



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Proteinspektren von Gerste mit HPLC als Grundlage zur  
Bestimmung und Erklärung von ernährungsphysiologischen  
und technologischen Eigenschaften

Verfasserin

Stephanie Kirchmayr

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 0507866

Studienrichtung lt. Studienblatt: Ernährungswissenschaften

Betreuer: Ao. Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. Emmerich BERGHOFER



## **Vorwort**

Die vorliegende Diplomarbeit wurde im Rahmen eines dreijährigen Projektes über die Speicherproteine verschiedener Getreidesorten in der österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit am Institut für Sortenwesen/Abteilung für Technologische Wertprüfung durchgeführt. Im Laufe des zweiten Projektjahres begann ich mit meiner Diplomandentätigkeit.

Durch die Zusammenarbeit zwischen AGES und der Universität für Bodenkultur, Department für Lebensmittelwissenschaften und –technologie/Abteilung Lebensmitteltechnologie konnte diese Arbeit verwirklicht werden.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Erarbeitung dieser Diplomarbeit geholfen haben. Für die Betreuung und die Möglichkeit meine Diplomarbeit am Department für Lebensmittelwissenschaft und -technologie durchführen zu können, möchte ich in erster Linie Herrn Ao. Univ. Prof. Dipl.-Ing. Dr. Emmerich Berghofer danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Ing. Dr. Manfred Werteker für die kompetente Betreuung und Hilfestellung.

Auch bei meiner Familie, meinem Freund, meinen Studienkolleginnen und allen, die mir während meines Studiums zur Seite gestanden sind, möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung .....	1
2	Literatur .....	2
2.1	Getreide.....	2
2.2	Gerste (Hordeum vulgare) .....	2
2.2.1	Gerstenformen.....	3
2.2.2	Braugerste.....	3
2.2.3	Bierherstellung und Mälzung.....	6
2.2.4	Inhaltsstoffe der Gerste .....	7
2.3	Einfluss der Getreidespeicherproteine auf die technologischen Eigenschaften	9
2.3.1	Proteinfractionen.....	11
2.3.2	Qualitätsmerkmale .....	12
2.4	Gesundheitsrelevante Einflüsse der Getreidespeicherproteine.....	14
2.5	Analytik.....	17
3	Aufgabenstellung.....	18
4	Material und Methoden .....	19
4.1	Verwendete Rohstoffe .....	19
4.1.1	Kleinmälzung.....	20
4.1.2	$\alpha$ -Amylaseaktivität .....	20
4.1.3	ELISA-Test.....	20
4.2	Analytische Methoden .....	20
4.2.1	Extraktion von Gerstenproben .....	20
4.2.2	HPLC – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	25
4.2.3	Auswertung der Chromatogramme.....	27
4.2.4	Qualitätsparameter der Braugerste .....	31
4.2.5	$\alpha$ -Amylaseaktivität .....	35
4.2.6	ELISA.....	37
4.3	Statistische Methode .....	41
5	Versuchsdurchführung .....	44
5.1	Trennung der Speicherproteine der Gerste in Fraktionen .....	44
5.2	Charakterisierung der Proteine hinsichtlich ihrer technologischen Einflüsse ..	44
5.3	Statistische Methoden .....	44

5.4	Beobachtung technologisch relevanter Proteine während des Mälzungsprozesses.....	44
5.5	Charakterisierung der Proteine hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität.....	45
5.6	Charakterisierung der Proteine hinsichtlich ihrer immunologischen Eigenschaften gegenüber dem R5 Antikörper .....	45
6	Ergebnisse und Diskussion .....	46
6.1	Ergebnisse der Proteinspektrenanalyse .....	46
6.1.1	Feinschrot-Extraktausbeute .....	46
6.1.2	Diastatische Kraft.....	56
6.1.3	Extrakt Differenz .....	66
6.1.4	Löslicher Stickstoff und Kolbachzahl .....	73
6.2	Mälzung.....	82
6.2.1	Feinschrot-Extraktausbeute .....	87
6.2.2	Diastatische Kraft.....	88
6.3	Amylaseaktivität.....	88
6.3.1	Optimale Wellenlänge .....	88
6.3.2	Ergebnisse Amylaseaktivität.....	89
6.4	ELISA.....	91
7	Schlussfolgerungen.....	96
8	Zusammenfassung.....	100
9	Summary.....	101
10	Literaturverzeichnis.....	102
	Anhang.....	109

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Chemische Zusammensetzung der Getreidearten [Gew.-%].....	8
Tabelle 2: Einteilung Osborne-Fraktionen .....	9
Tabelle 3: b-Koeffizienten: Feinschrotextrakt .....	49
Tabelle 4: b-Koeffizienten: Diastatische Kraft .....	58
Tabelle 5: b-Koeffizienten: Löslicher Stickstoff.....	75
Tabelle 6: Amylaseaktivität: unterschiedliche Konzentrationen .....	89
Tabelle 7: ELISA-Test: Messung Standards .....	91
Tabelle 8: ELISA-Test: Messung Extinktion Hordein .....	93
Tabelle 9: ELISA-Test: Messung Extinktion Hordenin .....	94

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Ablauf der Bierherstellung .....	6
Abbildung 2: Bärenklau.....	19
Abbildung 3: Kaffeemühle .....	20
Abbildung 4: Probenvermahlung.....	22
Abbildung 5: Extraktion Albumine und Globuline .....	23
Abbildung 6: Extraktion Prolamine bzw. Hordeine .....	24
Abbildung 7: Extraktion Hordenine .....	25
Abbildung 8: Peaknummerierung 1-33: Albumin .....	28
Abbildung 9: Peaknummerierung 34-67: Hordein.....	29
Abbildung 10: Peaknummerierung 68-98: Hordenin .....	30
Abbildung 11: Kleinmälzungsanlage .....	34
Abbildung 12: Kleinmälzungsanlage bestückt mit Edelstahl-Behälter .....	34
Abbildung 13: Getreidereiniger .....	34
Abbildung 14: Gefriertrockner mit Vakuumpumpe.....	34
Abbildung 15: Fractovap, Vakuumschüttler, Vakuumpumpe .....	38
Abbildung 16: Kühlgerät .....	38
Abbildung 17: Probenvorbereitung für ELISA-Test.....	40
Abbildung 18: ELISA-Test Pipettierschema Kavitäten .....	41
Abbildung 19: Bsp. Auswertungsdiagramm .....	43
Abbildung 20: Versuchsdurchführung .....	45

Abbildung 21: Extraktausbeute, alle Fraktionen, alle Proben.....	50
Abbildung 22: Extraktausbeute, alle Fraktionen, 1. Teilprobenmenge .....	51
Abbildung 23: Extraktausbeute, alle Fraktionen, 2. Teilprobenmenge .....	51
Abbildung 24: Extraktausbeute, Albumine, alle Proben .....	52
Abbildung 25: Extraktausbeute, Albumine, 1. Teilprobenmenge .....	52
Abbildung 26: Extraktausbeute, Albumine, 2. Teilprobenmenge.....	53
Abbildung 27: Extraktausbeute, Hordeine, alle Proben.....	53
Abbildung 28: Extraktausbeute, Hordeine, 1. Teilprobenmenge.....	54
Abbildung 29: Extraktausbeute, Hordeine, 2. Teilprobenmenge.....	54
Abbildung 30: Extraktausbeute, Hordenine, alle Proben.....	55
Abbildung 31: Extraktausbeute, Hordenine, 1. Teilprobenmenge .....	55
Abbildung 32: Extraktausbeute, Hordenine, 2. Teilprobenmenge .....	56
Abbildung 33: Diastatische Kraft, alle Fraktionen, alle Proben.....	60
Abbildung 34: Diastatische Kraft, alle Fraktionen, 1. Teilprobenmenge .....	60
Abbildung 35: Diastatische Kraft, alle Fraktionen, 2. Teilprobenmenge .....	61
Abbildung 36: Diastatische Kraft, Albumine, alle Proben .....	61
Abbildung 37: Diastatische Kraft, Albumine, 1. Teilprobenmenge .....	62
Abbildung 38: Diastatische Kraft, Albumine, 2. Teilprobenmenge.....	62
Abbildung 39: Diastatische Kraft, Hordeine, alle Proben.....	63
Abbildung 40: Diastatische Kraft, Hordeine, 1. Teilprobenmenge.....	63
Abbildung 41: Diastatische Kraft, Hordeine, 2. Teilprobenmenge.....	64
Abbildung 42: Diastatische Kraft, Hordenine, alle Proben.....	64
Abbildung 43: Diastatische Kraft, Hordenine, 1. Teilprobenmenge .....	65
Abbildung 44: Diastatische Kraft, Hordenine, 2. Teilprobenmenge .....	65
Abbildung 45: Extraktdifferenz, alle Fraktionen, alle Proben .....	67
Abbildung 46: Extraktdifferenz, alle Fraktionen, 1. Teilprobenmenge .....	67
Abbildung 47: Extraktdifferenz, alle Fraktionen, 2. Teilprobenmenge.....	68
Abbildung 48: Extraktdifferenz, Albumine, alle Proben.....	68
Abbildung 49: Extraktdifferenz, Albumine, 1. Teilprobenmenge.....	69
Abbildung 50: Extraktdifferenz, Albumine, 2. Teilprobenmenge.....	69
Abbildung 51: Extraktdifferenz, Hordeine, alle Proben .....	70
Abbildung 52: Extraktdifferenz, Hordeine, 1. Teilprobenmenge .....	70

Abbildung 53: Extrakt Differenz, Hordeine, 2. Teilprobenmenge .....	71
Abbildung 54: Extrakt Differenz, Hordenine, alle Proben.....	71
Abbildung 55: Extrakt Differenz, Hordenine, 1. Teilprobenmenge .....	72
Abbildung 56: Extrakt Differenz, Hordenine, 2. Teilprobenmenge .....	72
Abbildung 57: Löslicher Stickstoff, alle Fraktionen, alle Proben .....	76
Abbildung 58: Löslicher Stickstoff, alle Fraktionen, 1. Teilprobenmenge .....	77
Abbildung 59: Löslicher Stickstoff, alle Fraktionen, 2. Teilprobenmenge .....	77
Abbildung 60: Löslicher Stickstoff, Albumine, alle Proben.....	78
Abbildung 61: Löslicher Stickstoff, Albumine, 1. Teilprobenmenge .....	78
Abbildung 62: Löslicher Stickstoff, Albumine, 2. Teilprobenmenge .....	79
Abbildung 63: Löslicher Stickstoff, Hordeine, alle Proben .....	79
Abbildung 64: Löslicher Stickstoff, Hordeine, 1. Teilprobenmenge .....	80
Abbildung 65: Löslicher Stickstoff, Hordeine, 2. Teilprobenmenge .....	80
Abbildung 66: Löslicher Stickstoff, Hordenine, alle Proben .....	81
Abbildung 67: Löslicher Stickstoff, Hordenine, 1. Teilprobenmenge .....	81
Abbildung 68: Löslicher Stickstoff, Hordenine, 2. Teilprobenmenge .....	82
Abbildung 69: Kleinmälzung: Gerste 0h .....	83
Abbildung 70: Kleinmälzung: Gerste 24h .....	83
Abbildung 71: Kleinmälzung: Gerste 48h .....	83
Abbildung 72: Kleinmälzung: Gerste 72h .....	83
Abbildung 73: Kleinmälzung: Gerste 96h .....	83
Abbildung 74: Kleinmälzung: Gerste 120h .....	83
Abbildung 75: Kleinmälzung: Gerste 164h .....	84
Abbildung 76: Kleinmälzung: Darrmalz.....	84
Abbildung 77: Mälzung Albumine.....	84
Abbildung 78: Mälzung Albumine: Gerste vs. Darrmalz.....	85
Abbildung 79: Mälzung Hordeine .....	85
Abbildung 80: Mälzung Hordeine: Gerste vs. Darrmalz .....	86
Abbildung 81: Mälzung Hordenine .....	86
Abbildung 82: Mälzung Hordenine: Gerste vs. Darrmalz .....	87
Abbildung 83: Amylaseaktivität: optimale Wellenlänge .....	88
Abbildung 84: Amylaseaktivität: Extinktion.....	90

Abbildung 85: Elutionssystem .....	90
Abbildung 86: ELISA-Test: Eichkurve Standards .....	92
Abbildung 87: ELISA-Test: messfertige Mikrotiterplatte Gerste .....	93
Abbildung 88: ELISA-Test: Messung Hordein .....	94
Abbildung 89: ELISA-Test: HPLC-Chromatogramm Hordein, Probe A.....	94
Abbildung 90: ELISA-Test: Messung Hordenin .....	95
Abbildung 91: ELISA-Test: HPLC-Chromatogramm Hordenin, Probe A .....	95
Abbildung 92: Gesamtproteinkonzentrationsänderung aller Fraktionen beim Mälzungsprozess .....	98

## 1 Einleitung

Getreide gehört seit Jahrtausenden zur Nahrungsgrundlage der Menschen. Es wurde zum wesentlichen Element des täglichen Lebens: Steuern und Tribute mussten in Form von Getreideabgaben entrichtet werden. Getreide war Maßeinheit und Zahlungsmittel. Noch heute trägt eine Reihe von Münzen das Bild von Getreideähren [BECKER, 1994]. An der zentralen Bedeutung des Getreides für den Menschen hat sich bis in unser Jahrhundert hinein kaum etwas geändert, es ist als Rohstoff für die Herstellung von Lebens- und Futtermitteln von besonderer Bedeutung. Dementsprechend wird Getreide auf etwa 60 % der Weltackerflächen angebaut [BELITZ et al., 2008].

In Europa ist Gerste, nach Weizen, die zweitwichtigste Getreideart [HEYLAND et al., 2008]. Das entwickeltste Anbauggebiet von Braugerste ist Mitteleuropa, wo der Gerstenanbau seit 150 Jahren systematisch betrieben wird. Europa ist mit ca. 90 Mio. t nicht nur der größte Gerstenproduzent der Welt, sondern darüber hinaus auch der Erdteil mit dem größten Braugerstenbedarf in Höhe von ca. 10 Mio. t [KUNZE, 2007].

Die Ziele der Braugerstenzüchtung sind neben der Verbesserung der agronomischen Eigenschaften, wie Resistenz-, Ertrags- und Qualitätseigenschaften, in erster Linie die gute Verarbeitbarkeit in Mälzerei und Brauerei sowie die Qualität der Inhaltsstoffe, die auf die Geschmacksstabilität und Zusammensetzung der Biere Einfluss nehmen. Die Malzqualität hat dabei einen entscheidenden Einfluss auf den Bierbereitungsprozess und letztendlich auf die Bierqualität. Der möglichst gleichmäßige und vollständige Abbau der Zellwände und das richtige Maß der Proteinlösung sind durch den Einsatz moderner Brauverfahren wichtige Aufgaben des Mälzers [GASTL, 2010].

Die Speicherproteine üben einen großen Einfluss aus auf technologische Eigenschaften der Gerste und des Gerstenmalzes, die sich positiv oder negativ auf die Malzqualität auswirken können. Des Weiteren geht von diesen Proteinen auch eine allergene Eigenschaft aus, weshalb Gerste und andere Getreidearten für einige Menschen nicht verträglich sind. Der Zusammensetzung und dem Gehalt der Gerstenproteine sollte somit mehr Beachtung geschenkt werden, um die Qualitätseigenschaften zu verbessern und die allergenen Proteinfraktionen zu identifizieren.

## 2 Literatur

### 2.1 Getreide

Es gibt verschiedene Getreidearten, wie Weizen, Roggen, Gerste, Hafer usw., die von der Wildform bestimmter Gräser (*Poaceae*) abstammen [BELITZ et al., 2008]. Die stärkereichen Samen dieser Pflanzen bilden die einzelnen Getreidearten. Die einzelnen Getreidearten und auch die dazugehörigen Sorten können durch Gel-Elektrophorese voneinander unterschieden werden [EBERMANN und ELMADFA, 2008].

Der Aufbau und das Aussehen der Körner verschiedener Getreidearten sind sehr ähnlich. Es können vier Grundbestandteile unterschieden werden: der Mehlkörper, der rund 80 % der Kornmasse ausmacht und in dem die Stärkekörner eingebettet sind [BECKER, 1994], die Aleuronschicht, die der wichtigste Ausgangspunkt für die Enzyymbildung beim Mälzen ist [KUNZE, 2007], der Keimling, aus dem eine neue Getreidepflanze entsteht und die Frucht- und Samenschale, die das Korn und den Keimling schützen soll [BECKER, 1994].

Die Körner fast aller Getreidearten sind von harten und zähen Spelzen umgeben, deren Spitzen nadelförmige Fortsätze, die Grannen, tragen [BECKER, 1994]. Die Spelzen bestehen im Wesentlichen aus Zellulose, in ihnen sind geringe Mengen von Stoffen eingelagert, die sich auf die Qualität des Bieres unangenehm auswirken können, u.a. Gerbstoffe und Bitterstoffe [KUNZE, 2007]. Bei Gerste, Hafer, Dinkel, Reis und Hirse bleiben die Spelzen mit der Fruchtschale des Korns fest verbunden und werden in einem gesonderten Schälvorgang sorgfältig abgetrennt, darüber hinaus gibt es einige Gersten und Haferarten, die nach dem Drusch frei von Spelzen sind (Nacktgerste, Nackthafer) [BECKER, 1994].

### 2.2 Gerste (*Hordeum vulgare*)

Gerste gehört botanisch gesehen zur Gattung *Hordeum* in die Familie der Süßgräser (*Poaceae*) [MacGREGOR und BHATTY, 1993] und ist auf dem Acker leicht von anderen Getreidearten, an ihren besonders langen Grannen, zu unterscheiden [BELITZ et al., 2008]. Gerste ist aufgrund ihrer geringen Ansprüche an Klima und Boden und wegen ihrer kurzen Wachstumszeit praktisch weltweit verbreitet [BECKER, 1994]. Ein Anbau ist auch in Ländern mit kurzen Sommern möglich [EBERMANN und ELMADFA, 2008].

Gerste wird hauptsächlich als Futtermittel (70 %) verwendet, ein Viertel der angebauten Gerste wird zu Braumalz verarbeitet. Der Rest wird als Saatgut oder für die Nahrungsindustrie verwendet [HEYLAND et al., 2008].

### 2.2.1 Gerstenformen

Bei der Gerste wird zwischen der Winterform (Wintergerste), die etwa Mitte September ausgesät wird, und der Sommerform (Sommergerste), die März bis April ausgesät wird, unterschieden. In beiden Formen gibt es Sorten, die nach der Anordnung ihrer Körner auf der Ährenspindel in zweizeilige und mehrzeilige unterteilt werden können [KUNZE, 2007]. Zweizeilige Gersten haben aufgrund des Fehlens der seitlichen Kornpositionen gleichmäßiger geformte [HEYLAND et al., 2008] und große dickbauchige Körner mit gewöhnlich dünner, fein gekräuselter Spelze. Damit hat diese Gerste verhältnismäßig mehr wertvolle Inhaltsstoffe und weniger Gerb- und Bitterstoffe. Die Körner sind alle sehr einheitlich, der Extraktgehalt ist vergleichsweise hoch. Die zweizeilige Gerste wird vorzugsweise als Sommergerste angebaut und vereinigt alle Vorzüge für die Malz- und Bierherstellung in sich [KUNZE, 2007]. Etwa 40 % der Sommergerste wird als Braugerste zur Deckung des österreichischen Eigenbedarfs benötigt [ÖSTERREICHISCHE BESCHREIBENDE SORTENLISTE, 2009] und soll einen Eiweißgehalt von unter 12% aufweisen [EBERMANN und ELMADFA, 2008].

Die Erträge von Wintergerste liegen jedoch mit etwa 70-80 dt/ha wesentlich höher als die Erträge von Sommergerste mit etwa 50 dt/ha, was natürlich auf die viel kürzere Vegetationszeit der Sommergerste (rd. 150 Tage gegenüber rd. 300 Tagen bei der Wintergerste) zurückzuführen ist [KUNZE, 2007].

### 2.2.2 Braugerste

Obwohl ein Großteil der Sommergerste als Futter Verwendung findet, wird die Züchtung von Braugerste wegen der höheren Wertschöpfung mit wesentlich höherer Intensität betrieben. Jährlich verarbeiten die österreichischen Mälzereien etwa 170.000 t Gerste. Neben Bonituren (Spelzenfeinheit usw.) werden zahlreiche physikalische und chemische Analysen zur Qualitätsermittlung der Gerste und des Malzes angewandt [ÖSTERREICHISCHE BESCHREIBENDE SORTENLISTE, 2009].

Bei der Sortenzüchtung legt man großen Wert auf verschiedene Qualitätsgesichtspunkte, wie Resistenz gegenüber Krankheiten und Schädlingen, gute Standfestigkeit, hohes Nährstoffausnutzungsvermögen, hoher Kornertrag, gute

Körnerform und -gestalt, gutes Wasseraufnahmevermögen und geringe Wasserempfindlichkeit, niedriger Eiweißgehalt, hohe Keimfähigkeit zum Zeitpunkt der Mälzungsreife, gutes Enzymbildungsvermögen, gutes Lösungsvermögen und hohe Extraktausbeute beim Mälzen [KUNZE, 2007]. Zur Beurteilung der letztgenannten Merkmale, der Malzqualität, bedienen sich die Braugerstenzüchter der Kleinvermälzung. Das wesentliche Ergebnis der Malzanalyse ist die Ermittlung des Malzextraktes. Daneben werden die Lösungseigenschaften des Malzes sowie spezielle Inhaltsstoffe bestimmt. Bei den Inhaltsstoffen wird vor allem die Enzymausstattung untersucht, welche für die Zellwand- und Eiweißlösungseigenschaften verantwortlich sind [HEYLAND et al., 2008].

Ausgewählte Qualitätsmerkmale von Braugerste: [ÖSTERREICHISCHE BESCHREIBENDE SORTENLISTE, 2009]

- Spelzenbeschaffenheit
- Keimfähigkeit: Mindestkeimfähigkeit von über 98 %, schlechte Keimfähigkeit mindert die Enzymbildung und verursacht Störungen im Mälzungsprozess
- Vollgerstenanteil: für Brauzwecke sollte er über 90 % liegen
- Ausputz: sollte 2 % nicht überschreiten
- Aufgeplatzte Körner: erhöhter Schimmelpilzbefall, überhöhte Wasseraufnahme und Keimschädigung, daraus resultieren inhomogene Malze und Probleme bei der Verarbeitung
- Rohprotein im Korn: Brautechnisch günstig sind 9,5-11,0 %, hohe Gehalte beeinträchtigen die Extraktausbeute, den Gärverlauf, die Filtrationseigenschaften, den Schaum und das Aroma des Bieres sowie dessen Haltbarkeit

Dem Brauprozess ist die Mälzung vorgeschaltet, dabei wird Getreide durch Weichen im Wasser zum Keimen gebracht. Stärke und Eiweiß werden in diesem Prozess zu Zucker und löslichen Eiweißverbindungen abgebaut. Das erhaltene Grünmalz wird durch Trocknen und Rösten in mehr oder weniger dunkles und aromareiches Darrmalz übergeführt. Der auf Trockenmasse bezogene Mälzungsverlust liegt bei 11-13% [BELITZ et al., 2008].

Ausgewählte Qualitätsmerkmale von Gerstenmalz: [ÖSTERREICHISCHE

## BESCHREIBENDE SORTENLISTE, 2009]

- Rohprotein im Malz: korrespondiert mit dem Korn-Proteingehalt, liegt um 0,3-0,4 % niedriger
- Feinschrot-Malzextraktgehalt: Der Feinschrotextraktgehalt gibt Auskunft über den Gehalt aller wasserlöslichen Bestandteile [HEYLAND et al., 2008]. Erwünscht sind 81% Extraktausbeute, ein höherer Anteil an vergärbarem Extrakt ergibt mehr Bier. Der Extraktgehalt wird im Wesentlichen von der Sorte, dem Proteingehalt und dem Vollgerstenanteil bestimmt.
- Mehl-Schrot-Differenz: Differenz zwischen Extraktgehalt von Feinschrotwürze und Grobschrotwürze, normale Werte liegen zwischen 0,8-2,0%
- Friabilimeterwert: ein Maß für die cytolytische Lösung (Zellwandlösung) des Malzes, erwünschte Werte von über 80 %
- Ganzglasigkeit: dieser Wert sollte gering sein
- Löslicher Stickstoff: gelöstes Protein in der Würze [HEYLAND et al., 2008], Werte zwischen 650-750 mg/100 g Malz
- Kolbachzahl: Verhältnis zwischen löslichem Stickstoff und Gesamtstickstoff [HEYLAND et al., 2008], Eiweißlösungsgrad im Bereich von 40-43 % optimal
- Viskosität: geringe Viskosität ist erwünscht, gute Malze ergeben Würzen mit Viskositäten zwischen 1,52 und 1,58 mPas. Beobachtet werden Viskositäten zwischen 1,48 und 1,75 mPas [NARZISS, 1999]
- Beta-Glucan-Gehalt: mindert die Filtrationsgeschwindigkeit im Brauprozess, Konzentration soll nicht über 200 mg/L Würze liegen
- Diastatische Kraft: v.a. die  $\beta$ -Amylaseaktivität wird gemessen
- VZ 45°C: Die Verhältniszahl gibt an, wie viel Prozent der höchstmöglichen Extraktausbeute bereits bei 45 °C erreicht werden und weist auf die enzymatische Aktivität aller Enzyme (Ausnahme:  $\alpha$ -Amylase) hin - erwünscht sind Werte von über 38 %.
- Endvergärungsgrad: ist ein Maß für die Güte des Extraktes und kennzeichnet den Anteil an vergärbarem Extrakt
- Würzefarbe: ist abhängig von der Gerstensorte, den Standorts- und Jahresbedingungen und dem Mälzungsverfahren

- Klarheit der Würze: erwünscht ist eine klare Würze (d.h. niedrige Ausprägungsstufe), wird photometrisch ermittelt

### 2.2.3 Bierherstellung und Mälzung

Bier wird vorwiegend aus Gerstenmalz, Hopfen, Hefe und Wasser hergestellt (Abb. 1). Neben Gerstenmalz spielen andere stärke- und/oder zuckerhaltige Rohstoffe eine Rolle, z.B. andere Malzarten (Weizenmalz), nicht gemälztes Getreide, auch als Rohfrucht bezeichnet (Gerste, Weizen, Mais, Reis, Stärkemehle, Stärkeabbauprodukte und Zucker). Ungemälzte Gerste enthält ca. dreimal so viele  $\beta$ -Glucane wie Gerstenmalz. Zur Senkung der Viskosität des Extraktes auf die bei Verwendung von Malz üblichen Werte ist deshalb ein Abbau mit  $\beta$ -Glucanasen erforderlich [BELITZ et al., 2008].

Gerste nimmt unter diesen Rohstoffen die erste Stelle ein. Sie ist beschreibbar durch einen mäßigen Eiweißgehalt (9-10 %), gute Keimfähigkeit (mindestens 95% der Körner), große Keimenergie und gutes Quellvermögen und enthält die für die Bierherstellung notwendige Stärke, die später im Sudhaus der Brauereien in vergärbare Extrakt umgewandelt wird [BELITZ et al., 2008; KUNZE, 2007].

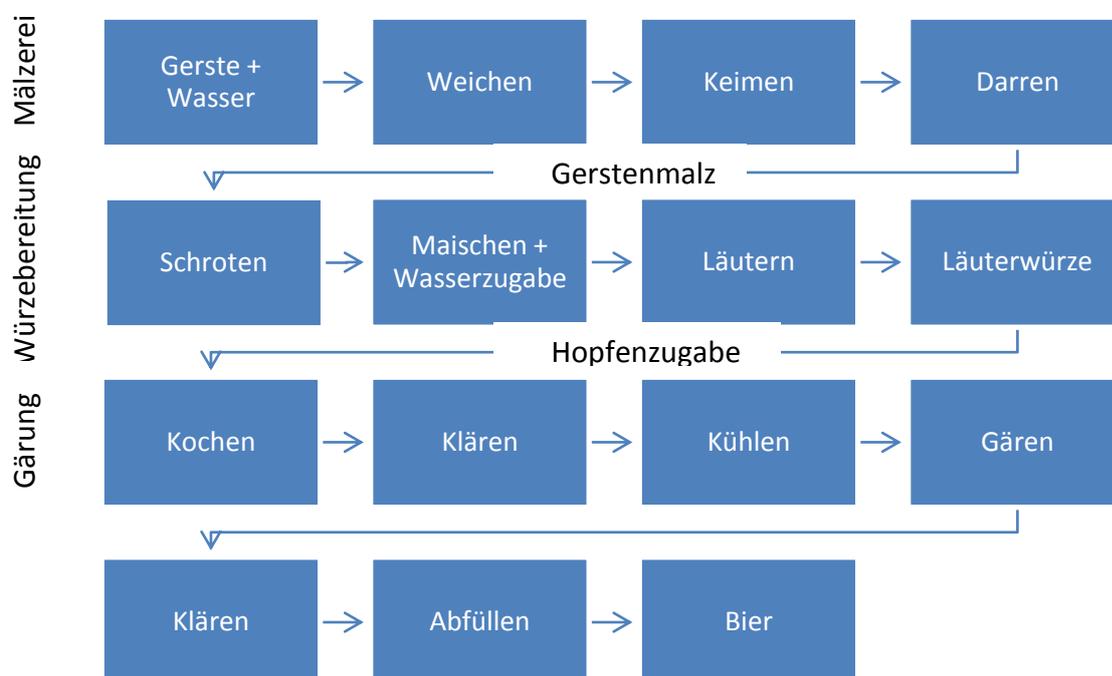


Abb. 1: Ablauf der Bierherstellung [BELITZ et al., 2008]

Der Mälzungsprozess kann in drei Arbeitsstufen eingeteilt werden. Beim ersten Schritt, dem Weichen, wird dem Getreide das zum Keimen notwendige Wasser zugeführt [BELITZ

et al., 2008]. Eine rasche und ausreichende Aufnahme von Wasser und Sauerstoff ist wichtig, um den Keimling anzuregen und die Hormonaktivität zu initiieren [WRIGLEY, 2004]. In der zweiten Phase, der Keimung, beginnt der Keimling sich auszubilden und Enzyme werden synthetisiert, aktiviert und mobilisiert (z.B.:  $\alpha$ -Amylase,  $\beta$ -Amylase, Dextrinase,  $\alpha$ -Glucosidase,  $\beta$ -Glucanase, Xylanase, Endo- und Exoproteinasen). Die aktivierten Enzyme lösen die Zellwand und die Proteinstruktur, in der die Stärkekörner eingelagert sind, auf [WRIGLEY, 2004]. Am Ende dieser Phase, die vier bis sechs Tage dauert [DELCOUR und HOSENEY, 2010], entsteht Grünmalz mit einem Wassergehalt von 43-47 % [BELITZ et al., 2008]. Im letzten Schritt, dem Darren, wird das Kornwachstum durch Hitzebehandlung (Darren) unterbrochen [WRIGLEY, 2004], bei diesem Vorgang werden die Körner auf einen konstanten und niedrigen Wassergehalt von 2,5 – 4,5 % getrocknet [BELITZ et al., 2008]. Dadurch entsteht ein lager- und transportfähiges Darrmalz, in dem die Enzyme erhalten bleiben. Es kommt zur Ausbildung und Stabilisierung von Farbe, Aroma und Geschmack. Bei diesem letzten Prozess werden aber auch unerwünschte Geschmacksstoffe und chemische Verbindungen entfernt [WRIGLEY, 2004].

Eine günstige Malzqualität bedeutet einen sehr hohen Malzextraktgehalt, eine sehr niedrige Mehl-Schrot-Differenz, einen sehr hohen Friabilimeter-Wert, einen sehr hohen Löslichen Stickstoffgehalt, eine sehr hohe Kolbachzahl, einen sehr niedrigen Gehalt an  $\beta$ -Glucanen, eine sehr hohe Diastatische Kraft, eine sehr helle Würzefarbe und eine sehr klare Würze [POMERANZ, 1987].

Die charakteristischen Eigenschaften von vielen Bieren, wie Farbe, Schaum und einige Geschmacksnoten, sind eine direkte Konsequenz der gemälzten Gerste und werden in der traditionellen Bierproduktion verwendet [MacGREGOR und BHATTY, 1993]. Es ist somit notwendig, durch den Anbau geeigneter Sorten solche Gersten zu erzeugen, die extraktreiches Malz liefern und zugleich durch andere Inhaltsstoffe die Bierqualität sichern [KUNZE, 2007].

#### 2.2.4 Inhaltsstoffe der Gerste

Hauptkomponente des entspelzten Gerstenkornes sind die verwertbaren Kohlenhydrate, die ihrerseits hauptsächlich aus Stärke bestehen, gefolgt von den Proteinen und Ballaststoffen (Tab. 1).

Tab. 1: Chemische Zusammensetzung der Getreidearten [Gew.-%], [BELITZ et al., 2008]

	Weizen	Roggen	Mais	Gerste	Hafer	Reis	Hirse
Wasser	13,2	13,7	12,5	11,7	13,0	13,1	12,1
Protein	11,7	9,5	9,2	10,6	12,6	7,4	10,6
Lipide	2,2	1,7	3,8	2,1	7,1	2,4	4,05
Verwertbare Kohlenhydrate	59,6	60,7	64,2	63,3	55,7	74,1	68,8
Ballaststoffe	13,3	13,2	9,7	9,8	9,7	2,2	3,8
Mineralstoffe [mg/kg]	1,5	1,9	1,3	2,25	2,85	1,2	1,6

Lagerfeste Gerste muss einen Wassergehalt unter 15 % aufweisen [KUNZE, 2007].

### *Kohlenhydrate*

Das Hauptkohlenhydrat, die Stärke, kommt als Reservestoff nur im Mehlkörper vor, wobei die Form und Größe der Stärkekörner charakteristisch für die einzelnen Getreidearten sind. Für die Brauer ist die Stärke der potenzielle Extraktbringer, aus dem später der gewünschte Alkohol entstehen soll [KUNZE, 2007].

