lochung der Siebe: Trapezlochung
- Auffangbehälter: 900 mL mit Standardkassette

4.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Rasterelektronenmikroskopie von verschieden modifizierten Mehle erfolgte bei der HOSOKWA ALPINE AG in Augsburg. Mit Hilfe dieser Technik wurde die Oberflächenmikrostruktur der Mehlpartikel bildgebend mit hoher Vergrößerung und hoher Tiefenschärfe untersucht.

Mikroskop:	EVO MA 10 (Carl Zeiss Co., Jena, Deutschland)	
Sondenstrom:	7 bzw. 16 pA	
Beschleunigungsspannung:	4 – 5 kV	
Probenvorbereitung:	Besputtung:	Gold
	Dicke:	ca. 300 Å
	Sputtergerät:	Hummer V
Detektor:	Sekundärelektronendetektor (SE)	
Vergrößerung:	7 – 20 000-fach	

4.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach Kasarda et al. (1998) und unter reduzierenden Bedingungen (Reduktionsmittel: DTT) durchgeführt.

Herstellen der Lösungen

Probenpuffer

Dieser Puffer wurde für die Probeninkubation benötigt. Dafür wurden in einen 100 mL-Messkolben die in Tabelle 62 genannten Komponenten eingewogen, mit Millipore-Wasser gelöst und bis zur Marke aufgefüllt.

Tabelle 62: Zusammensetzung Probenpuffer

Chemikalien	Einwaage	Konzentration
Saccharose	20.0 g	293.3 mmol/L
Tris	6.0 g	246.4 mmol/L
SDS	4.0 g	69.4 mmol/L
EDTA	30.0 mg	0.51 mmol/L
Serva Blue G250	37.5 mg	0.22 mmol/L
Phenolrot	12.5 mg	0.177 mmol/L
Salzsäure (1mol/L)	21.15 mL	0.105 mmol/L
DTT [a]	7.7 g	50.0 mmol/L

[a] Zusatz unter reduzierenden Bedingungen

Elektrodenpuffer

Mit diesem Puffer wurden die innere und die äußere Kammer der Elektrophorese-Vorrichtung befüllt. Dafür wurden in einen 1 L-Messkolben die in Tabelle 63 genannten Komponenten eingewogen, mit Millipore-Wasser gelöst und bis zur Marke aufgefüllt.

Tabelle 63: Zusammensetzung des MOPS-Elektrodenpuffers

Chemikalien	Einwaage	Konzentration
MOPS	20.92 g	50.0 mmol/L
Tris	12.12 g	50.0 mmol/L
SDS	2.0 g	3.5 mmol/L
EDTA	0.6 g	1.0 mmol/L

Lösungen für die schnelle Coomassie-Färbung

Fixierlösung: 12 % Trichloressigsäure (120 g/L; w/v)

Färbelösung: 0.25 % Coomassie-Brilliant-Blau R250 in Methanol/Eisessig/H_2O (454/92/454; v/v/v) (2.5 g Coomassie/L)

Entfärbelösung I: Methanol/Eisessig/ H_2O (50/10/40; v/v/v)

Entfärbelösung II: Methanol/Eisessig/ H_2O (10/10/80; v/v/v)

Marker

Zur Kalibrierung wurde als Marker der Standard PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Molecular Weight Range: 10 000-200 000) eingesetzt.

Probenvorbereitung

500 µL des Probenpuffers wurde kurz vor Gebrauch 1:1 mit Millipore Wasser verdünnt. Für die reduzierte Variante musste der Probenpuffer vor der Zugabe zur Probe noch mit DTT versetzt werden.

Je 20 mg des Mehles wurden anschließend in ein 2 mL-Safe-Lock Tube eingewogen und mit 1 mL Probenpuffer versetzt, kurz mit dem Vortexmischers gemixt und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 60 °C für 10 min im Heizblock (HLC Heating-Thermo Mixer MHR 13, DITABIS, Pforzheim, Deutschland) inkubiert und danach bei 5000 U/min für 5 min zentrifugiert (Hochgeschwindigkeits-Mikroliterzentrifuge CT15RE, VWR, Darmstadt, Deutschland). Der Überstand wurde in ein weiteres Safe-Lock Tube gegeben und 5-15 µL zur Elektrophorese eingesetzt.

Gelvorbereitung

Als Elektrophorese-System wurde NuPAGE™ (Fa. Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Als Kammer wurde eine XCell SureLockTM Electrophoresis Cell mit einem NuPAGE™ 10 %-Bis-TRIS [Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan-HCl]-Gel (10 × 1.0 mm well; Invitrogen, Carlsbad, USA) eingesetzt.

Die Gelkassette wurde aus der Folie entnommen und mit dest. Wasser abgewaschen. Der Kamm wurde vorsichtig aus dem Gel gezogen, die Kammern nochmals mit dest. Wasser ausgespült, durch Ausschütteln vom Wasser befreit und der Klebestreifen entfernt. Anschließend wurde die Gelkassette in die Elektrophoresekammer gestellt, sodass die Kammöffnungen ins Kammerinnere zeigen.

Anschließend wurde die innere Kammer mit Elektrodenpuffer gefüllt und ggf. bei der reduzierten Variante der Elektrodenpuffer der inneren Kammer ebenfalls mit DTT (154.3 mg/200 mL, 10 mmol/L) versetzt.

Danach wurden die Proben und der Marker für die Kalibrierung submers in die Tröge pipettiert, anschließend die äußere Kammer der Elektrophoresevorrichtung mit Elektrodenpuffer befüllt und der Deckel aufgesetzt.

Starten der Elektrophorese

Die Elektrophorese erfolgte unter folgenden Bedingungen:

Tabelle 64: Elektrophoresebedingungen der SDS-PAGE

	1 Gel	2 Gele
Stromstärke	115 mA	230 mA
Spannung	200 V	200 V
Leistung	30 W	50 W
Dauer	ca. 30 min	ca. 50 min

Nach dem Ende der Trennung wurde die Gelkassette aus der Kammer entnommen, mit destilliertem Wasser abgewaschen und mit Hilfe eines speziellen Messers vorsichtig auseinandergebrochen. Die Gelränder wurden glatt geschnitten, das Gel vorsichtig von der Kassette gelöst und in die Fixierlösung gegeben.

Entwicklung des Gels

Fixierung:

Die Proteine wurden unter Schütteln für 30 min in der Fixierlösung behandelt. Dann wurde das Gel mit destilliertem Wasser gewaschen und in die Färbelösung gegeben.

Färbung:

Das Gel wurde für 30 min unter Schütteln in der Färbelösung behandelt. Nach der Färbezeit wurde das Gel mit destilliertem Wasser gewaschen und in die Entfärbelösung I gegeben.

Entfärben:

Erst wurde das Gel unter Schütteln für 15 min in die Entfärbelösung I gegeben. Danach erfolgte das Abgießen der Entfärbelösung I, Waschen mit destilliertem Wasser und die Zugabe der Entfärbelösung II. Das Gel lagerte über Nacht ohne Schütteln in dieser Lösung.

Dokumentation:

Das Gel wurde mittels des Scanners „Gel Doc™ EZ Imager“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und dem Einsatz „White Light Sample Tray“ eingescannt und des zugehörigen Bildbearbeitungsprogrammes „Image Lab™ software“ bearbeitet.

4.5 Modifizierte Osborne-Fraktionierung

Zur Untersuchung der einzelnen Proteinfraktionen im Mehl wurde eine modifizierte Osborne-Fraktionierung im Kleinmaßstab (100 mg Mehl) durchgeführt.

4.5.1 Extraktion

Herstellung der Extraktionslösungen

Modifizierte Osborne-Salzextraktionslösung für Albumine und Globuline

Lösung a: 0.067 mol/L Na_2HPO_4; 0.4 mol/L KCl: 11.88 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ und 23.38 g KCl wurden in Millipore-Wasser gelöst und auf 1 L aufgefüllt

Lösung b: 0.067 mol/L KH_2PO_4; 0.4 mol/L NaCl: 4.45 g KH_2PO_4 und 11.69 g KCl wurden in Millipore-Wasser gelöst und auf 0.5 L aufgefüllt

Lösung c: Lösung a wurde mit Lösung b auf pH = 7.6 eingestellt

Ethanol-Extraktionslösung (60 %, v/v) für GLIA

600 mL Ethanol wurden mit Millipore-Wasser versetzt und auf 1 L aufgefüllt

Reduzierende Extraktionslösung für GLUT

Lösung a: 0.067 mol/L Na_2HPO_4; 0.4 mol/L KCl: 11.88 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ und 23.38 g KCl wurden in Millipore-Wasser gelöst und auf 1 L aufgefüllt

Lösung b: 0.067 mol/L KH_2PO_4; 0.4 mol/L NaCl: 4.45 g KH_2PO_4 und 11.69 g KCl wurden in Millipore-Wasser gelöst und auf 0.5 L aufgefüllt

Lösung c: Lösung a wurde mit Lösung b auf pH = 7.6 eingestellt

Lösung d: Lösung c wurde mit 1-Propanol 1:1 (v/v) gemischt

Reduktionslösung: Vor Gebrauch wurden 10 mg/mL DTT in der Pufferlösung gelöst.

Durchführung der Extraktion (Mehl) zur Analyse mittels RP-HPLC

100 mg-Ansatz

Es wurden 100 ± 2 mg der Basismehle bzw. der modifizierten Mehle in Dreifachbestimmung in ein Pyrex-Kulturröhrchen eingewogen. Es erfolgte zweimal eine Extraktion mit je 1 mL modifizierter Osborne-Salzlösung. Im Anschluss wurden die Proben 2 min mittels Vortexmischer gemixt und anschließend bei RT 10 min gerührt. Nachfolgend wurden die Extrakte 25 min bei RT und 3750 x *g* zentrifugiert. Die Überstände, die Albumine und Globuline enthielten, wurden in einem 2 mL-Messkolben gesammelt, mit der Extraktionslösung bis zur

Marke aufgefüllt, membranfiltriert (0.45 µm) und zur RP-HPLC eingesetzt. Der Rückstand, der die GLIA und GLUT beinhaltete, wurde dreimal mit 0.5 mL 60 %igem Ethanol (v/v) extrahiert. Das weitere Verfahren wurde analog zu der Albumin-/Globulin-Extraktion durchgeführt. Der verbleibende Rückstand, der die GLUT enthielt, wurde mit der GLUT-Extraktionslösung behandelt. Der Rückstand wurde zweimal mit je 1 mL der Extraktionslösung versetzt und 10 s unter Rühren mit Stickstoff begast. Die Probe wurde 2 min mittels Vortexmischer gemixt, 30 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert, abgekühlt und 25 min bei RT und 3750 x *g* zentrifugiert. Die Überstände wurden in einem 2 mL-Messkolben gesammelt, mit der Reduktionslösung bis zur Marke aufgefüllt, membranfiltriert (0.45 µm) und zur RP-HPLC eingesetzt.

4.5.2 Reversed-Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

Die erhaltenen Proteinfraktionen (ALGL, GLIA, GLUT) wurden mittels RP-HPLC analysiert. Für die externe Kalibrierung wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt, wobei das PWG-GLIA (Prolamin Working Group, Freising, Deutschland; Vier-Punkt-Kalibrierung, absoluter Kalibrierbereich: 11.6 µg - 46.6 µg) verwendet wurde (van Eckert et al., 2006).

Systemparameter:

HPLC:	Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Deutschland)
Pumpe:	Ultimate 3000 RS Pump HPG-3400 RS
Detektor:	Ultimate 3000 RS Wavelength Detector VWD-3400
Software:	Chromeleon® 6.8 Chromatography Data System
Autosampler:	Ultimate 3000 RS Autosampler WPS-3000
Säulenofen:	Ultimate 3000 Column Compartement TCC-3000
Säule:	Acclaim™ 300 C18 3 µm; 300 Å; 2.1 x 150 mm

Säulentemperatur:	60.0 °C
Minimale Säulentemperatur:	5.0 °C
Maximale Säulentemperatur:	65.0 °C
Minimaler Druck:	0 bar
Maximaler Druck:	200 bar
Maximale Fluss-RampDown	3.000 mL/min
Flussrate:	0.200 mL/min
Fließmittel:	A: Wasser (0.1 % TFA, v/v)
	B: Acetonitril (0.1 % TFA, v/v)
	C: Acetonitril 40% (v/v)
Draw-Geschwindigkeit:	2 µL/s
Multistep-Gradient:	

ALGL		GLIA, GLUT	
Zeit [min]	B [%]	Zeit [min]	B [%]
0.0	0	0	0
0.4	0	0.4	0
0.5	20	0.5	24
7.0	60	20.0	56
7.1	90	20.1	90
11.0	90	24.0	90
11.1	0	24.1	0
17.0	0	30.0	0

Draw-Verzögerung:	3000 ms	
Disp-Geschwindigkeit	10 µL/s	
Waste-Geschwindigkeit:	20 µL/s	
Waschvolumina:	200 µL	
Wasch-Geschwindigkeit:	20 µL/s	
Detektion	210 nm	
Injektionsvolumen:	PWG-GLIA :	5-20 µL
	AGL:	20 µL
	GLIA:	10 µL
	GLIA reduziert:	10 µL
	GLUT:	20 µL

4.6 Quantitative SDSL- und GMP-Analyse

4.6.1 Extraktion

Herstellung der Extraktionslösungen

SDS-Lösung zur Extraktion des SDS-löslichen Proteinanteils

Na-Phosphatpuffer (0.05 mol/L):

- 9.0 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ wurden in einen 1 L-Messkolben in Millipore-Wasser gelöst und bis zur Marke aufgefüllt. Anschließend wurde mit 32 %iger HCl der pH-Wert auf 6.9 eingestellt.

SDS-Lösung (1%ig):

- 1 g SDS wurde in einen 100 mL-Messkolben in Na-Phosphatpuffer gelöst und bis zur Marke aufgefüllt.

Reduzierende Extraktionslösung für das GMP (Gluteninmakropolymer)

Lösung a:	0.067 mol/L Na_2HPO_4; 0.4 mol/L KCl: 11.88 g $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ und 23.38 g KCl wurden in Millipore-Wasser gelöst und auf 1 L aufgefüllt
Lösung b:	0.067 mol/L KH_2PO_4; 0.4 mol/L NaCl: 4.45 g KH_2PO_4 und 11.69 g KCl wurden in Millipore-Wasser gelöst und auf 0.5 L aufgefüllt
Lösung c:	Lösung a wurde mit Lösung b auf pH = 7.5 eingestellt.
Lösung d:	Lösung c wurde mit 1-Propanol 1:1 (v/v) gemischt.
Reduktionslösung:	Vor Gebrauch wurden 10 mg/mL DTT in der Pufferlösung gelöst.

Durchführung im 100 mg-Ansatz (zur Analyse mittels GP-HPLC)

SDS-lösliche Proteinfraktion:

Es wurden 100 mg ± 5 mg der Basismehle bzw. der modifizierten Mehle in ein Pyrexröhrchen eingewogen. Zunächst wurde der SDS-lösliche Proteinanteil zweimal mit jeweils 1 mL der oben beschriebenen SDS-Lösung extrahiert. Im Anschluss wurden die Proben 2 min mittels Vortexmischer gemixt und anschließend bei RT 30 min gerührt. Nachfolgend wurden die Extrakte 25 min bei RT und 3750 x *g* zentrifugiert. Die Überstände wurden in einem 5 mL-Messkolben gesammelt und dieser bis zur Marke mit SDS-Lösung aufgefüllt. Die Lösung wurde nach Membranfiltration (0.45 µm) mittels GP-HPLC analysiert.

GMP-Fraktion:

Zur Extraktion des wurde der Rückstand der SDS-Extraktion zweimal mit je 1 mL Reduktionslösung behandelt. Der verbleibende Rückstand, der das GMP enthielt, wurde mit

der GLUT-Extraktionslösung extrahiert. Der Rückstand wurde zweimal mit je 1 mL der Reduktionslösung versetzt und 10 s unter Rühren mit Stickstoff begast. Die Probe wurde 2 min mittels Vortexmischer gemixt, 30 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert, abgekühlt und 25 min bei RT und 3750 x *g* zentrifugiert. Dabei wurde auf eine permanente reduzierende Stickstoffatmosphäre geachtet. Die Überstände wurden in einem 2 mL-Messkolben gesammelt, mit der Reduktionslösung bis zur Marke aufgefüllt, membranfiltriert (0.45 µm) und zur GP-HPLC eingesetzt.

4.6.2 Gel-Permeations-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (GP-HPLC)

Zur Quantifizierung des SDS-löslichen (SDSL) Anteils und des Gluteninmakropolymers (GMP) wurden die Extrakte mittels GP-HPLC nach Molekülgröße getrennt und bei 210 nm UV-spektrometrisch detektiert. Für die externe Kalibrierung wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt, wobei das PWG-GLIA (Prolamin Working Group; Vier-Punkt-Kalibrierung, absoluter Kalibrierbereich: 11.6 µg - 46.6 µg) verwendet wurde (van Eckert et al., 2006).

Systemparameter:

HPLC:	X-LC (Jasco, Pfungstadt, Deutschland)
Pumpe:	PU-2085 Plus semi-micro
Detektor:	X-LC 3075 UV
Autosampler:	X-LC 3059 AS
Software:	CHROMPASS Chromatography Data System
Entgaser:	LG 2080-53 3-Line Degaser
Controller:	LG-2080-02 Ternary Gradient Unit
Säule:	BioSep – SEC-S 3000; 300 × 4,60 mm (Phenomenex, USA)
Säulentemperatur:	25 °C
Fluss:	0.3 mL/min
Injektionsvolumen:	10-35 µL
Fließmittel:	1.0 % SDS in Natriumphosphatpuffer (0.05 mol/L)
Gradient:	isokratisch
Detektion:	UV 210 nm

4.7 Rheologie

4.7.1 Bestimmung der Teigentwicklungszeit, der Wasseraufnahmefähigkeit und der Teigstabilität

Die Wasseraufnahme, die Teigentwicklungszeit sowie die Teigstabilität eines Mehles wurden in Anlehnung an die ICC-Standardmethode Nr. 115/1 (ICC, 1992) in einem Fariographen® E (Brabender, Duisburg, Deutschland) mittels eines 10 g-Kneters bestimmt. Die Wasseraufnahme ist diejenige Wassermenge, die benötigt wird, um einen Teig mit einer maximalen Konsistenz von 550 FE bei einer Knettemperatur von 22 °C herzustellen. Dazu wurden ca. 10 g Mehl (angepasst an den Feuchtigkeitsgehalt des Mehls), 0.2 g Natriumchlorid und die entsprechende Menge Wasser (automatische Berechnung für bestimmte Teigkonsistenz am Knetoptimum) in den auf 22 °C temperierten Kneter des Farinographen gegeben und geknetet, bis das Knetoptimum erreicht wurde (Koehler und Grosch, 1999). Die Methodenparameter wurden in Anlehnung an Kieffer et al. (1998) eingestellt, sodass anstelle von 500 FE auf 550 FE geknetet, Natriumchlorid zugegeben wurde und die Knettemperatur nicht bei 30 °C sondern bei 22 °C lag. Die Wasseraufnahmefähigkeit wurde in mL (Wasser) pro 100 g Mehl mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 14 % ausgedrückt.
Die hier ermittelten Parameter dienten als Basis für die nachfolgenden Backversuche (4.7.6).

4.7.2 Feuchtklebergehalt (in Anlehnung an ICC-Nr. 137/1)

Um den Feuchtklebergehalt der Mehle zu bestimmen, wurde die ICC-Standardmethode Nr. 137/1 (ICC, 1994b) für die Perten-Glutomatik Typ 2200 (Perten Instruments, Hamburg, Deutschland) herangezogen. Hierfür wurden ca. 10 g Mehl, 0.2 g NaCl und ca. 5.8 mL Wasser (angepasst an die Wasseraufnahme des Mehles) im Farinographen bis zum Optimum (550 BE, 22 °C) angeteigt. Der Teigling wurde abgedeckt 3 min ruhen gelassen. Anschließend wurden Stärke und lösliche Partikel mit 540 mL NaCl-Lösung (0.4 mol/L) für 10 min in der Perten-Glutomatik (88 µm-Polyamidsieb) in ein Becherglas ausgewaschen. Das überschüssige Wasser im Kleber wurde durch Zentrifugation (3750 x *g*, 10 min, 22 °C) in einer Heraeus Multifuge 3L-R (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) entfernt und der Feuchtklebergehalt gravimetrisch bestimmt.

4.7.3 Zugversuche

Die Teigzugversuche wurden mit dem TA.XT plus Texture Analyzer mit Kieffer Dough & Gluten Extensibilty Rig (Stable Micro Systems, Surrey, UK) nach Scherf und Koehler (2018) durchgeführt. Im 10 g-Kneter wurden ca. 10 g Mehl (14 % Mehlfeuchte, 8.6 g Trockenmasse) im Farinographen (550 BE, 22 °C) unter Zugabe der angepassten Wassermenge und 0.2 g NaCl im Farinographen bis zum Teigoptimum geknetet wurden (siehe 4.7.1).
Für die Kleberzugversuche wurden die Feuchtkleber, wie in Abschnitt 4.7.2 beschrieben, isoliert.
Für die Kleber- und Teigzugversuche wurden die Kleber- bzw. Teigstücke elliptisch geformt und in gefettete, standardisierte PTFE (Polytetrafluorethylen)-Formen mit Rillen (53 x 4 x 4 mm) gepresst. Anschließend ruhten die Teigstränge für 15 min bei RT, sodass sich der Kleber entspannte. Im Anschluss wurden die Kleber- bzw. Teigstränge (homogen und luftblasenfrei) auf die Probenplatte transferiert, in die Halterung der Messvorrichtung gelegt und anschließend in das Messgerät eingelegt. Mittels eines speziellen Hakens wurden die Teig- bzw. Kleberstränge bis zum Zerreißen gedehnt, wobei die Enden der Stränge durch die Halterung festgehalten wurden. Die Hakengeschwindigkeit betrug 3.3 mm/s bei einer Auslösekraft von 1 g.
Dabei wurde ein Kraft-Weg-Diagramm aufgezeichnet, bei welchem auf der Ordinate die Dehnbarkeit als Weg in [cm] und auf der Abszisse der Dehnwiderstand als Kraft in [N] aufgetragen wurde. Es entstand eine sogenannte Kieffer-Kurve. Betrachtet wurden die einzelnen Parameter (E_{max}, R_{max}, E_{max}/R_{max}), sowie die Fläche unter der Kurve als Dehnenergie (DE).

4.7.4 Gluten Index (GI)

Aus 10 g Kleber wurde nach 4.7.2 der Feuchtkleber ausgewaschen. Nach dem Waschen wurde der Feuchtkleber in das Spezialsieb einer Gluten Index Zentrifuge (Perten Instruments, Hamburg, Deutschland) gelegt. Anschließend wurde eine Minute lang bei 6 000 ± 5 U/min zentrifugiert. Der Anteil des Feuchtklebers, der das Sieb passiert hatte, wurde mit einem Spatel herausgenommen und gewogen. Der verbliebene Anteil auf dem Sieb wurde mit einer Pinzette entnommen und ebenfalls gewogen. Die Menge des Klebers, die auf dem Sieb verblieb, in Relation zum gesamten Feuchtklebergehalt, ergibt den Gluten Index.

4.7.5 GlutoPeak Test (GPT)

Die Glutenaggregation wurde mittels des GlutoPeak Testers (Brabender, Duisburg, Deutschland) in Anlehnung an Marti et. al (2015) analysiert. Für das konstante Verhältnis von $CaCl_2$-Lösung und Mehl von 1.26 wurden ca. 8.5 g Mehl (unter Berücksichtigung der Mehlfeuchte von 14 %) in 9.5 g 0.5 M $CaCl_2$-Lösung suspendiert. Dazu wurde die 0.5 M $CaCl_2$-Lösung in den Probentopf eingewogen, auf 34 °C temperiert und anschließend das Mehl zugegeben. Die Bestimmung wurde bei einer konstanten Rotation des Rührflügels von 1900 U/min für 7 min durchgeführt. Dabei wurde das Drehmoment in Abhängigkeit von der Knetzeit aufgezeichnet und von der GlutoPeak-Software grafisch als Kurve dargestellt. Das maximale Drehmoment (MT) und der Zeitpunkt des maximalen Drehmoments (PMT) wurden automatisch berechnet. Zudem wurde die Lift Off Time (LoT), der Zeitpunkt an dem die Aggregationszeit beginnt, bestimmt. Durch die Differenz von PMT und LoT konnte die Aggregationszeit (AGT) berechnet werden.

4.7.6 Mikrobacktest (MBT)

Zu Beginn wurden das Mehl (10 g, 14 % Mehlfeuchte) sowie 0.2 g Natriumchlorid, 0.1 g Saccharose, 0.3 mL L (+) -Ascorbinsäure-Lösung (0.67 mg/mL), 0.1 g Kokosfett (Palmitin) und 0.7 g Frischhefe in den auf 22 °C temperierten 10 g-Kneter des Farinographen mit integriertem Flügelmixer gegeben und für 1 min homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der optimalen Wassermenge (siehe 4.7.1), die aufgrund der Zugabe von Ascorbinsäure, der Hefefeuchtigkeit und der geschmeidig machenden Eigenschaften des Fettes nach unten korrigiert wurde. Nach dem Anteigen mit 63 U/min bis zum Teigoptimum (550 BE, 22 °C) wurde der Teig zu einer Kugel geformt, gewogen und für 20 min im wasserdampfgesättigten Gärschrank (Fa. Heraeus) bei 30 °C unter wassergesättigter Atmosphäre ruhen gelassen. Anschließend erfolgte die Homogenisierung des Teiges mittels einer Rundwirkmaschine. In dieser wurde der Teigling für 10 Umdrehungen gewirkt, durch eine Nudelmaschine mit konstanter Geschwindigkeit (50 U/min, 3 mm Schichtdicke) gewalzt und nach zweimaliger Faltung des flachen Teigstückes wiederum mit der Rundwirkmaschine für 20 Umdrehungen zu einer Kugel geformt. Der so gebildete Teigling wurde auf ein mit Teflon-Folie belegtes Lochblech gelegt und in die Backstraße gestellt. Nach einer Gärzeit von 35 min bei 30 °C unter wassergesättigter Atmosphäre wurden die Brote stufenweise in der Backstraße 12 min lang in drei verschiedenen Temperaturzonen (100 °C, 180 °C und 250 °C) gebacken.

Nachdem die Brote abgekühlt waren (nach ca. 1 h), wurde das Brotvolumen mit dem Volumenmessgerät VolScan Profiler 600 (Stable Micro Systems, Surrey, Großbritannien) bestimmt.