### *Fett/Lipide*

In Getreidekörnern kommen relativ geringe Mengen an Lipiden vor, doch gibt es artenbedingte Unterschiede. Bevorzugt gespeichert werden die Lipide im Keimling. In der Fettsäurezusammensetzung unterscheiden sich die Getreidelipide nicht sehr, Linolsäure dominiert in allen Fällen [BELITZ et al., 2008].

### *Enzyme*

Die Gerste beinhaltet eine Reihe von Enzymen, viele davon jedoch in geringer Menge. Die meisten Enzyme bilden sich erst während der Keimung beim Mälzen [KUNZE, 2007]. Technologisch wichtig für die Malzbereitung und damit für die Brauerei ist die starke Amylaseaktivität der keimenden Gerste (Diastatische Kraft). Malz erhält man durch den Amylase-katalysierten Teilabbau der im Korn enthaltenen Stärke zu Maltose und Stärke-Oligosacchariden (Dextrinen) [EBERMANN und ELMADFA, 2008].

$\alpha$ - und  $\beta$ -Amylasen kommen in allen Getreidearten vor. Im reifen Korn erreicht insbesondere die  $\alpha$ -Amylaseaktivität ein Minimum, die bei der Keimung wieder ansteigt. Ungünstige Erntebedingungen (hohe Feuchtigkeit und Temperatur) fördern eine vorzeitige Keimung („Auswuchs“), die äußerlich noch nicht zu erkennen ist [BELITZ et al., 2008]. Die Aktivität der  $\alpha$ -Amylase kann nachgewiesen werden, indem bei der Hydrolyse

durch  $\alpha$ -Amylase die Viskosität einer Stärkelösung rasch abnimmt („Stärkeverflüssigung“) und die Jodfärbung verschwindet. Die Aktivität des Enzyms sinkt mit fallendem Polymerisationsgrad des Substrats schnell ab [BELITZ et al., 2008].

Die  $\beta$ -Amylaseaktivität wird vom Aussaatzeitpunkt beeinflusst, jedoch gibt es keinen Zusammenhang mit dem Proteingehalt [YIN et al., 2002].

### **$\beta$ -Glucan**

Der  $\beta$ -Glucangehalt in Gerste beträgt 3-7 % [BELITZ et al., 2008]. Dem enzymatischen Abbau der  $\beta$ -Glucane kommt beim Mälzen außerordentliche Bedeutung zu. Ein ungenügender Abbau der  $\beta$ -Glucane kann sich bis ins fertige Bier negativ bemerkbar machen [KUNZE, 2007], z.B. wird die Filtration der Würze bei der Bierbereitung erschwert [BELITZ et al., 2008]. Ein geringer  $\beta$ -Glucangehalt und Proteingehalt sind somit wünschenswert für die Qualität von Mälzungsgerste [ZHANG et al., 2001].

## **2.3 Einfluss der Getreidespeicherproteine auf die technologischen Eigenschaften**

Das Gesamtprotein von Mehlen verschiedener Getreidearten unterscheidet sich in der Aminosäurezusammensetzung. Die Einteilung der Proteine erfolgt nach *T.B. Osborne*, der 1907 die Proteine des Weizens in Abhängigkeit von der Löslichkeit in vier Fraktionen getrennt hat, indem er mit Wasser die Albumine, mit einer Salzlösung, z.B. 0,4 mol/L NaCl, die Globuline und mit 70 %igem wässrigen Ethanol die Prolamine nacheinander aus einem Mehl extrahiert hat. Im Rückstand verbleiben die Gluteline. Die weitere Trennung der *Osborne*-Fraktionen und –Unterfraktionen in die Komponenten ist analytisch mit elektrophoretischen Methoden sowie präparativ mit RP-HPLC möglich [BELITZ et al., 2008].

**Tab. 2: Einteilung Osborne-Fraktionen [BELITZ et al., 2008]**

<b>Fraktion</b>	<b>Weizen</b>	<b>Roggen</b>	<b>Hafer</b>	<b>Gerste</b>	<b>Mais</b>	<b>Reis</b>	<b>Hirse</b>
Albumin	Leukosin						
Globulin	Edestin						
Prolamin	Gliadin	Secalin	Avenalin	Hordein	Zeain	Oryzin	Kafirin
Glutelin	Glutenin	Secalinin	Avenin	Hordenin	Zeanin	Oryzenin	

Im Hinblick auf die Proteinmenge und –qualität ist deutlich zwischen Sommer- und Wintergerste zu unterscheiden. Bei der Sommergerste für Brauzwecke soll ein niedriger

bis mittlerer Proteingehalt von 9,6 bis 10,5 % als Optimalwert angestrebt werden, er sollte kleiner als 11,5 % sein, ein höherer Gehalt würde den Mälzungsprozess verlängern und hätte nachteilige Effekte auf die Bierqualität [ZHANG et al., 2001]. Bei Wintergerste, die als Futtergerste genutzt werden soll, ist eine möglichst hohe Proteinkonzentration anzustreben. Proteingehalte liegen geringfügig unter denen von Weizen; mehr als 13 % sind aber auch bei Gerste durchaus möglich [HEYLAND et al., 2008].

Der Proteingehalt wird hauptsächlich genetisch beeinflusst, weiters nehmen Klima- und Umweltfaktoren, wie Trockenheit und physiologischer Stress, und der Aussaatzeitpunkt Einfluss [BATHGATE, 1987; SMITH, 1990; QI et al., 2005]. Die Tageslänge und der Temperaturverlauf haben einen starken Einfluss auf die hormonelle Balance, die Zusammensetzung des Gerstenkorns und die enzymatische Entwicklung während der Mälzung [MOLINA-CANO<sup>2</sup> et al., 2000]. Gehobene Qualitätsorten werden von Umweltfaktoren weniger beeinflusst als Durchschnittsqualitätssorten, diese zeigen eine gute Qualität wenn die Umweltbedingungen sehr günstig waren [MOLINA-CANO<sup>1</sup> et al., 2000].

Rund 30% der Proteine sind als Transportproteine in die Zellwände des Endosperms eingelagert und regulieren den Stoffaustausch. Von diesen Eiweißstoffen gelangt etwa nur ein Drittel ins fertige Bier [MacGREGOR und BHATTY, 1993]. Ein Großteil der Proteine im Gerstenkorn wird während des Mälzungs- und Brauprozesses proteolytisch und thermisch abgebaut und denaturiert. Einige Proteine bleiben trotz der bei der Verarbeitung herrschenden Konditionen in natürlicher oder modifizierter Form in Malz und Bier erhalten [GORJANOVIC, 2007]. Gerstenproteine, die man im fertigen Bier wieder findet, sind vor allem Proteine aus der Albuminfraktion, die eine hohe Stabilität gegenüber Wärme und Proteolyse aufweisen [SORENSEN et al., 1993] und hitzestabile Proteine, die reich an Cystein sind, die von Disulfid-Bindungen stabilisiert werden [PERROCHEAU et al., 2005]. Obgleich die Menge der Eiweißstoffe im Bier relativ gering ist, kann sie doch einen wesentlichen Einfluss auf die Qualität des Bieres ausüben. So tragen Eiweißstoffe wesentlich zur Schaumhaltbarkeit bei, können andererseits aber auch an der Entstehung von Trübungen im Bier maßgeblich beteiligt sein [KUNZE, 2007]. Es wird geschätzt, dass ca. 50 % der Proteine während des Mälzungsprozesses mobilisiert werden [MacGREGOR und BHATTY, 1993].

### 2.3.1 Proteinfraktionen

Die Zusammensetzung der Proteine ist nicht nur von der Sorte sondern auch von den Wachstumsbedingungen abhängig, dies inkludiert Aussaatzeitpunkt, Stickstoffdüngungszeitpunkt und Stickstoffgehalt im Boden [DUFFUS und COCHRANE, 1993; QI et al., 2005].

Das Albumin der Gerste löst sich in reinem Wasser und macht etwa 11% des Eiweißes in der Gerste aus. Beim Kochen wird es vollständig ausgefällt [KUNZE, 2007]. Das Globulin der Gerste löst sich in verdünnten Salzlösungen, also auch in der Maische, und macht etwa 15% des Gersteneiweißes aus. Es besteht aus vier Komponenten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), von denen das schwefelhaltige  $\beta$ -Globulin auch bei längerem Kochen nie ganz ausfällt und im Bier Trübungen veranlassen kann [KUNZE, 2007]. Albumine werden vom Aussaatdatum und der Stickstoffdüngung aber weniger vom Stickstoffgehalt im Boden beeinflusst, bei den Globulinen ist dies umgekehrt [WANG et al., 2007].

Das Prolamin der Gerste heißt Hordein und löst sich in 80%igem Alkohol und gelangt z.T. in die Treber [KUNZE, 2007]. Hordein ist das Hauptspeicherprotein in der Gerste [SHEWRY, 1993; YALCIN et al., 2008] und beträgt 35-55 % der Gesamtgerstenproteine. Hordein wird in fünf Untergruppen nach ihrer elektrophoretischen Mobilität und Aminosäurezusammensetzung eingeteilt: in B-Hordeine (70-80 % der Hordeinfraktion), C-Hordeine (10-20 %), D- und  $\gamma$ -Hordeine (weniger als 5 % der Hordeinfraktion) [SHEWRY, 1993; TATHAM und SHEWRY, 1995]. A-Hordeine sind die kleinsten Polypeptide und können alkohollösliche Albumine und Globuline oder Abbauprodukte größerer Hordeine sein [BAXTER, 1981]. Die B-Hordeine können weiters in B1, B2 und B3 Untergruppen eingeteilt werden [SKERRITT und JANES, 1992]. Die Hordeinfraktionen unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer Schwefelgehalte in schwefelreiche Fraktionen (B- und  $\gamma$ -Hordein) und schwefelarme Fraktionen mit einem niedrigen molekularen (C-Hordein) oder einem höher molekularen Anteil (D-Hordein) [SHEWRY, 1993; SHEWRY und TATHAM, 1990; SHEWRY et al., 1994; TATHAM und SHEWRY, 1995]. Die B-Hordeine sind positiv korreliert mit dem Proteingehalt der Gerste [QI et al., 2005].

Das Gersteneiweiß besteht zu etwa 30% aus Hordenin, das sich nur in verdünnten Alkalien löst. Es wird berichtet, dass ein großer Teil dieses Proteins in der Aleuronschicht lokalisiert ist, später nicht abgebaut wird und unverändert in die Treber übergeht [KUNZE, 2007]. Die Hordenine sind negativ korreliert mit Malzextrakt, Diastatischer Kraft,

Kolbachzahl und Malzviskosität. Es ist möglich, die Malzqualität zu verbessern, wenn durch züchterische Maßnahmen die Proteinkonzentration unter 11,5 % gehalten wird und ein niedriger Hordeningehalt angestrebt wird [WANG et al., 2007].

Hordein und Hordenin werden vom Aussaatdatum und Stickstoffgehalt aber weniger von der Stickstoffdüngung beeinflusst [WANG et al., 2007]. Bei den Hordeinen steigt vor allem der Gehalt der B-Hordeine durch einen späteren Aussaatzeitpunkt, die C- und D-Hordeine werden nur gering beeinflusst [QI et al., 2005].

Im Laufe des Mälzungsprozesses werden die Gerstenproteine in Aminosäuren und kleine Peptide mittels proteolytischer Enzyme abgebaut [BAXTER, 1981; ENARI und SOPANEN, 1986; JONES, 2005]. Das fertige Malz enthält weniger als die Hälfte der Hordeine des rohen Gerstenkorns [BAXTER, 1981]. Im Laufe des Prozesses werden am schnellsten die D-Hordeine, dann die B-Hordeine und schlussendlich die C-Hordeine abgebaut [MARCHYLO et al., 1986; TATHAM und SHEWRY, 1995; WALLACE und LANCE, 1988]. Der Anstieg von Albuminen und Globulinen während der Mälzung ist ein Resultat des proteolytischen Abbaus der Hordeine und der Enzymsekretion im Endosperm [CELUS et al., 2006].

Der Proteingehalt im Getreidekorn korreliert signifikant positiv mit Albumin, Globulin und Hordein, jedoch wird der Hordeningehalt nicht beeinflusst [WANG et al., 2007].

### 2.3.2 Qualitätsmerkmale

Die Vorhersage der zu erwartenden Malzqualität von ungemälzter Gerste ist schwieriger als die von fertigem Darrmalz. Mittels SE-HPLC kann eine Voraussage auf den Malzextrakt durch Bestimmung der Proteinzusammensetzung getroffen werden. Die Malzqualität wird aber auch von weiteren Parametern beeinflusst, wie Enzymaktivierungspotential, Kohlenhydratzusammensetzung und Proteingehalt [JANES und SKERRITT, 1993]. Ein größerer Stickstoffeinsatz zu einer späteren Wachstumsphase reduziert die Malzqualität, der optimale Aussaatzeitpunkt und die richtige Anwendung von Stickstoffdüngung sind spezifisch für individuelle Braugerstensorten und verbessern die Malzqualität [WANG et al., 2007]. Malzqualitätseigenschaften, wie Extraktgehalt, Stickstoffgehalt im Getreidekorn und Diastatische Kraft, werden von saisonalen Unterschieden stark beeinflusst. Aber nicht nur der Proteingehalt sondern auch die Proteinfraction oder die Stärkeeigenschaften und der Faseranteil beeinflussen die Malzqualität [MOLINA-CANO<sup>1</sup> et al., 2000]. Eine negative Korrelation der Malzqualität

besteht mit den Hordeinspeicherproteinen und deren Zusammensetzung, eine positive Korrelation besteht mit dem Anteil an hydrolytischen Enzymen wie Amylase und  $\beta$ -Glucanase [MacGREGOR und BHATTY, 1993]. Die Malzqualität kann mittels Zuchtprogrammen verändert und die Eigenschaften, wie Korngröße, Diastatische Kraft,  $\alpha$ -Amylaseaktivität, Kolbachzahl, alkalische Viskosität und Gesamtmalz  $\beta$ -Glucan, können verbessert werden [HORSLEY et al., 1995].

Der Malzextraktgehalt spielt eine sehr wichtige Rolle in der Brauindustrie und ist negativ korreliert mit dem Proteingehalt [QI et al., 2005; WANG et al., 2007] sowie den B-Hordeinen, jedoch nicht mit C- und D-Hordeinen [MOLINA-CANO<sup>2</sup> et al., 2000; WANG et al., 2007]. Proteine haben somit eine limitierende Wirkung auf den Extraktgehalt. Ein höherer Proteingehalt bewirkt eine Abnahme der Komponenten, die einen größeren Beitrag zum Extraktgehalt zeigen. Bei steigendem Tausendkorngewicht sinkt der Gehalt an leichten nichtextrahierbaren Schalenanteilen. Der Extraktgehalt ist teilweise ein genetisches Merkmal, wird aber auch von landwirtschaftlichen Faktoren und Umweltfaktoren indirekt beeinflusst [KACZMAREK et al., 1999], die die chemische Zusammensetzung, wie Protein- und Stärkegehalt, beeinflussen [FOX et al., 2003]. Der Stärkegehalt nimmt eine primäre Funktion ein [BURGER und LaBERGE, 1985], die Stärkekörner sind im Endosperm eingelagert und so wird das Eingreifen von amyolytischen Enzymen während der Keimung begrenzt [MOLINA-CANO<sup>1</sup> et al., 2000]. Aber auch anderen Faktoren, wie Ährenmorphologie, physikalische Kornbeschaffenheit, Schalenanteil, Zellwandpolysaccharide, Veränderung bei Wasseraufnahme, Enzyymbildung und Endospermstruktur, nehmen Einfluss [BURGER und LaBERGE, 1985; ROUMELIOTIS et al., 1999]. Klimatische Faktoren, Unterschiede in der Endospermzusammensetzung der Hauptkomponenten (Hordein,  $\beta$ -Glucane, etc.) und hormonelle und enzymatische Reaktionen beeinflussen ebenso diesen Parameter [MOLINA-CANO<sup>1</sup> et al., 2000]. Einen geringen Einfluss hat der Aussaatzeitpunkt auf die Extraktausbeute [QI et al., 2005]. Eine positive Korrelation gibt es zwischen Extraktgehalt und Diastatischer Kraft, dadurch wird angedeutet, dass die Extraktausbeute ein Resultat enzymatischer Aktivität ist [LI et al., 2008].

Eine negative Korrelation besteht auch zwischen Malzviskosität und Proteinkonzentration [MOLINA-CANO et al., 1995].

Die Diastatische Kraft wird vom Aussaatzeitpunkt beeinflusst [QI et al., 2005] und steht in positiver Korrelation zum Proteingehalt der Gerste [BISHOP und DAY, 1993; ARENDS et al., 1995; HOWARD et al., 1996]. Ein größerer Stickstoffeinsatz während einer späteren Wachstumsphase bewirkt etwa eine Steigerung der Diastatischen Kraft durch Erhöhung des Proteingehaltes, reduziert aber eben dadurch die Extraktausbeute [WANG et al., 2007]. Die Diastatische Kraft beruht größtenteils auf der  $\beta$ -Amylaseaktivität [ARENDS et al., 1995; GEORG-KRAEMER et al., 2001; EVANS et al., 2003], aber auch die Glycosidhydrolasen, wie  $\alpha$ -Amylase, beeinflussen diesen Qualitätsparameter. Die Diastatische Kraft wird von der amylolytischen Aktivität bestimmt, im Gegensatz zum Extraktgehalt, welcher vor allem auf dem Stärkegehalt des Kornes beruht [LI et al., 2008].

Die Kolbachzahl drückt den löslichen Stickstoff in Prozent des Gesamtstickstoffes aus. Da der lösliche Stickstoff nicht im gleichen Maße zunimmt wie der Gesamtstickstoff, besteht eine negative Korrelation zwischen den beiden Parametern [WANG et al., 2007].

Vor allem Proteine, die Proteinkonzentration und der pH-Wert haben großen Einfluss auf die Schaumbildung und Schaumstabilität [YALCIN et al., 2008].

Trübungsaktive Proteine in Bier wurden primär im Gerstenspeicherprotein (Hordein), das aus Fragmenten von unterschiedlichem Molekulargewicht besteht und reich an der Aminosäure Prolin ist, gefunden [ASANO et al., 1982]. Die Minimierung von trübungsaktiven Proteinen in Bier könnte eine Option sein, um die Biertrübungsstabilität während der Lagerung zu verbessern [ROBINSON et al., 2007].

## 2.4 Gesundheitsrelevante Einflüsse der Getreidespeicherproteine

Bei manchen Personen tritt genetisch bedingt eine Unverträglichkeit der Gliadinfraktion des Weizenklebers auf. Die damit verbundene Krankheit wird Zöliakie genannt. Sie äußert sich durch eine Atrophie der Schleimhaut des Dünndarms und ist von verminderter Aufnahmefähigkeit der Nahrung begleitet. Typische Symptome sind Leibschmerzen, Durchfälle, Anämie, Wachstumsverzögerung, Migräne und aufgrund einer gestörten Nährstoffausnutzung kann es zu Mangelerscheinungen kommen. Diese Symptome sind das Resultat eines Entzündungsprozesses als Ursache einer Zottenatrophie im Darm, welche die normale Nährstoffaufnahme vermindert. Die Krankheit wird auch bei Konsum von Roggen, Gerste und eventuell Hafer beobachtet. Zöliakie wurde nicht nach Verzehr von Mais, Reis oder Hirse beobachtet, sodass diese Getreidearten für Zöliakiepatienten eine Ausweichmöglichkeit darstellen. Die Symptome

der Glutenüberempfindlichkeit können nur durch eine glutenfreie Diät erfolgreich behandelt werden, die allerdings lebenslang beibehalten werden muss [EBERMANN und ELMADFA, 2008; HAMM und HOSBACH, 1998; MITEA et al., 2008].

Mit einer Häufigkeit von 0,5-1,0 % ist Zöliakie die meist bekannte immunologische Nahrungsmittelintoleranz in der westlichen Welt [MITEA et al., 2008]. Sie tritt familiär gehäuft auf, es muss also eine genetische Veranlagung vorhanden sein. Obwohl im Blut mancher Patienten Antikörper gegen Gluten zu finden sind, handelt es sich nicht um eine Allergie. Für eine Diagnose können serologische Tests auf Antikörper gegen Gluten durchgeführt werden. Eine sichere Diagnose erfolgt durch den mikroskopischen Nachweis der zerstörten Dünndarmzotten. Die Zottenatrophie lässt sich im Schweregrad nach „Marsh“ einteilen [ÖGE, 2007].

Die gesundheitsschädlichen Faktoren für Zöliakieerkrankte im Getreide sind die Speicherproteine Gliadin und Glutenin von Weizen, Secalin von Roggen und Hordein von Gerste [WIESER und KOEHLER, 2008]. Während der Verdauung werden die Proteine enzymatisch im Magen-Darm-Trakt gespalten. Aufgrund des hohen Prolingehaltes in Gluten ist der Abbau nicht vollständig und relativ lange Glutenpeptide bleiben bestehen [SHEWRY, 1995; SHAN et al., 2002]. Bei Zöliakiepatienten lösen solche Peptide eine CD4<sup>+</sup> T-zellvermittelte Immunantwort aus [van de WAL et al., 1998; ANDERSON et al., 2000; ARENTZ-HANSEN et al., 2000]. Die von Gluten abgeleiteten Peptide, die an HLA-DQ2 oder HLA-DQ8 binden können und die T-Zellen stimulieren, sind die wahren Übeltäter und sollten nicht in Nahrungsmitteln für Zöliakiepatienten enthalten sein [MITEA et al., 2008]. Die stimulierten T-Zellen aktivieren B-Zellen, diese produzieren IgA- und IgG-Antikörper gegen Glutenprotein (Antigen) und in der Darmschleimhaut vorhandene Transglutaminase (Autoantigen) [WIESER und KOEHLER, 2008]. Die T-Zellen stimulierenden Glutenproteine sind  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Gliadin und niedrigmolekulargewichtige (LMW) und hochmolekulargewichtige (HMW) Gluteninen [ARENTZ-HANSEN et al., 2002; van de WAL et al., 1999; MOLBERG et al., 2003]. Peptide mit ähnlichen T-Zellen stimulierenden Bestandteilen konnten auch in Gerste, Reis und Hafer identifiziert werden [VADER et al., 2003].

Der alkohollöslichen Prolaminfraktion, den Gliadinen, wird der größte schädliche Faktor zugewiesen, die unlösliche Glutenfraktion, die Gluteline, wurden früher als nicht schädlich, später aber als schwach schädlich oder so toxisch wie Gliadine beschrieben.

Vor allem die Gliadinfraktion von Weizen, die Prolaminfraktion von Roggen (Secalin) und Gerste (Hordein) werden mit der Zöliakie assoziiert. Die Zöliakie auslösenden Speicherproteine der Hordeinfraktion der Gerste können in drei Gruppen eingeteilt werden: Proteine mit hohem Molekulargewicht (HMW) – D-Hordeine, mit mittlerem Molekulargewicht (MMW) – C-Hordeine und die größte Gruppe mit niedrigem Molekulargewicht (LMW) –  $\gamma$ -Hordein und B-Hordein [WIESER und KOEHLER, 2008]. Die Aminosäurezusammensetzung der Prolamine ist bei Weizen, Roggen und Gerste sehr ähnlich. Die *Triticeae*, die in der Aminosäurezusammensetzung der Prolamine weitgehend übereinstimmen, können Zöliakie verursachen. Im Vergleich zu den Prolaminen der übrigen Getreidearten besitzen sie in dieser Proteinfraction einen wesentlich höheren Glutamin- und Prolin-Anteil. Es wird vermutet, dass diese Besonderheiten in der Struktur der Prolamine für die Auslösung von Zöliakie verantwortlich sind [BELITZ et al., 2008]. Generell können die verschiedenen Proteinfractionen aufgrund des strukturellen Aufbaus mit Sequenzen, die reich an Glutamin, Prolamin und hydrophoben Aminosäuren sind, charakterisiert werden. Zusammenfassend, die Gesamtheit von Speicherproteinen (Prolamine und Gluteline) von Weizen, Roggen, Gerste und möglicherweise Hafer sind beteiligt bei der Auslösung von Zöliakie [WIESER und KOEHLER, 2008].

Laut dem Codex Alimentarius dürfen natürlich gluten-freie Produkte maximal 20 mg/kg Gluten (z.B. basierend auf Reis- oder Getreidemehl) und gereinigte Produkte maximal 100 mg/kg Gluten (z.B. Weizenstärke) enthalten, um als Gluten-frei deklariert und an den Konsumenten abgegeben werden zu können [CODEX ALIMENTARIUS, 1981; EU VERORDNUNG, 2009; WIESER und KOEHLER, 2008].

Der Sandwich-ELISA-Test ist eine anerkannte Methode zum Nachweis von Prolaminen, verschiedene Testkits sind am Markt erhältlich. Die Antikörper dieser Testkits werden gegen Epitope von  $\omega$ -Gliadinen erhoben [SKERRITT und HILL, 1990] und mit einem Standard-Gliadinpräparat kalibriert [vanECKERT et al., 2006]. Die Antikörper dieser Tests werden als R5-Antikörper bezeichnet, sind jedoch nicht speziell auf die Zöliakie auslösenden Aminosäuresequenzen spezifisch. Sie messen nicht die T-Zellen stimulierenden Glutenpeptide, somit ist diese Prüfung zwar kein Maßstab für die Anwesenheit von gesundheitsschädlichen Peptiden für Zöliakiepatienten [MITEA et al.,

2008], sie wurde dennoch zur Evaluierung der Methode angewandt, da die pathogenspezifischen ELISAs zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht verfügbar waren.

## 2.5 Analytik

Die Proteinverbindungen im Mehl sind sehr komplex und so ist es notwendig, die Proteinverbindungen in verschiedenlösliche Fraktionen zu trennen [WIESER et al., 1998]. Die Proteinfractionen von Getreide können unterschiedlich extrahiert werden und werden meist nach Osborne eingeteilt: Albumine und Globuline sind in Wasser und schwacher Salzlösung löslich, Hordeine sind in einer Alkohol-Wasser-Lösung löslich und die letzte Fraktion, die Hordenine, die nicht in den vorigen Lösungen extrahiert werden, sind in einer schwachen Säure oder Base löslich [MacGREGOR und BHATTY, 1993]. Die Trennung der Proteinfractionen erfolgt der Reihe nach in drei Gruppen, zuerst werden die Albumine und Globuline, anschließend die Hordeine und schlussendlich die Hordenine extrahiert.

Der HPLC-Detektor ist sehr hochempfindlich und somit ist es möglich, aus einem einzigen Getreidekorn Proteine zu extrahieren und zu analysieren. Die RP-HPLC wurde schon weitgehend bei der Analyse von Getreideproteinen angewandt und ist ein effizientes Werkzeug zur Erforschung der Gliadin- und Glutenin-Fractionen im Weizen. Es ist eine sehr effiziente und sensitive Methode zur Bestimmung der Proteine, die Reproduzierbarkeit ist gut und sie zeichnet sich durch eine einfache Handhabung aus. Das Verfahren kann zur quantitativen Charakterisierung von Glutenproteinen im Mehl und verarbeiteten Produkten verwendet werden und ist im Prinzip auf andere Getreidearten übertragbar. Die Kombination von Extraktion und HPLC ermöglicht eine rasche und schnelle quantitative Bestimmung von entsprechenden Mengen unterschiedlicher Glutenproteintypen. Die Ergebnisse geben brauchbare Informationen für Zuchtprogramme, genetische Optimierung von Getreide und für die Qualitätskontrolle von Rohmaterial und Endprodukten her [WIESER et al., 1998].

### 3 Aufgabenstellung

Gerste hat zwar für die menschliche Ernährung eher eine geringe Bedeutung, aber in der Brauindustrie ist sie der Hauptrohstoff bei der Herstellung von Malz. Das Augenmerk dieser Arbeit lag auf den Speicherproteinen der Gerste, die einerseits Einfluss auf die technologischen Eigenschaften und andererseits auf ernährungsphysiologischen Eigenschaften haben, z.B. Allergene, die in vielen Fällen Ursache von Lebensmittelunverträglichkeiten sind.

Die Ziele dieser Arbeit waren die Datensammlung über Proteinspektren von im Rahmen der Sortenprüfung untersuchten Sorten und aussichtsreichem Zucht- bzw. Elternmaterial und deren Zusammenhang mit technologischen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften (z.B. Glutenintoleranz). Des Weiteren die Schaffung einer auf die Erfordernisse der Pflanzenzüchtung ausgerichteten Untersuchungsmethode zur Erkennung verschiedenster Merkmale aus geringen Mengen an Zuchtmaterial.

Die durchzuführenden Aufgaben waren:

- Erstellung von Proteinspektren mittels HPLC
- Auswertung der Chromatogramme
- Statistische Auswertung in Bezug auf technologische Eigenschaften
- Durchführung eines Mälzungsprozesses
- Überprüfung der  $\alpha$ -Amylaseaktivität
- Vorbereitung einer ELISA-basierten Methode zur Erkennung pathogener Epitope

Mittels der HPLC-Methode soll ein universelles Werkzeug bei der Qualitätsanalyse von Gerste erstellt werden. Am Ende soll ein Rechenmodell für die Vorhersage technologischer Eigenschaften stehen sowie eine Methode zur immunologischen Charakterisierung von Getreidefraktionen evaluiert sein.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Verwendete Rohstoffe

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden Sommergerstenproben aus der Sortenwertprüfung der Ernte 2009 untersucht. Die Proben wurden in Parzellen von 12m<sup>2</sup> Fläche in vierfacher Wiederholung an folgenden Standorten angebaut und geerntet: Fuchsenbigl, Großnondorf, Schönfeld, Freistadt und Waltersdorf.

Insgesamt wurden 144 Proben, bestehend aus 32 Standardsorten bzw. Prüfstämmen, an fünf Versuchsstandorten analysiert. Standardsorten sind bereits zugelassene Sorten, deren agronomische und technologische Eigenschaften bekannt sind. Die Prüfstämme werden mit den untersuchten Standardsorten im Zuge der Sortenprüfung verglichen, um einen Prüfstamm als Sorte zu zulassen. Standardsorten und Prüfstämme umfassten folgendes Spektrum:

Standardsorten: Bodega, Bojos, Class, Felicitas, Marthe, Signora, Victoriana, Vivaldi, Xanadu

Prüfstämme: 68/03NZ-13, 9/02-1G, 9/02-6D, AC 03/054/32, AC 04/542/54, AC 04/598/6, Br 8403c2, CSBC 6747.22, NFC 403-49, NORD 07/1111, NORD 07/2403, NSL 04-2076-B, NSL 04-4079B, NSL 05-4196-A, PF 12136-57, SE 206/07 SG, SE 213/08 SG, SJ 067533, SJ 071085, Strg 678/04, SZD 3628B, SZD 4748, SZD 5822

Die geernteten Gerstenkörner wurden in etikettierten Papiersäcken im Kühlhaus bei 10°C und 50 % rel. Luftfeuchtigkeit gelagert.

Bei den Gerstenproben aus Freistadt war eine Verunreinigung vorhanden, die als Bärenklau identifiziert wurde. Nicht alle Fremdkörner konnten vor der Vermahlung entfernt werden (Abb. 2).



Abb. 2: Bärenklau

### 4.1.1 Kleinmälzung

Für die Mälzung wurde eine Braugerste der Sorte Xanadu Ernte 2009 von der Firma STAMAG verwendet.

### 4.1.2 $\alpha$ -Amylaseaktivität

Gegenstand der Untersuchung der  $\alpha$ -Amylaseaktivität waren Eluate aus den HPLC-Trennungen des gedarrten Malzes der durchgeführten Kleinmälzung.

### 4.1.3 ELISA-Test

Für den ELISA-Test wurde die Sorte Xanadu aus dem Versuchsstandort Freistadt verwendet.

## 4.2 Analytische Methoden

### 4.2.1 Extraktion von Gerstenproben

#### *Geräte für Extraktion*

- Kaffemühle (Typ: 380 V, Fa. Ditting, Schweiz) (Abb. 3)



**Abb. 3: Kaffemühle**

- Analysenwaage (Mettler AT200, Mettler Toledo, Schweiz)
- Vortex (MS1 Minishaker, IKA Works, USA)
- Schüttler VXA (IKA-VIBRAX-VXR, Janke&Kunkel GmbH, Deutschland)
- VXA-Aufsatz (Typ VX2, Janke&Kunkel GmbH, Deutschland)
- Zentrifuge (Megafuge 2.0, Heraeus Sepatech, Deutschland)
- Trockenschrank (Typ 1811530000202, WTBbinder, Deutschland)
- Magnetrührer (Typ MINI-MR, Janke&Kunkel, Deutschland)
- pH-Meter (pH 330, WTW, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen 12 mL
- Epprouvetten ca. 20 mL (Eppendorf, Deutschland)

- Samplerfläschchen 2 mL (Part Number: 5181-3375, Agilent Technologies, Deutschland)
- Membranfilter 0,45 µm, Polyester (Chromafil®PET-45/15MS, Macherey-Nagel GmbH, Deutschland)
- Div. Bechergläser, Pipetten und Glasgeräte
- Metalldosen mit Deckel

#### *Chemikalien für Extraktion*

- 1-Propanol (UN 1274, Bestellnr. 1.00997.1000, Merck, Deutschland)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Bestellnr. 1.08382.0500, Merck, Deutschland)
- Kaliumhydrogenphosphat (Bestellnr. 1.04873.1000, Merck, Deutschland)
- Harnstoff (Bestellnr. 1.08487.1000, Merck, Deutschland)
- Natriumchlorid (Bestellnr. 1.06404.5000, Merck, Deutschland)
- Methanol (Bestellnr. 1.06007.2500, Merck, Deutschland)
- DL-Dithiothreitol (D5545-5G, Sigma-Aldrich, Kanada)
- Salzsäure 25 % (Bestellnr. 1.00316.2500, Merck, Deutschland)
- Stickstoff ECD (UN 1066, EinecsNr. 231-783-9, CASNr. 07727-37-9, Messer Austria, Österreich)
- Ethanol (Bestellnr. 1.00983.2500, Merck, Deutschland)
- Natriumhydroxid Plätzchen (Bestellnr. 6498, 500g; Merck, Deutschland)
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (Bestellnr. 1.06579-1000, Merck, Deutschland)

Zur Extraktion wurden folgende Lösungen hergestellt:

Lösung A: 0,4 mol/L NaCl + 0,067 mol/L HKNaPO<sub>4</sub> (pH 7.6):

Einwaage von 23,995 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 9,118 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in ein 1000 mL Becherglas und bis zur 1 L-Marke mit bi-destilliertem Wasser aufgefüllt. Vermischung und Auflösung des Pulvers erfolgte mittels eines Magnetrührers. Der pH-Wert wurde gemessen und mit 2N NaOH auf pH 7,6 eingestellt. 23,376 g NaCl in einen 1000 mL Messkolben eingewogen und mit der HKNaPO<sub>4</sub>-Lösung aufgefüllt. Der Messkolben wurde geschüttelt bis sich alles löste und im Dunkeln gelagert.