4.7.7 Krumentextur

Im Anschluss an die Volumenmessung der Brote wurden Krumenzylinder (d = 20 mm) mittels eines Korkschneiders aus 15 mm dicken Brotscheiben ausgestanzt. Die Texturmessung der zuvor gewogenen Krumenzylinder erfolgte aus jeweils drei Broten. Die Texturmessung erfolgte mit dem TA.XT plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd, Godalming, UK) mit installierter 5 kg Kraftzelle. Der Krumenzylinder wurde mit Hilfe eines runden Plexiglas-Kompressionsstempels (75 mm) zyklisch in zwei aufeinanderfolgenden Messungen belastet, wobei die Vorschubgeschwindigkeit 1 mm/s und die Testgeschwindigkeit 0.5 mm/s betrug und der Weg auf 7 mm festgesetzt wurde. Die Zeit zwischen dem ersten und dem zweiten Kompressionszyklus betrug 5 s. Die Aufzeichnung der wirkenden Kraft wurde bei 5.0 *g* ausgelöst. Dabei wurden die Kraft-Weg- und Kraft-Zeit-Diagramme sowie die Flächenverhältnisse aufgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software EXPONENT Texture Analysis, Version 6.1.5.0 (Stable Micro Systems, Surrey, UK), wobei die Parameter Härte (Festigkeit), Spannkraft (Elastizität) und Kohäsivität berechnet wurden. Über die Lagerzeit von 24 h gemessen, konnten Rückschlüsse auf die Frischhaltung gezogen werden.

4.8 Puroindoline

4.8.1 Optimierung der Stärkeextraktion

Herstellung der gepufferten Salzextraktionslösung für ALGL

Lösung a: 0.067 mol/L Na_2HPO_4; 0.4 mol/L KCl: 11.88 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ und 23.38 g KCl wurden in Millipore-Wasser gelöst und auf 1 L aufgefüllt

Lösung b: 0.067 mol/L KH_2PO_4; 0.4 mol/L NaCl: 4.45 g KH_2PO_4 und 11.69 g KCl wurden in Millipore-Wasser gelöst und auf 0.5 L aufgefüllt

Lösung c: Lösung a wurde mit Lösung b auf einen pH von 7.6 eingestellt

Herstellung der Ethanol-Extraktionslösung (60 %, v/v) für GLIA

600 mL Ethanol wurden mit Millipore-Wasser auf 1 L aufgefüllt

Herstellung der reduzierenden Extraktionslösung für GLUT

Lösung a: 0.1 mol/L Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (pH 7.6)

Lösung b: 1-Propanol

Lösung c: Lösung a wurde mit Lösung b 1:1 (v/v) gemischt

Lösung d: kurz vor Gebrauch wurden 10 mg/mL DTT in der Pufferlösung gelöst

Ansatz 1

Aus Weichweizen-Vollkornmehl wurde die Stärke folgendermaßen extrahiert. Es wurden ca. 50 g Mehl und ca. 30 mL Wasser (angepasst an die jeweilige Teigkonsistenz, ohne NaCl-Zusatz) im Farinographen für genau 2 min angeteigt. Anschließend wurden Stärke und lösliche Partikel (in ca. 20 g-Portionen) mit Wasser für 10 min in der Perten-Glutomatik Typ 2200 mit einem 88 µm-Polyamidsieb (Perten Instruments, Hamburg, Deutschland) ausgewaschen. Die ausgewaschenen Stärkesuspensionen wurden im Anschluss in 500 mL-Edelstahl-Zentrifugenbechern zentrifugiert (3750 x *g*, 25 min, 20 °C) und die Überstände dekantiert. Danach wurden die Rückstände im Vakuumtrockenschrank Vacutherm VT 6130 M (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland) für 2 Tage bei 50 °C getrocknet.

Ansatz 2

Aus Weichweizen-Auszugsmehl wurde die „Stärke“ mit drei verschiedenen Extraktionslösungen extrahiert. Dazu wurde jeweils 1 g Mehl in einen 10 mL-PP-Röhrchen mit

a) 5 mL ALGL-Extraktionslösung 5 min mittels Vortexmischer gemixt und anschließend bei RT 20 min gerührt.
b) 5 mL GLIA- Extraktionslösung 5 min mittels Vortexmischer gemixt und anschließend bei RT 20 min gerührt.

c) 5 mL GLUT-Extraktionslösung unter reduzierenden Bedingungen (mit DTT) 15 min mittels Vortexmischer gemixt und anschließend bei 40 °C gerührt.

Nachfolgend wurden die Extrakte zentrifugiert (3750 x *g*, 25 min, 20 °C) und die Überstände dekantiert. Die Rückstände wurden im Vakuumtrockenschrank Vacutherm VT 6130 M für 48 h bei 50 °C getrocknet.

4.8.2 PIN-Extraktion

Herstellung des Extraktionspuffers I

Für den Tris-HCl-Puffer wurden in einen 500 mL- Kolben die in Tabelle 65 genannten Komponenten eingewogen und mit Millipore-Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit 37 %iger HCl auf pH = 7.8 eingestellt. Danach wurde der Kolben mit Millipore-Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Tabelle 65: Zusammensetzung des Extraktionspuffers I

Chemikalien	Konzentration		Einwaage
KCl	0.2 mol/L	(7.45 g/L)	3.06 g
Tris	0.05 mol/L	(6.07 g/L)	7.46 g

Herstellung des Extraktionspuffers II

Die Herstellung des Puffers erfolgte in Anlehnung an die des Extraktionspuffers I (Vgl. Tabelle 65) unter Zusatz von 2 % Triton X-114 (w/v) und 0.01 % Lutein (w/v).

Durchführung

Es wurden 0.1 g extrahierte, vakuumgetrocknete Stärke in 1 mL Extraktionspuffer I (pH 7.8) in 10 mL-PP-Zentrifugenröhrchen suspendiert und anschließend 30 min bei 4 °C (auf Eis) gerührt. Danach wurde die Suspension bei 3750 x *g* 25 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand wiederum bei 4 °C (auf Eis) für 60 min mit 0.75 mL Extraktionspuffer II extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt bei 3750 x *g* 25 min zentrifugiert und der Überstand bei 30 °C für 60 min im Wasserbad gerührt. Danach wurde der Extrakt erneut bei 3750 x *g* für 25 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde verworfen und die untere Phase weitere 2 h in der Vakuumzentrifuge RVC 2-25 CDplus (Christ, Osterode, Deutschland) bei 8 mbar (30 °C) stark eingeengt.

Der Rückstand wurde in 1960 µL HCOOH (0.1 %ig) und 40 µL ACN aufgenommen und durch einen Whatman SPARTAN Syringe Filter (RC, 30 mm, 0.45 µm) [GE Healthcare Life Sciences, Solingen, Deutschland] bzw. eine Vivaspin®20 Ultrafiltrationseinheit (30.000 MWCO PE) [Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland] filtriert. Das Filtrat wurde im Anschluss 1:1 verdünnt und mittels LC-ESI$^+$-QToF-MS vermessen.

4.8.3 Reduktion des PIN-Extraktes mit TCEP vor Alkylierung und Hydrolyse

Herstellung der Reduktionslösung

Tris-HCl-Puffer (0.5 mol/L): 1.8 g Tris wurden in Millipore-H_2O gelöst, der pH von 8.5 mit 25 %iger HCl eingestellt und auf 10 mL aufgefüllt

TCEP-Lösung (0.1 mol/L): 25 mg TCEP wurden in 1.0 mL Millipore-H_2O gelöst

Reduktion des PIN-Extraktes

Der Extraktionsrückstand wurde in 30 µL Tris-HCl-Puffer, 80 µL 1-Propanol, 50 µL Millipore-H_2O und 12.5 µL Mischstammlösung IS (5 µg/mL) in einem 10 mL-Pyrex gelöst. Im Anschluss wurden 25 µL Reduktionslösung (TCEP) zugegeben, 30 min bei 60 °C im Heiz-Thermomixer unter reduzierenden Bedingungen (Stickstoffatmosphäre) gerüttelt und danach auf Raumtemperatur abgekühlt.

Reduktion der unmarkierten/isotopenmarkierten Peptidstandards

Die gelösten Peptide (je 1 mg/mL) wurden 1:64 mit Tris-HCl-Puffer/1-Propanol (v/v, 1:1) verdünnt. Es folgte die Reduktion mit 10 µL TCEP-Lösung (0.05 mol/L) bei 60 °C für 30 min unter reduzierenden Bedingungen (Stickstoffatmosphäre).

4.8.4 Alkylierung des PIN-Extraktes mit Chloracetamid vor Hydrolyse

Herstellung des Alkylierungsreagenzes

CAA-Lösung (0.5 mol/L): 47 mg Chloracetamid wurden in 1 mL Millipore-H_2O gelöst

Durchführung

Zu dem reduzierten Extrakt wurden 100 µL CAA-Lösung gegeben. Im Anschluss wurde die Probe 60 min bei 37 °C im Heiz-Thermomixer im Dunkeln gerüttelt. Nachfolgend wurde die Lösung 25 min bei 3750 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in der Vakuumzentrifuge RVC 2-25 CDplus bei 8 mbar (30 °C) 3 h zur Trockne eingeengt.

Zur Bestimmung der exakten Masse der PIN wurde der Rückstand in 750 µL Ameisensäure (0.1 %ig , v/v) aufgenommen und direkt mittels LC-MS/MS (Triple Quadrupol TSQ-Vantage) vermessen (Vgl. 4.8.8).

Anderenfalls folgte die tryptische Hydrolyse (Vgl. 4.8.5) des reduzierten und alkylierten Extraktes.

4.8.5 Enzymatische Hydrolyse des PIN-Extraktes mit Trypsin

Herstellung der Reaktionslösungen

Tris-HCl-Puffer (0.05 mol/L): 1.53 g Tris wurden in 250 mL Millipore-H_2O gelöst, der pH von 7.8 mit 25 %iger Salzsäure eingestellt

Trypsin-Lösung: 2 mg Trypsin und 24 mg Harnstoff wurden in 10 mL Tris-HCl-Puffer gelöst

Durchführung

Der trockene, reduzierte und alkylierte PIN-Extrakt wurde mit 125 µL Trypsin-Lösung bei 37 °C für 24 h im Heiz-Thermomixer bei einer Schüttelfrequenz von 700 rpm hydrolysiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mittels 4 µL konzentrierter Trifluoressigsäure (TFA).

Anschließend wurde der Extrakt mittels Vakuumzentrifuge RVC 2-25 CDplus bei 8 mbar (30 °C) 3 h zur Trockne eingeengt. Darauffolgend wurde der Rückstand in 1.5 mL Ameisensäure (0.1 %ig , v/v) aufgenommen und durch einen Whatman SPARTAN Syringe Filter (RC, 30 mm, 0.45 µm) membranfiltriert. Der gelöste und membranfiltrierte Extrakt wurde im Anschluss mittels LC-MS/MS an einem Ionenfallen MS (ESI/HCT Ultra, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) bzw. einen Triple-Quadrupol MS (TSQ-Vantage, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) vermessen (Vgl. 4.8.8).

4.8.6 ESI-Quadrupol-Time-of-Flight Massenspektrometrie (LC-ESI$^+$-QToF-MS)

Der PIN-Extrakt aus 4.8.2 wurde in Anlehnung an Lagrain et al. (2013) nach Membranfiltration per ESI$^+$-QToF-MS (microTOF-Q, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) gekoppelt mit einer HPLC (Ultimate 3000 HPLC, Dionex, Idstein, Deutschland) analysiert. Durch interne Kalibrierung auf eine simultan injizierte Natriumformiat-Lösung konnte eine Genauigkeit der Massenbestimmung von 5 ppm (exakte Masse) erreicht werden.

Systemparameter

HPLC:	Dionex Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Deutschland)	
Pumpe:	Ultimate 3000 RS Pump DGP-3600 M	
Detektor:	Ultimate 3000 RS Wavelength Detector VWD-3400	
Software:	Chromeleon® 6.8 Chromatography Data System	
Autosampler:	Ultimate 3000 RS Autosampler WPS-3000 TPL	
Säulenofen:	Ultimate 3000 Column Compartement FLM-3300	
Säule:	X-Bridge™ BEH300 C4 3.5 µm, 2.1 x 150 mm (Waters)	
Säulentemperatur:	60 °C	
Fluss:	0.2 mL/min	
Injektionsvolumen:	20 µL	
Fließmittel:	A: Acetonitril (0.1 % HCOOH)	
	B: Wasser (0.1 % HCOOH)	
Multistep-Gradient:	0.0 min	100.0 % B
	0.5 min	76.0 % B
	20.0 min	44.0 % B
	20.1 min	10.0 % B
	32.0 min	10.0 % B
	33.0 min	100.0 % B

ESI$^+$-QToF-MS:	microTOFq (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland)	
Quellenparameter:	End plate offset: -500 V	
Kapillarspannung:	-4000 V	
Zerstäuber:	1.3 bar	
Trockengas:	Stickstoff, 8.0 mL/min	
Trockentemperatur:	180 °C	
Transferparameter:	Funnel 1 RF:	400 Volts peak-to-peak
	Funnel 2 RF:	400 Volts peak-to-peak
	ISCID Energie:	0.0 eV
	Hexapole RF:	400 Volts peak-to-peak

Quadrupol:	Ionisierungsenergie:	5.0 eV
	Max. *m/z*:	1500 *m/z*
Kollisionszelle:	Kollisionsenergie:	10 eV
	Kollision RF:	1400 Volts peak-to-peak
	Transferzeit:	150 µs
	Pre Puls-Speicher:	25 µs
Detektor:	Detektorquelle:	0 V
	Detektorspannung:	2.100
	Kalibrierung:	Natriumformiatcluster (0.005 mol/L NaOH, Wasser/2-Propanol (1:1), 0.2 % Ameisensäure); ESI positiv; *m/z* 90-1722 bzw. 3000

Scanbereich (*m/z*):	750-3000	
MS Datenfile:	Bruker Daltonics DataAnalysis Version 3.4	
Molekülion:	ionenabhängige Dekonvolution	
Berechnung:	Massenbereich:	5 000 – 100 000
	max. Ladung:	100
	min. Peaks in Verbindungen:	3
	max. Anzahl an Verbindungen:	10
Envelopgrenze:	75 %	
M_r Übereinstimmung:	0.05 %	
Maximale Entropie:	Massenbereich:	5 000 – 100 000
Dekonvolution:	Auflösungsvermögen:	10 000

Die Auswertung der LC-MS Daten wurde mit der Software DataAnalysis (Bruker Daltonics) realisiert. Das Molekulargewicht der Proteine wurde mit einer related-ion und einer maximalen Entropie-Dekonvolution errechnet.