Lösung B: 60 % vol/vol Ethanol:

Mischung von 600 mL 100 % Ethanol mit 400 mL bi-destilliertem Wasser.

Lösung C:

Einwaage von 12,012 g Harnstoff  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  mit 0,6057 g Tris(hydroxymethylaminomethan)  $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$  und in 25 mL bi-dest. Wasser gelöst. Vermischung und Auflösung des Pulvers erfolgte mittels eines Magnetrührers. Der pH-Wert wurde gemessen und mithilfe HCL (12 % vol/vol) auf pH 7,5 eingestellt. 50 mL 1-PrOH in einem 100 mL Messkolben hinzugegeben und mit bi-dest. Wasser aufgefüllt. 15 min Stickstoff eingeleitet. Zugabe von 1 g DL Dithiothreitol und der Messkolben wurde geschüttelt bis sich alles löste.

***Vorbereitung***

Die Gerstenproben wurden gezogen (ca. handvoll) und mit Hilfe einer Kaffeemühle (Fa.Ditting) auf Stufe eins vermahlen. Je feiner die Proben waren, desto besser konnten die Proteine extrahiert und somit analysiert werden. Die Zwischenlagerung bis zur Extraktion erfolgte in verschließbaren Metall Dosen (Abb. 4).



**Abb. 4: Probenvermahlung**

***Extraktion der Proteinfractionen***

Die Extraktion der Proteine erfolgte in drei Schritten: Zuerst wurden die Albumine und Globuline, anschließend die Prolamine bzw. Hordeine und zum Schluss die Hordenine extrahiert [WIESER et al., 1998]. Die Analyse wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

In beschrifteten Zentrifugenröhrchen wurden jeweils zwischen 0,0900 bis 0,1100 g Probe eingewogen und das Gewicht notiert.

Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten nacheinander für jedes Zentrifugenröhrchen:

Schritt 1: Nach Zugabe von 1 mL Lösung A wurde 1 min lang bei 2200 min<sup>-1</sup> auf dem Minishaker durchgeschüttelt, anschließend für 10 min bei 1400 min<sup>-1</sup> im IKA-VIBRAX-VXA durchgeschüttelt. Die gut gemischten Röhrchen wurden 15 min bei 6000 min<sup>-1</sup> abzentrifugiert. Der klare Überstand enthielt die *Albumine* und *Globuline* und wurde in eine Eprovette dekantiert. Die Extraktion mit Lösung A wurde noch zweimal wiederholt (Abb. 5).

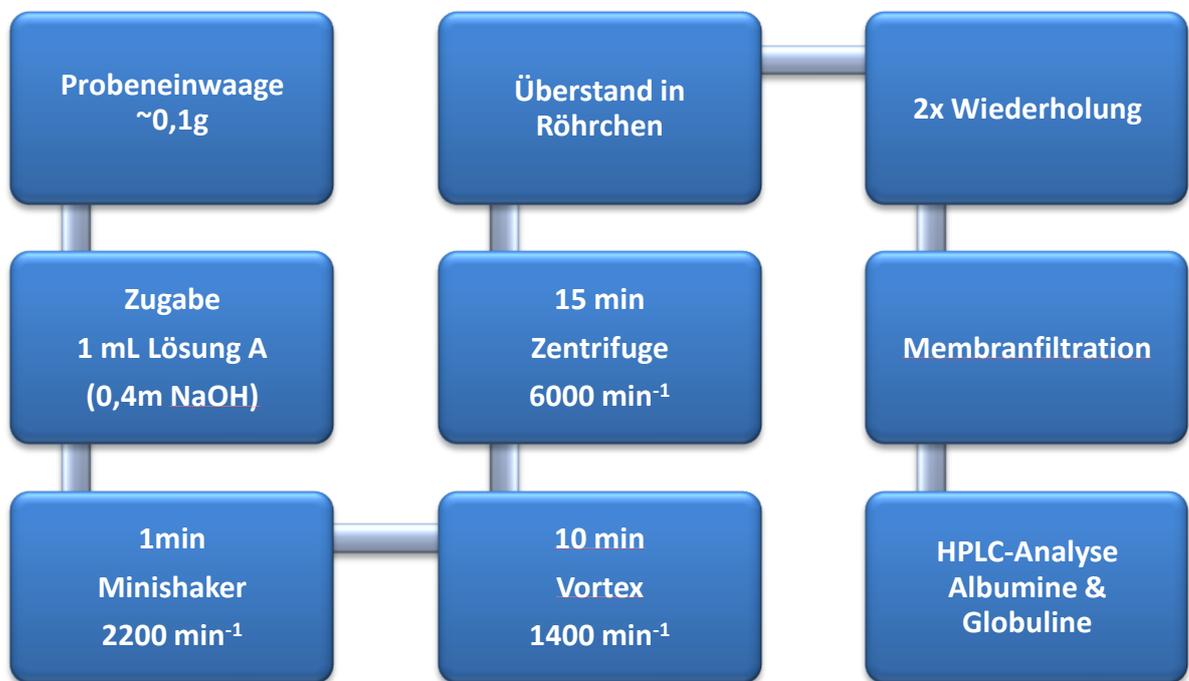


Abb. 5: Extraktion Albumine und Globuline

Schritt 2: Der Rückstand in den Zentrifugenröhrchen wurde mit 0,5 mL Lösung B versetzt. Das Zentrifugenröhrchen wurde 15 sec bei 2200 min<sup>-1</sup> auf dem Minishaker und anschließend für 10 min bei 1400 min<sup>-1</sup> im IKA-VIBRAX-VXA durchgeschüttelt. Das gut gemischte Röhrchen kam für 20 min bei 6000 min<sup>-1</sup> in die Zentrifuge. Der klare Überstand wurde in eine Eprovette dekantiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Zum Schluss wurde die Eprovette mit dem gesammelten Überstand mit 0,5 mL Lösung B versetzt. Im klarem Überstand waren die *Prolamine* bzw. *Hordeine* enthalten (Abb. 6).



Abb. 6: Extraktion Prolamine bzw. Hordeine

Schritt 3: Der Rückstand im Zentrifugenröhrchen wurde mit 1 mL Lösung C versetzt und mittels Glasstab etwas gelockert. Anschließend wurde 30 sec lang Stickstoff eingeleitet, das Zentrifugenröhrchen mit Alufolie verschlossen und dieses 10 sec bei 2200  $\text{min}^{-1}$  auf dem Minishaker durchgeschüttelt. Danach kam das Zentrifugenröhrchen auf dem IKA-VIBRAX-VXA (1400  $\text{min}^{-1}$ ) für 20 min bei 60°C in den Trockenschrank. Die Probe wurde sodann 20 min bei 6000  $\text{min}^{-1}$  zentrifugiert. Der klare Überstand enthielt die *Hordeine* und wurde in eine Epruvette dekantiert. Schritt 3 wurde einmal wiederholt (Abb. 7).

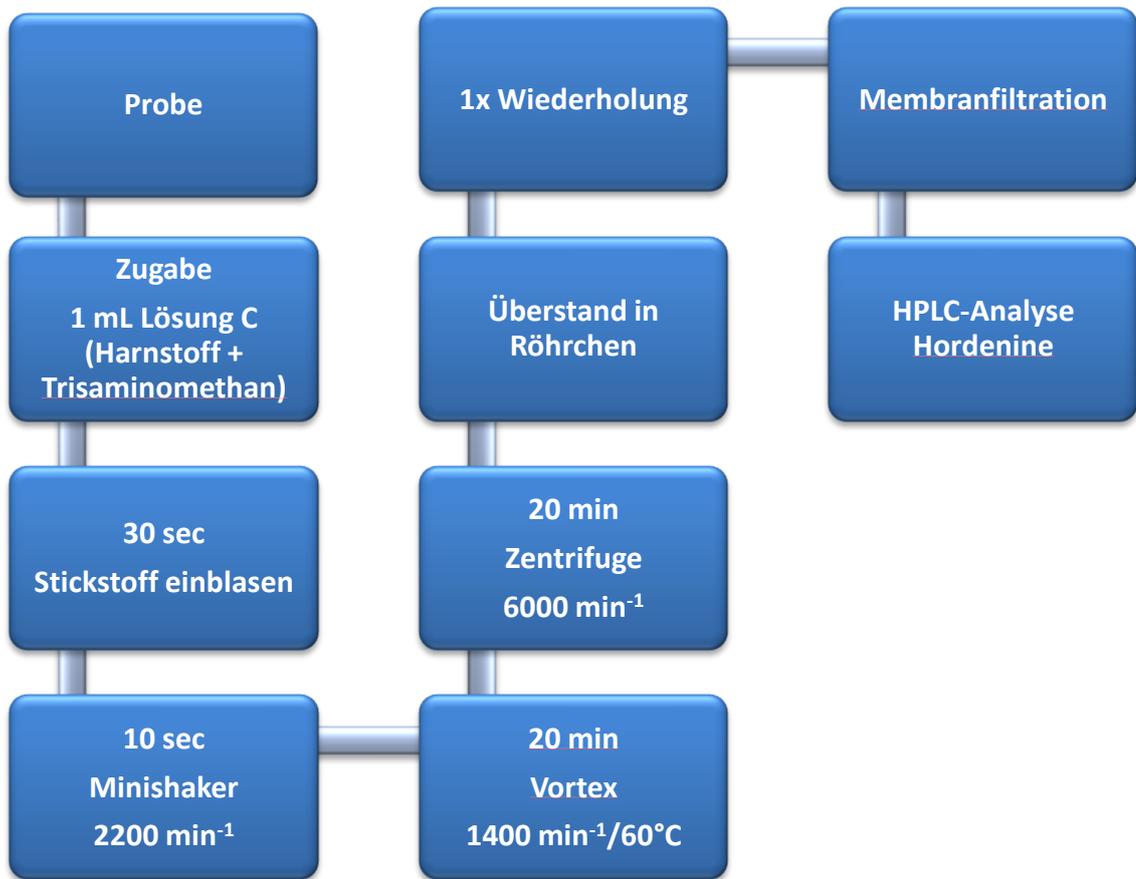


Abb. 7: Extraktion Hordenine

Die in den Eprovetten gesammelten Überstände jeder Fraktion betragen  $\sim 2$  mL und wurden mittels  $0,45 \mu\text{m}$  Membranfilter in die Samplerfläschchen für die HPLC-Analyse filtriert und verschlossen. In einem Arbeitsgang konnten 12 Proben in Doppelbestimmung aufgearbeitet werden. Die extrahierten Albumin- und Hordeninproben wurden bis zur HPLC-Analyse im Kühlschrank zwischengelagert. Die Hordeinproben konnten nicht im Kühlschrank gelagert werden, da es hier zu einer Ausfällung der Proteine kam und somit erfolgte die Zwischenlagerung in einem kühleren Nebenraum.

#### 4.2.2 HPLC – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

##### Geräte für HPLC

- HPLC-Anlage Merck-Hitachi bestehend aus:
  - Interface D-7000
  - UV-Detector L-7400
  - Column Oven L-7300
  - Programmable Autosampler L-7250
  - Pump L-7100

- Säule: EC 250/4 NUCLEOSIL 300-5 C8, Macherey-Nagel, Deutschland
- Vorsäule: CC 8/4 NUCLEOSIL 300-5 C8, Macherey-Nagel, Deutschland
- Computer mit Geräteprogramm „D-7000 HSM“
- Drucker

#### *Chemikalien für HPLC*

- Acetonitril (UN 1648, Bestellnr. 1.00030.2500, Merck, Deutschland)
- Methanol (UN 1230, Bestellnr. 1.06007.2500, Merck, Deutschland)
- Trifluoressigsäure (Bestellnr. 91700, Fluka Chemie, Deutschland)
- Helium ECD (UN 1046, EnecsNr. 231-168-5, CASNr. 07440-59-7, Messer Austria, Österreich)
- Bi-destilliertes Wasser (Gerät: Milli-Q Advantage A10, Millipore, Österreich)
- Lösung A: bi-destilliertes Wasser + 0,1% vol Trifluoressigsäure
- Lösung B: Acetonitril + 0,1% vol Trifluoressigsäure

#### *HPLC-Probenauftrennung*

Die HPLC-Trennungen der Extrakte wurden auf einem La Chrom Chromatographiesystem (Hersteller Merck-Hitachi) mit dem Geräteprogramm D-7000 HSM durchgeführt. Die Laufmittel wurden vor der Verwendung durch Einleiten von Helium entgast. Probenbezeichnungen, Einspritzvolumina und angewandte Methode wurden in das Eingabefenster des Geräteprogrammes eingetragen. Die Laufmittel-Lösungen A und B wurden durch 15 Minuten langes Spülen mit Helium entgast. Sobald der Ofen die Temperatur von 50°C erreicht hatte, wurde die Analysenserie gestartet.

In den erhaltenen Chromatogrammen wurde manuell eine Basislinie zwischen dem Beginn des ersten in die Auswertung einbezogenen Peak und dem Minimum nach dem letzten auswertbaren Peak gezogen. Folgende Bereiche wurden bei den einzelnen Proteinfractionen gewählt: Albumine 6,80 - 25,00 min; Hordeine 9,30 - 34,50 min; Hordenine 11,20 – 35,50 min.

#### Gerätekonfiguration

Probengeberschleife: 2 ml

Säule: EC 250/4 NUCLEOSIL 300-5 C8, Macherey-Nagel

Vorsäule: CC 8/4 NUCLEOSIL 300-5 C8, Macherey-Nagel

Flussrate: 1,0 mL/min

Gradient: 0 Minuten 28 % vol/vol B, 30 Minuten 56 % vol/vol B, linear, danach 10

Minuten 90 % vol/vol B, danach equilibrieren 10 Minuten 28% vol/vol B.

Detektor: UV Absorption 210 nm

Ofentemperatur: 50°C

Einspritzvolumen Albumin: 200 µL

Einspritzvolumen Hordein bzw. Prolamin: 80 µL

Einspritzvolumen Hordenin: 150 µL

Vor und nach jeder Probeninjektion werden zusätzlich 500 µL vol Lösung A injiziert.

### 4.2.3 Auswertung der Chromatogramme

Die Identifizierung der Peaks erfolgte an Hand von Leit-Peaks. Das sind besonders charakteristische Peaks, die meistens ihre Umgebung deutlich überragen. Mithilfe der Leit-Peaks war es möglich, die Auswertung und Zuordnung der Einzelpeaks zu gewährleisten. Eine Identifizierung allein aufgrund der Laufzeiten war nicht möglich, da sich die Retentionszeit oftmals verschoben hat, was unter anderem durch den häufigen Wechsel der HPLC-Säule zustande kam. Die Peaks wurden über alle extrahierten Fraktionen durchnummeriert. Die Albumin/Globulin-Fraktion umfasste die Peaks 1 bis 33 (Abb. 8), die Hordein-Fraktion die Nummern 34 bis 67 (Abb. 9) und die Hordenine 68 bis 98 (Abb. 10).

Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgte auf der Grundlage der Einwaage an Gerstenschrot in g und der gemessenen Peakflächen in mV\*msec. Die Berechnung der Ergebnisse in mg Protein/g Gerstenschrot erfolgte mit Hilfe einer im Rahmen des gleichen Projektes durchgeführten Kalibration für Weizen aus einer noch nicht fertig gestellten Diplomarbeit. Aus der Regressionsgleichung der Eichgeraden ergab sich folgende Berechnung des Gehaltes einer Proteinfraction im Gerstenschrot:

$$\frac{\text{Peakfläche} * 0,000000025 \text{ [mg]}}{\text{Einwaage [g]}} = \left[ \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right]$$

Bei der Anwendung der Gleichung wurde vorausgesetzt, dass die Absorption bei 210 nm bei allen untersuchten Fraktionen und bei Weizen und bei Gerste gleich ist. Diese Annahme ist zulässig, da die angewandte Wellenlänge bei 210 nm spezifisch für Peptidbindungen ist und weniger durch Aminosäurereste beeinflusst wird. Bei 260-280 nm haben aromatische Aminosäuren, deren Gehalt stark von der Primärstruktur des Proteins abhängig ist, großen Einfluss auf die Absorption [KIRSCHENBAUM, 1975].

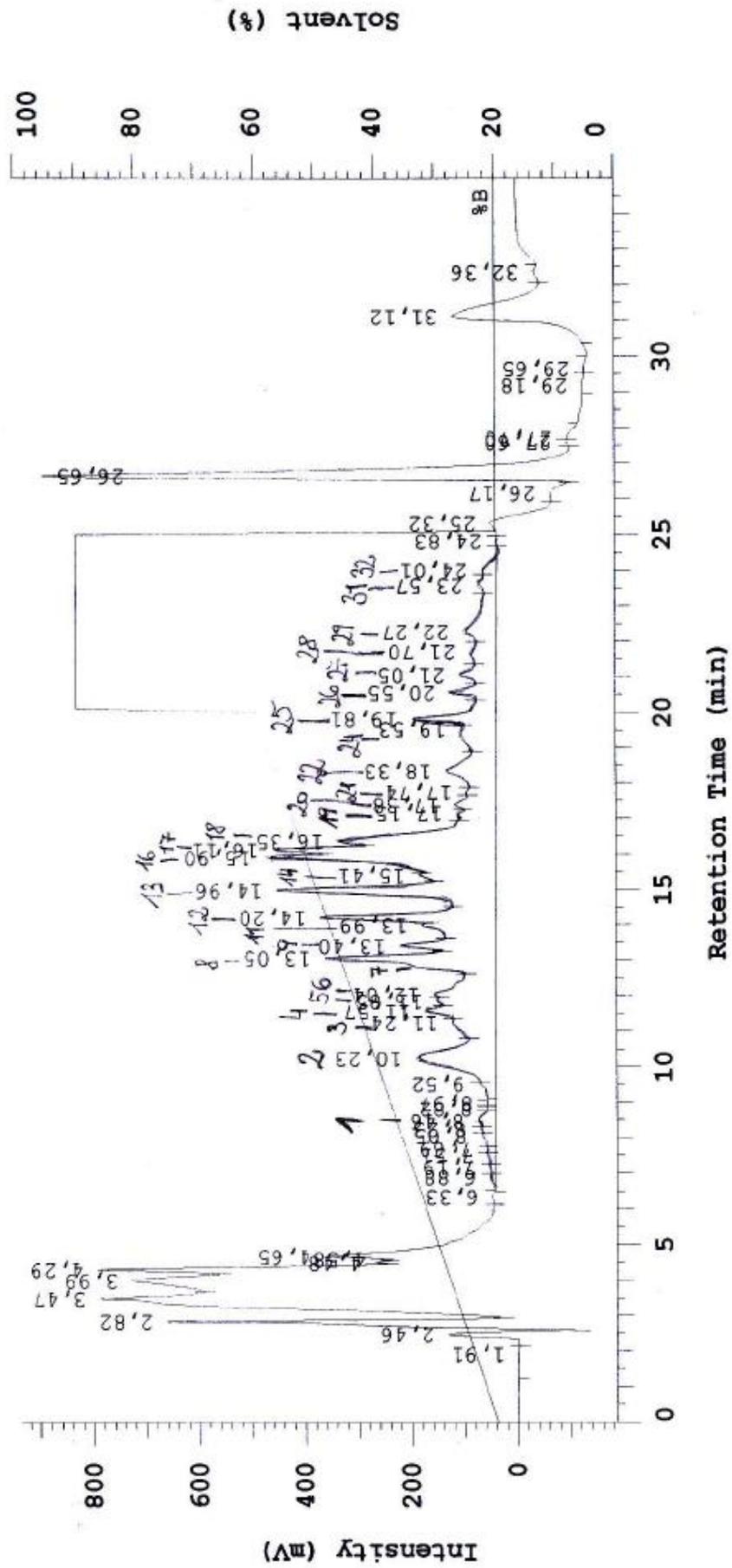


Abb. 8: Peaknummerierung 1-33: Albumin

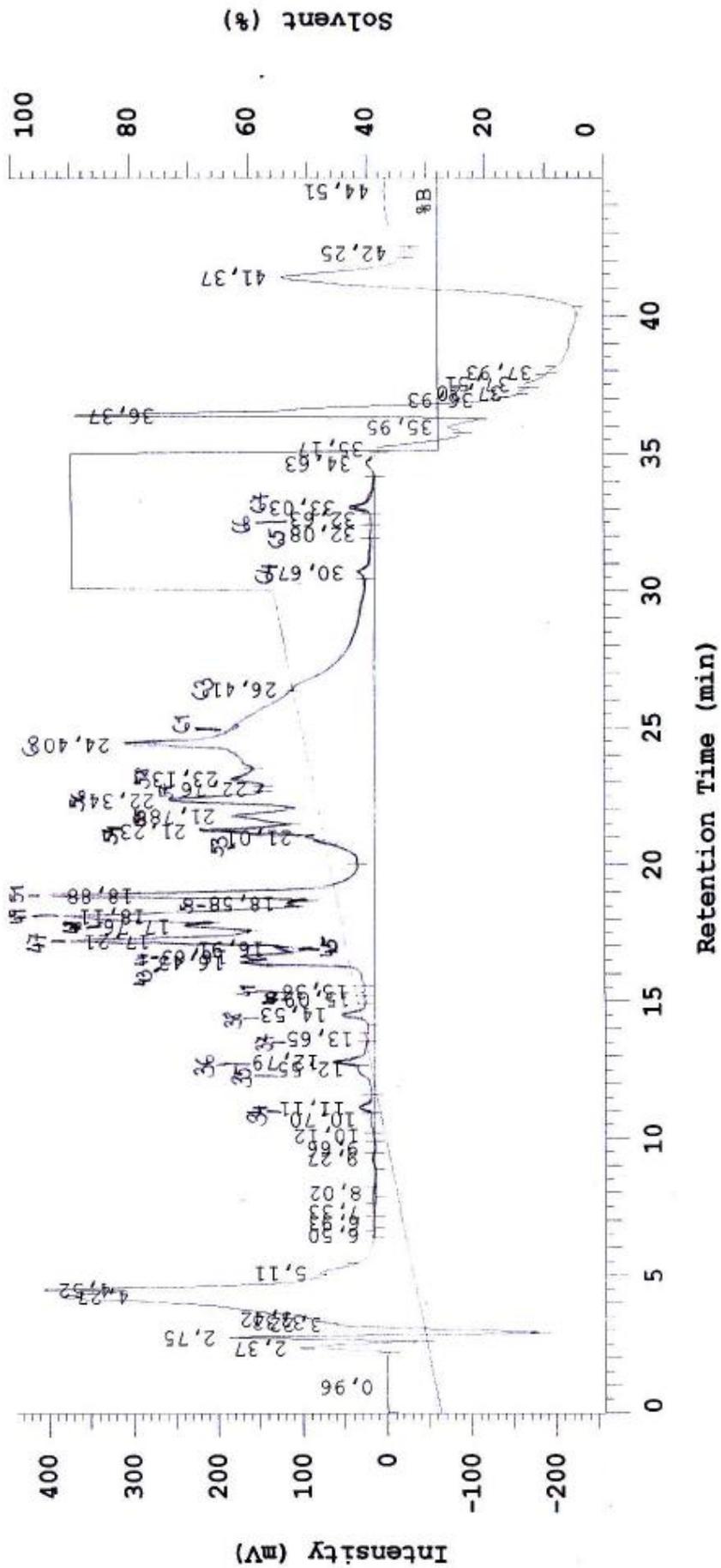


Abb. 9: Peaknummerierung 34-67: Hordein

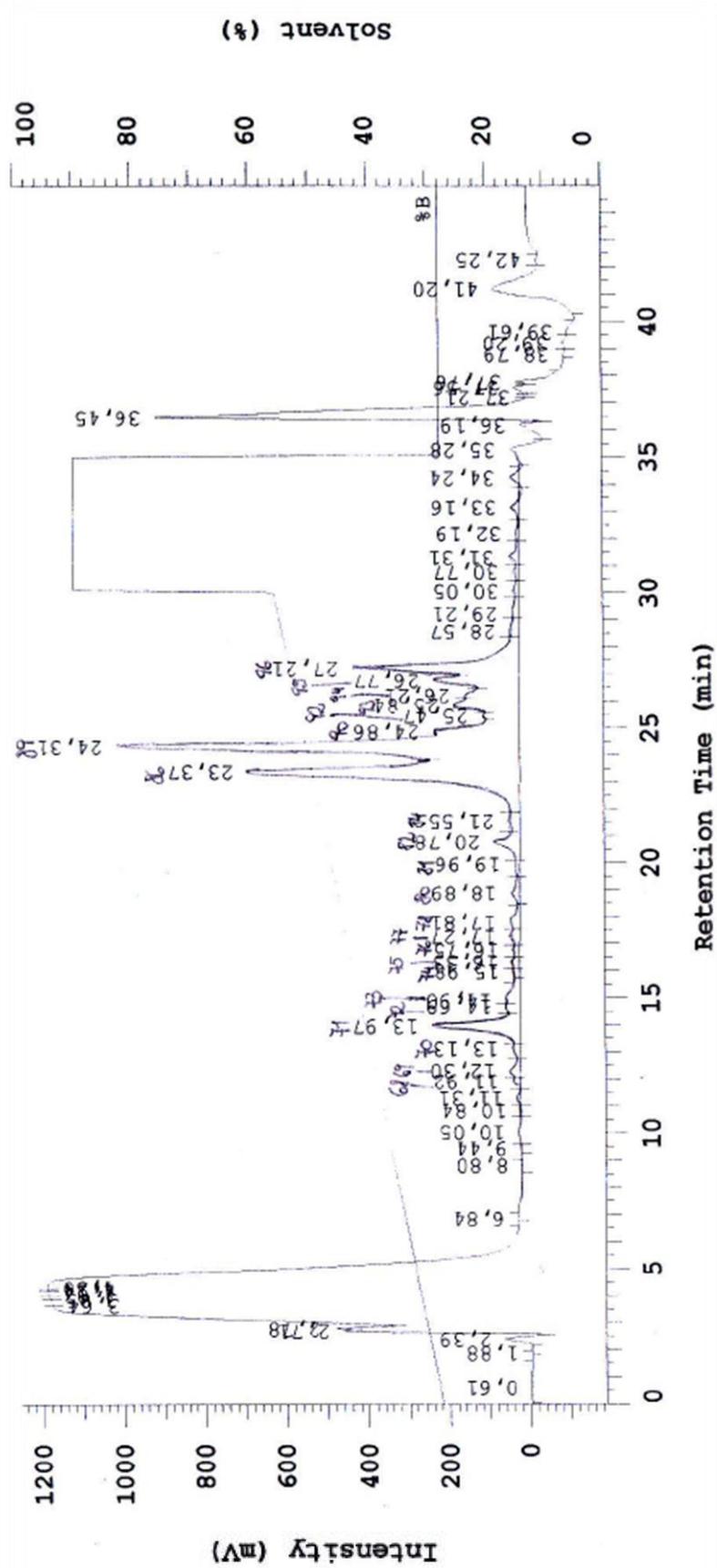


Abb. 10: Peaknummerierung 68-98: Hordenin

#### 4.2.4 Qualitätsparameter der Braugerste

Sämtliche Qualitätsparameter wurden im Zuge der amtlichen Sortenprüfung im Routinebetrieb des Institutes für Sortenwesen bestimmt. Die Qualitätsparameter der Gerste wurden laut der Vorschrift „Analytica-EBC, 1975“ ermittelt. Obwohl die Durchführung der Analysen nicht Teil der vorliegenden Diplomarbeit war, sind im Folgenden die Untersuchungsverfahren kurz beschrieben.

##### *Feinschrot-Extraktausbeute*

Der Feinschrotextraktgehalt gibt Auskunft über den Gehalt des Malzes an wasserlöslichen Bestandteilen - die Angabe erfolgt in [% mas].

Für die Feinschrot- bzw. Grobschrotanalyse wurde eine ausreichende Menge Malz gezogen. Für die Vermahlung des Grobschrot-Extraktes wurde eine Schlagkreuzmühle (unter Verwendung eines 2,5 mm-Siebes) verwendet. Die Vermahlung für die Bestimmung des Feinschrot-Extraktes erfolgte auf einer MIAG Kegelmühle. Im Schrot erfolgte die Feuchtigkeitsbestimmung. Anschließend wurden von jedem Malzschrot 50,0g in einen Maischbecher übergeführt, mit erwärmtem destillierten Wasser versetzt (Temperatur in der Maische soll 45°C erreichen) und umgerührt (keine Klumpenbildung). Der Maischbecher wurde in ein vorgeheiztes Maischbad gestellt. Die Temperatur wurde während des Maischprozesses 30 Minuten lang bei 45°C gehalten, um sodann innerhalb von 25 Minuten auf 70°C erhöht zu werden. Diese Temperatur wurde eine Stunde lang gehalten, anschließend wurde die Maische auf 20°C abgekühlt. Die Maische wurde ständig mittels Rührer in Bewegung gehalten. Der Rührer wurde nach dem Prozess abgespült und der Inhalt des Bechers mit destilliertem Wasser auf 450 g aufgefüllt. Der Inhalt des Bechers wurde filtriert. Anschließend wurde mit einem PAAR-Dichtemessgerät die Dichte bestimmt, anhand von Tabellen bzw. daraus abgeleiteten Regressionsgleichungen wurde der Extraktgehalt der Würze bestimmt.

Der Extraktgehalt des Malzes wurde wie folgt berechnet:

$$E = \frac{P(W+800)}{100-P} \text{ und } E' = \frac{E \cdot 100}{100-W}$$

E = % Extrakt im lufttrockenen Malz

E' = % Extrakt in der Trockensubstanz

P = g Extrakt in 100 g Würze

W = Feuchtigkeit des Malzes in %

### Extraktdifferenz

Von der Differenz zwischen Fein- und Grobschrotextraktgehalt eines Malzes kann auf dessen Lösungsgrad geschlossen werden. Die Angabe erfolgt in [% mas]

Folgende Grenzwerte für die „Auflösung“ gibt es:

Extraktdifferenz	Auflösung
< 1,3 %	sehr gut
1,3 – 1,9 %	gut
2,0 – 2,6 %	normal
2,7 – 3,3 %	schlecht
> 3,3 %	sehr schlecht

### Diastatische Kraft

20 g Feinschrot aus Malz wurden eingewogen, mit 480 mL kaltem destilliertem Wasser versetzt und für eine Stunde in ein 40 °C Wasserbad - unter ständigem Rühren - gestellt. Der Becherinhalt wurde abgekühlt und mit destilliertem Wasser auf 520 g aufgewogen. Vier 200 mL-Messkolben wurden mit Stärkelösung versetzt, zusätzlich wurden die ersten beiden Messkolben (1 und 2) mit Acetatpuffer vermengt und alle Messkolben kamen in ein Wasserbad bei 20 °C. Nach 20 min wurden in Messkolben 1 und 2 5 mL Malzauszug einpipettiert und erneut für 30 min ins Wasserbad gestellt. Zur Inaktivierung wurde danach allen Messkolben Natriumhydroxidlösung zugegeben und Messkolben 3 und 4 mit Malzauszug versetzt. Die Kolben wurden mit destilliertem Wasser aufgefüllt und reagierten alkalisch gegen Thymolphthaleinlösung. Der durch die diastatische Wirkung gebildete Zucker wurde jodometrisch bestimmt.

Berechnung: Angabe in [g Maltose/100 g Malz]

$$\text{Lintner Grade} = 0,3 * [(mL \text{ Jodlösung}1; 2 - mL \text{ Jodlösung}3; 4) * \text{Faktor}] + 4$$

Bei einer Einwaage von 20 g Malz beträgt der Faktor 34,2.

### Löslicher Stickstoff

Der gesamtlösliche Stickstoff wurde nach einem modifizierten Verfahren, durch Eindicken einer definierten Würzmenge mittels Verdunstung im Trockenschrank bei 103°C, durchgeführt. Das Auswiegen der eingedickten Würze und die Analyse einer Teilmenge nach der Verbrennungsmethode erfolgten im Stickstoffanalysator. Die Ergebnisse wurden in mg/100g Malz angegeben.

### *Kolbachzahl*

Die Kolbachzahl beschreibt das Verhältnis zwischen löslichem Stickstoff und Gesamtstickstoff des Malzes. Die Angabe erfolgt in [% mas].

### *Mälzung*

Die Gerste wurde einem ca. einwöchigen Mälzungsprozess unterzogen, um fertiges Darmalz herzustellen, dieses wird für die Bierherstellung benötigt. Schrittweise wurden während der Mälzung Proben gezogen, um die Veränderungen der Proteinfractionen im Laufe des Prozesses zu analysieren.

### *Geräte für Mälzung*

- Kleinmälzungsanlage Phoenix-System (Automatic Micromalting System, Phoenix Systems, Australien) (Abb. 11, Abb. 12)
- Waage (Model BA BC 200, Sartorius, Deutschland)
- Waage (Typ H59, August Sauter KG, Deutschland)
- Rundfilterpapier (MN 640 M Ø 185 mm No. 43 Ref. 203 018, Macherey-Nagel, Deutschland)
- Verschließbare Plastikdosen
- Gefriertrockner (Christ Alpha 1-4, Christ, Deutschland) (Abb. 14)
- Drehschiebervakuumpumpe (Typ DVO 004B, Balzers, Germany)(Abb. 14)
- Gefrierschrank
- Getreidereiniger (Typ Pr. S mit Standardsiebsatz und 33 mm Entgrannerstiften, Farikat Pfeuffer, Deutschland) (Abb. 13)
  - Sieb 1: Schlitzloch 500 (5 mm)
  - Sieb 2: Rund/Querschlitze (2 mm/1,5 mm)
  - Sieb 3: Schlitzloch 250 (2,5 mm)



Abb. 11: Kleinmälzungsanlage



Abb. 12: Kleinmälzungsanlage bestückt mit Edelstahl-Behälter



Abb. 13: Getreidereiniger



Abb. 14: Gefriertrockner mit Vakuumpumpe

### **Reinigung**

Bevor mit der Mälzung begonnen werden konnte, wurde die Braugerste gereinigt. Durch die maschinelle Reinigung wurde ein Großteil der Verunreinigungen (z.B. Unkrautsamen, Staub, Steine, Erde, Spelzen, Grannen) entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels eines Getreidereinigers. Dieser wurde mit der Probe gefüllt und der Reinigungsvorgang durchgeführt. Im Zuge der Reinigung wurde auch die Siebung durchgeführt. Für die Kleinmälzung wurden ausschließlich Gerstenkörner mit  $< 2,5$  mm Durchmesser verwendet.

### **Kleinmälzung**

Mit der sortierten Gerste ( $>2,5$  mm) wurde ein Kleinmälzungsversuch durchgeführt, dafür wurden 20 runde Edelstahl-Behälter für die Mälzung mit einem runden Filterpapier ausgelegt und jeweils 250 g Braugerste eingewogen.

Die Kleinmälzungsanlage wurde mit den Behältern bestückt und es wurde nach folgendem Schema gemälzt (modifiziertes Mälzungsschema - Weihenstephan):

1. Wäsche	1 Stunde	
2. Weiche	4 Stunden	14,0°C
3. Luftkeimung	19 Stunden	14,0°C
4. Weiche	2 Stunden	14,0°C
5. Luftkeimung	24 Stunden	14,0°C
6. Einstellen des Weichgrades auf 45 % durch Wasserzugabe		
7. Luftkeimung	115 Stunden	13,5°C
8. Schwelk-Prozess	17 Stunden	50,0°C
9. Darre	1 Stunde	60,0°C
10. Darre	1 Stunde	70,0°C
11. Darre	8 Stunden	80,0°C
12. Entnahme bei 60,0°C		

Zu Beginn, in Abständen von 24 Stunden sowie vom fertigen Darrmalz wurden etwa 100 g Probe entnommen und bei -18°C tiefgefroren. Die gesammelten Proben wurden anschließend gefriergetrocknet, geschrotet und anschließend extrahiert und mittels HPLC analysiert (siehe Punkt 4.2.1 und 4.2.2).

#### 4.2.5 $\alpha$ -Amylaseaktivität

In den Fraktionen der HPLC-Trennung der Albumine von Gerstenmalz wurde versucht die  $\alpha$ -Amylaseaktivität auf der Basis der Jod-Stärkereaktion zu bestimmen. Hierzu wirkten HPLC-Eluat auf eine Lösung von verkleisterter Stärke ein.

##### *Geräte für $\alpha$ -Amylaseaktivität*

- Wasserbad (Typ 3043, Kottermann, Deutschland)
- Fraktionskollektor (Typ 2070 ULTRORAC®II, Fa. LKB Bromma, Schweden)
- Photometer (Spektralphotometer PM 6, Zeiss, Deutschland)
- Analysenwaage (Mettler AT200, Mettler Toledo, Schweiz)
- Vortex (MS1 Minishaker, IKA Works, USA)
- Bunsenbrenner mit Stativ
- Eprouvetten
- Div. Bechergläser
- Div. Pipetten (Eppendorf, Deutschland)
- Plastikkuvetten 1 cm

### *Chemikalien für $\alpha$ -Amylaseaktivität*

- Stärke löslich (Bestellnr. 1.01252.0250, Merck, Deutschland)
- Jod (Bestellnr. 1.04761.0500, Merck, Deutschland)
- Kaliumjodid p.a. (Bestellnr. 1.05043.1000, Merck, Deutschland)
- Bi-distilliertes Wasser

Zur Testdurchführung wurde folgende Lösung hergestellt:

- 0,01 N Jod/Kaliumjodid-Lösung

### *Vorbereitungen*

Als Substrat für die Enzymreaktion wurde gemäß der EBC-Vorschrift für die Diastatische Kraft eine Stärkelösung hergestellt, dafür wurden 10 g lösliche Stärke mit 400 mL kochendem Wasser vermischt, nachgespült und auf 500 mL aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung unter mehrmaligem Rühren abgekühlt. Die unverdünnte Stärkelösung wurde am Tage der Verwendung hergestellt [Analytica-EBC, 1975].

Bestimmung des Extinktionsmaximums der Jod/Stärkereaktion: 25  $\mu$ L unverdünnte Stärkelösung wurden mit 5 mL bi-distilliertem Wasser und 1 mL 0,01N Jodlösung versetzt und am Minishaker durchgeschüttelt. Die Konzentration wurde so gewählt, dass bei etwa 1 cm Schichtdicke eine transparente Lösung vorlag. Im Bereich von 360 bis 800 nm wurde in einer 1 cm Küvette gegen bi-distilliertes Wasser in Abständen von 10 nm die Extinktion gemessen.

Bestimmung der optimalen Stärkekonzentration: 25 bis 300  $\mu$ L unverdünnte Stärkelösung wurden mit 5 mL bi-distilliertem Wasser verdünnt, mit 25  $\mu$ L 0,01N Jod/Kaliumjodid-Lösung je Ansatz versetzt und am Vortex-Schüttler gemischt. Die Extinktion der Lösungen wurde beim Extinktionsmaximum gemessen. Es wurde eine Extinktion von 0,5 bis 1,0 angestrebt.

Prüfung der  $\alpha$ -Amylaseaktivität (Vorversuch mit Malzextrakt): Um zu überprüfen, ob die  $\alpha$ -Amylaseaktivität nach der Extraktion mit Pufferlösung (Lösung A gemäß Seite 25), Verdünnung durch das Laufmittel und weitere Verdünnung des Eluates mit bi-distilliertem Wasser ausreichend für den Nachweis durch die Jod/Stärkereaktion ist, wurden 0,1 g Malzschrot in 35 mL bi-distilliertem Wasser (Volumen des gesamten Eluates) suspendiert und 10 Minuten lang am Magnetrührer gerührt. Die Suspension wurde filtriert und je 1 mL des Filtrates mit 10 bzw. 100 mL verdünnt. Je 3,75 mL bi-distilliertes Wasser, 1 mL unverdünntes Filtrat sowie 1 mL Filtrat von jeder

Verdünnungsstufe wurden mit 25µL unverdünnter Stärkelösung versetzt und 15 Minuten bei 70°C in ein Wasserbad gestellt. Die Proberöhrchen wurden unter fließendem Wasser abgekühlt und mit 1 mL 0,01N Jod/Kaliumjodidlösung versetzt und auf Jodnormalität geprüft.

### *Messung der $\alpha$ -Amylaseaktivität*

1. Versuch: Minutenweise wurde das Eluat (= 1 mL) einer HPLC-Albumin- bzw. Hordein-Protein-Analyse von Malz mit dem Fraktionskollektor in Eprouvetten aufgefangen. 1 mL Eluat wurde mit 25 µL verdünnte Stärkelösung (1:4) versetzt, am Minishaker geschüttelt und bei 70°C im Wasserbad 15 min inkubiert. Anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlt, 25 µL Jodlösung hinzugegeben, am Minishaker durchgeschüttelt und eine photometrische Messung im Absorptionsmaximum durchgeführt.

2. Versuch: Das minutenweise aufgefangene Eluat (je 1 mL) wurde 1:100 mit bi-distilliertem Wasser verdünnt. Anschließend wurde 1 mL verdünnte Stärkelösung (1:4) hinzugesetzt, am Minishaker durchgeschüttelt und 15 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Eprouvetten auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 1 mL Jodlösung versetzt. Anschließend wurden die Lösungen am Minishaker durchgeschüttelt. Die photometrische Messung wurde im Absorptionsmaximum durchgeführt.

### **4.2.6 ELISA**

Der ELISA wurde mit einem Testkit durchgeführt, dem die Antigen-Antikörper-Reaktion zugrunde liegt. Er war ein Sandwich-Enzymimmunoassay, welcher sich zur quantitativen Bestimmung von Prolaminen aus Weizen (Gliadin), Roggen (Secalin) und Gerste (Hordein) eignet. Die im Testkit enthaltenen Mikrotiterplatten sind in den Vertiefungen mit spezifischen Antikörpern gegen Gliadin beschichtet, durch die Zugabe der Probe bzw. Standards kam es zu einer Komplexbildung mit den darin enthaltenen Antigenen. In weiterer Folge wurden mit Enzymen konjugierte Antikörper zugegeben, wodurch enzymatisch aktive Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe entstanden, welche nach Zugabe von dem im Testkit enthaltenen Substrat zu Farbreaktionen befähigt waren. Durch Zugabe bestimmter im Testkit enthaltenen Reagenzien kam es zur Färbung, die mit dem Photometer gemessen wurde. Die gemessene Extinktion entsprach proportional der Prolamin-Konzentration in der Probe.

### Geräte für ELISA

- Mikrotiterplatten-Photometer 450 nm (UVM 340, ASYS, Österreich)
- Fraktionsverdampfer Fractovap (Vortex Evaporator, Buechler Instruments Lapcone Company, USA) (Abb. 15)
- Vakuumschüttler (Vakuumschüttler, Buechler Instruments Lapcone Company, USA) (Abb. 15)
- Vakuumpumpe (Typ MZ 2C/2,4; Vacuubrand, Deutschland) (Abb. 15)
- Controller (Typ CVC 24, Vaccubrand, Deutschland)
- Kühlgerät (Kühlung Lauda UKT 1000 P, Lauda, Deutschland) (Abb. 16)
- Epprovetten
- Trockenschrank (Typ 1811530000202, WTBbinder, Deutschland)
- Fraktionskollektor (Typ 2070 ULTRORAC®II, Fa. LKB Bromma, Schweden)
- Vortex (MS1 Minishaker, IKA Works, USA)
- Mikropipetten variable 20 µL – 200 µL; 200 µL – 1000 µL (Eppendorf, Deutschland)
- Mehrkanalpipette 100-1200 µL (6-Kanal, EPD3-Plus 100-1200 µL, Art.Nr. 17001603, Mettler-Toledo, Deutschland)
- Mehrkanalpipette (Eppendorf, Deutschland)
- Div. Bechergläser, Pipetten und Glasgefäße



Abb. 15: Fractovap, Vakuumschüttler, Vakuumpumpe



Abb. 16: Kühlgerät

### Chemikalien für ELISA

- Cocktail Lösung (Cocktail-Solution, Art.No. R7006, R-Biopharm AG, Deutschland)
- RIDASCREEN® Gliadin-Test (Art.No.: R7001, R-Biopharm AG, Deutschland)

- Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten
- Gliadin Standards (0 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 40 ppb, 80 ppb Gliadin)
- Konjugat
- Substrat
- Chromogen
- Stopp-Reagenz
- Probenpuffer
- Waschpuffer
- Ethanol (Bestellnr. 1.00983.2500, Merck, Deutschland)

Zur Testdurchführung wurde folgendes Lösungsmittel hergestellt:

- Ethanolösung 80 % vol

### *Vorbereitungsmaßnahmen*

Verwendete Geräte mussten gereinigt und frei von Prolamin-Spuren sein, desweiteren wurde der ELISA-Test in einem anderen Raum als die Probenaufbereitung durchgeführt, um mögliche Kontamination zu vermeiden. Während der Testdurchführung wurde sehr exakt gearbeitet, um mögliche Verunreinigung zu verhindern. Ein rasches Arbeiten war notwendig sowie keine bzw. nur geringe Pausen, denn die Kavitäten durften während der Durchführung niemals austrocknen und die Lösungen sollten nur die angegebene Zeit einwirken. Die benötigten Chemikalien wurden so spät als möglich vorbereitet bzw. verdünnt, damit sie möglichst „frisch“ verwendet werden konnten. Zuvor wurden sie auf Zimmertemperatur gebracht (keine Kristallbildung der gelösten Chemikalien).

### *Probenvorbereitung*

Minutenweise wurde das Proben-Eluat (= 1 mL) nach einer HPLC-Analyse von Hordein bzw. Hordenin in Eprovetten aufgefangen. Bei Hordenin wurden einige Fraktionen zusammengefasst, d.h. nach Abklärung mit dem Chromatogramm zusammen gemischt (z.B.: Minute eins bis acht, ...), da nicht genügend Kavitäten vorhanden waren. Anschließend fraktionsweise im Fraktionsverdampfer (der aus Fractovap, Vakuumschüttler, Vakuumpumpe, Kühlgerät und Fraktionskollektor besteht) eingedampft bis die gesamte Flüssigkeit entfernt war. Die Eprovetten wurden mit 0,5 mL Cocktaillösung versetzt und 40 min bei 50°C im Trockenschrank abgedeckt inkubiert. Anschließend mit 1,5 mL Ethanol (80 % vol) versetzt und am Minishaker gut durchgeschüttelt (Abb. 17).

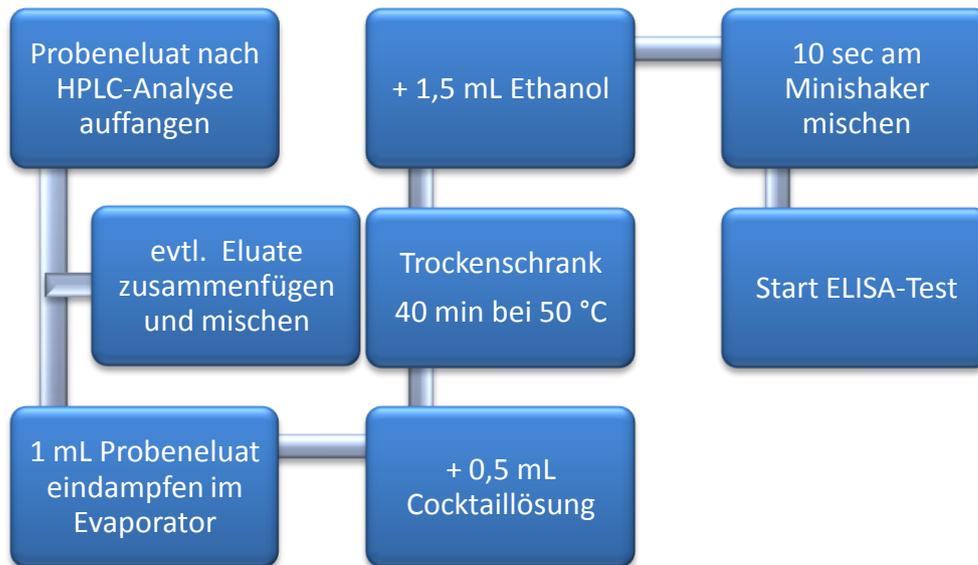


Abb. 17: Probenvorbereitung für ELISA-Test

### Testdurchführung

Die benötigten Kavitäten wurden auf der Mikrotiterplatte aufgesteckt und entsprechend der Proben und Standards durchnummeriert. Der Probenpuffer lag als 5-fach Konzentrat vor, für den Test wurde dieser 1:5 mit dest. Wasser verdünnt. 980  $\mu\text{L}$  verdünnter Probenpuffer wurde in die Epruvetten vorgelegt und mit 20  $\mu\text{L}$  vorbereiteter Probe (aus dem Trockenschrank, Abkühlung auf Zimmertemperatur) versetzt und kurz am Minishaker (10 sec) durchgeschüttelt. 100  $\mu\text{L}$  dieser verdünnten Probe bzw. 100  $\mu\text{L}$  aus den Standardfläschchen wurde in die einzelnen Kavitäten pipettiert, der Halterahmen wurde anschließend in 8er-Bewegung gekreist, um ein vollständiges Benetzen zu gewährleisten und die Lösungen wurden 30 min abgedeckt inkubiert. Während der Inkubationszeit konnte der Waschpuffer hergestellt werden, es wurde darauf geachtet, dass sich vor dem Verdünnen alle eventuell gebildeten Kristalle gelöst haben, bei Bedarf war ein Wasserbad mit 37°C zu verwenden. Der Waschpuffer wurde 1:10 mit dest. Wasser verdünnt. Nach der Inkubationszeit wurden die Kavitäten mit den enthaltenen Proben und Standards mit Schwung geleert (so viel Flüssigkeit wie möglich entfernt) und auf Papiertüchern ausgeklopft. Anschließend wurden die Kavitäten jeweils dreimal mit 300  $\mu\text{L}$  Waschpuffer gefüllt und erneut entleert und ausgeklopft. Nach dem 1. Waschgang wurde das Enzymkonjugat vorbereitet, dieses wurde 1:11 mit dest. Wasser verdünnt und sofort zur Lagerung ins Dunkle gestellt (lichtempfindlich). Nach Abschluss des Waschgangs wurden 100  $\mu\text{L}$  Enzymkonjugat in die Kavitäten pipettiert und danach die Halterung in 8er-Bewegung gekreist. Die Lösung wurde 30 min abgedeckt inkubiert. Erneut wurden die Kavitäten mit Schwung geleert und dreimal mit je 300  $\mu\text{L}$  Waschpuffer gewaschen.

Gewaschene Kavitäten wurden mit jeweils 50  $\mu\text{L}$  Substrat und 50  $\mu\text{L}$  Chromogen versetzt, der Halterungsrahmen in 8er-Bewegung gekreist und 30 min im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 100  $\mu\text{L}$  Stopp-Reagenz hinzugegeben, erneut in 8er-Bewegungen gekreist und sofort (innerhalb 30 min) die photometrische Messung bei 450 nm durchgeführt (Abb. 18).

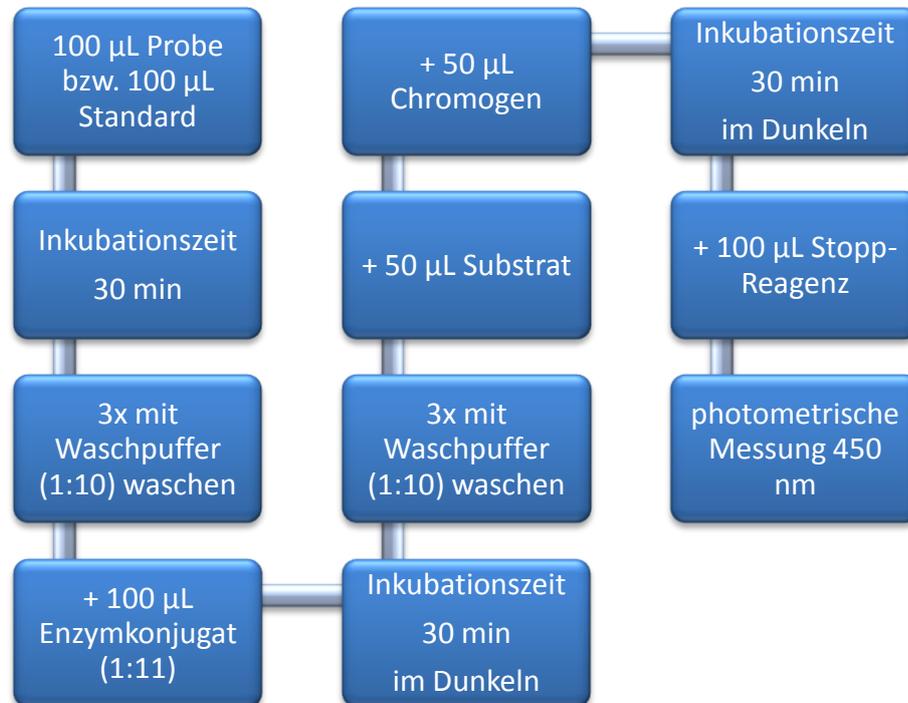


Abb. 18: ELISA-Test Pipettierschema Kavitäten

### 4.3 Statistische Methode

Um die Zusammenhänge zwischen den chromatographischen Proteinspektren und den Qualitätseigenschaften von Gerstenproben zu analysieren, wurde eine multivariate Datenanalyse mittels einer Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Zur Anwendung kam die Version 9.8 des Programmes „Unscrambler - Multivariate Datenanalyse: für Pharma-, Bio und Prozessanalytik von Waltraud Kessler“ [KESSLER, 2007].

Bei der Analyse wurden Datensätze von unabhängigen Variablen, die in mg Protein/g Korn umgerechneten Peakflächen in den ausgewerteten Chromatogrammen, in ein Koordinatensystem eingeordnet, wobei sich die Achsen der Hauptkomponenten (PCs) nach der größten im System vorhandenen Variabilität ausrichteten. Die erste Hauptachse richtete sich nach der größten durch die Variabilität der Ergebnisse einzelner Proteinfractionen hervorgerufenen Streuung, während die zweite Hauptkomponente normal auf die erste stand und sich in ihrer Ebene der größten Streuung ausrichtete. Das System wuchs um eine Dimension bzw. Hauptkomponente für jeden ausgewerteten Peak.

Mittels der Hauptkomponentenanalyse war es möglich, mehrere unabhängige Variable zu einer Hauptkomponente zusammen zu fassen und somit den Datensatz bei geringstmöglichem Informationsverlust zu verkleinern. Für die Berechnung der Modelle wurde das Verfahren der Multikomponent-Regression herangezogen.

Auswertung des Statistik-Diagramms: [KESSLER, 2007]

Der „Scoreplot“ lieferte Informationen über die Gruppenbildungen von den verschiedenen Gerstensorten bei den Qualitätsparametern. Mit dieser Darstellung konnten auch mögliche „Ausreißer“ von Proben ermittelt werden (Abb. 19a).

Die Verteilung der einzelnen Peaks und die Erkennung jener Peaks mit der größten Variabilität war anhand der „X-loadings“ (Abb. 19b) feststellbar. Die Loadings gaben die Gewichtung eines Parameters bei der jeweiligen Hauptkomponente an. Die positiven oder negativen Einflüsse der Peaks wurden mit den b-Koeffizienten berechnet, diese mussten in allen berechneten Teilmodellen im jeweiligen Qualitätsparameter immer ein positives Vorzeichen (+) vorweisen, um einen positiven Einfluss zu bestätigen oder ein negatives Vorzeichen (-), um einen negativen Einfluss zu bestätigen. Bei Vorzeichenwechsel innerhalb eines Peaks konnte kein klar definierter Einfluss des Peaks auf den Parameter erfolgen. Die Berechnung der b-Koeffizienten erfolgte ebenfalls anhand der Daten von Abb. 19b.

Die Abb. 19c zeigte die Berechnung der erklärten Kalibrierungsvarianz (blauer Balken) und der erklärten Validierungsvarianz (roter Balken). Diese Darstellung zeigte jenen Anteil an Varianz bei den einzelnen Hauptkomponenten, der durch das Rechenmodell erklärt wurde. Anhand dieser Daten erfolgte die Auswahl der optimalen PC. Die Validierung der errechneten Modelle erfolgte, indem der Datensatz in 20 Segmente eingeteilt wurde. Es wurde dabei jeweils ein Segment ausgelassen und beim Berechnen von 20 Modellen die Analyseergebnisse des jeweils fehlenden Segments berechnet. Zwischen den berechneten Werten und den Referenzwerten wurde im Rahmen der Validierung eine Korrelation berechnet. Es konnte somit jene PC ermittelt werden, mit der ein Großteil der gesamten Varianz erklärt wurde, ohne eine Überanpassung zu verursachen (Abb. 19c).

Der Zusammenhang der Daten untereinander wurde mittels des Regressionsmodells ermittelt, dabei wurden die gemessenen Werte (blaue Zahlen) und die vorhergesagten Werte (rote Zahlen) berechnet. Je näher die Validierungswerte (rot) an die Kalibrierungswerte (blau) kamen, desto robuster verhielt sich das Modell (Abb. 19d).

Durch die Veränderung der Chromatogramme und mithilfe der berechneten b-Koeffizienten konnten somit Rückschlüsse auf qualitätsrelevante Peaks und Fraktionen getroffen werden.

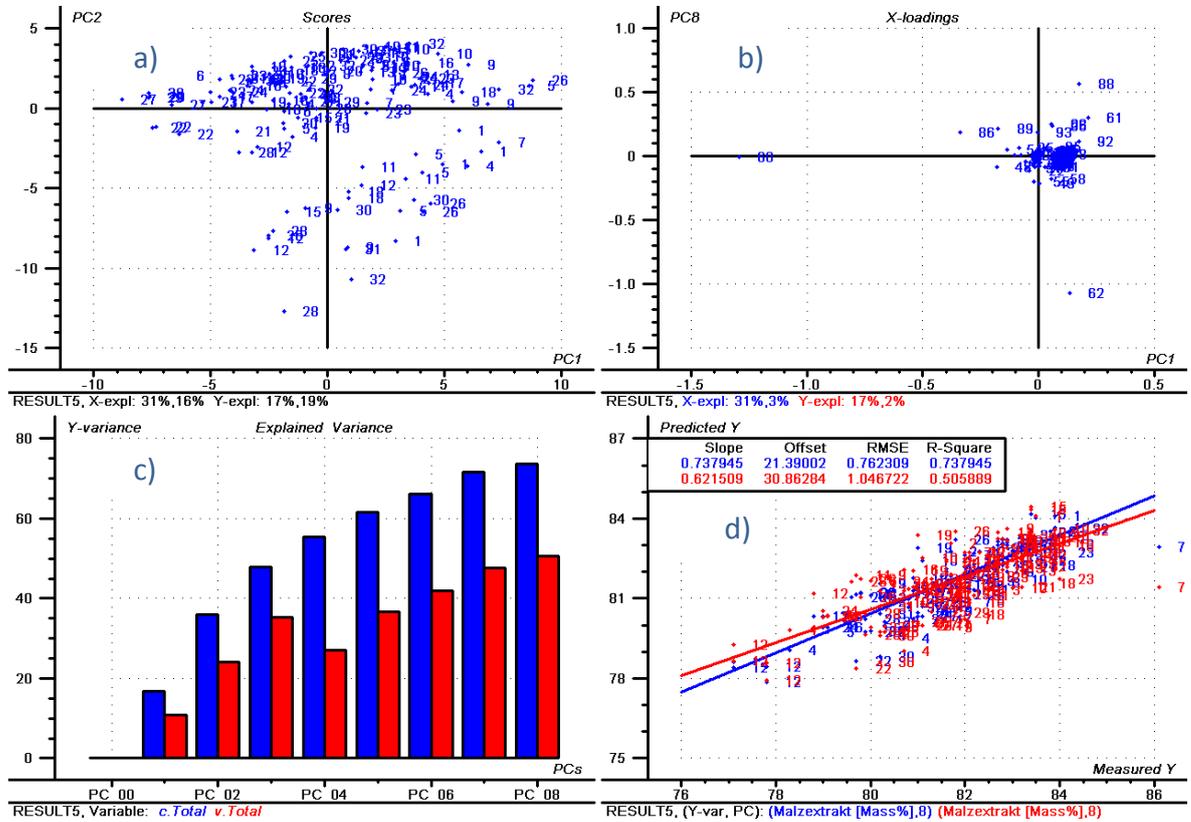


Abb. 19: Bsp. Auswertungsdiagramm: a) Probenverteilung, b) Peakverteilung, c) Varianz, d) Regression

## 5 Versuchsdurchführung

### 5.1 Trennung der Speicherproteine der Gerste in Fraktionen

Die Proteine wurden durch die in Kapitel 4.2 detailliert beschriebenen Extraktionsverfahren nach Albuminen&Globulinen, Hordeinen und Hordeninen getrennt, aus den Proben extrahiert und durch die ebenfalls beschriebenen HPLC-Methoden getrennt. Neben der analytischen Trennung zur quantitativen Erfassung der Proteinfractionen wurden auch präparative Trennungen für die Untersuchung der Amylaseaktivität und der immunologischen Eigenschaften durch ELISA durchgeführt.

### 5.2 Charakterisierung der Proteine hinsichtlich ihrer technologischen Einflüsse

Die Proteinpeaks wurden fraktionsweise, d.h. getrennt nach Albuminen und Globulinen, Hordeinen und Hordeninen, mit den Qualitätsparametern in Beziehung gesetzt und durch multivariate Datenanalyse ausgewertet, um Rückschlüsse auf die technologischen Eigenschaften zu erhalten. Mittels der statistischen Auswertung konnte ermittelt werden, welche Einzelpeaks oder Peakpaare in den Fraktionen und als Gesamtes einen positiven bzw. negativen Einfluss auf die einzelnen Qualitätseigenschaften aufwiesen.

### 5.3 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm: „Unscrambler - Multivariate Datenanalyse: für Pharma-, Bio und Prozessanalytik von Waltraud Kessler“ [KESSLER, 2007]. Es wurden die Zusammenhänge der chromatographischen Proteinspektren und der Qualitätseigenschaften von Gerstenproben mittels multivariate Datenanalyse von Hauptkomponenten analysiert.

### 5.4 Beobachtung technologisch relevanter Proteine während des Mälzungsprozesses

Im Zuge einer durchgeführten Kleinmälzung mit einer Gerstensorte wurde täglich eine Probe entnommen und für die Extraktion mit anschließender HPLC-Analyse vorbereitet. Die Chromatogramme wurden zueinander in Beziehung gesetzt, um die Veränderungen der Proteine während des durchgeführten Mälzungsprozesses sichtbar zu machen.

## 5.5 Charakterisierung der Proteine hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität

Von Gerstenproben wurden HPLC-Eluat der einzelnen Fraktionen aufgefangen und nach der Probenvorbereitung mit Jodlösung versetzt. Mittels Photometer wurde die enzymatische Aktivität der Amylase gemessen und ausgewertet.

## 5.6 Charakterisierung der Proteine hinsichtlich ihrer immunologischen Eigenschaften gegenüber dem R5 Antikörper

HPLC-Eluat der Fraktion Hordein und Hordenin einer Gerstenprobe wurden minutenweise gesammelt, eingedampft und für den Sandwich-ELISA-Test vorbereitet. Nach Behandlung mit bestimmten Reagenzien erfolgte die photometrische Messung. Der Gehalt der Fraktionen an Epitopen, welche der Spezifität des R5-Antikörpers entsprechen, wurde mit ELISA festgestellt. Mit den Ergebnissen konnte ein Rückschluss auf die immunologischen Eigenschaften gegenüber dem R5-Antikörper getroffen werden.

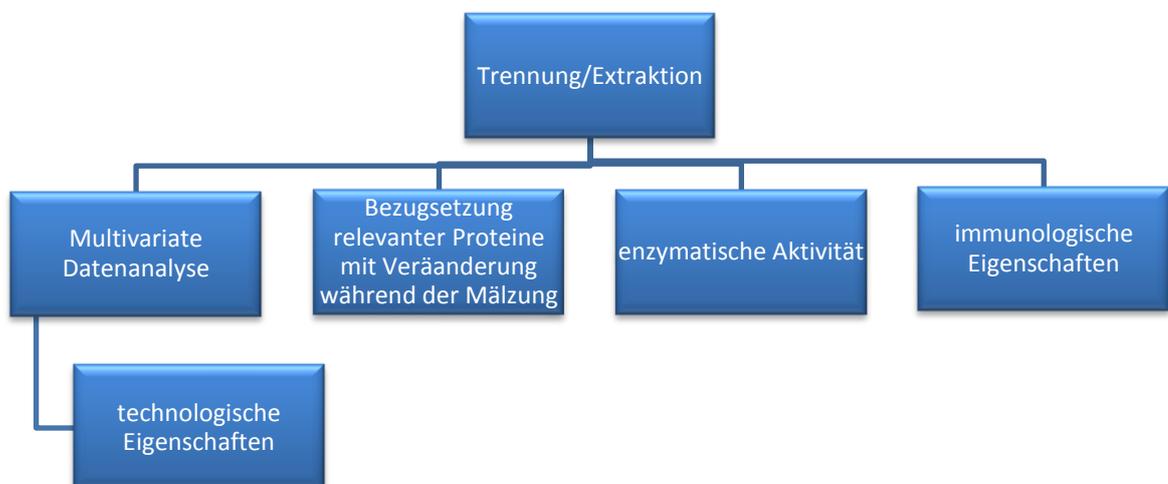


Abb. 20: Versuchsdurchführung

## 6 Ergebnisse und Diskussion

### 6.1 Ergebnisse der Proteinspektrenanalyse

#### 6.1.1 Feinschrot-Extraktausbeute

Anhand der Scores der einzelnen Rechenmodelle können mögliche Gruppenbildungen der analysierten Proben ersichtlich werden. Die Einzelwerte der Peaks jeder Probe sind auf die jeweiligen Hauptkomponenten projiziert, wobei mittels der Hauptkomponenten 1 und 2 der größte Anteil der Variabilität des Probensatzes erklärt wird. Es zeigte sich bei fast allen Rechenmodellen, sowohl bei der Berechnung mit der Gesamtzahl an Proben als auch bei den Teilprobenmengen, dass der Großteil der Probenwerte in einer leicht ansteigenden ovalen Punktwolke angeordnet war, sowie rechts unter der Wolke eine zweite wesentliche schwächer besetzte Zone auftrat, dabei waren jedoch keine Gruppenbildungen einzelner Proben bzw. Sorten zu erkennen. Es könnte sich hierbei um spezielle Standorteinflüsse bzw. Einflüsse des Kleinmälzungsprozesses handeln (Abb. 21, Abb. 22, Abb. 23). Alle Probenwerte werden in die Rechenmodelle trotz etwaiger Abweichung mit einbezogen, da sich dadurch die Stabilität der Rechenmodelle erhöht und sich dies in der Praxis bewährt hat.