4.8.7 LC-Ionenfallen Massenspektrometrie mit CID-Fragmentierung (LC-ESI$^+$-Ion Trap-MS/MS-CID)

Die eingeengten tryptischen Hydrolysate aus 4.8.5 wurden in 0.1 %iger HCOOH (v/v) aufgenommen, wurden chromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch im CID-Modus vermessen.

Systemparameter

HPLC:	Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Deutschland)	
Pumpe:	Ultimate 3000 RS Pump HPG-3200 M	
Detektor:	Ultimate 3000 RS Wavelength Detector VWD-3400	
Software:	Chromeleon® 6.8 Chromatography Data System	
Autosampler:	Ultimate 3000 RS Autosampler WPS-3000 TSL, Micro	
Säulenofen:	Dionex Ultimate 3000 Column Compartement TCC-3000	
Säule:	Aeris PEPTIDE 3.6 u XB-C_{18} 150 x 2.1 mm (Phenomenex, USA)	
Säulentemperatur:	30 °C	
Fluss:	0.2 mL/min	
Injektionsvolumen:	10 µL	
Fließmittel:	A: Acetonitril (0.1 % HCOOH, v/v)	
	B: Wasser (0.1 % HCOOH, v/v)	
Multistep-Gradient:	0.0 min	100.0 % B
	5.0 min	100.0 % B
	45.0 min	30.0 % B
	55.0 min	30.0 % B
	60.0 min	10.0 % B
	62.0 min	100.0 % B
	77.0 min	100.0 % B
UV/VIS-Detektion:	210 nm	

MS:	HCT-Ultra PTM (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Deutschland)	
Ionenquelle:	CID: ESI positive (Electrospray Ionisation)	
Massenanalysator:	Ionenfalle	
Detektor:	Sekundärelektronenvervielfacher (SEV)	
ESI-Parameter:	Modus:	positiv
		Massenbereich: erweiterter Scan (8100 mz/s)

Kapillarspannung:	-4 000V
Kapillarausgangsspannung:	136.5 V

Skimmerspannung:	40 V
Trockengas:	Stickstoff, 8.0 mL/min
Trockentemperatur:	325 °C
Zerstäuber:	30 psi
MS-Mode:	Auto-MS^2

Fragmentierungsoptionen:	Cut Off:	20 % der Precursormasse
	Intelligente Fragmentierung:	an
	Startamplitude:	30 %
	Endamplitude:	300 %
Parameter:	Verzögerung:	0 ms
	Zeit:	40 ms
	Weite:	> 4.0 *m/z*
AutoMS (2):	Precursor Auswahl:	100 000 – 250 000
	Anzahl der Precursor-Ionen:	2
	Grenzwert (absolut):	20 000
	Grenzwert (relativ):	0.5 %
	Aktiver Ausschluss:	nach 2 Spektren
	Auslösung nach 0.20 min	
Erfassungsparameter	MS/MS Fragmentierungsamplitude: 0.40 V	

Die Auswertung der LC-MS Daten wurde mit der Software DataAnalysis (Bruker Daltonics GmbH) realisiert.

4.8.8 TripleQuad-LC-MS mit CID-Fragmentierung (LC-ESI$^+$-Triple Quad MS/MS-CID)

Die enzymatischen Hydrolysate aus 4.8.5 wurden chromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch im CID-Modus vermessen.

Systemparameter

HPLC:	Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Deutschland)	
Pumpe:	Ultimate 3000 RS Pump HPG-3200 M	
Detektor:	Ultimate 3000 RS Wavelength Detector VWD-3400	
Software:	Chromeleon® 6.8 Chromatography Data System	
Autosampler:	Ultimate 3000 RS Autosampler WPS-3000 TSL, Micro	
Säulenofen:	Dionex Ultimate 3000 Column Compartement TCC-3000	
Säule:	Aqua® 5µm C_{18} 125 Å, 150 x 2 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, D)	
Säulentemperatur:	22 °C	
Fluss:	0.2 mL/min	
Injektionsvolumen:	10 µL	
Fließmittel:	A: Acetonitril (0.1 % HCOOH, v/v)	
	B: Wasser (0.1 % HCOOH, v/v)	
Multistep-Gradient:	0.0 min	100.0 % B
	3.0 min	100.0 % B
	16.0 min	10.0 % B
	21.0 min	10.0 % B
	23.0 min	100.0 % B
	37.0 min	100.0 % B

MS:	TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland)
Ionenquelle:	CID: ESI positive (Electrospray Ionisation)
Massenanalysator:	TripleQuad
Detektor:	Sekundärelektronenvervielfacher (SEV)
Sprayspannung:	4 500 V
Verdampfungstemperatur:	50 °C
Mantelgasdruck:	40 au
Kapillartemperatur:	300 °C
Declusteringspannung:	-10 V
Scan:	MRM-Modus, SRM-Modus

Die Auswertung der LC-MS Daten erfolgte mit den Softwares X-Calibur (Thermo Fisher Scientific) sowie Skyline 4.1 (MacCoss Lab).

4.8.9 Responsegeraden

Je 1 mg interner Standard (IS) bzw. Analyt (A) wurden in ein 4 mL Braunglasvial eingewogen. Anschließend wurden die Peptide in 1 mL Millipore-Wasser gelöst. Folgend wurden von den IS und den A Mischstammlösungen (MSL, 100 µg/mL) hergestellt. Je 200 µL dieser MSL wurden mit 120 µL Tris-HCl (1.5 M, pH = 8.5), 320 µL 1-Propanol und 70 µL TCEP (0.1 mol/L) versetzt und unter reduzierenden Bedingungen 30 min bei 60 °C geschüttelt. Für die nachfolgende Alkylierung wurden 290 µL CAA (0.5 mol/L) zum reduzierten Ansatz gegeben und bei 37 °C im Dunkeln für 30 min geschüttelt. Im Anschluss wurden Mischungen der reduzierten und alkylierten A- bzw. IS-MSL hergestellt (9+1, 4+1, 3+1, 1+1, 1+3, 1+4, 1+9) und mittels LC-MS/MS (Triple Quad MS) gemessen.

4.8.10 Methodenvalidierung

4.8.10.1 Linearität

Um den linearen Bereich zu definieren, wurden die reduzierten und alkylierten MSL (20 µg/mL) aus 4.8.9 stufenweise verdünnt (10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001 µg/mL) und im Anschluss am LC-MS/MS (Triple Quad TSQ-Vantage) gemessen.

4.8.10.2 Präzision

0.1 g extrahierte Stärke wurden an drei Tagen jeweils in Sechsfachbestimmung nach 4.8.2 extrahiert. Nach erfolgter Vakuumtrocknung wurden zu dem Extrakt 50 µL Millipore-Wasser, 30 µL Tris-HCl (1.5 M, pH = 8.5), 80 µL 1-Propanol und 12.5 µL MSL des IS (5 µg/mL) gegeben und analog zu 4.8.3, 4.8.4 und 4.8.5 verfahren. Die erhaltenen Lösungen wurden dann am LC-MS/MS (Triple Quad TSQ-Vantage) gemessen.

4.8.10.3 Nachweis- und Bestimmungsgrenze (LoD und LoQ)

Aus den MSL der IS bzw. A aus 4.8.9 wurden Stammlösungen in fünf Konzentrationsstufen (10, 5, 1, 0.5, 0.1 mg/mL) hergestellt (Σ = 18). Je 1.0 g Durum-Stärken wurden in Dreifachbestimmung für jede Konzentrationsstufe der LoD und LoQ nach 4.8.2 extrahiert. Nach erfolgter Vakuumtrocknung wurden zu dem Extrakt 200 µL Millipore-Wasser, 120 µL Tris-HCl (1.5 M, pH = 8.5), 320 µL 1-Propanol und je 50 µL Stammlösung gegeben und analog zu 4.8.3, 4.8.4 und 4.8.5 verfahren. Die erhaltenen Lösungen wurden dann am LC-MS/MS (Triple Quad TSQ-Vantage) gemessen.

4.8.11 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen in Anlehnung an 4.4 durchgeführt. Folgende Änderungen in der Methode erfolgten:

Probenvorbereitung

Je 50 mg der ausgewaschenen, getrockneten Stärken wurden in ein 2 mL-Safe-Lock Tube eingewogen, in 250 µL SDS-Lösung (1 %ig) gelöst, mit dem Vortexmischer gemixt und für 45 min im Multi-Tube Vortexer leicht geschüttelt (Stufe 4). Anschließend wurde für 3 min bei 11000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein weiteres Safe-Lock Tube gegeben. Im Verhältnis 3+1 wurden die Proben mit SDS-Inkubationspuffer versetzt und mit dem Vortexmischer gemixt. Im Anschluss wurde die Lösung für 5 min im Heizblock bei 100 °C inkubiert und für 3 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Zur Elektrophorese wurden jeweils 5-10 µL Probe aufgetragen.

Herstellung des Elektrodenpuffers

Mit diesem Puffer wurden die innere und die äußere Kammer der Elektrophorese-Vorrichtung befüllt. Dafür wurden in einen 1000 mL- Kolben die untengenannten Komponenten eingewogen und anschließend mit Millipore-Wasser gelöst und bis zur Marke aufgefüllt.

Tabelle 66: Zusammensetzung des MES-Elektrodenpuffers

Chemikalien	Konzentration	Einwaage
MES	50 mM	9.8 g
Tris	50 mM	6.1 g
SDS	0.1 %	1.0 g
EDTA	1 mM	0.3 g

4.9 Statistische Methoden

Die statistische Evaluierung der Daten wurde mittels Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Corporation, Seattle, WA, USA) realisiert, wobei die Mittelwerte sowie die absoluten und relativen Standardabweichungen der Mittelwerte berechnet wurden.

Varianzanalyse

Für die Modifikationen in der Kugelmühle wurden die signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten Mehlen innerhalb einer Drehzahl mit dem Faktor Mahldauer durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) und Tukey-Test ($p < 0.05$) identifiziert. Der Parameter SLV wurde untersucht, um die essentiellen Effekte zu identifizieren, die die Wasseraufnahme, die Teigentwicklungszeit, R_{max}, E_{max}, EE, E_{max}/R_{max}-Verhältnis, der Feuchtkleberanteil, der Gluten Index, PMT, MT, LoT, AGT, die Krumenhärte, -spannkraft und -kohäsivität darauf haben. Alle statistischen Varianzanalysen erfolgten mit Sigma Plot 12.0 (Systat Software, San José, CA, USA).

Korrelationsberechnungen

Die Gehalte von ALGL, GLIA, GLUT und Gluten sowie die Gehalte an SDS, GMP und der Summe von SDSL und GMP wurden mit den rheologischen Parametern mittels einer Pearson Produkt Moment Korrelation korreliert. Die Bereiche der Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 67 dargestellt. Als Software diente Sigma Plot 12.0 (Systat Software, San José, CA, USA).

Tabelle 67: Grenzen des Korrelationskoeffizienten (r)

Bereich des Korrelationskoeffizienten (r)	Bezeichnung der Korrelation
$0.00 < r \leq \pm 0.54$	keine Korrelation
$\pm 0.54 < r \leq \pm 0.67$	niedrige Korrelation
$\pm 0.67 < r \leq \pm 0.78$	mittlere Korrelation
$\pm 0.78 < r \leq \pm 1.00$	hohe Korrelation

5 Zusammenfassung

Protein und Stärke sind die Hauptkomponenten von Weizenmehl und beeinflussen dessen funktionelle Eigenschaften und die Qualität daraus hergestellter Backwaren maßgeblich. Durch die Zerkleinerung während des Mahlprozesses wird die Struktur der Stärke wesentlich verändert und die funktionellen Mehleigenschaften beeinflusst. Die eintretende Stärkemodifikation hat u.a. einen positiven Einfluss auf die Wasseraufnahme und das Brotvolumen. Es gibt weiterhin Hinweise, dass eine vermahlungsinduzierte mechanische Modifizierung auch zu Proteinmodifikationen führen könnte. Da über die möglichen Auswirkungen der Zerkleinerung auf die Proteineigenschaften bislang keine Studien vorlagen, war es erforderlich, prozessbedingte Proteinmodifikationen zu analysieren und deren Auswirkungen auf die Mehlfunktionalität aufzuklären. Der unerforschte Faktor „Proteinmodifikation“ in Kombination mit der Stärkemodifikation erschwerte bislang die genaue Aufklärung der Mehlfunktionalität.
Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung einer Methode zur Charakterisierung des Proteinmodifikationsgrades von Weizenmehl und die Untersuchung der Auswirkung der Proteinmodifikationen auf die rheologischen und die Backeigenschaften der Mehle. Das zweite Ziel war die Entwicklung einer MS-Methode zur Quantifizierung der für die Endospermhärte und die Backeigenschaften wichtigen Puroindoline PIN A und PIN B in Weizenmehl.