Bei der Berechnung des Gesamtprobenmodell mit allen Proteinfractionen konnte ein Rechenmodell mit einem Korrelationskoeffizienten von 69,3 % bei der Kalibration erstellt werden ( $n = 288$ , 144 Proben in Doppelbestimmung). Mittels der ersten Hauptkomponente wurden nur etwa 10 % der Werte der Extraktausbeute erklärt und mit der darauffolgenden zweiten Hauptkomponente nur etwa 30 % der Streuung. Zum Erreichen des Optimums waren 9 Hauptkomponenten notwendig, wobei die letzte Hauptkomponente nur noch 2 % zur Aufklärung beitrug. Bei den Teilprobenmengen aller Proteinfractionen wurden 8 Hauptkomponenten als optimal angenommen. Es kann aufgrund der hohen Anzahl an Hauptkomponenten der Schluss gezogen werden, dass die Einflüsse auf die Extraktausbeute sehr komplex sind. Aus technologischer Sicht kann dies einerseits durch die Enzymaktivität, die erst während der Mälzung ausgebildet wird, erklärt werden, andererseits ist aber bekannt, dass ein hoher Proteingehalt die Stärke vor dem Zugriff der Enzyme schützt. Es liegt also ein durchaus ambivalentes Verhältnis des Proteins zur Extraktausbeute vor. Bei der durchgeführten Validierung – Ausschluss eines

Teiles der Proben bei der Kalibrierung und Berechnung des Zielparameters in den ausgeschlossenen Proben mit Hilfe des errechneten Modells – konnte eine Korrelation zwischen berechneten und gemessenen Werten von  $R^2 = 0,569$  festgestellt werden (Abb. 21).

Die erste Hauptkomponente (X-loading) beim Gesamtmodell, wie auch bei den Teilprobenmodellen, wurde von den Peaks 60 und 61 aus der Hordeinfraktion dominiert, die miteinander indirekt korrelierten, wie den unterschiedlichen Vorzeichen auf der Achse der ersten Hauptkomponente zu entnehmen ist. Die neunte Hauptkomponente aus dem Gesamtprobenmodell wurde wesentlich von den Peaks 62, 88, 89 und 92 bestimmt, die letztgenannten drei Peaks (88, 89, 92) gehören hierbei der Hordeninfraktion an. Die 8. Hauptkomponente aus dem Teilprobenmodell wurde durch die Peaks 59, 62, 89 und 92 bestimmt. Die Übereinstimmung mit dem Gesamtmodell ist trotz kleiner Abweichung erstaunlich hoch.

Die aus den Teilprobenmengen berechneten Korrelationskoeffizienten der Kalibration betragen je nach Stichprobenauswahl zwischen 69,4 % und 73,8 %. Es erweckt somit den Anschein, dass auch aus kleineren Probenzahlen ( $n = 144$ ) brauchbare Modelle berechnet werden können. Es zeigte sich jedoch bei der Validierung der Modelle, dass deren Präzision erheblich verringert wurde. Die Korrelation zwischen berechneten und gemessenen Werten betrug nur mehr  $R^2 = 0,506$  bzw.  $R^2 = 0,420$  (Abb. 22, Abb. 23). Insgesamt gab es beim Vergleich der b-Koeffizienten aus den berechneten Teilprobenmodellen mit jenem Modell aus der Gesamtheit aller Proben eine hohe Übereinstimmung.

Bei Berechnung der Osborne-Fraktionen konnte mithilfe der errechneten Korrelationskoeffizienten eine Aussage über die Einflüsse der einzelnen analysierten Fraktionen getroffen werden. Bei den Albuminen und Globulinen konnte bereits nach 3 Hauptkomponenten aufgrund der geringeren Anzahl der in die Berechnung einbezogenen Peaks ein Optimum analysiert werden - jedoch auf niedrigerem Niveau als bei der Gesamtmodell-Berechnung. Es wurde ein Korrelationskoeffizient von  $R^2 = 0,526$  festgestellt sowie bei der Validierung ein Wert von  $R^2 = 0,484$  (Abb. 24). Bei der Hordeinfraktion wurde ein  $R^2 = 0,466$  bzw.  $0,373$  ermittelt (Abb. 27) und bei der Hordeninfraktion lag der Wert nur mehr bei  $R^2 = 0,336$  bzw.  $0,234$  (Abb. 30). Anhand dieser Ergebnisse wird ein etwas engerer Zusammenhang zwischen einigen Peaks der Albumin-

und Globulin-Fraktion mit der Extraktausbeute des Malzes angedeutet und in weiterer Folge auch ein Einfluss der Hordeine-Fraktion. Bei Betrachtung der b-Koeffizienten überwiegen vor allem bei den Hordeinen jene mit negativen Vorzeichen (Tab. 3), dies deckt sich deutlich mit dem Hinweis der negativen Einflüsse des Proteingehaltes und speziell des Gehaltes an Hordeinen auf die Extraktausbeute. Als Empfehlung für die Pflanzenzüchtung kann somit die Förderung der Peaks mit positiven Vorzeichen und eine Reduktion der Peaks mit negativen Vorzeichen bzw. eine Erhöhung des Albumin-Anteiles zu Lasten des Hordein-Anteiles gegeben werden.

In der ersten Hauptkomponente der Albumin- und Globulin-Fraktion wiesen vor allem die Peaks 17 und 18 und in der dritten Hauptkomponente die Peaks 15 und 16 starke Variabilität auf (Abb. 24, Abb. 25, Abb. 26). Diese Peaks sind jedoch durch keine großen b-Koeffizienten gekennzeichnet (Tab. 3), somit haben jene Peaks mit der größten Variationsbreite keinen wesentlichen Einfluss auf die Extraktausbeute. Ebenso ist zu bemerken, dass die bei den Validierungen erhaltenen Korrelationskoeffizienten nach Durchschreiten des Optimums wieder abnehmen. D.h. die Einbeziehung weiterer Hauptkomponenten in die Kalibrierung stellt nur eine Scheinanpassung dar, durch welche die Aussagekraft des Modells nicht erhöht wird. Dieses Rechenmodell stellt somit lediglich eine grobe Abschätzung des Einflusses dieser Komponenten auf die Extraktausbeute dar. Eine Verwendung zur Vorhersage der Extraktausbeute ist aber extrem unsicher.

Bei der Hordein-Fraktion wiesen, wie schon beim Gesamtmodell ersichtlich, die Peaks 60 und 61 die größte Variabilität auf die erste Hauptkomponente auf (Abb. 27, Abb. 28, Abb. 29). Beide Peaks weisen einen hohen negativen b-Koeffizienten auf und üben somit einen starken negativen Einfluss auf die Extraktausbeute aus.

Die Hordenin-Fraktion wird vor allem von den Peaks 88, 89, 91, 92 und 96 beeinflusst, diese Proteinfractionen weisen jedoch sehr niedrige b-Koeffizienten auf und somit ergibt sich deren praktische Bedeutungslosigkeit, die zweifellos eine Erklärung für den geringen Beitrag der Hordenine zur Streuung der Feinschrot-Extraktausbeute liefert (Abb. 30, Abb. 31, Abb. 32). Ebenso wurde bei der Validierung mit zunehmender Zahl an Hauptkomponenten ein Rücklauf dieser festgestellt, dadurch ist mit diesem Rechenmodell die Vorhersagekraft sehr gering.

Tab. 3: b-Koeffizienten: Feinschrotextrakt

b-Koeffizienten, Feinschrotextrakt								
Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Albumine	Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Hordeine	Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Hordenine
1	50	70	34	6	26	68	-31	0
2	0	1	35	-90	0	69	14	90
3	0	0	36	0	0	70	-51	-1
4	15	0	37	-86	0	71	0	0
5	0	0	38	-34	-99	72	54	0
6	0	1	39	56	0	73	0	-1
7	0	-1	40	-7	-23	74	37	0
8	1	1	41	14	-27	75	64	0
9	0	64	42	-65	-85	76	-85	-1
10	-1	-1	43	0	1	77	0	1395
11	-79	0	44	44	97	78	0	1137
12	33	63	45	-1	-1	79	-17	0
13	-26	0	46	0	0	80	0	0
14	0	0	47	0	0	81	31	0
15	-83	0	48	76	0	82	0	5
16	0	-69	49	0	0	83	-20	0
17	0	0	50	0	0	84	-78	0
18	0	0	51	0	0	85	0	0
19	-92	0	52	-48	0	86	-13	0
20	0	0	53	-63	0	87	43	-79
21	0	-1	54	0	0	88	20	81
22	0	-54	55	0	-1	89	26	0
23	0	0	56	0	0	90	0	75
24	0	0	57	-66	74	91	0	0
25	0	12	58	0	0	92	0	0
26	0	0	59	-82	0	93	-74	0
27	-76	0	60	-78	0	94	0	0
28	0	0	61	-82	0	95	0	-47
29	0	0	62	-74	-67	96	0	0
30	91	35	63	-37	0	97	-76	0
31	0	0	64	0	-1	98	0	0
32	-43	-96	65	-44	-82			

Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Albumine	Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Hordeine	Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Hordenine
33	<b>11</b>	<b>16</b>	66	-15	-10			
			67	0	0			