Für die Arbeit wurden zwei Weichweizen (*Triticum aestivum* L.) der Sorten cv. Akteur und cv. Julius per Walzenstuhl vermahlen (Basismehl). Die darauffolgende Modifikation der Basismehle erfolgte mittels Kugel (KM)- bzw. Zentrifugalmühle (ZM) unter systematischer Variation der Zerkleinerungsparameter (Mahldauer, Drehzahl, Siebporengröße).
Die Modifikation des Basismehls zeigte zum Teil beachtliche Effekte auf dessen morphologische und chemische Eigenschaften. Diese Veränderungen sind entweder direkt durch mechanischen Stress oder indirekt durch zunehmende Temperatur bei mechanischer Behandlung verursacht.
Unter anderem wurden durch die KM- bzw. ZM-Modifikation die Stärkeschädigungsgrade deutlich erhöht. Die Vermahlung bei hohen Drehzahlen führte zu einem deutlichen Temperaturanstieg bis auf 117 °C und einer haptisch und optisch feststellbaren Veränderung des Mehles: es wurde klebriger und pergamentähnlicher.
Der Vergleich der KM- und ZM-Modifikation zeigte, dass die Partikelzerkleinerung während des Mahlvorgangs nicht ausschließlich für den Anstieg der Wasserbindung modifizierter Mehle verantwortlich war, sondern dass weitere Veränderungen der Partikeloberfläche Einfluss auf die Hydratationseigenschaften hatten. Der deutliche Anstieg der Partikelgröße im Mehl nach KM-Modifikation könnte eine Konsequenz von Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen sein,

wodurch die an der Stärkegranula-Oberfläche gebundenen Proteine die Stärkekörner über Disulfidbindungen quervernetzen könnten.

Mittels SDS-PAGE der am intensivsten KM-modifizierten Mehle wurden stark veränderte Bandenintensitäten bzw. -strukturen im Vergleich zum unbehandelten Mehl festgestellt. Im Gegensatz dazu waren bei den ZM-modifizierten Mehlen kaum Auswirkungen sichtbar. Die Osborne-Fraktionierung zeigte nach KM- bzw. ZM-Modifikationen in abweichender Intensität deutliche Veränderungen der Proteintypenverteilung. ALGL und GLIA nahmen nach intensiver KM-Behandlung auf ca. 10 % des ursprünglichen Gehaltes ab. Mit steigendem Grad der Behandlung sank die Menge an extrahierbarem Protein merklich. Bei erhöhter Temperatur wurden die cysteinhaltigen α- und γ-GLIA durch Thiol-Disulfid-Austausch an die GLUT gebunden und nicht mehr mit den monomeren GLIA extrahiert. Bei der SDSL-/GMP-Fraktionierung waren keine Veränderungen bei ZM-Modifikationen sichtbar. Mit zunehmender Behandlungsintensität erfolgte in der KM eine kontinuierliche Zunahme des GMP-Gehaltes. Der indirekte Temperatureffekt scheint vorrangig zu sein, da die Verteilung der Proteinfraktionen nach KM-Behandlung vergleichbar mit den Auswirkungen des Backprozesses auf das Glutenprofil war.

Eine intensive KM-Behandlung erhöhte die Wasserabsorption der Mehle aufgrund des erhöhten Anteils geschädigter Stärke und der partiellen Stärkeverkleisterung deutlich. Die Teigentwicklungszeit von stark behandelten Mehlen nahm trotz erhöhter Wasserabsorption im Vergleich zum nativen Mehl um Faktor 2.4 zu. Der Feuchtkleberanteil sowie der Gluten Index deckte sich nach moderater Modifikation mit den Werten des Basismehls. Mit zunehmender Behandlungsintensität kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme des spezifischen Brotvolumens um mehr als 30 % bezogen auf das Brotvolumen aus dem Basismehl. Die Festigkeit und Kohäsivität der Brotkrume wurden ebenfalls negativ beeinflusst. Weiterhin kam es durch eine hohe Behandlungsintensität in der KM zu einer Verfestigung der Teige. Dies wurde in Mikro-Backtests und Texturanalysen der Krume bestätigt.

Die Untersuchungen zeigten, dass sich mechanisch modifizierte Mehle durch eine intensive Fragmentierung von Stärke-Gluten-Agglomeraten auszeichnen, die zu einer verstärkten Quellung, einer darauffolgenden vorzeitigen Verkleisterung bei der Verarbeitung von Teigen sowie zu einer reduzierten Viskosität beim Backen führen. Die daraus folgende Kleberausbildung führte in Kombination mit der frühzeitigen Verkleisterung und der niedrigen Viskosität zu einer verminderten Gashaltefähigkeit der Teige.

Grundsätzlich erzielte jegliche mäßige Modifikation einen negativen Effekt auf die funktionellen Eigenschaften, während eine geringe Modifikation zu einer Qualitätsverbesserung führte. Wurde das modifizierte Mehl lediglich als „funktioneller Zusatz“ in einer Mischung mit unbehandelte Mehl eingesetzt, wurde die Backfähigkeit verbessert.

Durch die Wahl geeigneter Mahlparameter könnten Mehle mit speziell funktionalisierten Eigenschaften bereitgestellt werden, die für die Backindustrie von Interesse sind. Zusammenfassend stellt eine geringfügige mechanische Modifikation von Weizenmehl eine Möglichkeit dar, Clean-Label-Backwaren mit verbesserten Herstellungseigenschaften und Endproduktqualitäten herzustellen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde eine Methode zur sensitiven Quantifizierung von PIN mittels LC-MS/MS in Weizenmehl entwickelt und validiert. Dazu wurde die Stärke, mit der die PIN assoziiert waren, zunächst isoliert und anschließend die PIN unter Zusatz des Tensids Triton X-114 extrahiert. Der PIN-Extrakt wurde mittels LC-ESI^+-QToF-MS analysiert, um die Extraktreinheit und die exakte molare Masse von PIN A und PIN B zu bestimmen.
Im Anschluss wurden die PIN-Extrakte reduziert, alkyliert, mit Trypsin hydrolysiert und mittels LC-MS/MS analysiert. Dabei wurden für PIN A und PIN B zwei bzw. drei charakteristische Peptide (sog. Markerpeptide) identifiziert. Diese mussten bestimmte Kriterien, wie z.B. eine PIN-spezifische Aminosäuresequenz, eine geeignete Peptidlänge (8-25 Aminosäuren), einen optimalen MS-Massenbereich (*m/z* = 500-1500), eine möglichst hohe Ausbeute und eine Stabilität gegenüber chemischen (v.a. Desamidierung, N-terminale Cyclisierung, Oxidation) sowie biologischen (post-translationalen) Modifikationen (u.a. C-terminale Peptide) erfüllen. Diese Peptide wurden zunächst auf Basis von Stabilisotopenverdünnungsassays im PIN-Extrakt quantifiziert und nachfolgend aus den ermittelten Peptidkonzentrationen die entsprechenden Proteinkonzentrationen bestimmt. Für acht untersuchte Weizensorten wurden Gehalte an PIN A und PIN B zwischen 484 µg/g (cv. Ritmo) und 963 µg/g (cv. Jubilar) analysiert. Dabei wurden für die Weizensorten mit PIN-Wildtypen signifikant höhere PIN-Gehalte als für die Weizensorten mit PIN-Sequenzvariationen ermittelt.
Die Methode wurde einer umfangreichen Validierung unterzogen. Die Prüfung der Linearität ergab für alle Peptide hohe Korrelationskoeffizienten ($r^2 > 0.98$). Die Wiederholbarkeit für die Intra-day-Tests lag für alle PIN-spezifischen Peptide bei Variationskoeffizienten < 6 %, die der Inter-day-Tests bei Variationskoeffizienten < 10 %. Für die Responsefaktoren ergaben sich Werte zwischen 0.63 und 1.18. Zur Bestimmung der LoD und LoQ wurde Durum-Mehl als PIN-freie Referenzmatrix verwendet. Für die Nachweisgrenzen der PIN-Peptide ergaben sich Konzentrationen zwischen 0.08 µg/g (Peptid PIN A-1) und 2.8 µg/g (Peptid PIN B-1), sowie Bestimmungsgrenzen zwischen 0.25 µg/g (Peptid PIN A-1) und 9.2 µg/g (Peptid PIN B-1). Alle ausgewählten Peptide konnten in der Matrix Weizenmehl detektiert werden.
Zusammenfassend wurde eine neue SIVA für die reproduzierbare und exakte Quantifizierung von PIN in Weizenmehl entwickelt. Durch Quantifizierung der Markerpeptide in Weizenproben und Berechnung der entsprechenden Proteingehalte wurden erstmals PIN-Gehalte quantifiziert, die anschließend mit technologischen Eigenschaften in Zusammenhang gebracht wurden.

6 Literaturverzeichnis

ABECASSIS, J., AUTRAN, J.-C. & FEILLET, P. Durum wheat, semolina and pasta quality recent achievements and new trends. 2001 Paris. INRA.

ANJUM, F. M. & WALKER, C. E. 1991. Review on the significance of starch and protein to wheat kernel hardness. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 56**,** 1-13.

ANTES, S. & WIESER, H. 1999. Modelluntersuchungen zum Reoxidationsverhalten von Glutelinuntereinheiten aus Weizen und Roggen. *Getreide, Mehl und Brot* 53**,** 291-295.

ARMANINO, C., DE ACUTIS, R. & ROSA FESTA, M. 2002. Wheat lipids to discriminate species, varieties, geographical origins and crop years. *Analytica Chimica Acta,* 454**,** 315-326.

BAKER, A. E. & PONTE, J. G. J. 1987. Measurement of bread firmness with the universal testing machine. Report of the AACC committee on bread firming measurement. *Cereal Foods World,* 32**,** 491.

BANAFA, W. 2004. *Einfluss der Prallzerkleinerung und Windsichtung auf die stoffliche Zusammensetzung und Verarbeitungseigenschaften von Weizenmehlen.* Technische Universität Berlin.

BARAK, S., MUDGIL, D. & KHATKAR, B. S. 2013. Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. *LWT - Food Science and Technology,* 51**,** 211-217.

BARLOW, K. K., BUTTROSE, M. S., SIMMONDS, D. H. & VESK, M. 1973. The nature of the starch-protein interface in wheat endosperm. *Cereal Chemistry,* 50**,** 443-454.

BARRERA, G., PÉREZ, G., RIBOTTA, P. & LEÓN, A. 2007. Influence of damaged starch on cookie and bread-making quality. *European Food Research and Technology,* 225**,** 1-7.

BAUER, B. A. & KNORR, D. 2005. The impact of pressure, temperature and treatment time on starches: pressure-induced starch gelatinisation as pressure time temperature indicator for high hydrostatic pressure processing. *Journal of Food Engineering,* 68**,** 329-334.

BAYERISCHE LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFT 2012. Auswirkungen internationaler Märkte auf die bayerische Land- und Ernährungswirtschaft; Weizen. Freising: Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft.

BECKER, A., HILL, S. & MITCHELL, J. 2001. Milling—A further parameter affecting the Rapid Visco Analyser (RVA) profile. *Cereal Chemistry,* 78**,** 166-172.

BECKER, G. & ACKER, L. 1976. *Die Lipide der Getreidestärken - Handbuch der Stärke,* Hamburg, Parey.

BEECHER, B., SMIDANSKY, E. D., SEE, D., BLAKE, T. K. & GIROUX, M. J. 2001. Mapping and sequence analysis of barley hordoindolines. *Theoretical and Applied Genetics,* 102**,** 833-840.

BELDEROK, B., MESDAG, H. & DONNER, D. A. 2000. *Bread-making quality of wheat: A century of breeding in Europe*, Springer Netherlands.

BELITZ, H.-D., GROSCH, W. & SCHIEBERLE, P. 2008. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie,* Berlin, Springer-Verlag.

BHAVE, M. & MORRIS, C. F. 2008. Molecular genetics of puroindolines and related genes: allelic diversity in wheat and other grasses. *Plant Molecular Biology* 66**,** 205-219.

BIEMANN, K. 1990. Appendix 5. Nomenclature for peptide fragment ions (positive ions). *Methods in enzymology,* 193**,** 886-887.

BLOCHET, J.-E., CHEVALIER, C., FOREST, E., PEBAY-PEYROULA, E., GAUTIER, M.-F., JOUDRIER, P., PÉZOLET, M. & MARION, D. 1993. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Letters,* 329**,** 336-340.

BOJA, E. S. & FALES, H. M. 2001. Overalkylation of a Protein Digest with Iodoacetamide. *Analytical Chemistry,* 73**,** 3576-3582.

BONJEAN, A. P. & ANGUS, W. J. 2001. *The World Wheat Book: A History of Wheat Breeding,* Paris, Lavoisier Publishing.

BORDIER, C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *Journal of Biological Chemistry,* 256**,** 1604-1607.

BOZ, H. & KARAOĞLU, M. M. 2013. Improving the quality of whole wheat bread by using various plant origin materials. *Czech Journal of Food Sciences,* 31**,** 457–466.

BRABENDER GMBH. 2017. *Quadrumat Junior – Probenvorbereitung von Getreide mit neuem, reinigungsfreundlichem Design* [Online]. Duisburg. Available: https://www.brabender.com/food/produkte/muehlen/probenvorbereitung-von-getreide-quadrumat-junior/ [Accessed February 2018].

BRITES, C. M., SANTOS, C. A. L. D., BAGULHO, A. S. & BEIRÃO-DA-COSTA, M. L. 2008. Effect of wheat puroindoline alleles on functional properties of starch. *European Food Research and Technology,* 226**,** 1205-1212.

BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT 2014. Besondere Ernte- und Qualitätsermittlung (BEE) 2013. Berlin: BMEL.

BUNDESSORTENAMT 2017. Beschreibende Sortenliste Getreide, Mais, Öl- und Samenpflanzen, Leguminosen, Rüben, Zwischenfrüchte. Hannover.

BURNS, J. A., BUTLER, J. C., MORAN, J. & WHITESIDES, G. M. 1991. Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine. *Journal of Organic Chemistry,* 56**,** 2648–2650.

CHEN, F., LI, H. & CUI, D. 2013. Discovery, distribution and diversity of Puroindoline-D1 genes in bread wheat from five countries (Triticum aestivum L.). *BMC plant biology,* 13**,** 125.

CUBADDA, R., CARCEA, M. & PASQUI, L. A. 1992. Suitability of the gluten index method for assessing gluten strength in durum wheat and semolina. *Cereal foods world,* 37**,** 866-869.

D'APPOLONIA, B. L. & GILLES, K. A. 1967. Protein alteration in flour damaged by ball-milling and roller-milling. *Cereal Chemistry,* 44**,** 324 - 332.

DALBON, G., GRIVON, D. & PAGANI, M. A. 1996. Continuous manufacturing process. *In:* KRUGER, J. E., MATSUO, R. B. & DICK, J. W. (eds.) *Pasta and noodle technology.* St. Paul, MN: AACC International.

DAY, L., BHANDARI, D. G., GREENWELL, P., LEONARD, S. A. & SCHOFIELD, J. D. 2006. Characterization of wheat puroindoline proteins. *FEBS Journal,* 273**,** 5358-5373.

DEGANT, O. 1996. New developments with impact grinding and air classification in cereal processing. *Getreide Mehl und Brot,* 3**,** 164-166.

DELCOUR, J. A. & HOSENEY, R. C. 2010a. Chapter 1: Structure of Cereals. *Principles of Cereal Science and Technology.* St. Paul, MN: AACC International Inc.

DELCOUR, J. A. & HOSENEY, R. C. 2010b. Chapter 2: Starch. *Principles of Cereal Science and Technology.* St. Paul, MN: AACC International, Inc.

DEXTER, J. E., PRESTON, K. R., MARTIN, D. G. & GANDER, E. J. 1994. The effects of protein content and starch damageon the physical dough properties and bread-making quality of Canadian durum wheat. *Journal of Cereal Science,* 20**,** 139-151.

DHAKA, V. & KHATKAR, B. S. 2015. Effects of gliadin/glutenin and HMW-GS/LMW-GS ratio on dough rheological properties and bread-making potential of wheat varieties. *Journal of Food Quality,* 38**,** 71-82.

DHITAL, S., SHRESTHA, A. K., FLANAGAN, B. M., HASJIM, J. & GIDLEY, M. J. 2011. Cryo-milling of starch granules leads to differential effects on molecular size and conformation. *Carbohydrate Polymers,* 84**,** 1133-1140.

DIN 10355 2017. Mahlerzeugnisse aus Getreide - Anforderungen, Typen und Prüfung. Deutschland.

DOEKES, G. J. & BELDEROK, B. 1976. Kernel hardness and baking quality of wheat — A genetic analysis using chromosome substitution lines. *Euphytica,* 25**,** 565-576.

DON, C., LOOKHART, G., NAEEM, H., MACRITCHIE, F. & HAMER, R. J. 2005. Heat stress and genotype affect the glutenin particles of the glutenin macropolymer-gel fraction. *Journal of Cereal Science,* 42**,** 69-80.

DUBREIL, L., COMPOINT, J.-P. & MARION, D. 1997. Interaction of puroindolines with wheat flour polar lipids determines their foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 45**,** 108-116.

DUPONT, F. M., SAMOIL, V. & CHAN, R. 2008. Extraction of up to 95 % of wheat (triticum aestivum) flour protein using warm sodium dodecyl sulfate (SDS) without reduction or sonication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*

EDWARDS, M. A., OSBORNE, B. G. & HENRY, R. J. 2008. Effect of endosperm starch granule size distribution on milling yield in hard wheat. *Journal of Cereal Science,* 48**,** 180-192.

EVERS, A. D., BAKER, G. J. & STEVENS, D. J. 1984. Production and measurement of starch damage in flour. Part 1. Damage due to rollermilling of semolina. *Starch - Stärke,* 36**,** 309-312.

EVERS, A. D. & LINDLEY, J. 1977. The particle-size distribution in wheat endosperm starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 28**,** 98-102.

EVERS, A. D. & STEVENS, D. J. 1988. Production and measurement of starch damage in flour. Effect of starch damage on hot pasting properties. *Starch - Stärke,* 40**,** 297-299.

EXPASY PEPTIDECUTTER TOOL. PeptideCutter. Available: https://web.expasy.org/peptide_mass/

FIDO, R. J., BÉKÉS, F., GRAS, P. W. & TATHAM, A. S. 1997. Effects of α-, β-, γ- and ω-gliadins on the dough mixing properties of wheat flour. *Journal of Cereal Science,* 26**,** 271-277.

FINNEY, P. L., KINNEY, J. E. & DONELSON, J. R. 1988. Prediction of damaged starch in straight-grade flour by near-infrared reflectance analysis of whole ground wheat. *Cereal Chemistry,* 65**,** 449-452.

FISHWICK, M. J. & WRIGHT, A. J. 1980. Isolation and characterization of amyloplast envelope membranes from Solanum tuberosum. *Phytochemistry,* 19**,** 55-59.

FREDRIKSSON, H., SILVERIO, J., ANDERSSON, R., ELIASSON, A. C. & ÅMAN, P. 1998. The influence of amylose and amylopectin characteristics on gelatinization and retrogradation properties of different starches. *Carbohydrate Polymers,* 35**,** 119-134.

GAN, Z., ELLIS, P. R. & SCHOFIELD, J. D. 1995. Gas cell stabilisation and gas retention in wheat bread dough. *Journal of Cereal Science,* 21**,** 215-230.

GAUTIER, M.-F., ALEMAN, M.-E., GUIRAO, A., MARION, D. & JOUDRIER, P. 1994. Triticum aestivum puroindolines, two basic cystine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Molecular Biology,* 25**,** 43-57.

GAUTIER, M.-F., COSSON, P., GUIRAO, A., ALARY, R. & JOUDRIER, P. 2000. Puroindoline genes are highly conserved in diploid ancestor wheats and related species but absent in tetraploid Triticum species. *Plant Science,* 153**,** 81-91.

GAZZA, L., NOCENTE, F., NG, P. K. W. & POGNA, N. E. 2005. Genetic and biochemical analysis of common wheat cultivars lacking puroindoline a. *Theoretical and Applied Genetics,* 110**,** 470-478.

GIROUX, M. J. & MORRIS, C. F. 1998. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 95**,** 6262-6266.

GOESAERT, H., SLADE, L., LEVINE, H. & DELCOUR, J. A. 2009. Amylases and bread firming – an integrated view. *Journal of Cereal Science,* 50**,** 345-352.

GOLLAN, P., SMITH, K. & BHAVE, M. 2007. Gsp-1 genes comprise a multigene family in wheat that exhibits a unique combination of sequence diversity yet conservation. *Journal of Cereal Science,* 45**,** 184-198.

GRAY, J. A. & BEMILLER, J. N. 2003. Bread staling: Molecular basis and control. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,* 2**,** 1-21.

GREENBLATT, G. A., BETTGE, A. D. & MORRIS, C. F. 1995. Relationship between endosperm texture and the occurrence of friabilin and bound polar lipids on wheat starch. *Cereal Chemistry* 72**,** 172-176.

GREENWELL, P. & SCHOFIELD, J. D. 1986. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal Chemistry,* 63**,** 379-380.

GUPTA, R. B., KHAN, K. & MACRITCHIE, F. 1993. Biochemical basis of flour properties in bread wheats. I. Effects of variation in quantity and size distribution of polymeric protein. *Journal of Cereal Science,* 18**,** 23-41.

HACKENBERG, S., VERHEYEN, C., JEKLE, M. & BECKER, T. 2017. Effect of mechanically modified wheat flour on dough fermentation properties and bread quality. *European Food Research and Technology,* 243**,** 287-296.

HESSE, M., MEIER, H. & ZEEH, B. 2005. *Spektroskopisehe Methoden in der organischen Chemie,* Stuttgart, G. Thieme Verlag.

HUANG, Z.-Q., LU, J.-P., LI, X.-H. & TONG, Z.-F. 2007. Effect of mechanical activation on physico-chemical properties and structure of cassava starch. *Carbohydrate Polymers,* 68**,** 128-135.

HUEN, J., BÖRSMANN, J., MATULLAT, I., BÖHM, L., STUKENBORG, F., HEITMANN, M., ZANNINI, E. & ARENDT, E. K. 2018. Wheat flour quality evaluation from the baker's perspective: comparative assessment of 18 analytical methods. *European Food Research and Technology,* 244**,** 535-545.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR CEREAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 1976. ICC-Standard Nr. 110/1: Determination of the Moisture Content of Cereals and Cereal Products (Practical method).

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR CEREAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 1990. ICC-Standard Nr. 104/1: Determination of Ash in Cereals and Cereal Products.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR CEREAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 1992. ICC-Standard Nr. 115/1: Method for using the Brabender farinograph.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR CEREAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 1994a. ICC-Standard Nr. 105/2: Determination of crude protein in cereals and cereal products for food and for feed.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR CEREAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 1994b. ICC-Standard Nr. 137/1: Mechanical determination of the wet gluten content of wheat flour (Perten Glutomatic).

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR CEREAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 2000. ICC-Standard Nr. 167: Determination of crude protein in grain and grain products for food and feed by the Dumas Combustion Principle.

JAKOB, E., SIEVERT, C., SOMMER, S. & PUHAN, Z. 1995. Automated determination of total nitrogen in milk by the Dumas method. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung,* 200**,** 239-43.

JOLLY, C. J., RAHMAN, S., KORTT, A. A. & HIGGINS, T. J. 1993. Characterisation of the wheat Mr 15000 "grain-softness protein" and analysis of the relationship between its accumulation in the whole seed and grain softness. *Theoretical and Applied Genetics,* 86**,** 589-597.

JPT PEPTIDE TECHNOLOGIES GMBH. *Isotope Labeled Peptides* [Online]. Berlin: JPT Peptide Technologies GmbH. Available: https://www.jpt.com/products/isotope-labeled-peptides/ [Accessed Juli 2018].

KASARDA, D. D., WOODARD, K. M. & ADALSTEINS, A. E. 1998. Resolution of high molecular weight glutenin subunits by a new SDS-PAGE system incorporating a neutral pH buffer. *Cereal Chemistry,* 75**,** 70-71.

KELLER, S. 2002. Dem Mehl auf der Spur. *In:* MEISTERMARKEN - ULMER SPATZ (ed.). Bingen am Rhein.

KIEFFER, R. & BELITZ, H.-D. 1993. Erhitzen von Weizen. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung,* 196**,** 441-445.

KIEFFER, R., KIM, J.-J. & BELITZ, H.-D. 1981. Zugversuche mit Weizenkleber im Mikromaßstab. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung,* 172**,** 190-192.

KIEFFER, R., SCHURER, F., KOEHLER, P. & WIESER, H. 2007. Effect of hydrostatic pressure and temperature on the chemical and functional properties of wheat gluten: Studies on gluten, gliadin and glutenin. *Journal of Cereal Science,* 45**,** 285-292.

KIEFFER, R., WIESER, H., HENDERSON, M. H. & GRAVELAND, A. 1998. Correlations of the breadmaking performance of wheat flour with rheological measurements on a micro-scale. *Journal of Cereal Science,* 27**,** 53-60.

KIRSCH, B. & ODENTHAL, A. 2008. *Fachkunde Müllereitechnologie - Werkstoffkunde : ein Lehrbuch über die Zusammensetzung, Untersuchung, Bewertung und Verwendung von Getreide und Getreideprodukten,* München, Bayerischer Müllerbund e.V.

KLINGLER, R. W., MEUSER, F. & NIEDIEK, E. A. 1986. Einfluß der Art der Energieübertragung auf strukturelle und funktionelle Merkmale von Stärke. *Starch - Stärke,* 38**,** 40-44.

KOEHLER, P., BELITZ, H.-D. & WIESER, H. 1991. Disulphide bonds in wheat gluten: isolation of a cystine peptid. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung,* 3**,** 234-239.

KOEHLER, P., BELITZ, H.-D. & WIESER, H. 1993. Disulphide bonds in wheat gluten: further cystine peptides from (HMW) and low molecular weight (LMW) subunits of glutenin and from γ-gliadins. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung,* 3**,** 239-247.

KOEHLER, P. & GROSCH, W. 1999. Study of the effect of DATEM. 1. Influence of fatty acid chain length on rheology and baking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 47**,** 1863-1869.

KOEHLER, P. & WIESER, H. 2013. Chemistry of cereal grains. *In:* GOBETTI, M. & GÄNZLE, M. (eds.) *Handbook on sourdough biotechnology.* New York: Springer-Verlag.

KRAUSE, I., MÜLLER, U. & BELITZ, H.-D. 1988. Charakterisierung von Weizensorten durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und zweidimensionale Elektrophorese (2D-PAGE) der Glutenine. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung,* 186**,** 398-406.

LAGRAIN, B., BRUNNBAUER, M., ROMBOUTS, I. & KOEHLER, P. 2013. Identification of intact high molecular weight glutenin subunits from the wheat proteome using combined liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *PLOS ONE,* 8**,** e58682.

LAGRAIN, B., THEWISSEN, B. G., BRIJS, K. & DELCOUR, J. A. 2008. Mechanism of gliadin–glutenin cross-linking during hydrothermal treatment. *Food Chemistry,* 107**,** 753-760.

LANGE, A. & BODE, J. 2003. Neues für Müller und Bäcker: Die Attritionsbehandlung. *Mühle+Mischfutter,* 140**,** 1-8.

LI, E., DHITAL, S. & HASJIM, J. 2014. Effects of grain milling on starch structures and flour/starch properties. *Starch - Stärke,* 66**,** 15-27.

LILLEMO, M. & MORRIS, C. F. 2000. A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe. *Theoretical and Applied Genetics,* 100**,** 1100-1107.

LIN, P. Y. & CZUCHAJOWSKA, Z. 1996. Starch damage in soft wheats of the Pacific Northwest. *Carbohydrates,* 73**,** 551-555.