**Rot:** Positive Vorzeichen in allen 3 Modellen

**Schwarz:** Vorzeichen in den 3 Modellen waren nicht gleich

**Blau:** Negative Vorzeichen in allen 3 Modellen

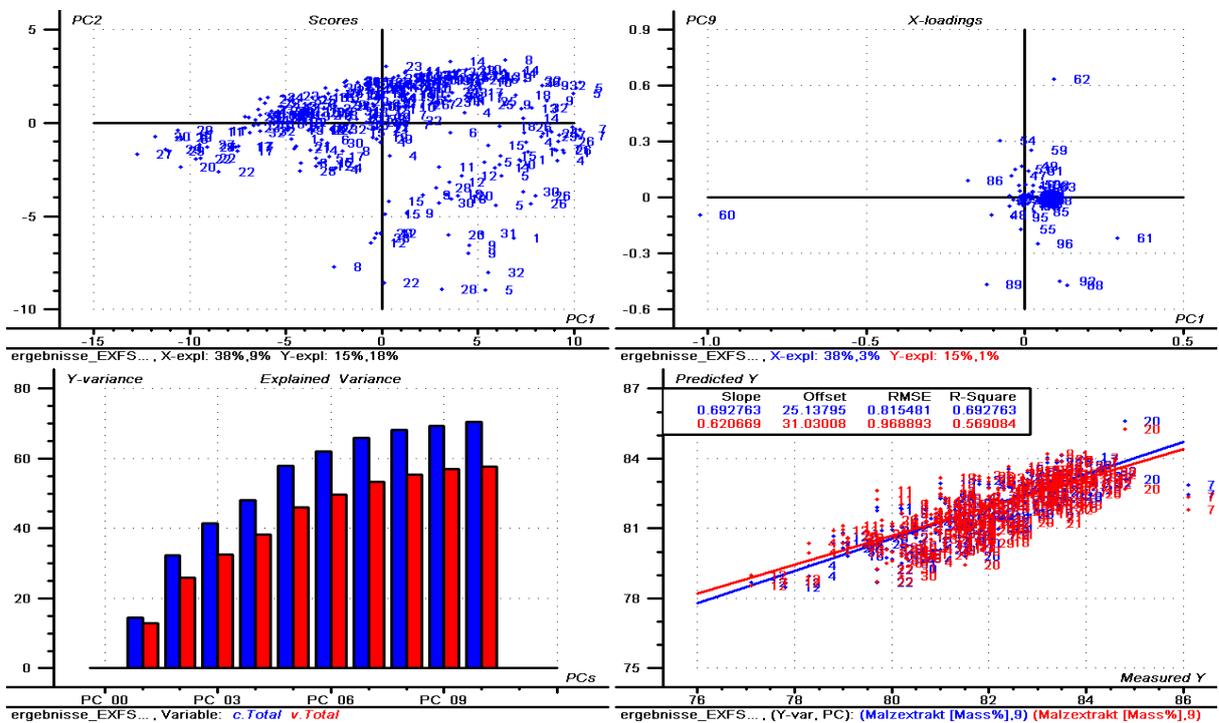


Abb. 21: Extraktausbeute, alle Fraktionen, alle Proben

# Ergebnisse und Diskussion

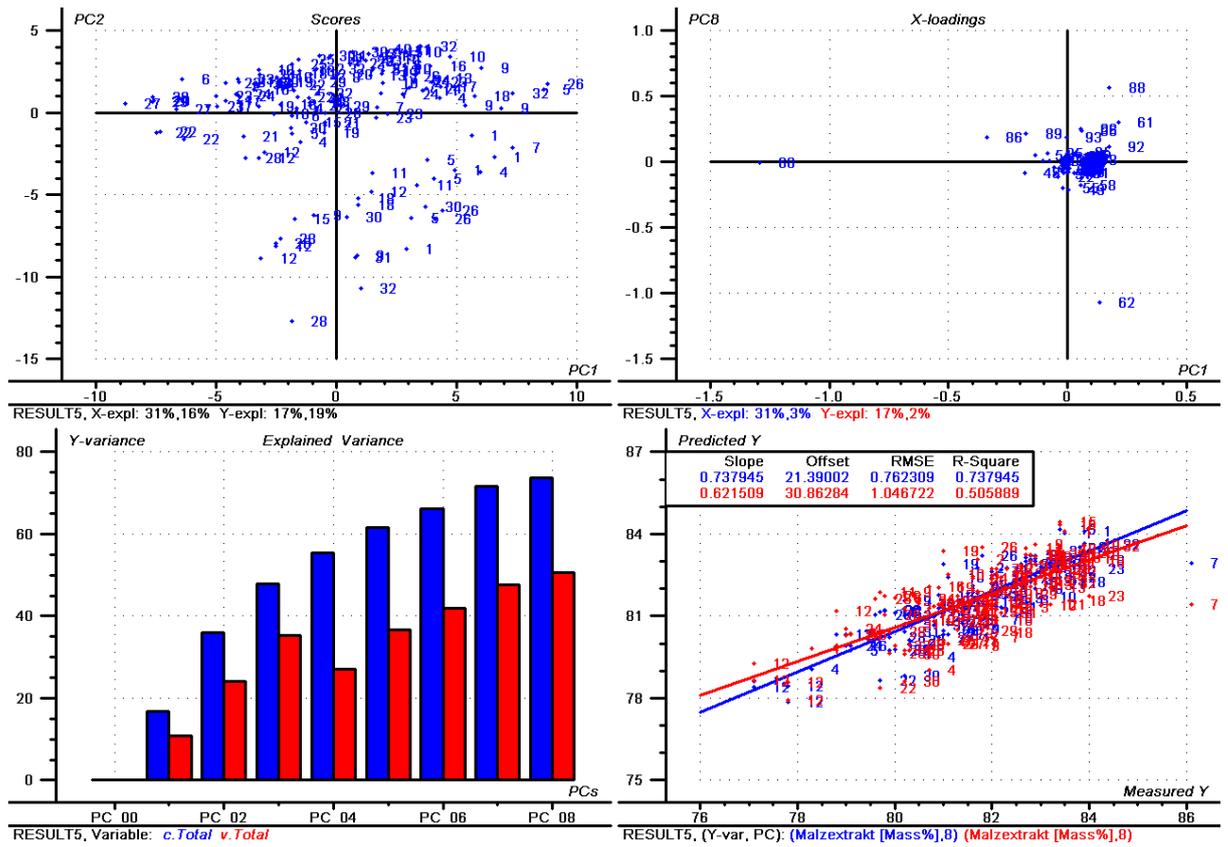


Abb. 22: Extraktausbeute, alle Fraktionen, 1. Teilprobenmenge

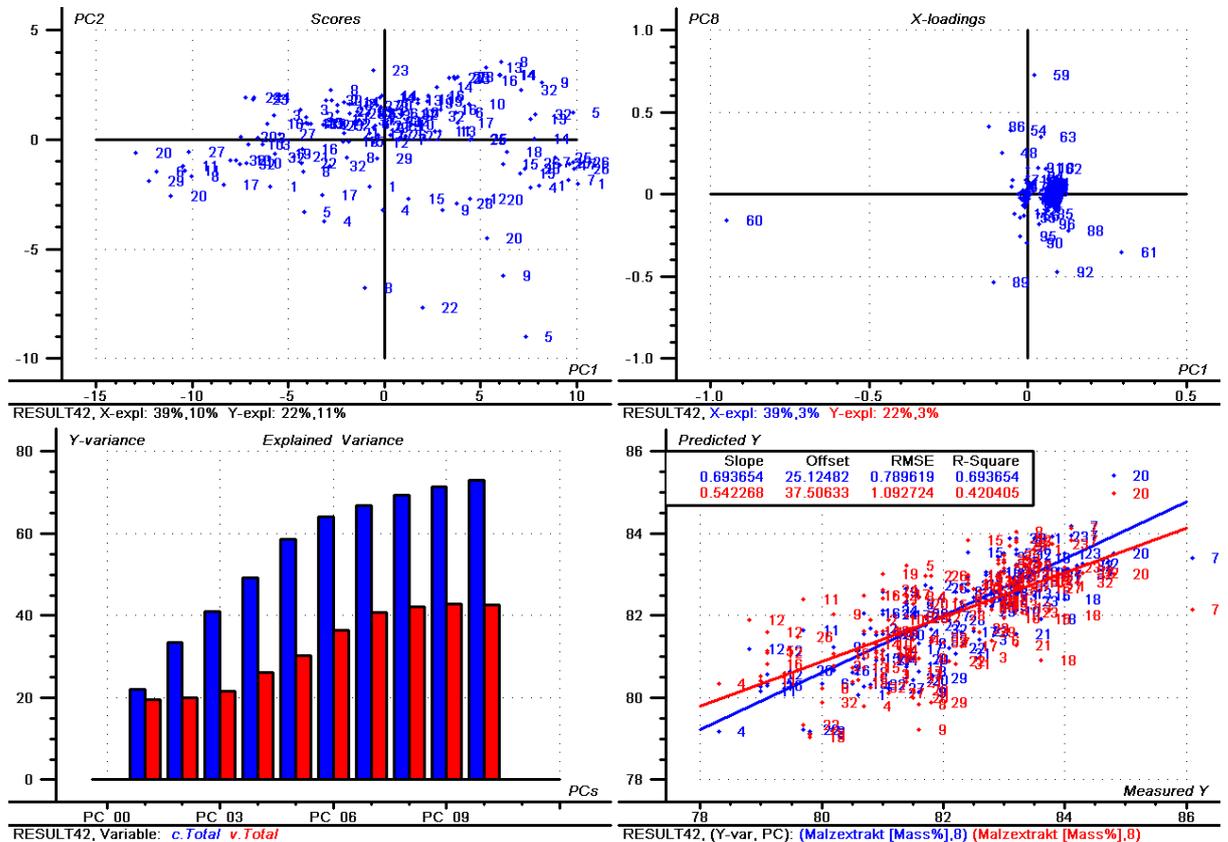


Abb. 23: Extraktausbeute, alle Fraktionen, 2. Teilprobenmenge

# Ergebnisse und Diskussion

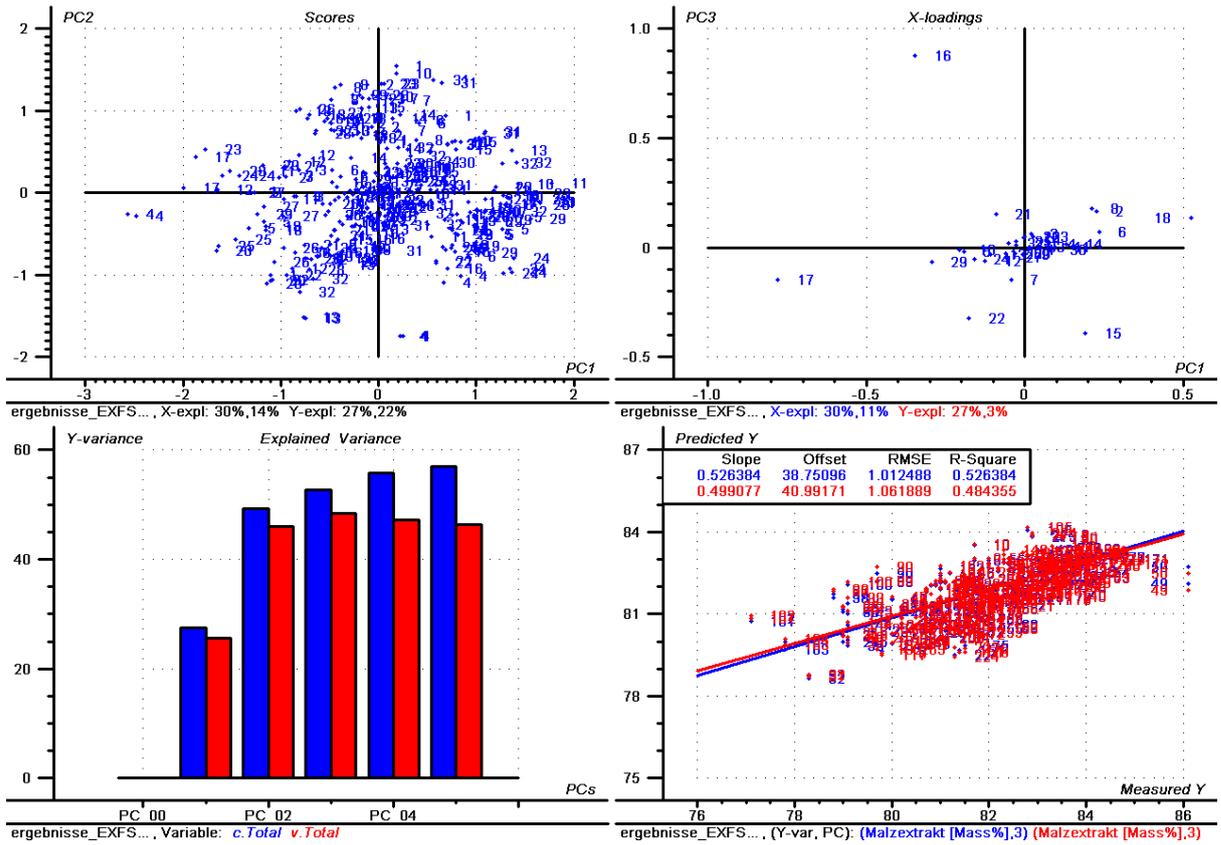


Abb. 24: Extraktausbeute, Albumine, alle Proben

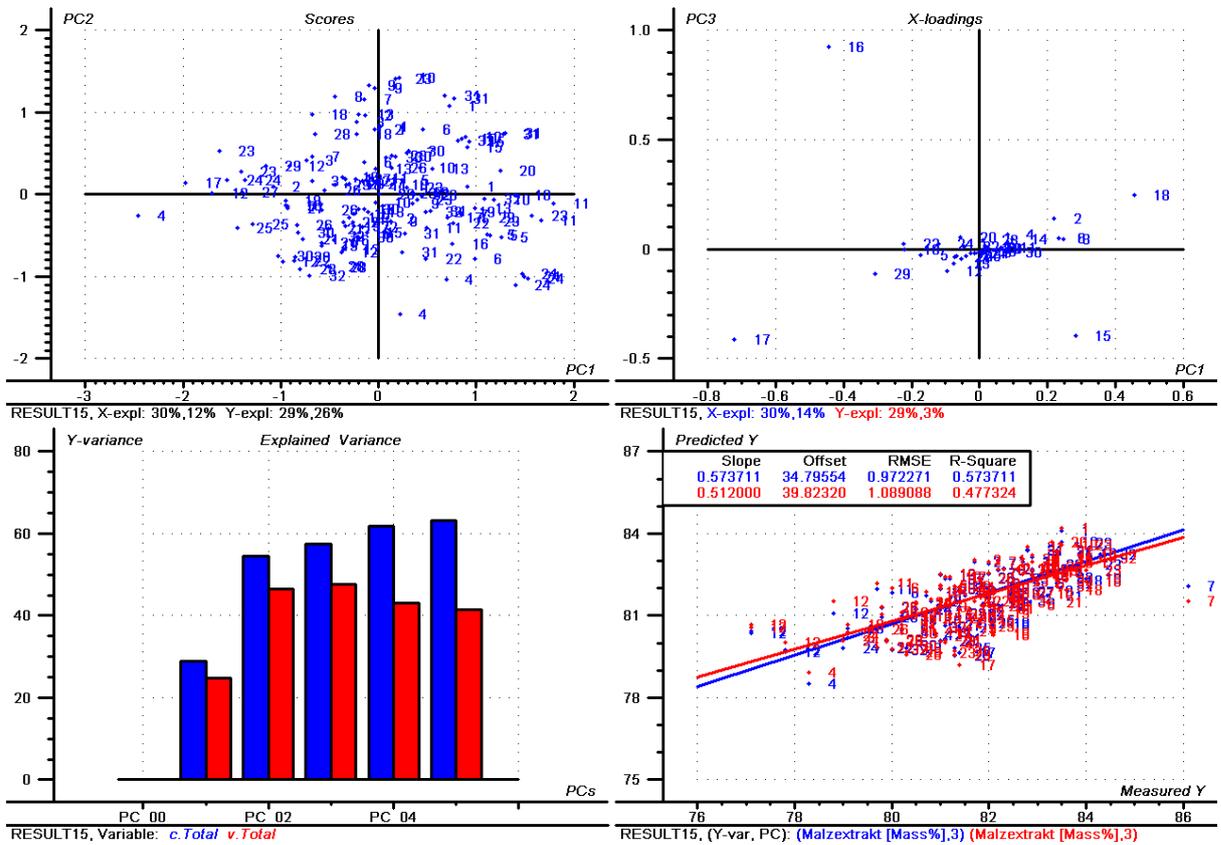


Abb. 25: Extraktausbeute, Albumine, 1. Teilprobenmenge

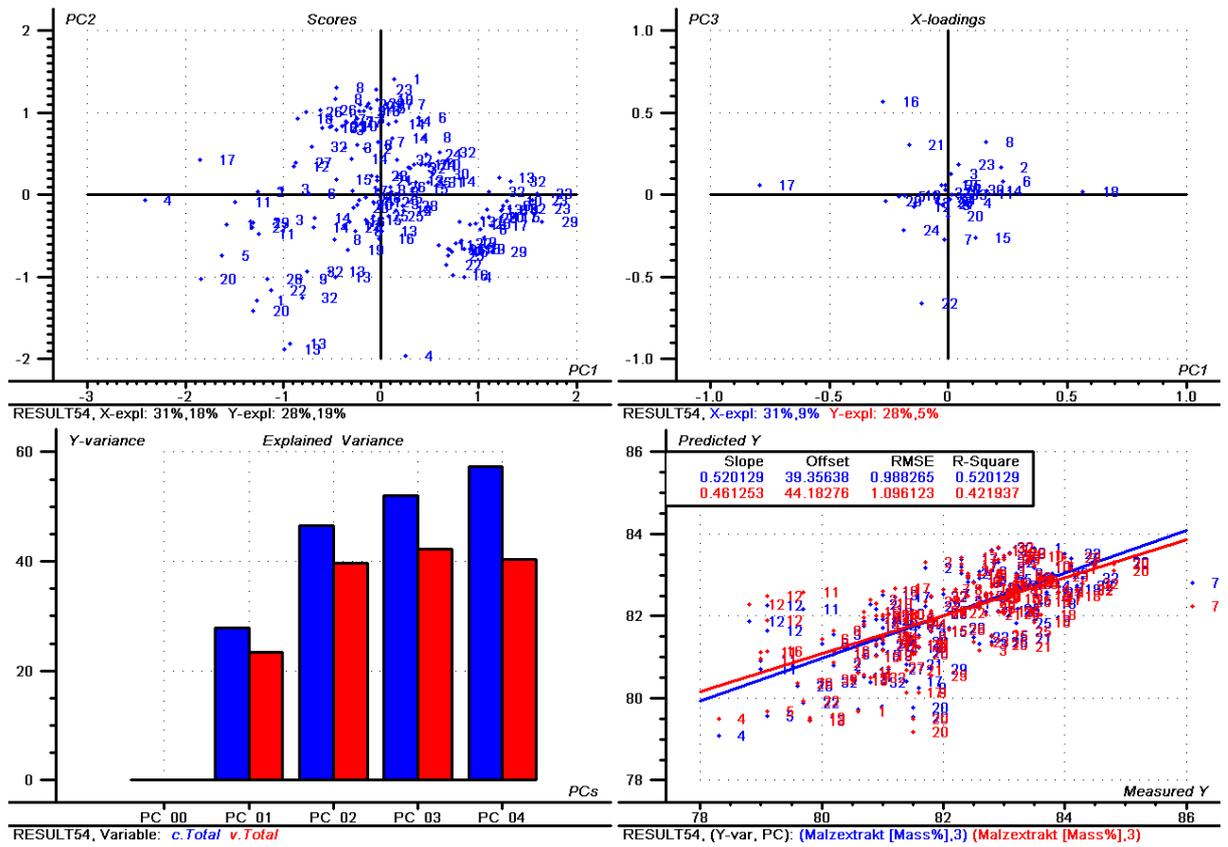


Abb. 26: Extraktausbeute, Albumine, 2. Teilprobenmenge

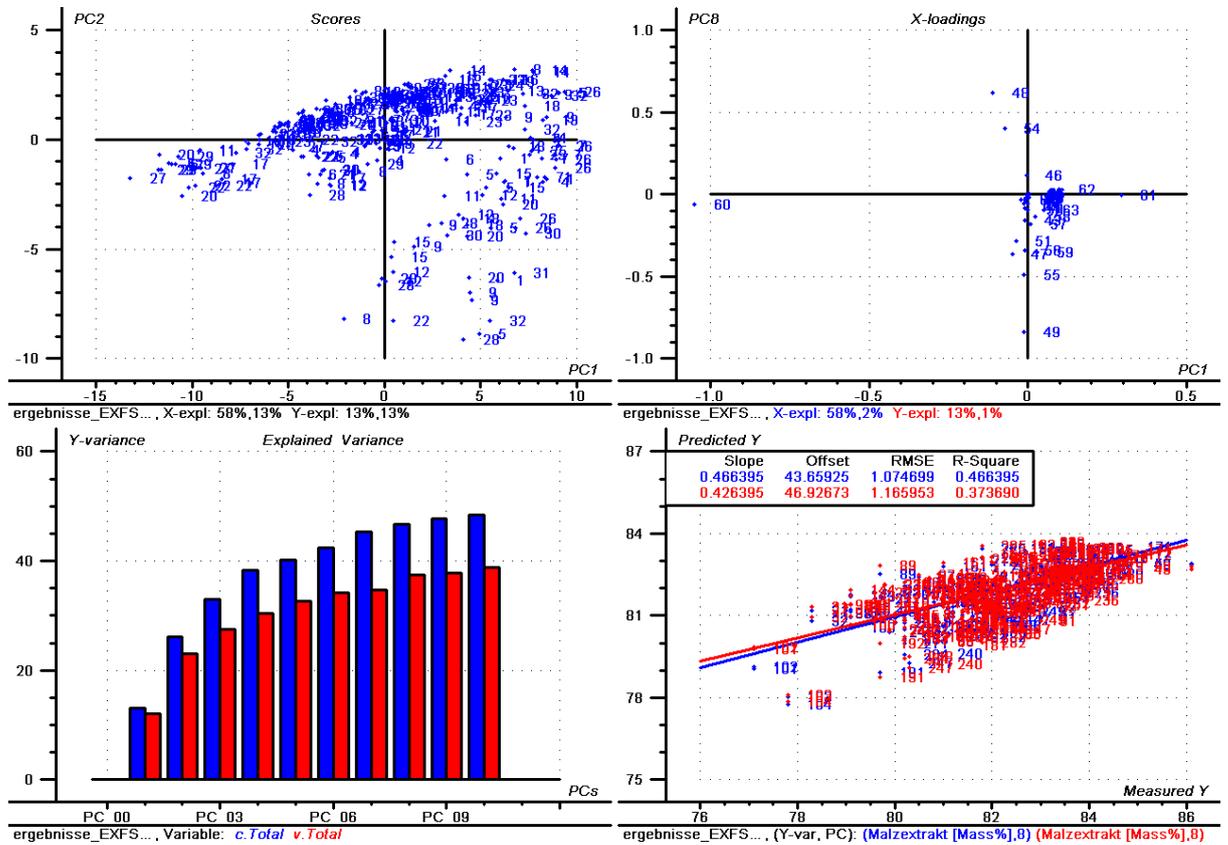


Abb. 27: Extraktausbeute, Hordeine, alle Proben

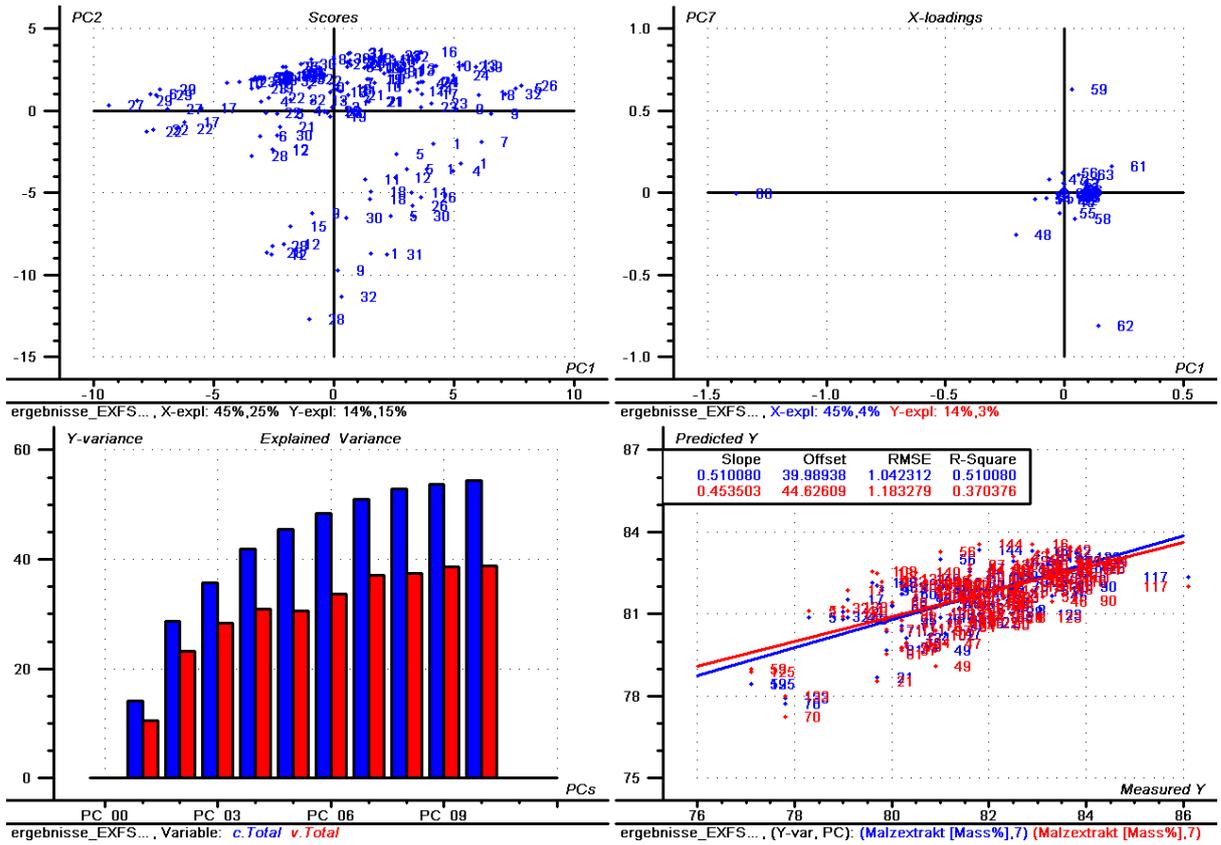


Abb. 28: Extraktausbeute, Hordeine, 1. Teilprobenmenge

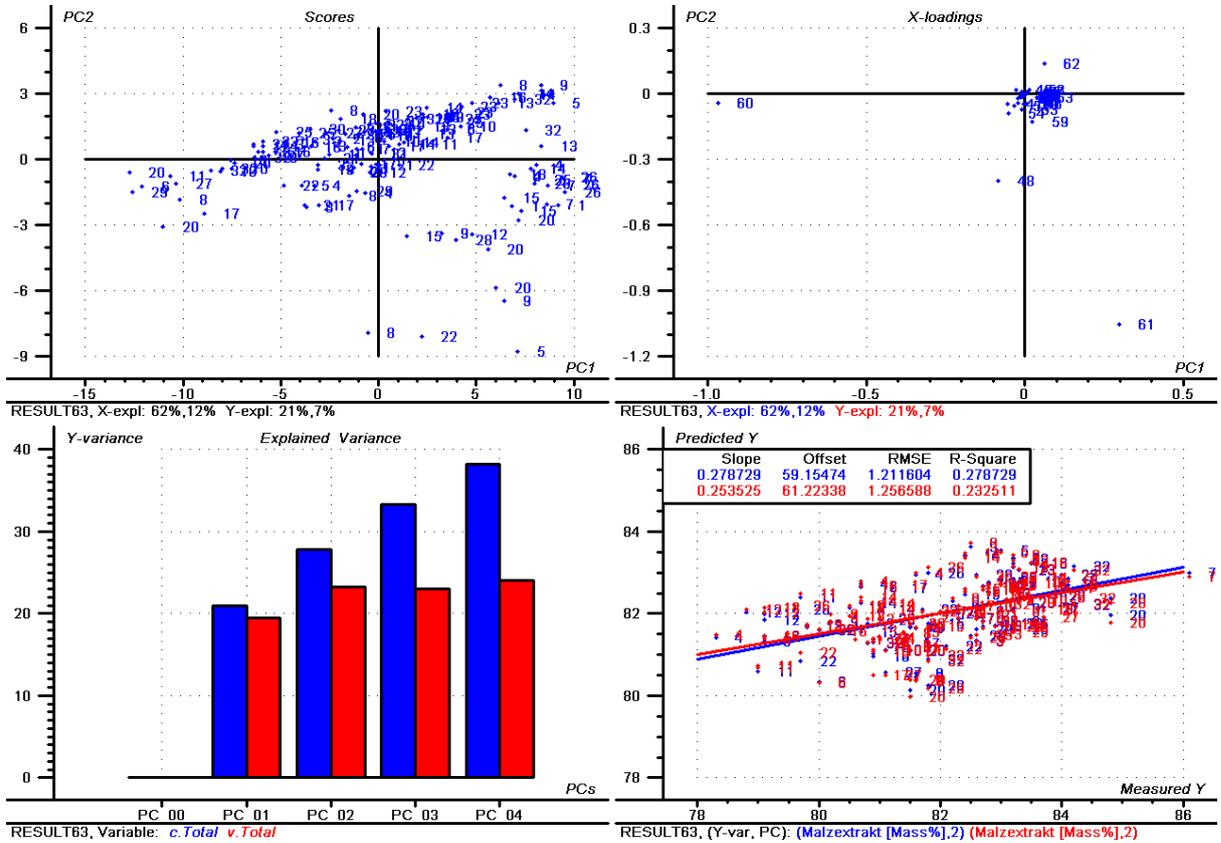


Abb. 29: Extraktausbeute, Hordeine, 2. Teilprobenmenge



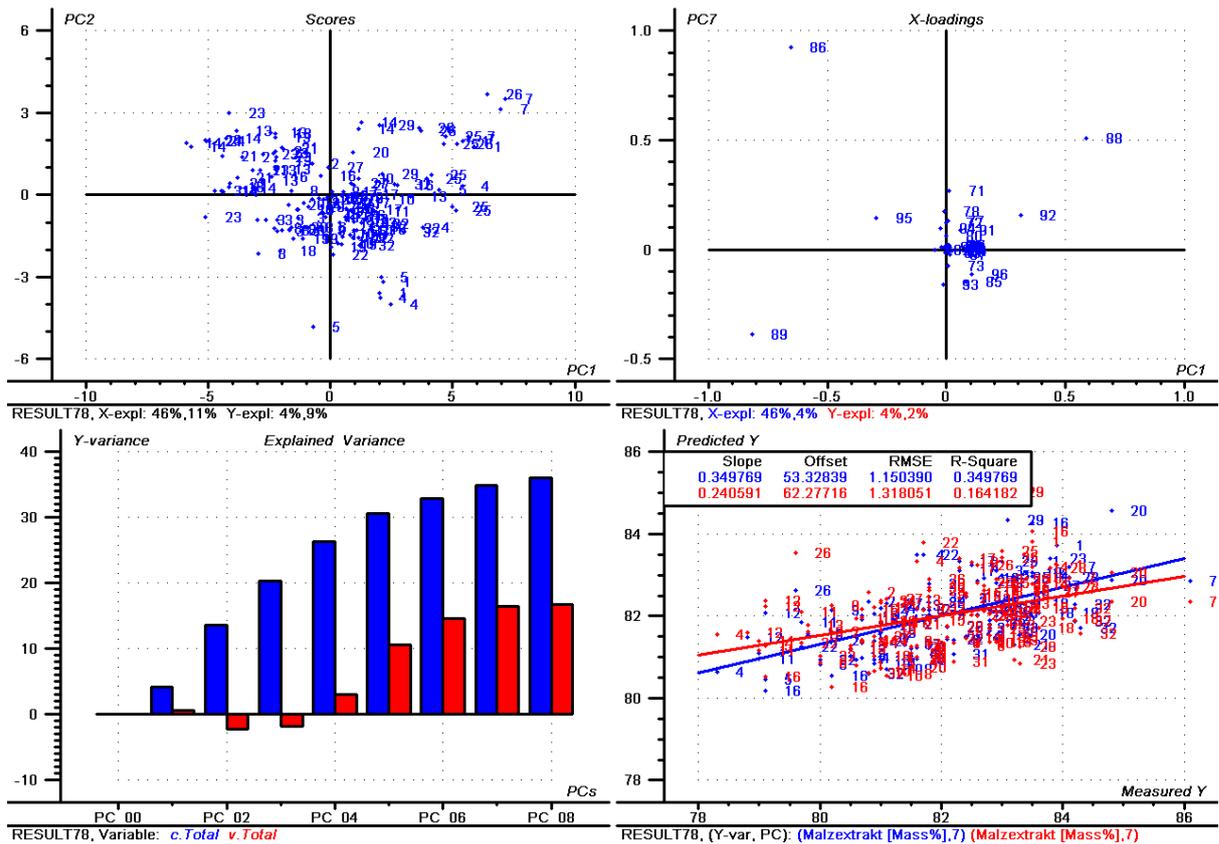


Abb. 32: Extraktausbeute, Hordenine, 2. Teilprobenmenge

### 6.1.2 Diastatische Kraft

Bei Betrachtung der Scores kam es, ähnlich wie bei der Feinschrot-Extraktausbeute, zu einer von links nach rechts ansteigenden ovalen Punktwolke und darüber kam es zu einer Ansammlung einzelner Probenwerte. Es waren aber auch hier keine Gruppenbildungen einzelner Sorten zu erkennen, somit kann nur angenommen werden, dass es sich hier ebenfalls um Standorteinflüsse bzw. Einflüsse des Kleinmälzungsprozesses handelt (Abb. 33).

Zum Erreichen des Optimums wurden bei der Berechnung des Rechenmodells erneut 9 Hauptkomponenten verwendet, wobei die 9. Hauptkomponente nur etwa 2 % der Werte erklärte. Insgesamt konnte beim Gesamtmodell eine Kalibration mit einem Bestimmtheitsmaß von 71,2 % erreicht werden und bei der Validierung ein Wert von 58,1 %. Der Kalibrationswert lag um einiges höher als bei der Extraktausbeute, der Validierungswert deckt sich in etwa mit jenem aus der Extraktausbeute (Abb. 33).

Bei den Teilprobenmodellen kam es bei Anwendung von 7 Hauptkomponenten ebenfalls zu hohen Differenzen zwischen den durch die Kalibration und den durch die Validierung erklärbaren Varianzen. Dies war ein eindeutiger Hinweis auf Überanpassung,

d.h. das Modell wird durch Hinzufügen einer siebenten Hauptkomponente nur scheinbar besser (Abb. 34, Abb. 35).

Die erste Hauptkomponente wurde wie bei der Extraktausbeute von den Peaks 60 und 61 aus der Hordein-Fraktion dominiert. Die Peaks 48, 59 und 62 wiesen eine starke Variabilität in der 9. Hauptkomponente auf. Die Peaks 48 und 62 zeigten unterschiedliche Vorzeichen bei der Berechnung der b-Koeffizienten aus den verschiedenen Modellen und wurden somit als nicht signifikant erkannt. Hohe positive Werte zeigten jedoch die Peaks 59, 60 und 61 (Tab. 4), d.h. diese Peaks sind mit der Diastatischen Kraft positiv korreliert und wiesen eine starke Variabilität aufgrund der Loadings-Darstellung auf.

Bei den Teilprobenmengen war wieder der starke Einfluss der Peaks 60 und 61 auf die erste Hauptkomponenten zu erkennen. In der 7. Hauptkomponente, die in beiden Teilprobenmodellen als optimal angenommen wurden, wiesen die Peaks 59, 62 und 63 eine hohe Variabilität auf, wobei die beiden erstgenannten Peaks im Gesamtprobenmodell schon ihren Einfluss zeigten. Peak 63 wies unterschiedliche Vorzeichen bei der b-Koeffizientenermittlung auf, der Einfluss dieser Proteinfraktion auf die Diastatische Kraft war somit zweifelhaft.

Bei den Rechenmodellen der einzelnen Osborne-Fraktionen wurde die erste Hauptkomponente in der Albumin- und Globulin-Fraktion durch die Peaks 17 und 18 stark beeinflusst, diese wiesen jeweils einen hohen positive b-Koeffizienten auf, dadurch wurde deren hoher positiver Einfluss auf die Diastatische Kraft deutlich. Bei der optimalen Anzahl an Hauptkomponenten kam es zu Unterschieden (3 und 6), wobei es bei den höchsten Hauptkomponenten zu einer größeren Streuung der Peaks kam. Daraus folgt, dass höhere Hauptkomponenten stark von der zufälligen Probenauswahl abhängig sind und aufgrund dieser Tatsache unzuverlässig sind. Die Peaks 8, 10, 16, 21 und 22 wiesen die größte Variabilität auf, wobei ein Großteil dieser Peaks mit negativen oder unterschiedlichen b-Koeffizienten ausgestattet waren mit Ausnahme von Peak 10, der eine hohen positiven b-Koeffizient aufwies (Abb. 36, Abb. 37, Abb. 38, Tab. 4).

Die erste Hauptkomponente der Hordein-Fraktion wurde, wie beim Gesamtprobenmodell, von den Peaks 60 und 61 in allen Rechenmodellen bestimmt (Abb. 39, Abb. 40, Abb. 41). Beide Peaks wiesen einen hohen positiven b-Koeffizienten auf. Die Berechnungen der Hauptkomponentenanzahl waren uneinheitlich (8, 12 und 2), die höchste Hauptkomponente wurde vor allem durch die Peaks 48, 54 und 55 beeinflusst.

Wobei die erstgenannten Peaks unterschiedliche Vorzeichen bei den b-Koeffizienten aufwiesen, jedoch Peak 55 mit großer Wahrscheinlichkeit einen positiven Einfluss auf die Diastatische Kraft ausübte.

Mittels dem Rechenmodell der Hordenin-Fraktion konnten durch die Kalibration 22,3 % der Streuung der Diastatischen Kraft erklärt und bei der Validierung 16,1 % erklärt werden (Abb. 42). Die Validierung der Modelle aus den Teilprobenmengen lieferte praktisch keine Erklärung der Variabilität der Diastatischen Kraft durch Proteinspektren. Auf eine weitere Interpretation der Rechenmodelle wurde daher verzichtet (Abb. 43, Abb. 44).

Die ermittelten Korrelationskoeffizienten der Rechenmodelle aus der Hordein-Fraktion und der Hordenin-Fraktion lagen deutlich unter jenen aus der Albumin- und Globulin-Fraktion, dadurch konnte der Schluss gezogen werden, dass die Diastatische Kraft vor allem durch die in der Albumin- und Globulin-Fraktion lokalisierten amylolytischen Enzyme beeinflusst wird. Es kann angenommen werden, dass jene Proteinfractionen aus der Hordein- und Hordenin-Fraktion nur indirekt mit der Diastatischen Kraft in Zusammenhang stehen, da diese Proteine ihrerseits positiv mit dem Gehalt an Enzymen und vermutlich mit dem Gesamtproteingehalt korrelieren.

**Tab. 4: b-Koeffizienten: Diastatische Kraft**

b-Koeffizienten , Diastatische Kraft								
Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Albumine	Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Hordeine	Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Hordenine
1	-5244	-18093	34	0	-1	68	2711	7071
2	-28367	-74446	35	6231	14967	69	2675	1
3	24493	34005	36	-13963	-26172	70	1782	8483
4	-26650	-12987	37	13937	33660	71	-7365	29977
5	-19472	-121514	38	-1494	1070	72	-10002	-8080
6	-23124	-79667	39	1	2574	73	9850	16258
7	24521	59935	40	1	2717	74	1	2022
8	-12065	-2188	41	1926	5407	75	-7	2037
9	-19353	-72214	42	9930	18664	76	-5441	1926
10	9716	51158	43	-13840	-30026	77	-11272	-6169
11	16303	-8908	44	-1086	9532	78	6658	-4326
12	1177	-1999	45	12995	23158	79	4508	6721

Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Albumine	Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Hordeine	Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Hordenine
13	26866	75054	46	8083	9642	80	3316	3208
14	2081	-25961	47	14039	17036	81	3814	5624
15	-5530	10303	48	2569	-1934	82	1405	1075
16	-9875	-8083	49	10743	5442	83	7724	8080
17	6350	23875	50	1335	-4603	84	-1755	-5847
18	34843	59974	51	12610	7077	85	-27377	-19417
19	14019	51989	52	28988	59585	86	-1874	4138
20	-23815	-39630	53	10404	13823	87	-8596	-6322
21	10650	3672	54	3137	63	88	-5710	-8758
22	-22985	5300	55	2597	12533	89	-1153	-3515
23	10268	16534	56	-1300	1040	90	98	7769
24	-2267	44961	57	-26890	-40136	91	1497	9926
25	-1833	-66165	58	10301	19674	92	12456	12180
26	11585	61898	59	8469	7563	93	8128	18392
27	-1232	-12794	60	6295	5415	94	11758	7667
28	-14151	-56805	61	4809	3992	95	16217	19489
29	19229	17874	62	-1173	-4005	96	23265	16529
30	-13038	-20754	63	-2073	10177	97	3396	2386
31	5925	36786	64	-6931	2272	98	6226	1048
32	6849	49420	65	-2955	-12389			
33	-2783	-7198	66	-1402	-2897			
			67	15238	31860			