LINDHAUER, M. G. 2003. Grundlagen Weizenmahlerzeugnisse. *In:* FREUND, W. (ed.) *Handbuch Backwaren Technologie.* Hamburg: Behr´s.

LIU, T. Y., MA, Y., YU, S. F., SHI, J. & XUE, S. 2011. The effect of ball milling treatment on structure and porosity of maize starch granule. *Innovative Food Science & Emerging Technologies,* 12**,** 586-593.

LONGIN, C. F. H., ZIEGLER, J., SCHWEIGGERT, R., KOEHLER, P., CARLE, R. & WÜRSCHUM, T. 2016. Comparative study of hulled (einkorn, emmer and spelt) and naked wheats (durum and bread wheat): Agronomic performance and quality traits. *Crop Science Abstract - Plant Genetic Resources,* 56**,** 302-311.

LOTTSPEICH, F. & ENGELS, J. W. 2012. *Bioanalytik,* Berlin, Springer Spektrum.

LU, Z. & SEETHARAMAN, K. 2014. Suitability of Ontario-grown hard and soft wheat flour blends for noodle making. *Cereal Chemistry,* 91**,** 482-488.

LUO, D., LIANG, X., XU, B., KOU, X., LI, P., HAN, S., LIU, J. & ZHOU, L. 2017. Effect of inulin with different degree of polymerization on plain wheat dough rheology and the quality of steamed bread. *Journal of Cereal Science,* 75**,** 205-212.

MALEGORI, C., GRASSI, S., OHM, J.-B., ANDERSON, J. & MARTI, A. 2018. GlutoPeak profile analysis for wheat classification: Skipping the refinement process. *Journal of Cereal Science,* 79**,** 73-79.

MANLEY, D., PAREYT, B. & DELCOUR, J. A. 2011. Wheat flour and vital wheat gluten as biscuit ingredients. *Manley's Technology of Biscuits, Crackers and Cookies.* Cambridge, UK: Woodhead Publishing.

MARTI, A., AUGST, E., COX, S. & KOEHLER, P. 2015. Correlations between gluten aggregation properties defined by the GlutoPeak test and content of quality-related protein fractions of winter wheat flour. *Journal of Cereal Science,* 66**,** 89-95.

MARTIN, J. M., FROHBERG, R. C., MORRIS, C. F., E TALBERT, L. & GIROUX, M. J. 2001. Milling and bread baking traits associated with puroindoline sequence type in hard red spring wheat. *Crop Science* 41**,** 228-234.

MEUSER, F., KUTSCHBACH, A., KIEFFER, R., WIESER, H. & SCHIEBERLE, P. 2002. Investigation of the effect of hot air drying of wheat gluten on its viscoelasticity and baking performance by a systems analytical model. *Cereal Chemistry,* 79**,** 617-623.

MEUSER, F., RAJANI, C. & JURETKO, A. 1977. Zur Problematik der mechanischen Trennung des Weizenendosperms in Stärke und Protein. *Getreide Mehl und Brot,* 8**,** 199-204.

MEUSER, F., W. KLINGLER, R. & A. NIEDIEK, E. 1978. Charakterisierung mechanisch modifizierter Stärke. *Starch - Starke* 30**,** 376-384.

MOHLER, V., SCHMOLKE, M., PALADEY, E., SELING, S. & HARTL, L. 2012. Association analysis of Puroindoline-D1 and Puroindoline b-2 loci with 13 quality traits in European winter wheat (Triticum aestivum L.). *Journal of Cereal Science,* 56**,** 623-628.

MOONEN, J. H. E., SCHEEPSTRA, A. & GRAVELAND, A. 1982. Use of the SDS-sedimentation test and SDS-polyacrylamidegel electrophoresis for screening breeder's samples of wheat for bread-making quality. *Euphytica,* 31**,** 677-690.

MORRIS, C. F. 2002. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Molecular Biology,* 48**,** 633-647.

MORRIS, C. F., GREENBLATT, G. A., BETTGE, A. D. & MALKAWI, H. I. 1994. Isolation and characterization of multiple forms of friabilin. *Journal of Cereal Science,* 20**,** 167-174.

MORRISON, W. R., TESTER, R. F. & GIDLEY, M. J. 1994. Properties of damaged starch granules. II. Crystallinity, molecular order and gelatinisation of ball-milled starches. *Journal of Cereal Science,* 19**,** 209-217.

MUELLER, E. 2016. *Backqualität von Weizenmehl – Funktionelle Untersuchungen und stoffliche Ursachen.* Dissertation, Technische Universität München.

MUELLER, U. & SCHNEEWEIß, V. 2001. Optimierung funktioneller Eigenschaften von Mehlen, Optimierte Mehle – Teil 1. *Brot und Backwaren,* 11**,** 30-32.

MÜLLER, T. & WINTER, D. 2017. Systematic evaluation of protein reduction and alkylation reveals massive unspecific side effects by iodine-containing reagents. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP,* 16**,** 1173-1187.

NOWAKOWSKI, D., SOSULSKI, F. W. & HOOVER, R. 1986. The effect of pin and attrition milling on starch damage in hard wheat flours. *Starch - Stärke,* 38**,** 253-258.

ODA, S. & SCHOFIELD, J. D. 1997. Characterisation of friabilin polypeptides. *Journal of Cereal Science,* 26**,** 29-36.

OSBORNE, T. B. 1907. *The proteins of the wheat kernel,* Washington, D.C., Carnegie institution of Washington.

PAULY, A., PAREYT, B., DE BRIER, N. & DELCOUR, J. A. 2014. Incubation of isolated wheat starch with proteolytic or lipolytic enzymes and different extraction media reveals a tight interaction between puroindolines and lipids at its granule surface. *Cereal Chemistry,* 91**,** 240-246.

PAULY, A., PAREYT, B., DE BRIER, N., FIERENS, E. & DELCOUR, J. A. 2012. Starch isolation method impacts soft wheat (Triticum aestivum L. cv. Claire) starch puroindoline and lipid levels as well as its functional properties. *Journal of Cereal Science,* 56**,** 464-469.

PAULY, A., PAREYT, B., FIERENS, E. & DELCOUR, J. A. 2013a. Wheat (Triticum aestivum L. and T. turgidum L. ssp. durum) kernel hardness: I. Current view on the role of puroindolines and polar lipids. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,* 12**,** 413-426.

PAULY, A., PAREYT, B., LAMBRECHT, M. A., FIERENS, E. & DELCOUR, J. A. 2013b. Flour from wheat cultivars of varying hardness produces semi-sweet biscuits with varying textural and structural properties. *LWT - Food Science and Technology,* 53**,** 452-457.

PELSHENKE, P. F., SEIBEL, W. & ZWINGELBERG, H. 1961. Zerkleinerung, Windsichtung und Stärkebeschädigung. *Die Mühle,* 28**,** 573-578.

PERSAUD, J. N., FAUBION, J. M. & PONTE JR, J. G. 1990. Dynamic rheological properties of bread crumb. *Cereal Chemistry,* 67**,** 92-96.

POMERANZ, Y. 1988. *Wheat chemistry and technology,* St. Paul, MN, American Association of Cereal Chemists.

POSNER, E. S. 2009. Wheat flour milling. *In:* KHAN, K. & SHEWRY, P. R. (eds.) *Wheat: chemistry and technology.* St. Paul, MN: AACC International.

PRABHASANKAR, P. & HARIDAS RAO, P. 2001. Effect of different milling methods on chemical composition of whole wheat flour. *European Food Research and Technology,* 213**,** 465-469.

RETSCH GMBH. 2016. *Ultra-Zentrifugalmühle ZM 200* [Online]. Haan. Available: https://www.retsch.de/de/produkte/zerkleinern/rotormuehlen/zm-200/funktion-merkmale/ [Accessed February 2018].

RETSCH GMBH. 2017a. *CryoMill* [Online]. Haan. Available: https://www.retsch.de/de/produkte/zerkleinern/kugelmuehlen/schwingmuehle-cryomill/funktion-merkmale/ [Accessed February 2018].

RETSCH GMBH. 2017b. *Planeten-Kugelmühle PM 100* [Online]. Haan. Available: https://www.retsch.de/de/produkte/zerkleinern/kugelmuehlen/planeten-kugelmuehle-pm-100/funktion-merkmale/ [Accessed February 2008].

RIBOTTA, P., CUFFINI, S., LEÓN, A. & AÑÓN, M. 2004. The staling of bread: An X-ray diffraction study. *European Food Research and Technology,* 218**,** 219-223.

ROA, D. F., BAEZA, R. I. & TOLABA, M. P. 2015. Effect of ball milling energy on rheological and thermal properties of amaranth flour. *Journal of Food Science and Technology,* 52**,** 8389-94.

ROEPSTORFF, P. & FOHLMAN, J. 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical Mass Spectrometry,* 11**,** 601.

ROMBOUTS, I., LAGRAIN, B., BRUNNBAUER, M., DELCOUR, J. A. & KOEHLER, P. 2013. Improved identification of wheat gluten proteins through alkylation of cysteine residues and peptide-based mass spectrometry. *Scientific Reports,* 3**,** 2279.

ROSELL, C. M., ROJAS, J. A. & BENEDITO DE BARBER, C. 2001. Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloids,* 15**,** 75-81.

SCHÄFER, W. 1985. *Das Getreide - Eine Waren und Sortenkunde,* Hannover, Alfred Strothe Verlag.

SCHERF, K. A. & KOEHLER, P. 2018. Optimization of micro-scale extension tests for wheat dough and wet gluten. *Journal of Cereal Science,* 79**,** 477-485.

SCHERF, K. A., UMSEHER, L., KIEFFER, R. & KOEHLER, P. 2016. Optimization of a micro-scale extension test for rehydrated vital wheat gluten. *Journal of Cereal Science,* 68**,** 140-147.

SCHNATBAUM, K., ZOLG, D., WENSCHUH, H. & REIMER, U. 2016. Fast and accurate determination of cysteine reduction and alkylation efficacy in proteomics workflows. *In:* JPT PEPTIDE TECHNOLOGIES (ed.). Berlin.

SCHUFFENHAUER, A., MAIER, M., HERBERT, G. & SUTOR, P. 2012. Auswirkungen internationaler Märkte auf die bayerische Land- und Ernährungswirtschaft - Weizen Freising: Institut für Ernährung und Markt.

SCHÜNEMANN, C. & TREU, G. 2002. *Technologie der Backwarenherstellung,* Alfeld/Leine, Gildebuchverlag GmbH.

SELING, S. 2010. Bedeutung des Proteingehaltes von Backweizen aus Sicht der Wissenschaft. *Getreidetechnologie,* 64**,** 103-110.

SELMAIR, P. L. & KOEHLER, P. 2008. Baking performance of synthetic glycolipids in comparison to commercial surfactants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 56**,** 6691-700.

SHEWRY, P. R., TATHAM, A. S., FORDE, J., KREIS, M. & MIFLIN, B. J. 1986. The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *Journal of Cereal Science,* 4**,** 97-106.

SIMEONE, M. & LAFIANDRA, D. 2005. Isolation and characterisation of friabilin genes in rye. *Journal of Cereal Science,* 41**,** 115-122.

SINGH, K. K. & GOSWAMI, T. K. 1999. Design of a cryogenic grinding system for spices. *Journal of Food Engineering,* 39**,** 359-368.

SOUCI, S. W., FACHMANN, W. & KRAUT, H. 2016. *Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen* Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

STARK, J. R. & YIN, X. S. 1986. The effect of physical damage on large and small barley starch granules *Starch - Stärke,* 38**,** 369-374.

STEVENS, J. & EVERS, A. D. 1983. Der Mechanismus der Stärkebeschädigung. *Getreide, Mehl und Brot,* 37**,** 101-106.

SYMES, K. J. 1965. The inheritance of grain hardness in wheat as measured by the particle size index. *Australian Journal of Agricultural Research* 16**,** 113-123.

TAMAKI, S., HISAMATSU, M., TERANISHI, K. & YAMADA, T. 1997. Structural change of potato starch granules by ball-milling treatment. *Starch - Stärke,* 49**,** 431-438.

TAN, S. L. & MORRISON, W. R. 1979. The distribution of lipids in the germ, endosperm, pericarp and tip cap of amylomaize, LG-11 hybrid maize and waxy maize. *Journal of the American Oil Chemists' Society,* 56**,** 531-535.

TANCHAK, M. A., SCHERNTHANER, J. P., GIBAND, M. & ALTOSAAR, I. 1998. Tryptophanins: isolation and molecular characterization of oat cDNA clones encoding proteins structurally related to puroindoline and wheat grain softness proteins. *Plant Science,* 137**,** 173-184.

TATHAM, A. S. & SHEWRY, P. R. 1985. The conformation of wheat gluten proteins. The secondary structures and thermal stabilities of α-, β-, γ- and ω-Gliadins. *Journal of Cereal Science,* 3**,** 103-113.

TESTER, R. F., MORRISON, W. R., GIDLEY, M. J., KIRKLAND, M. & KARKALAS, J. 1994. Properties of damaged starch granules: III. Microscopy and particle size analysis of undamaged granules and remnants. *Journal of Cereal Science,* 20**,** 59-67.

THANHAEUSER, S. M., WIESER, H. & KOEHLER, P. 2014. Correlation of quality parameters with baking performance of wheat flours. *Cereal Chemistry,* 91**,** 333-341.

TOSI, P. 2012. Trafficking and deposition of prolamins in wheat. *Journal of Cereal Science,* 56**,** 81-90.

TRAN, T. T., SHELAT, K., TANG, D., LI, E., GILBERT, R. G. & HASJIM, J. 2011. Milling of rice grains. The degradation on three structural levels of starch in rice flour can be independently controlled during grinding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59**,** 3964-3973.

TRANQUILLI, G., HEATON, J., CHICAIZA, O. & DUBCOVSKY, J. 2002. Substitutions and deletions of genes related to grain hardness in wheat and their effect on grain texture. *Crop Science,* 42**,** 1812-1817.

TRANQUILLI, G., LIJAVETZKY, D., MUZZI, G. & DUBCOVSKY, J. 1999. Genetic and physical characterization of grain texture-related loci in diploid wheat. *Molecular and General Genetics,* 262**,** 846-850.

TSCHEUSCHNER, H.-D. 2017. *Grundzüge der Lebensmitteltechnik,* Hamburg, Behr's.

TURNBULL, K. M. & RAHMAN, S. 2002. Endosperm Texture in Wheat. *Journal of Cereal Science,* 36**,** 327-337.

TURUSPEKOV, Y., BEECHER, B., DARLINGTON, Y., BOWMAN, J., BLAKE, T. & GIROUX, M. J. 2008. Hardness locus sequence variation and endosperm texture in spring barley. *Crop Science,* 48**,** 1007-1019.

UNIPROT KNOWLEDGEBASE. 2017a. P33432 (PUIA_WHEAT). Available: http://www.uniprot.org/uniprot/P33432

UNIPROT KNOWLEDGEBASE. 2017b. Q10464 (PUIB_WHEAT). Available: http://www.uniprot.org/uniprot/Q10464

UNIPROT KNOWLEDGEBASE. 2017c. UniProtKB. Available: http://www.uniprot.org/

VAN ECKERT, R., BERGHOFER, E., CICLITIRA, P. J., CHIRDO, F., DENERY-PAPINI, S., ELLIS, H. J., FERRANTI, P., GOODWIN, P., IMMER, U., MAMONE, G., MÉNDEZ, E., MOTHES, T., NOVALIN, S., OSMAN, A., RUMBO, M., STERN, M., THORELL, L., WHIM, A. & WIESER, H. 2006. Towards a new gliadin reference material–isolation and characterisation. *Journal of Cereal Science,* 43**,** 331-341.

VAN LONKHUIJSEN, H. J., HAMER, R. J. & SCHREUDER, C. 1992. Influence of specific gliadins on the breadmaking quality of wheat. *Cereal Chemistry,* 69**,** 174-177.

VOGELGESANG, J. & HÄDRICH, J. 1998. Limits of detection, identification and determination: a statistical approach for practitioners. *Accreditation and Quality Assurance,* 3**,** 242-255.

WEEGELS, P., DE GROOT, A., VERHOEK, J. & HAMER, R. 1994a. Effects on gluten of heating at different moisture contents. II. Changes in Physico-Chemical Properties and Secondary Structure. *Journal of Cereal Science,* 19**,** 39-47.

WEEGELS, P., HAMER, R. & SCHOFIELD, J. 1996a. Functional properties of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science,* 23**,** 1-18.

WEEGELS, P. L., VAN DE PIJPEKAMP, A. M., GRAVELAND, A., HAMER, R. J. & SCHOFIELD, J. D. 1996b. Depolymerisation and re-polymerisation of wheat glutenin during dough processing: I. Relationships between glutenin macropolymer content and quality parameters. *Journal of Cereal Science,* 23**,** 103-111.

WEEGELS, P. L., VERHOEK, J. A., DE GROOT, A. M. G. & HAMER, R. J. 1994b. Effects on gluten of heating at different moisture contents. I. Changes in functional properties. *Journal of Cereal Science,* 19**,** 31-38.

WIESER, H. 1993. Quantifizierung der Kleberprotein-Untergruppen in Weizenmehl. *Bericht der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie.* München.

WIESER, H. 1998. Investigations on the extractability of gluten proteins from wheat bread in comparison with flour. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A,* 207**,** 128-132.

WIESER, H. 2001. *25 Jahre Getreideforschung an der DFA: 1975-1999,* Garching, Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie.

WIESER, H. 2012. The use of redox agents in breadmaking. *In:* CAUVAIN, S. P. (ed.) *Breadmaking - Improving Quality.* Cambridge: Woodhead Publishing.

WIESER, H., ANTES, S. & SEILMEIER, W. 1998. Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chemistry,* 75**,** 644-650.

WIESER, H. & KIEFFER, R. 2001. Correlations of the amount of gluten protein types to the technological properties of wheat flours determined on a micro-scale. *Journal of Cereal Science,* 34**,** 19-27.

WIESER, H. & KOEHLER, P. 2009. Is the calculation of the gluten content by multiplying the prolamin content by a factor of 2 valid? *European Food Research and Technology,* 229**,** 9-13.

WIESER, H., KOEHLER, P. & KONITZER, K. 2014. *Celiac Disease and Gluten: Multidisciplinary Challenges and Opportunities,* New York, Academic Press.

WILCZEK, M., BERTLING, J. & HINTEMANN, D. 2004. Optimised technologies for cryogenic grinding. *International Journal of Mineral Processing,* 74**,** 425-434.

WILDE, P., C. CLARK, D. & MARION, D. 1993. Influence of competitive adsorption of a lysopalmitoylphosphatidylcholine on the functional properties of puroindoline, a lipid-binding protein isolated from wheat flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 41**,** 1570-1576.

WILLIAMS, P., LINDHAUER, M. G., POMS, R. E., WEHLING, R. L., BERGTHALLER, W. & GAINES, C. S. 2008. The joint AACC international-ICC methods harmonization project. *Cereal foods world,* 53**,** 99-102.

WINOPAL, R. A. 2009. Untersuchung der Frischhaltung von Brot mittels des Texture Analysers TA.XTplus und der Texture Profile Analyse. Elze: Winopal Forschungsbedarf GmbH.

YOCUM, A. K. & CHINNAIYAN, A. M. 2009. Current affairs in quantitative targeted proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic,* 8**,** 145-157.

YOUNG, L. S. 2012. Applications of texture analysis to dough and bread. *Bread-making: Improving Quality.* Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

ZWINGELBERG, H. 1998. Prallzerkleinerung und Windsichtung integriert in ein Vermahlungssystem *Getreide Mehl und Brot,* 1**,** 18-23.

7 Anhang

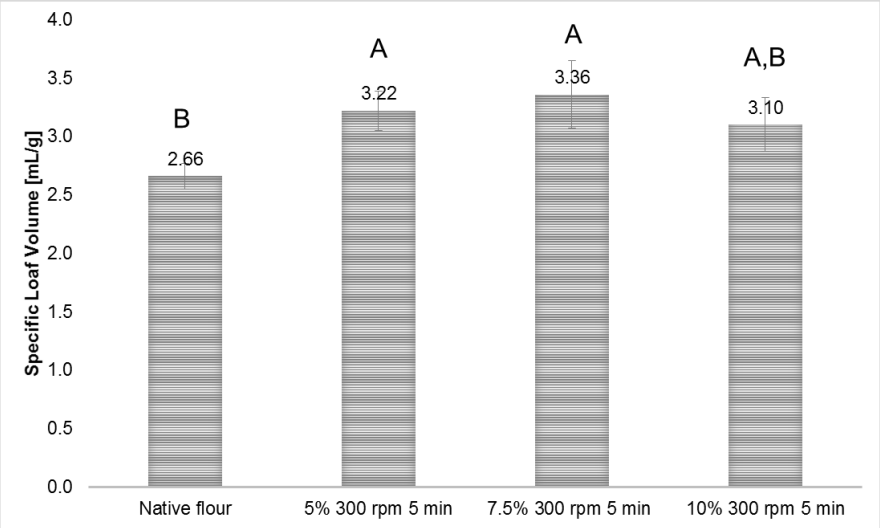


Abbildung 71: Spezifische Volumen von 50 g-Broten aus Weizenmehlmischungen, hergestellt mittels MBT, bestimmt mittels VolScan Profiler, Zusatz von 5, 7.5 und 10 % Mehl cv. Akteur (KM-modifiziert, 300 rpm, 5 min)

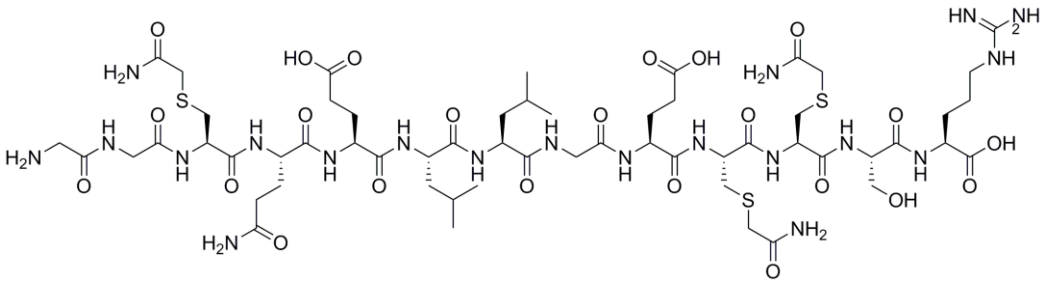


Abbildung 72: Strukturformel von Peptid PINA-1 (GGC*QELLGEC*C*SR), *C = Carbamidomethylierung

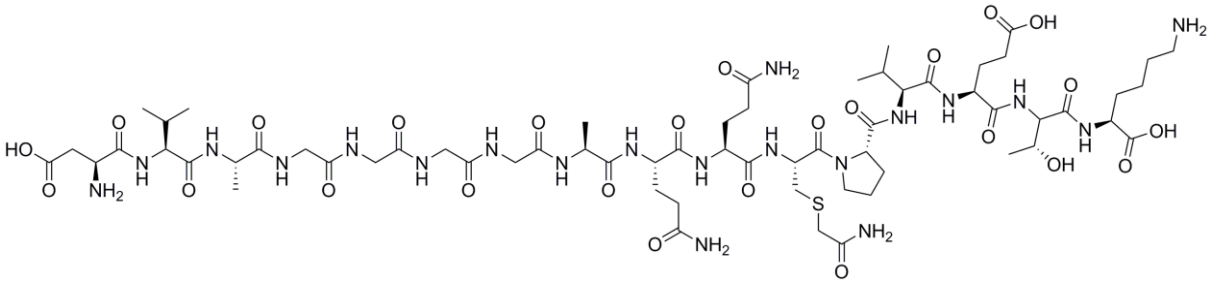


Abbildung 73: Strukturformel von Peptid PINA-2 (DVAGGGGAQQC*PVETK), *C = Carbamidomethylierung

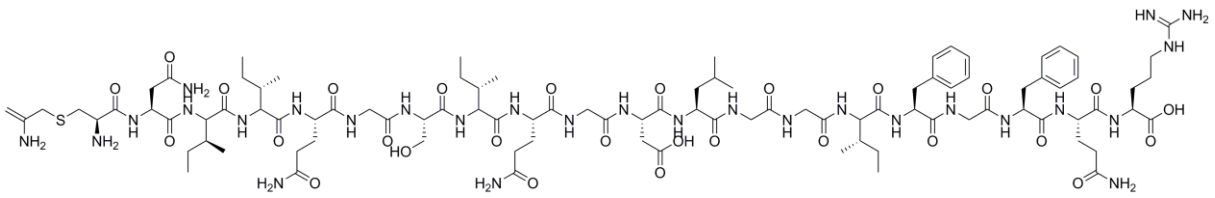


Abbildung 74: Strukturformel von Peptid PINA-3 (C*NIIQGSIQGDLGGIFGFQR), *C= Carbamidomethylierung

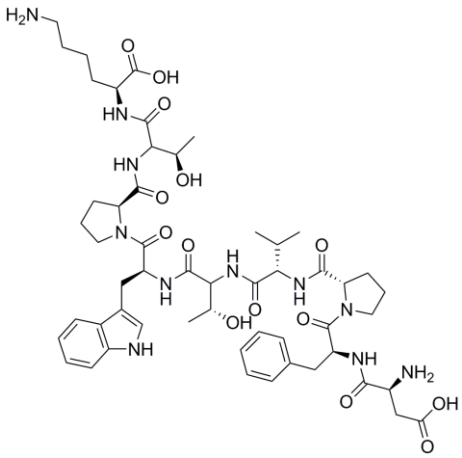


Abbildung 75: Strukturformel von Peptid PINB-1 (DFPVTWPTK)

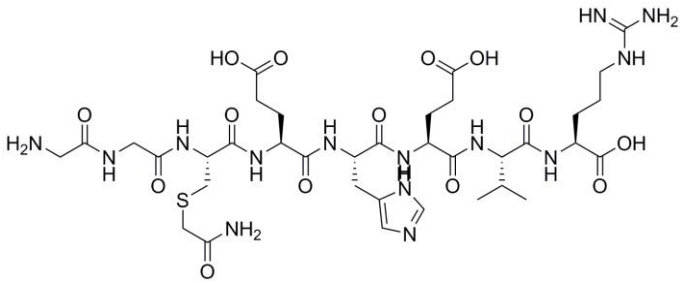


Abbildung 76: Strukturformel von Peptid PINB-2 (GGC*EHEVR), *C = Carbamidomethylierung

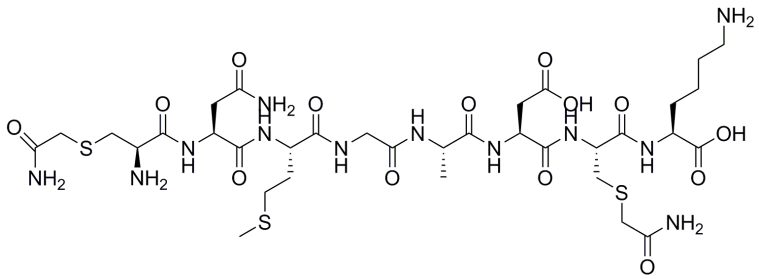


Abbildung 77: Strukturformel von Peptid PINB-3 (C*NMGADC*K), *C = Carbamidomethylierung