Rot: Positive Vorzeichen in allen 3 Modellen

Schwarz: Vorzeichen in den 3 Modellen waren nicht gleich

Blau: Negative Vorzeichen in allen 3 Modellen

# Ergebnisse und Diskussion

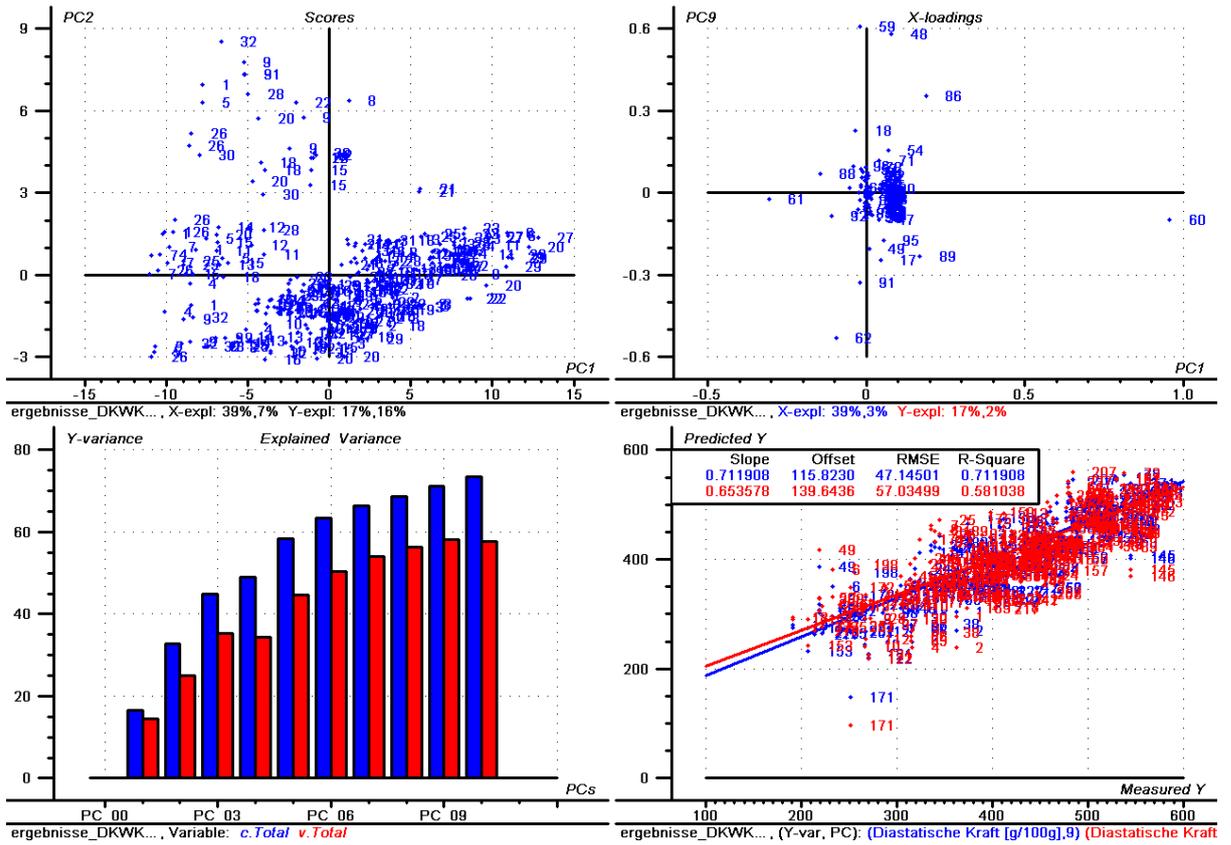


Abb. 33: Diastatische Kraft, alle Fraktionen, alle Proben

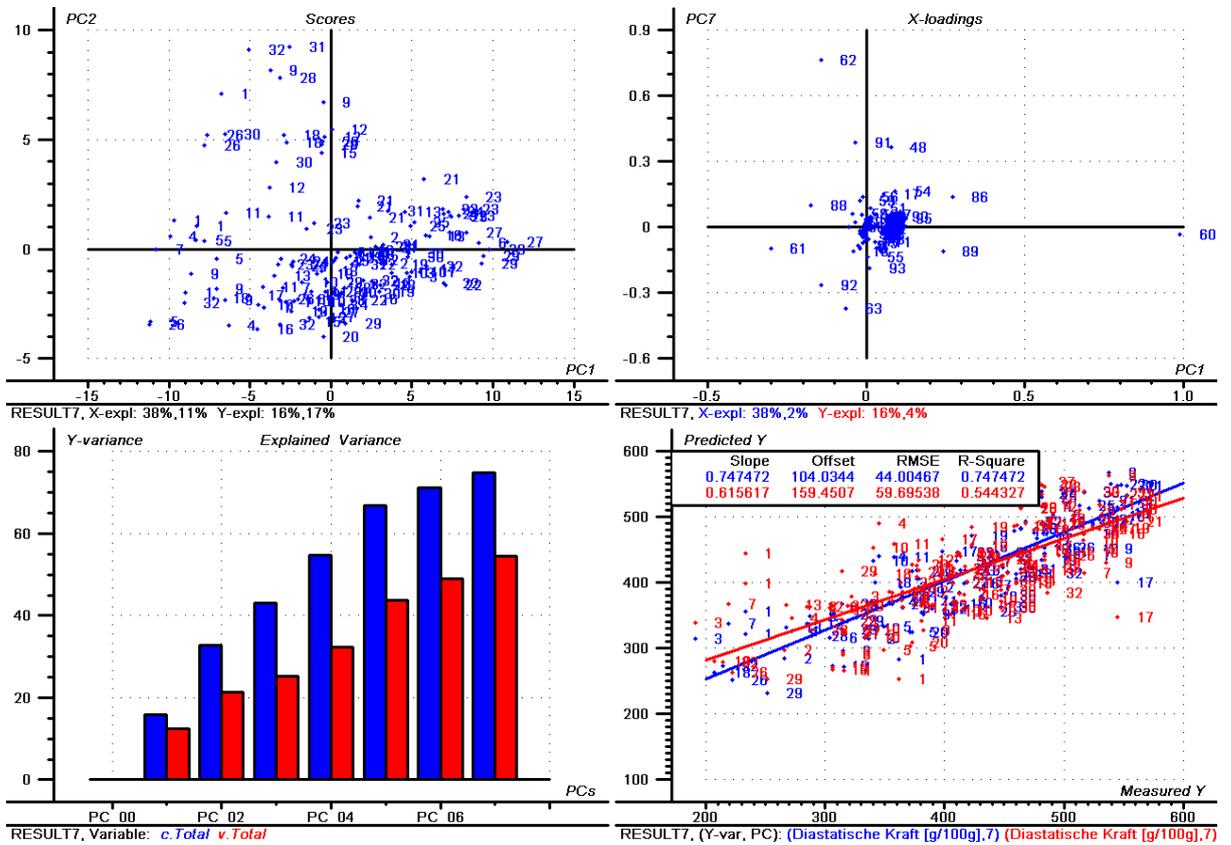


Abb. 34: Diastatische Kraft, alle Fraktionen, 1. Teilprobenmenge

# Ergebnisse und Diskussion

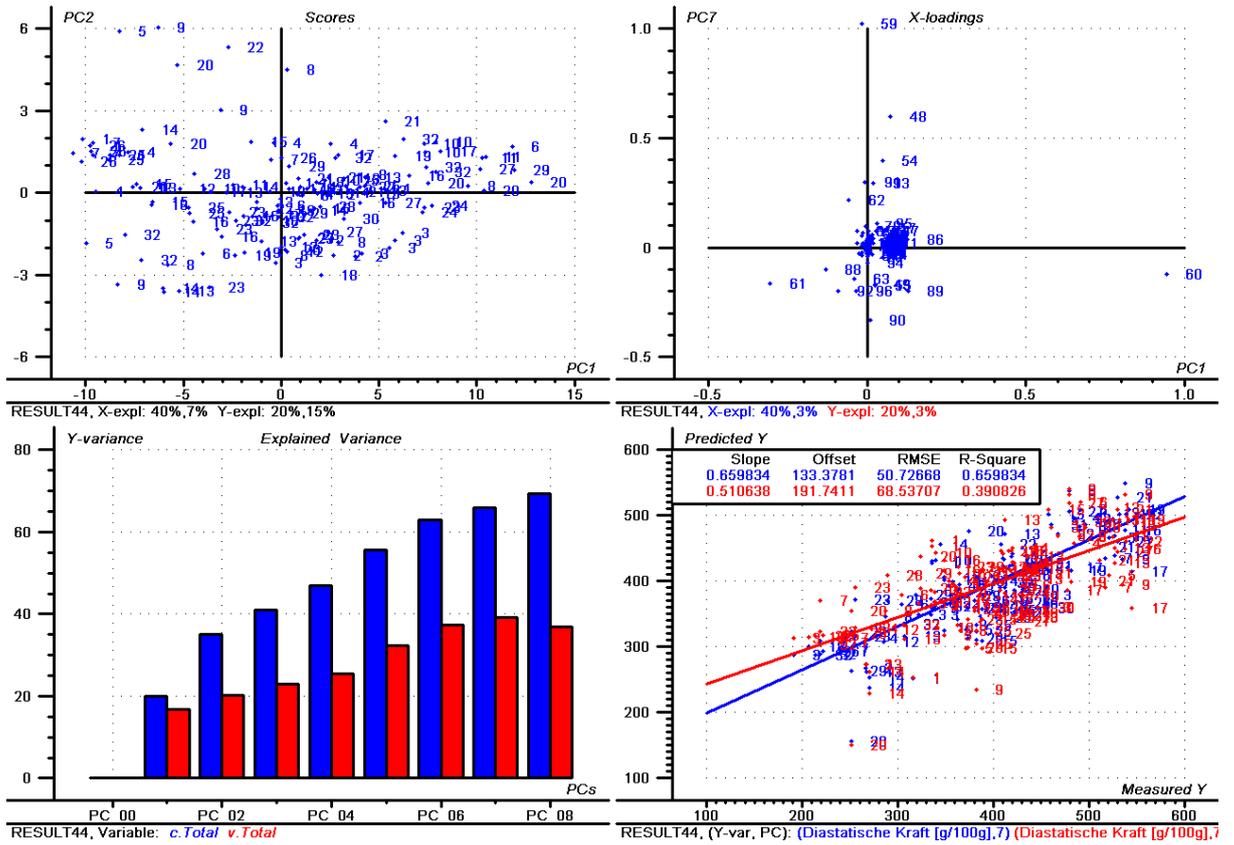


Abb. 35: Diastatische Kraft, alle Fraktionen, 2. Teilprobenmenge

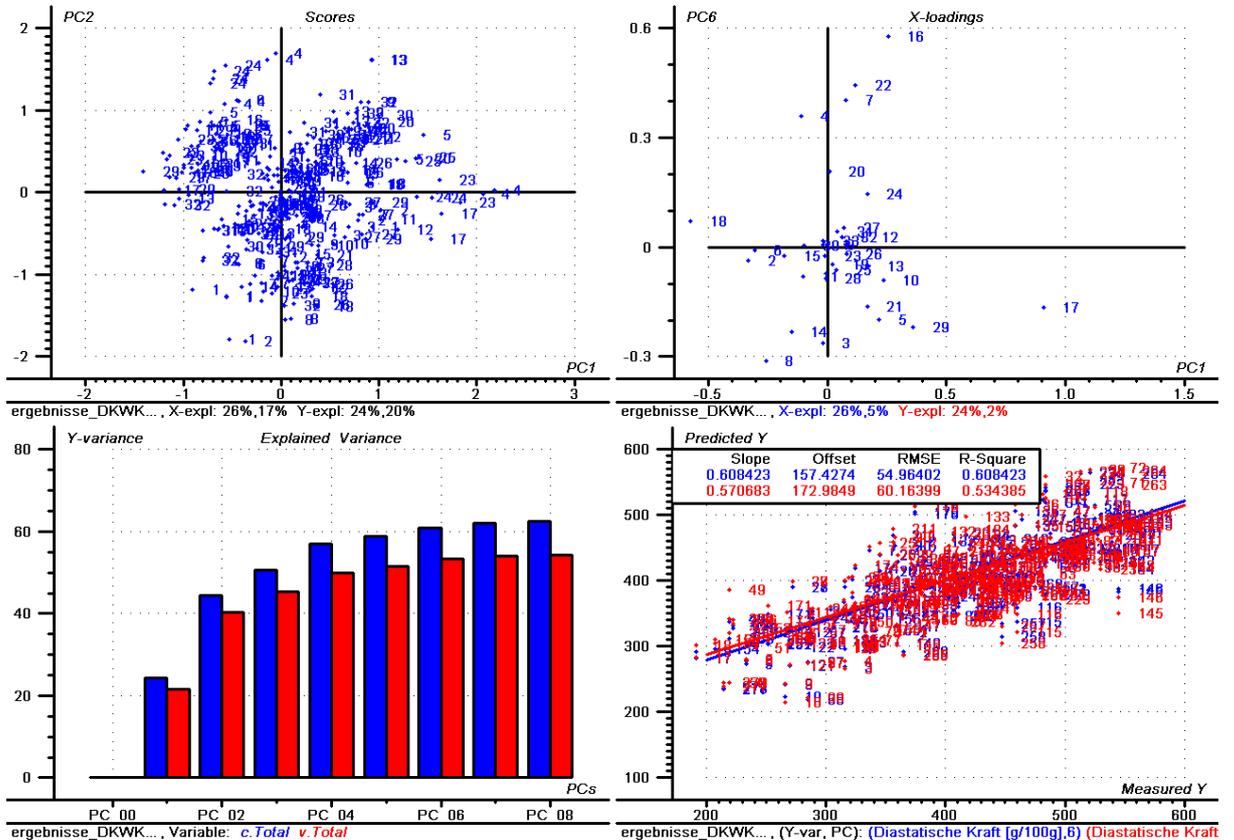


Abb. 36: Diastatische Kraft, Albumine, alle Proben

# Ergebnisse und Diskussion

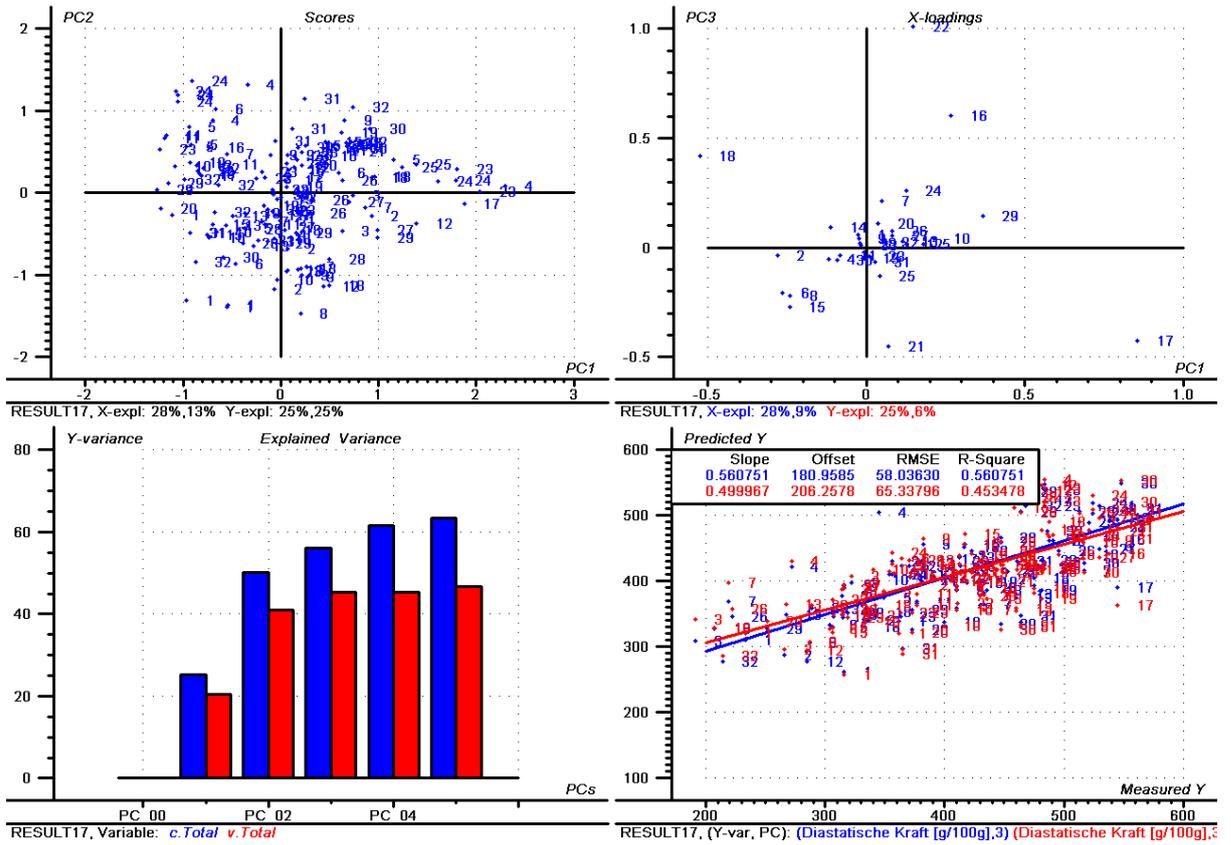


Abb. 37: Diastatische Kraft, Albumine, 1. Teilprobenmenge

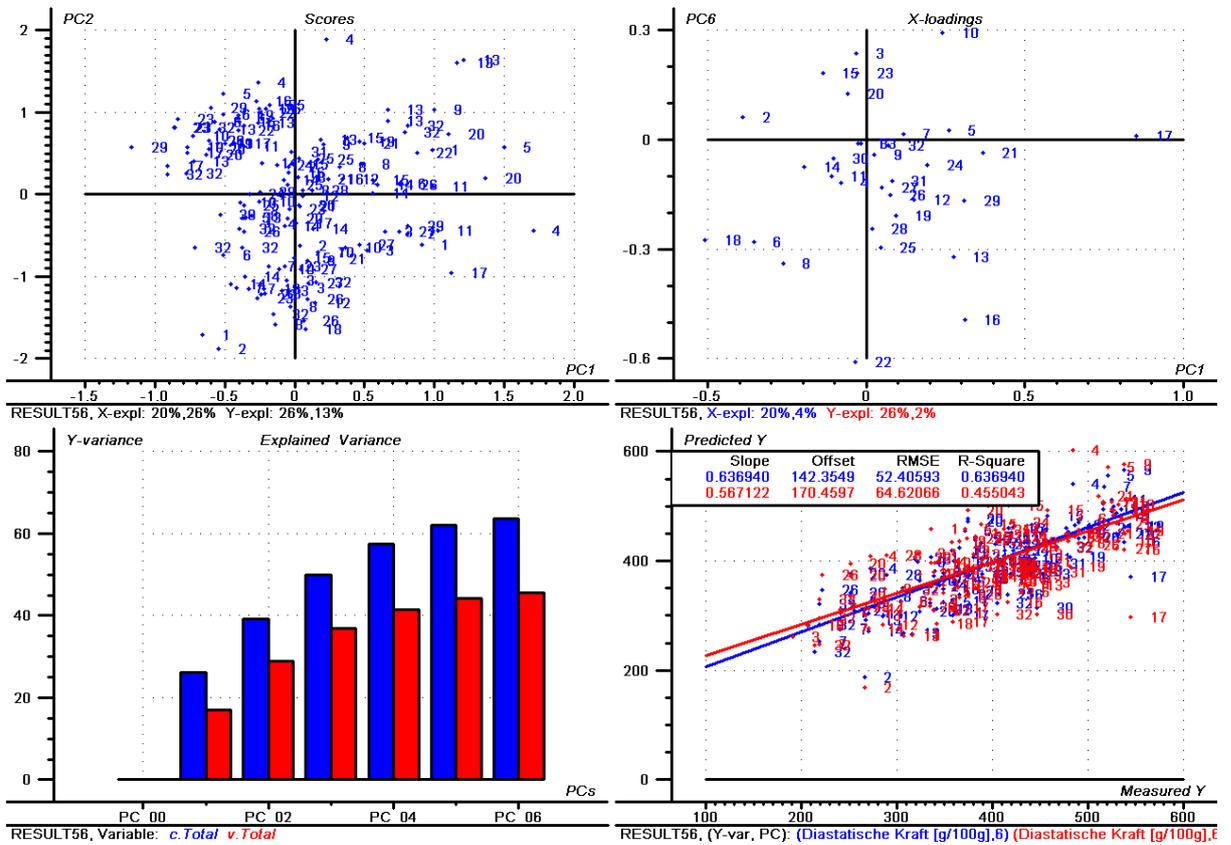


Abb. 38: Diastatische Kraft, Albumine, 2. Teilprobenmenge

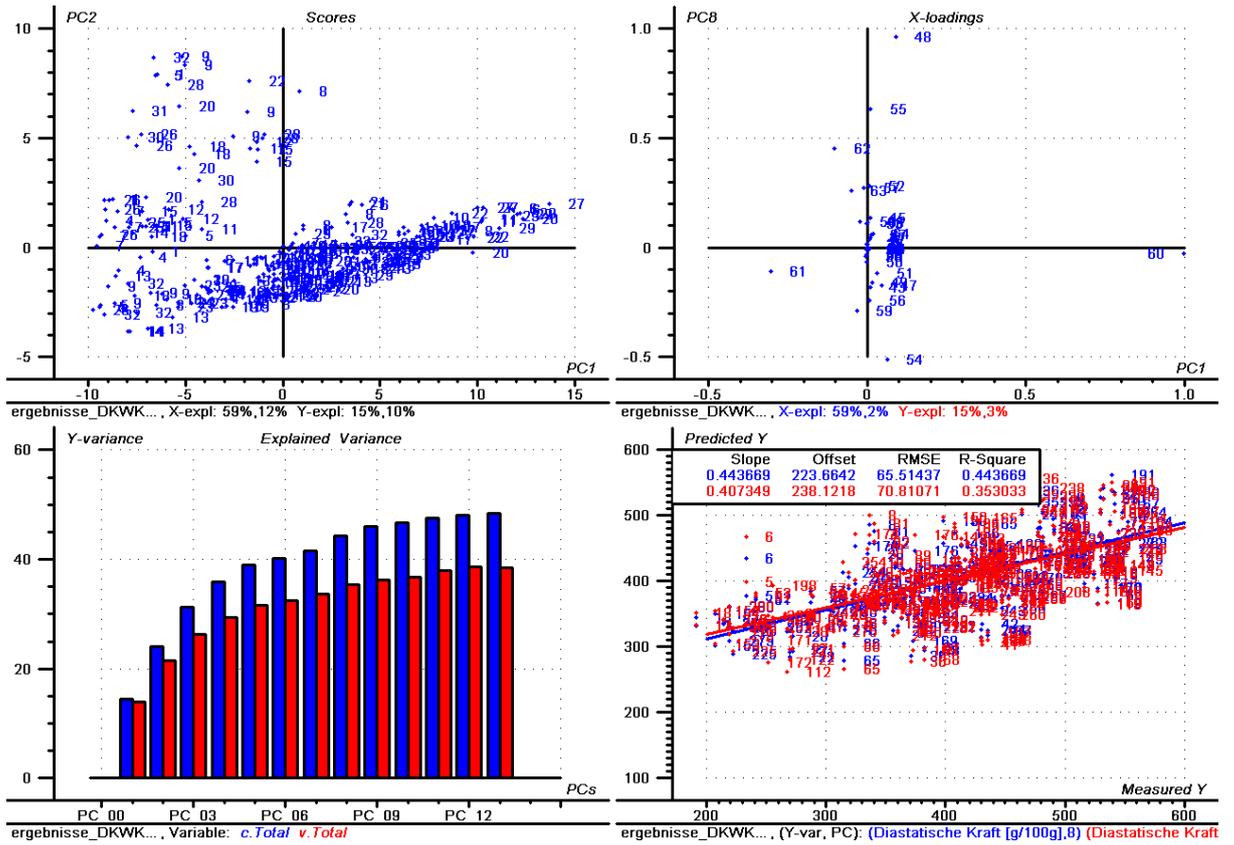


Abb. 39: Diastatische Kraft, Hordeine, alle Proben

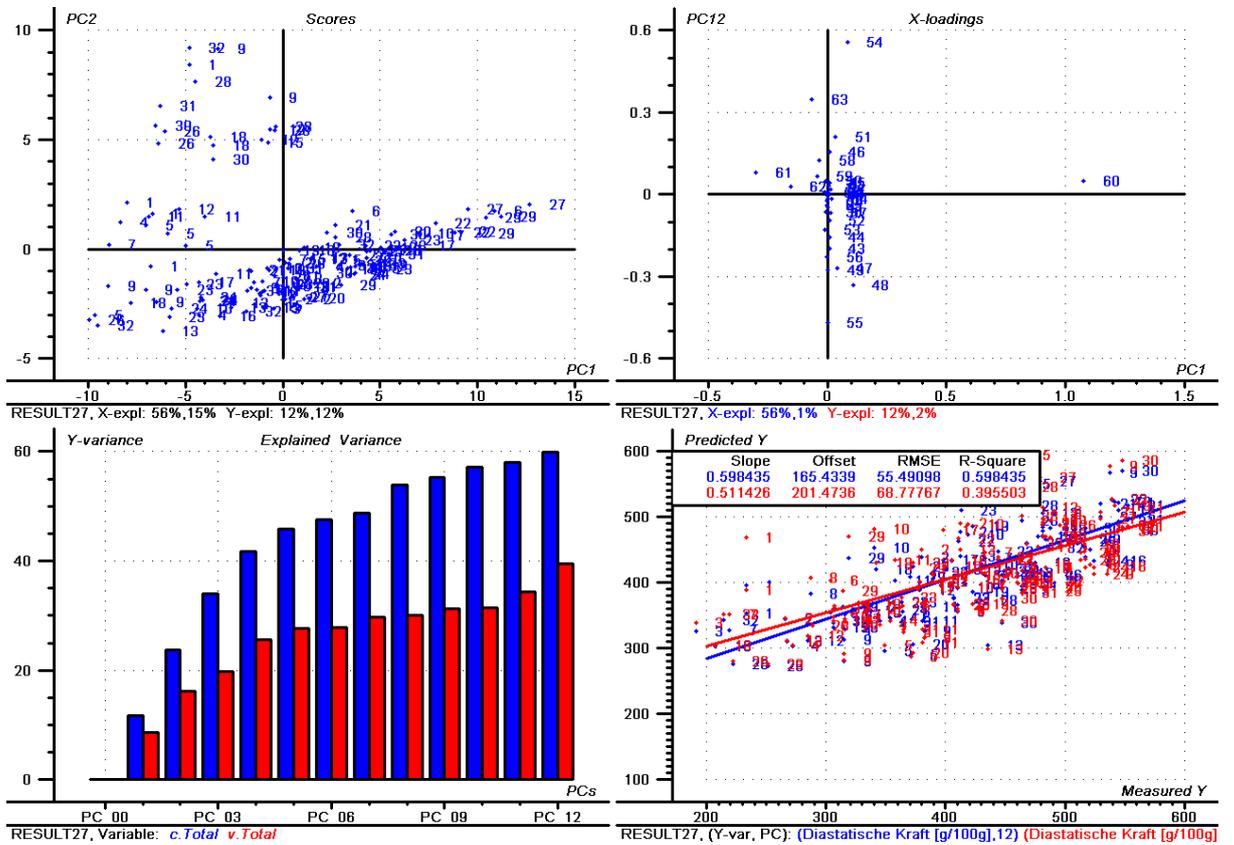


Abb. 40: Diastatische Kraft, Hordeine, 1. Teilprobenmenge

# Ergebnisse und Diskussion

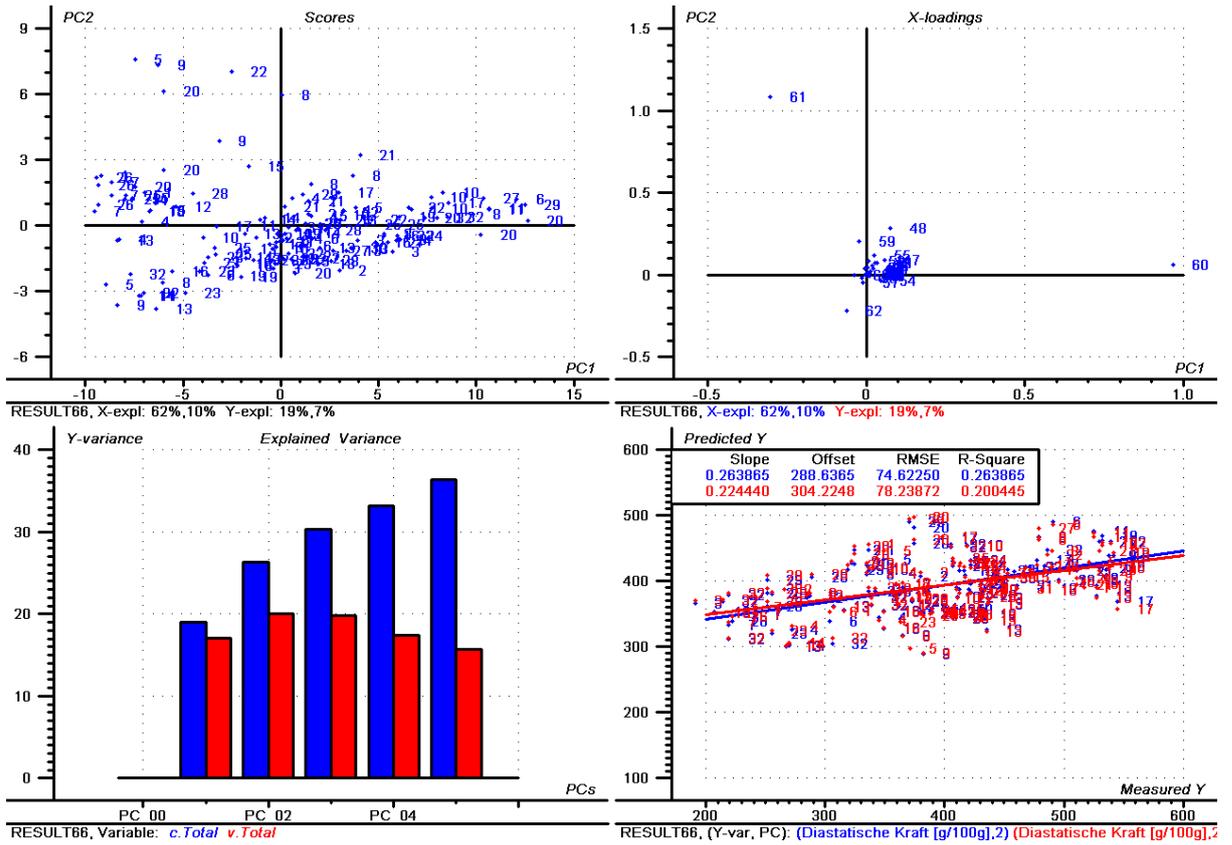


Abb. 41: Diastatische Kraft, Hordeine, 2. Teilprobenmenge

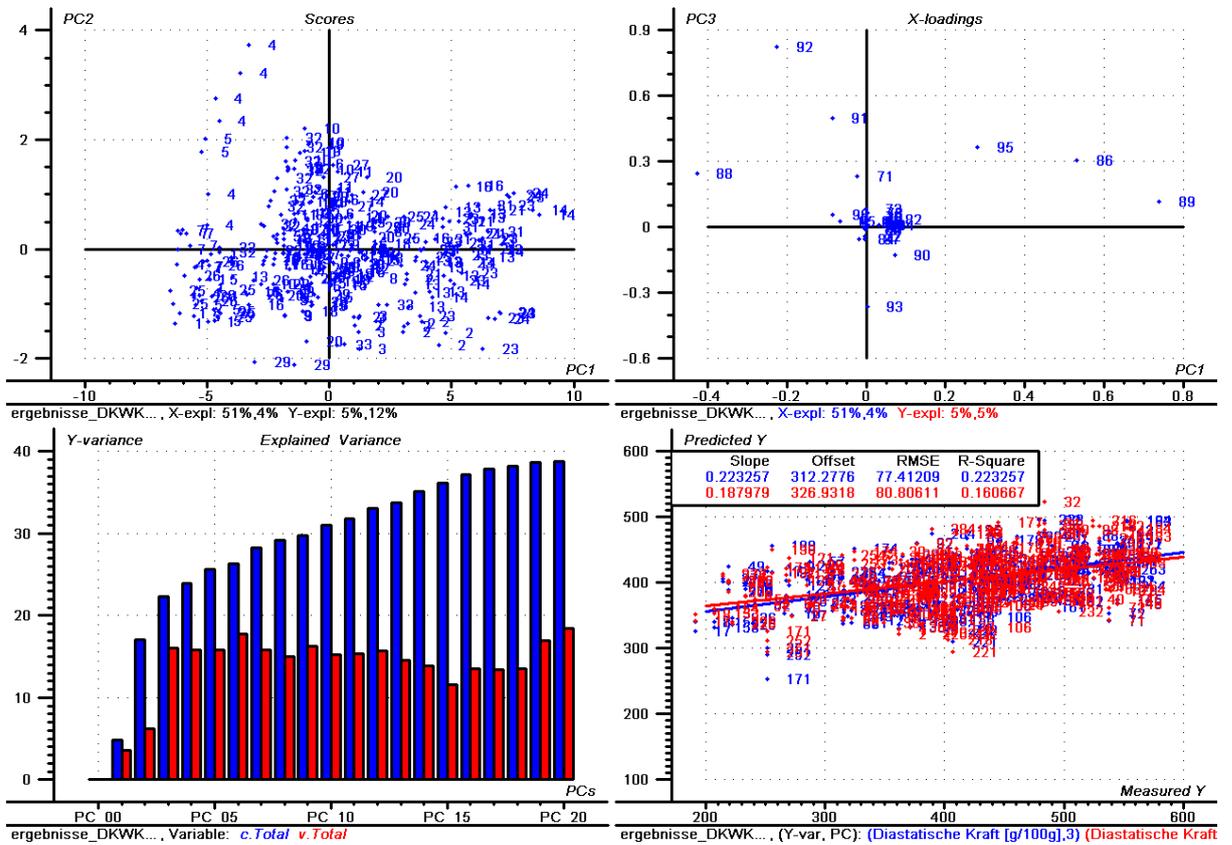


Abb. 42: Diastatische Kraft, Hordenine, alle Proben

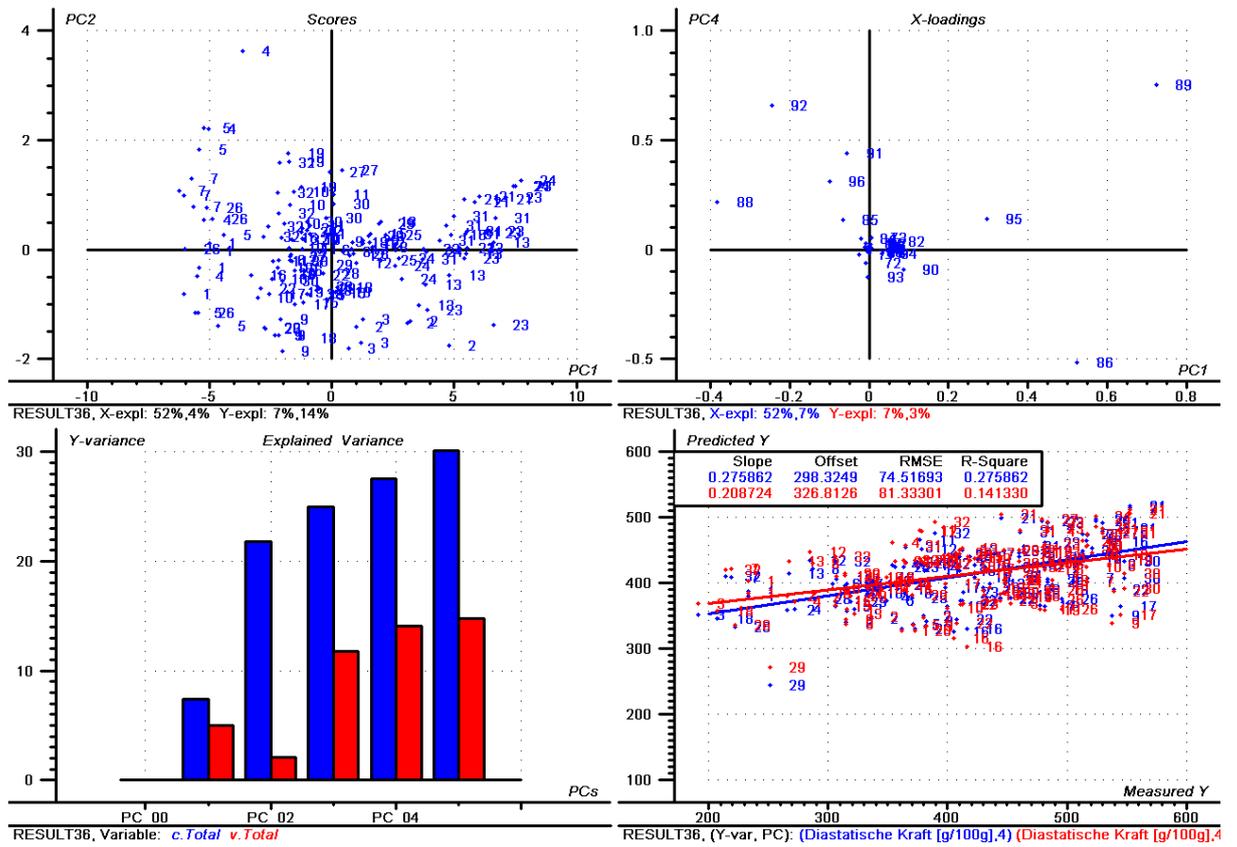


Abb. 43: Diastatische Kraft, Hordenine, 1. Teilprobenmenge

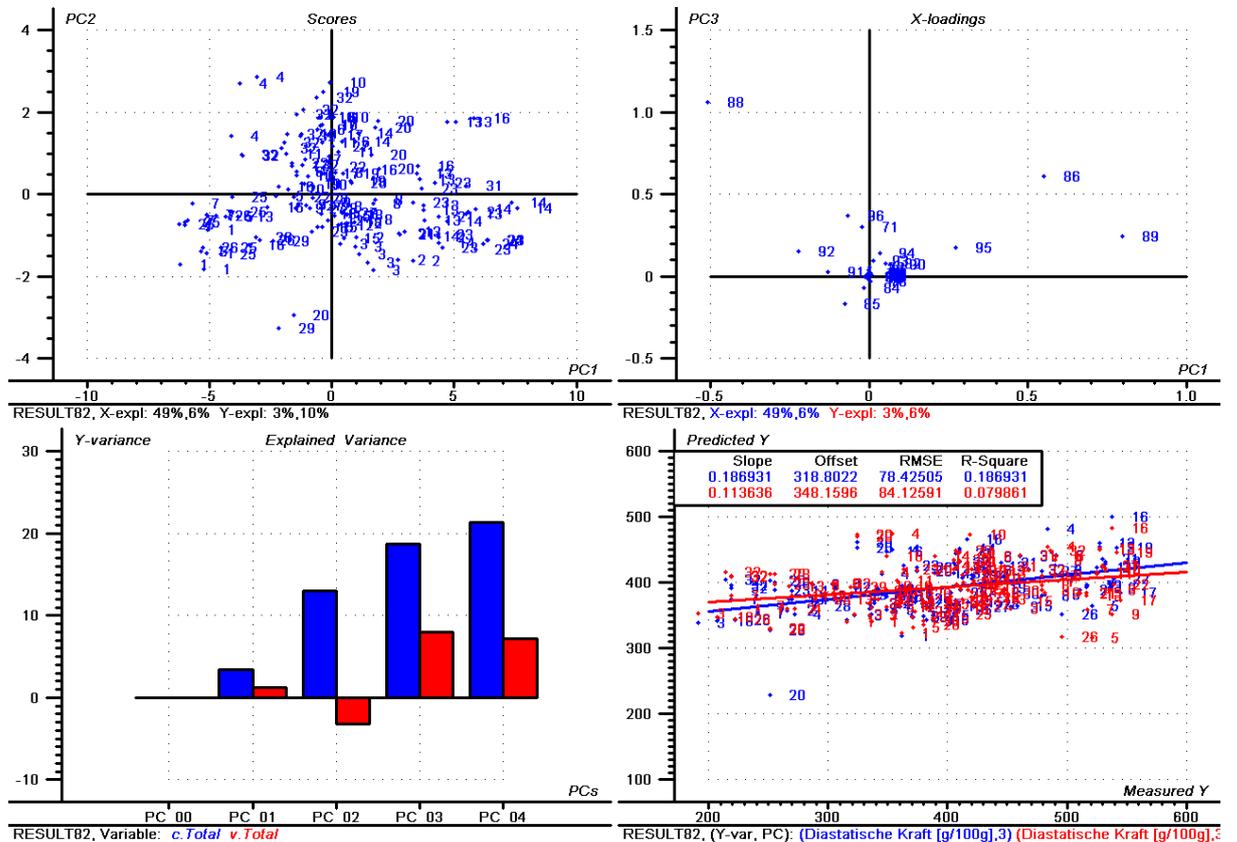


Abb. 44: Diastatische Kraft, Hordenine, 2. Teilprobenmenge

### 6.1.3 Extraktdifferenz

Der Wert der Extraktdifferenz liegt in der Regel zwischen 0,5 und 2,0 %. Bei der Ermittlung dieses Wertes nach den EBC-Vorschriften gehen aufgrund der angewandten Bestimmungsmethode die Analysefehler von zwei Extraktbestimmungen mit ein. Der Analysefehler darf je Messung  $\pm 0,4$  % betragen, somit kann der Wert der Extraktdifferenz um 0,8 % variieren. Dies ist aufgrund des üblichen kleinen Werteannahmereichs bei der Extraktdifferenz sehr viel. Es kommt somit zu einer sehr starken Zufallsbelastung der Referenzwerte aufgrund des möglichen Analysefehlers. Weiters beruht die Lösung des Malzes auf mehreren Ursachen, wie Stärke der Enzyme, Ausbildung der Zellwände und Härte des Endosperms, die alle in mehr oder weniger engem Zusammenhang mit dem Proteinspektrum stehen. Aufgrund dieser genannten Aspekte ist kaum eine Vorhersagbarkeit der Extraktdifferenz auf der Grundlage von Proteinspektren zu erwarten.

Bei der Gesamtheit aller Proben wurden bei der Kalibrierung ein  $R^2 = 0,129$  und bei der Validierung ein  $R^2 = 0,057$  berechnet (Abb. 45). Alle weiteren Teilprobenrechenmodelle (Abb. 46, Abb. 47) und Fraktionsrechenmodelle (Abb. 48 bis Abb. 56) lieferten ähnliche Werte. Auch der Anstieg der Regressionsgeraden war sehr gering, sie verlief fast parallel zur x-Achse. Auch bei Erhöhung der Anzahl der Hauptkomponenten kam es zu keiner Zunahme der erklärbaren Varianz. Aufgrund dieser Daten war zwischen der Extraktdifferenz und den Proteinspektren kein Zusammenhang feststellbar.

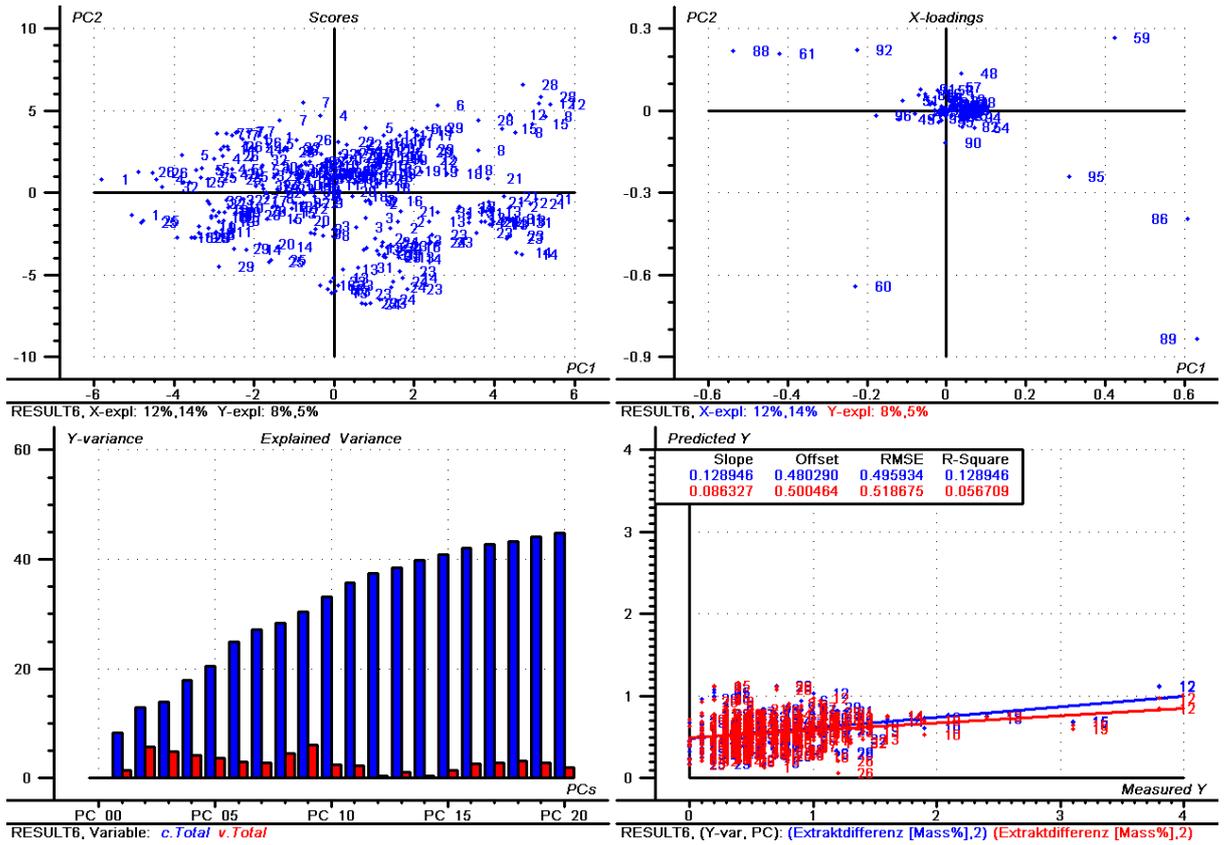


Abb. 45: Extraktdifferenz, alle Fraktionen, alle Proben

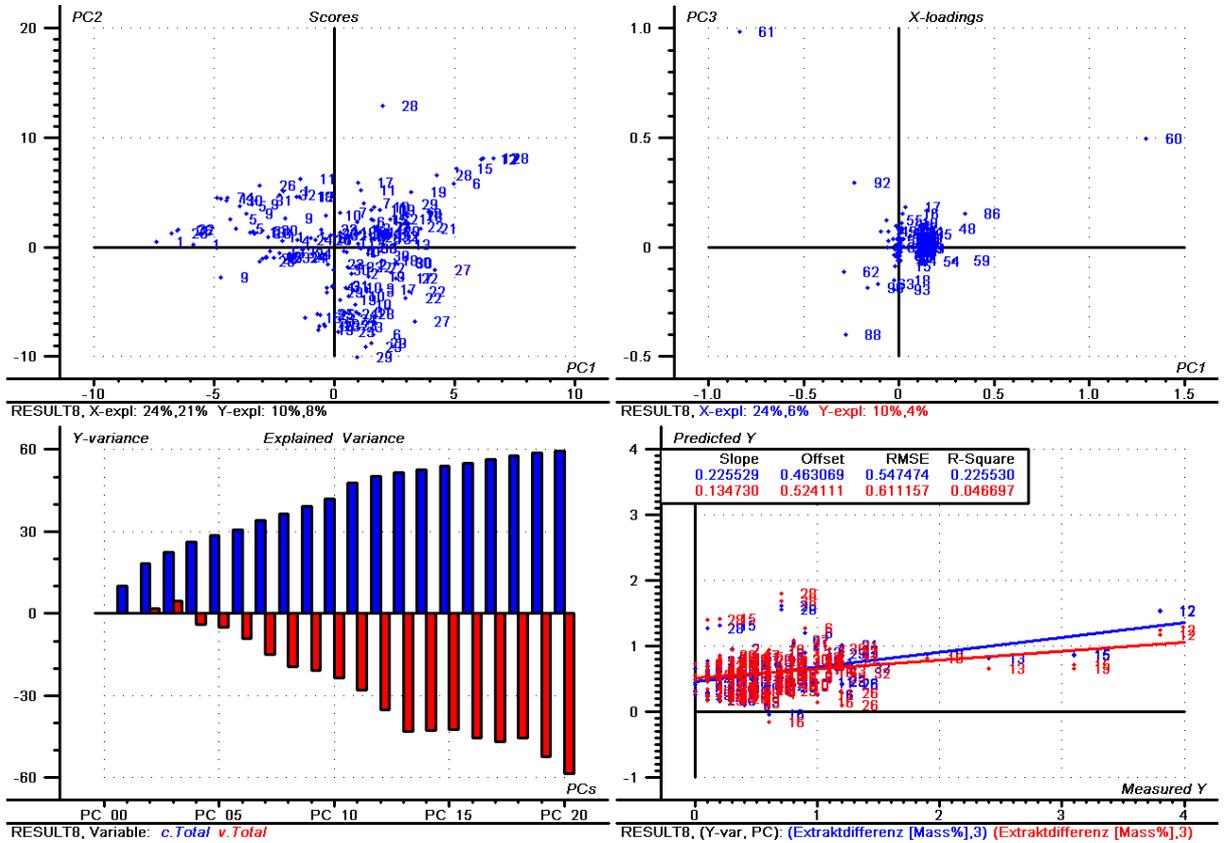


Abb. 46: Extraktdifferenz, alle Fraktionen, 1. Teilprobenmenge

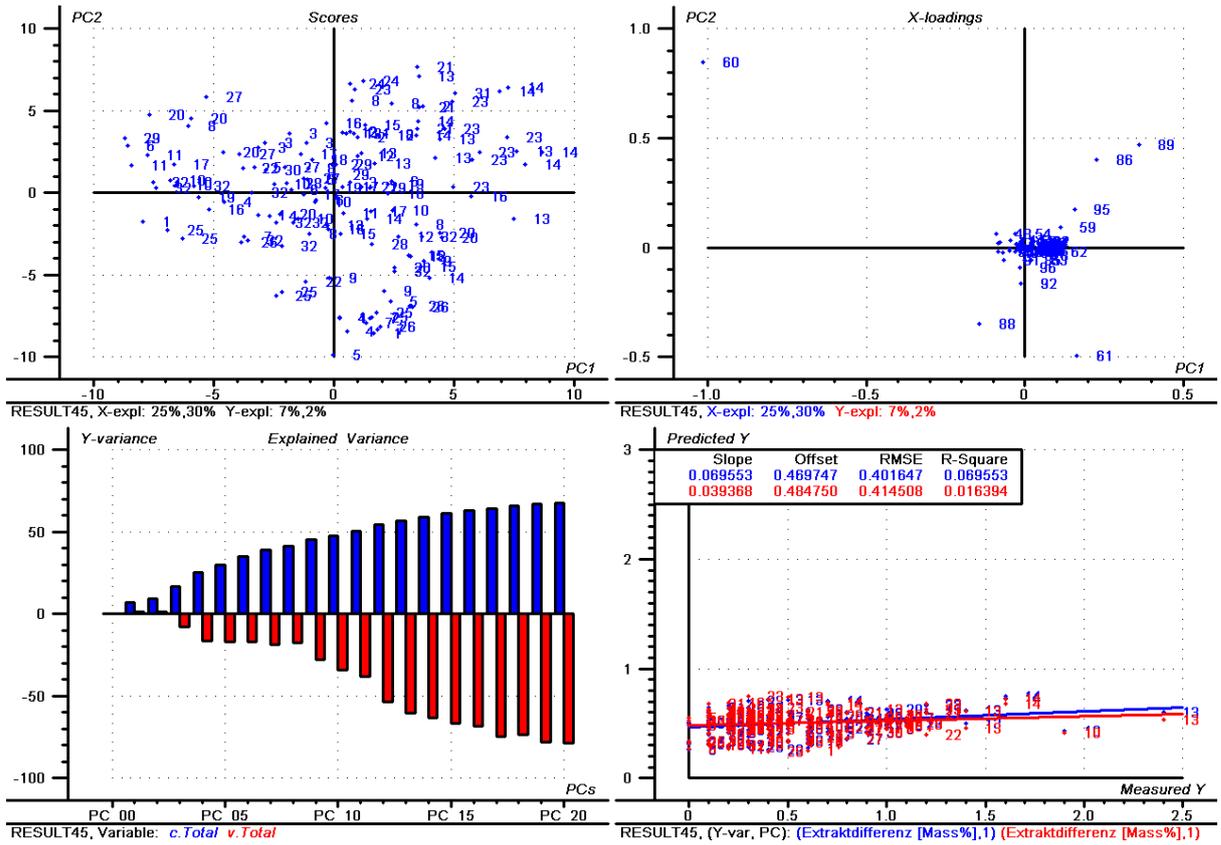


Abb. 47: Extrakt Differenz, alle Fraktionen, 2. Teilprobenmenge

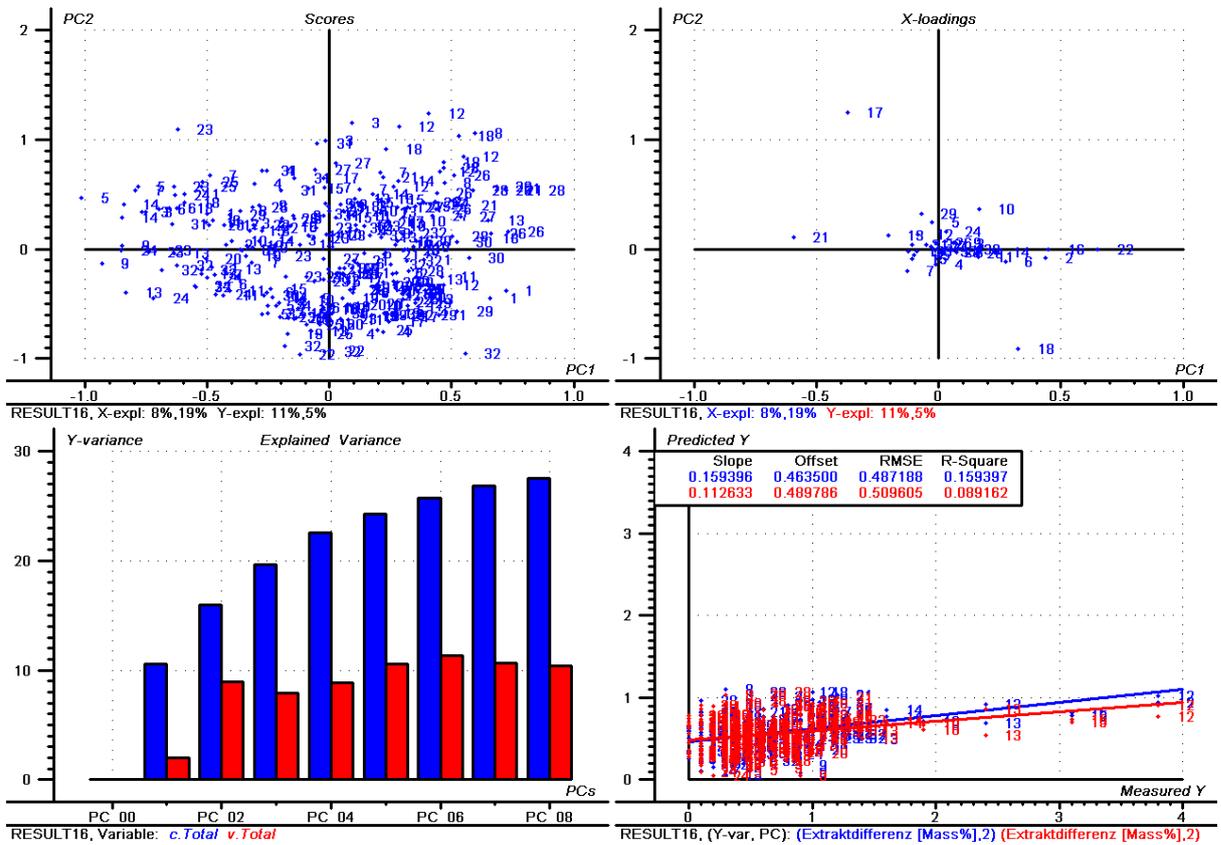


Abb. 48: Extrakt Differenz, Albumine, alle Proben

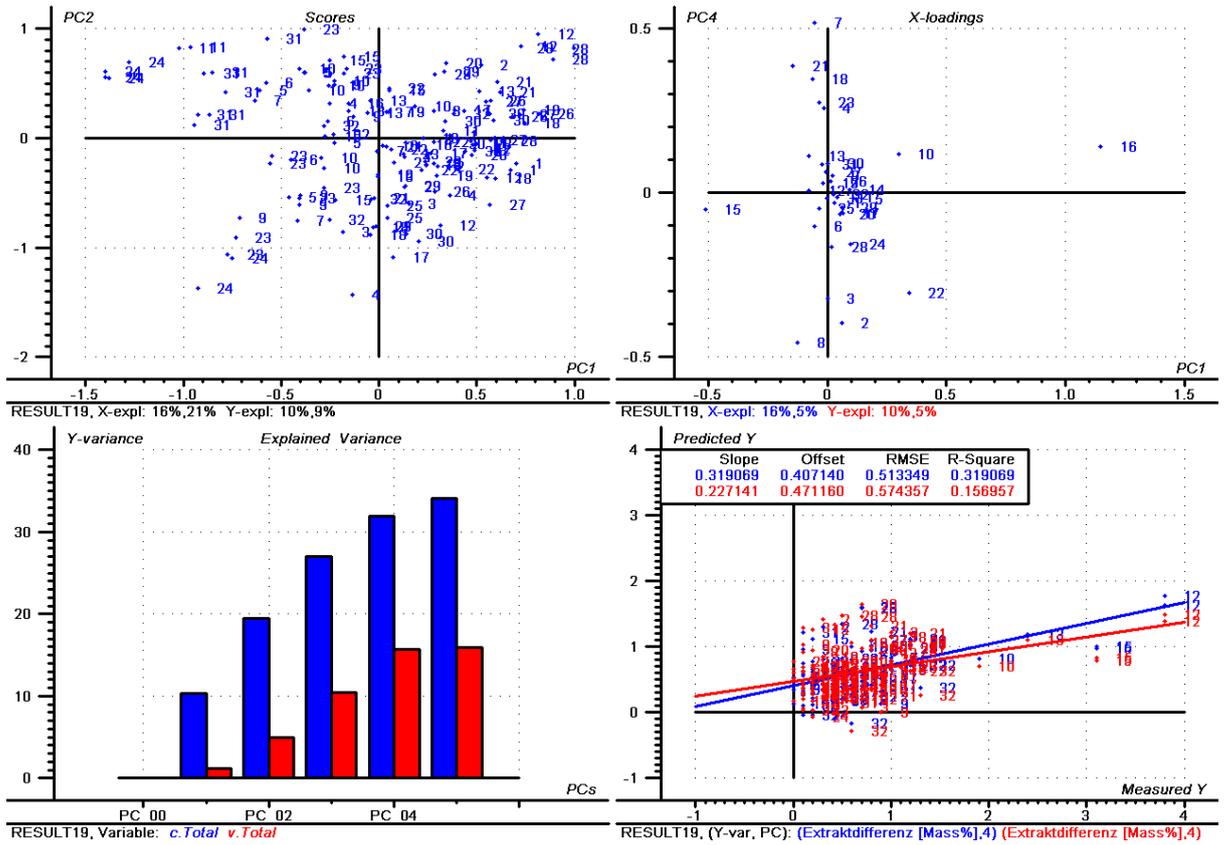


Abb. 49: Extrakt Differenz, Albumine, 1. Teilprobenmenge

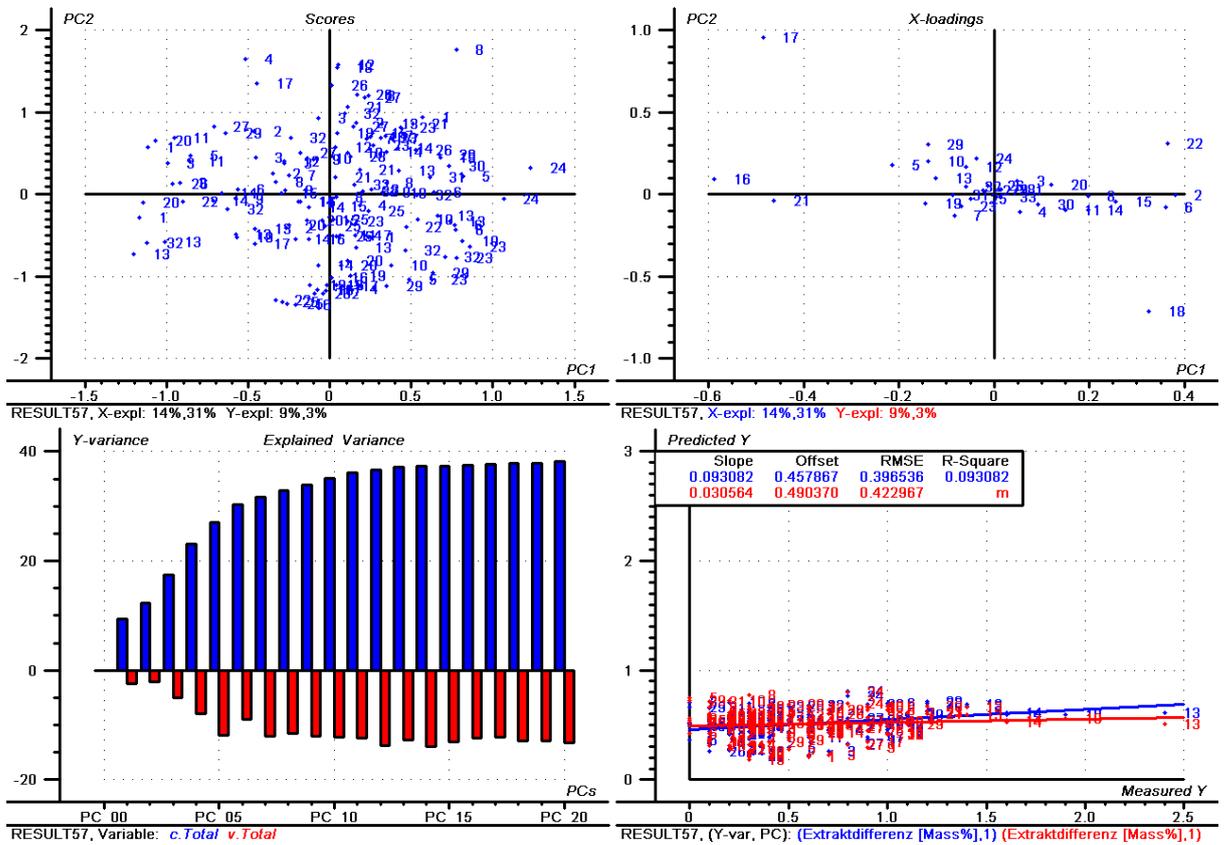


Abb. 50: Extrakt Differenz, Albumine, 2. Teilprobenmenge

# Ergebnisse und Diskussion

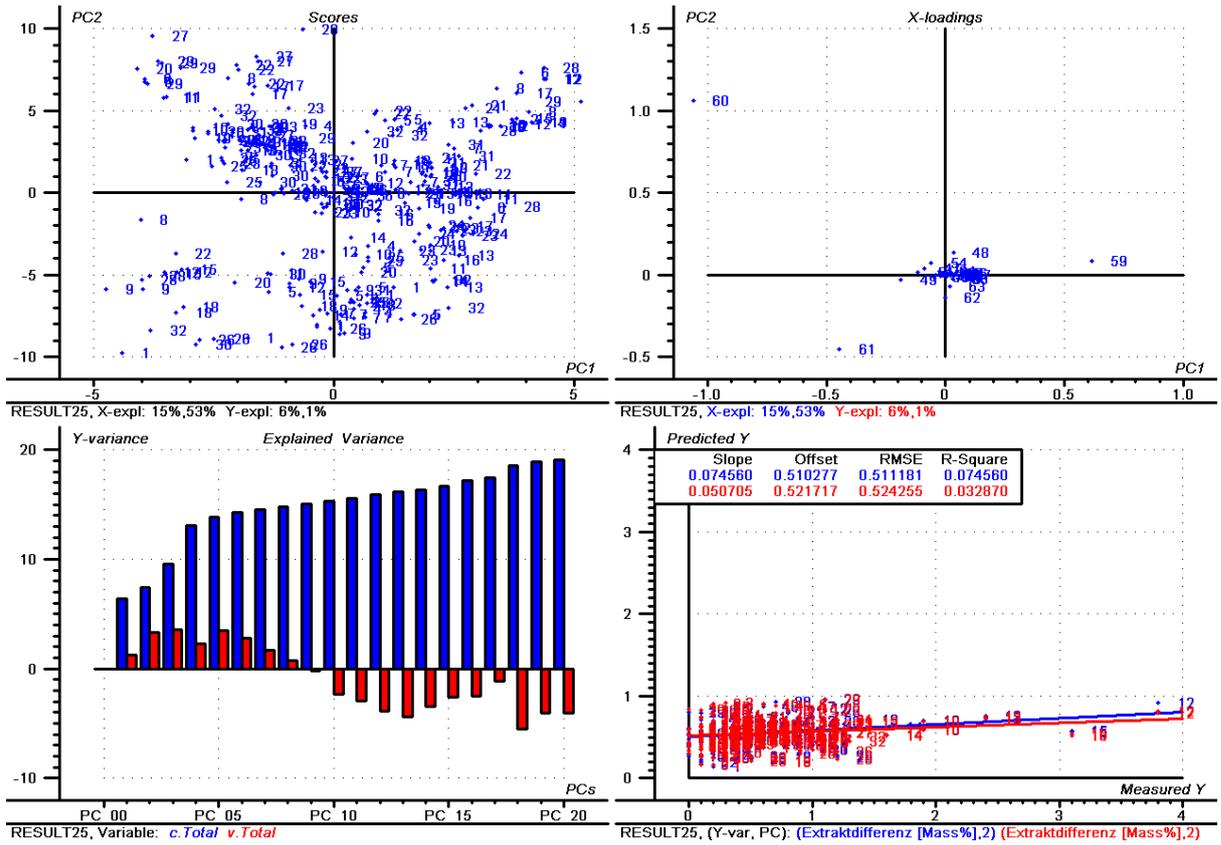


Abb. 51: Extrakt Differenz, Hordeine, alle Proben

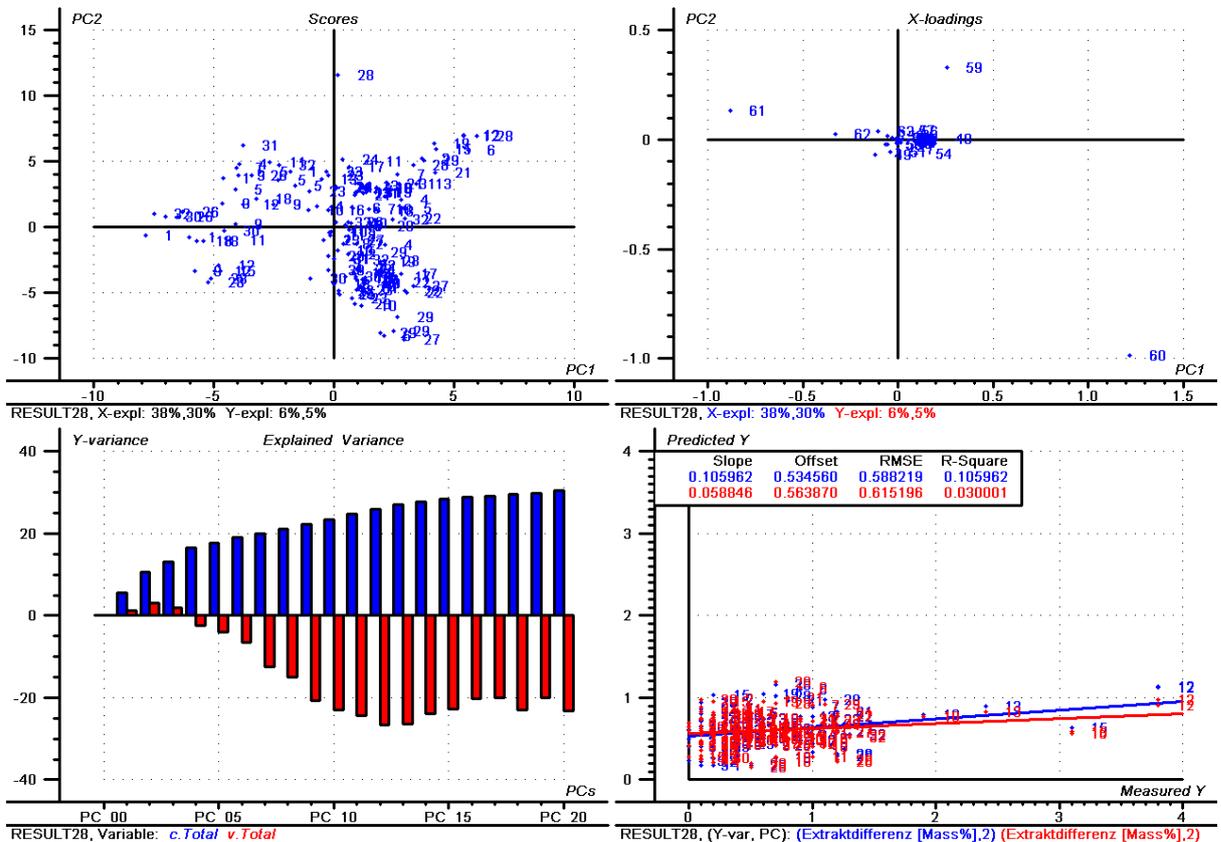


Abb. 52: Extrakt Differenz, Hordeine, 1. Teilprobenmenge

# Ergebnisse und Diskussion

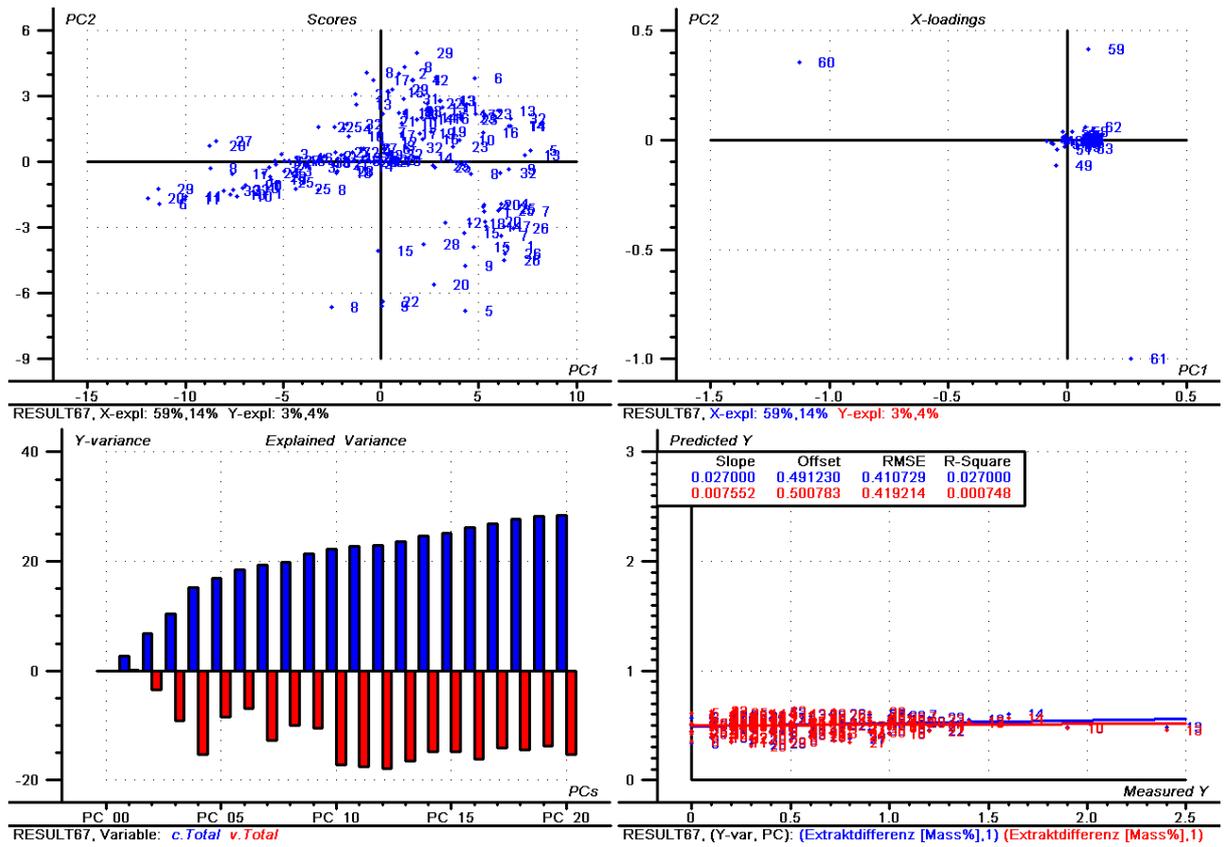


Abb. 53: Extrakt Differenz, Hordeine, 2. Teilprobenmenge

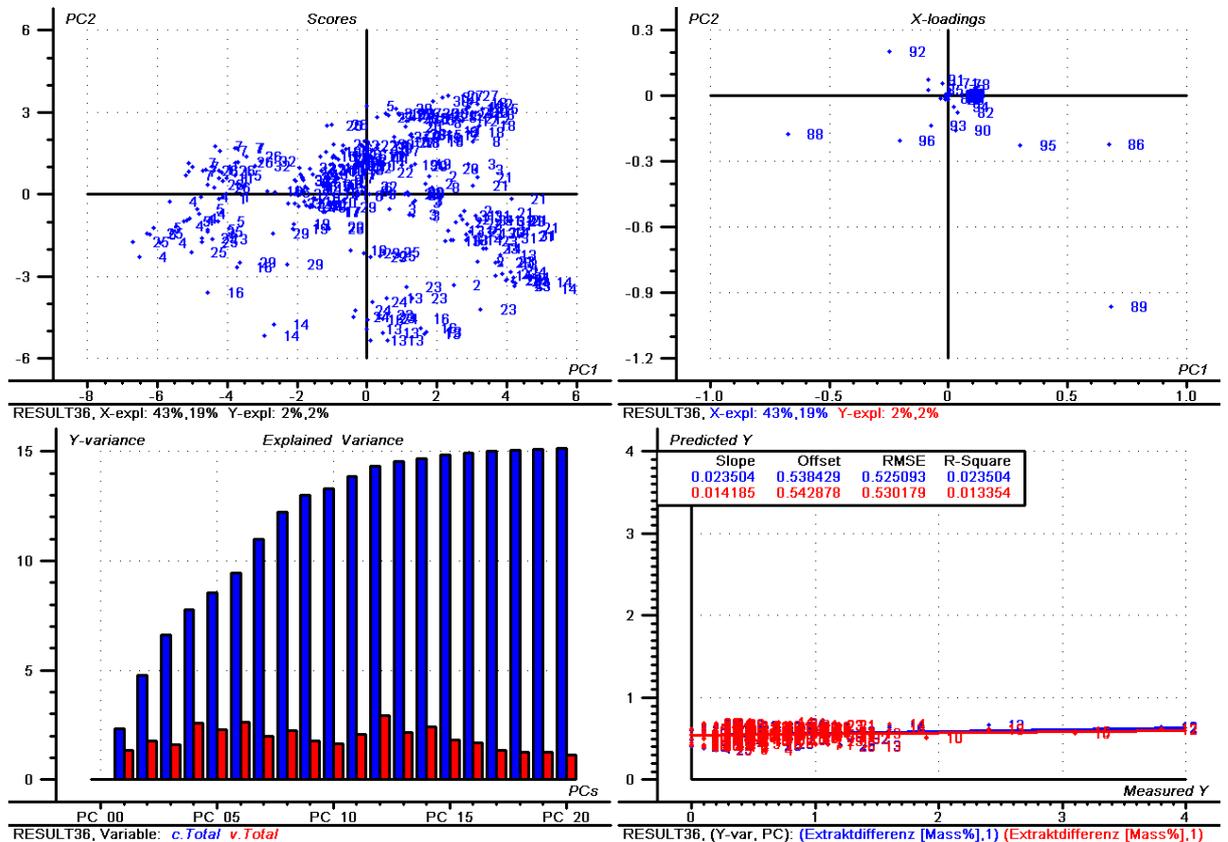


Abb. 54: Extrakt Differenz, Hordenine, alle Proben

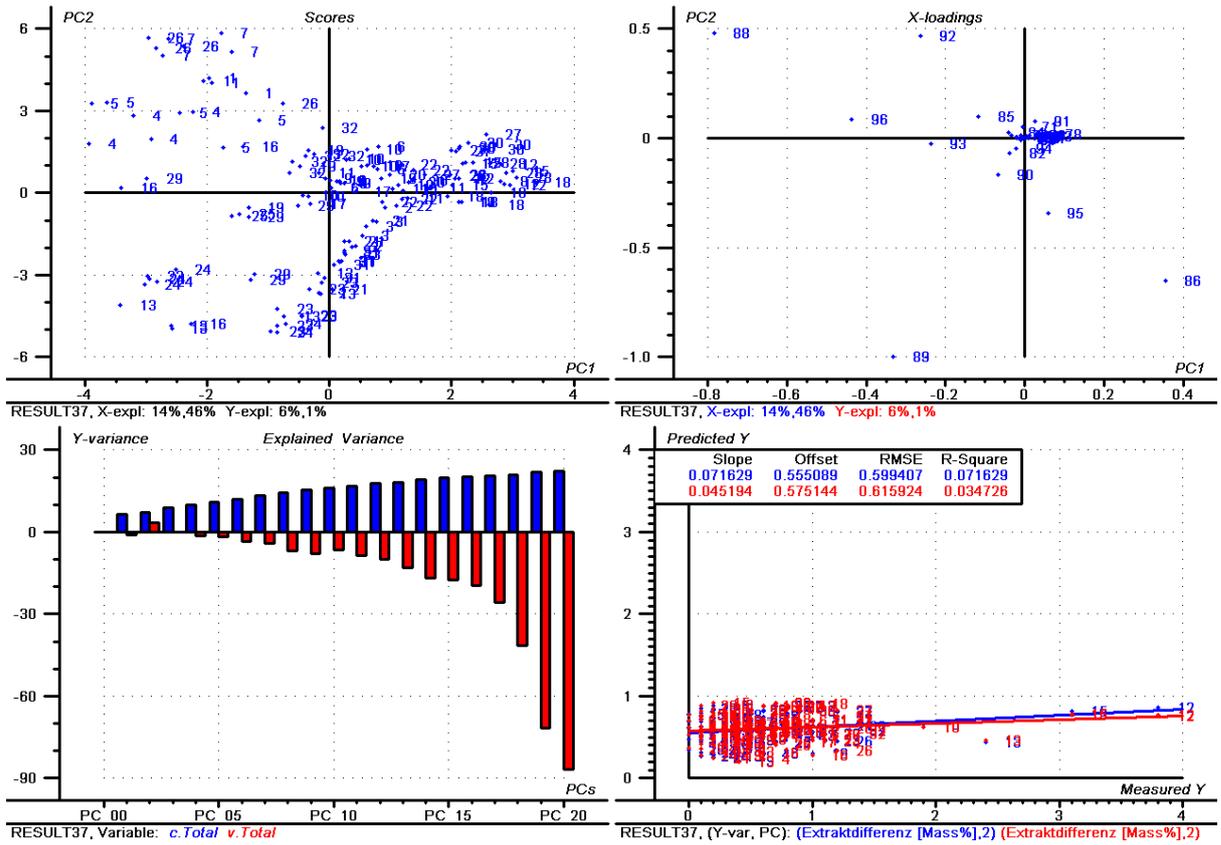


Abb. 55: Extrakt Differenz, Hordenine, 1. Teilprobenmenge

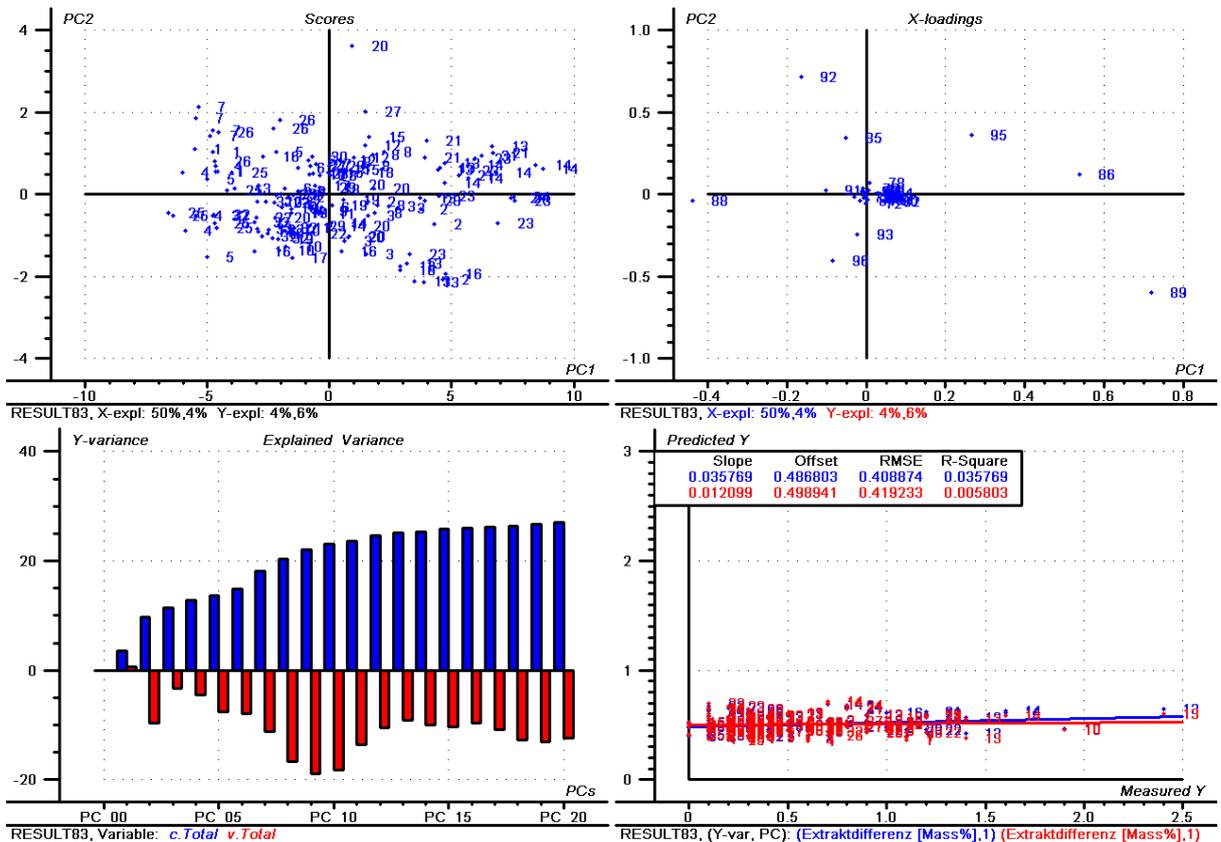


Abb. 56: Extrakt Differenz, Hordenine, 2. Teilprobenmenge

### 6.1.4 Löslicher Stickstoff und Kolbachzahl

Beim Gesamtrechenmodell aller Proben kam es bei den Scores zu einer ovalen ansteigenden Punktwolke und einer darüberliegenden schwächeren Zone an Probenwerten, ein ähnliches Bild wurde auch bei der Feinschrot-Extraktausbeute und der Diastatischen Kraft festgestellt (Abb. 57). Die Berechnung mit 10 Hauptkomponenten wurde als Optimalwert angenommen, es wurde eine Kalibration mit einem Korrelationskoeffizienten von 60,7 % berechnet, mit der Validierung konnten jedoch nur 37,9 % der Variabilität der Zielgröße erklärt werden. Die erste Hauptkomponente wurde wie bei den meisten anderen Qualitätsparametern durch die Peaks 60 und 61 beeinflusst, diese wiesen beide hohe positive b-Koeffizienten auf und übten somit einen starken Einfluss auf den löslichen Stickstoff aus (Tab. 5). Die 10. Hauptkomponente wurde von Peak 88 und 92 dominiert, wobei ersterer unterschiedliche Vorzeichen bei den b-Koeffizienten aufwies, Peak 92 besaß hohe positive b-Koeffizienten.

Die Rechenmodelle aus den Teilprobenmengen wiesen bei den Kalibrationen ein  $R^2 = 0,353$  und  $0,611$  auf und die korrespondierenden Werte aus der Validierung lagen bei  $R^2 = 0,177$  und  $0,209$  (Abb. 58, Abb. 59). Dies zeigte die starke Abhängigkeit der Rechenmodelle von der Stichprobenauswahl und die bereits beim Gesamtmodell angedeutete hohe Differenz zwischen Kalibrierung und Validierung. Desweiteren war bei Erhöhung der Anzahl an Hauptkomponenten in allen Modellen ein deutlicher Abfall der aus der Validierung berechneten Korrelationen ersichtlich, dies bestätigt die offenbare Unzuverlässigkeit der Rechenmodelle.

Bei den einzelnen Osborne-Fraktionen bestand der engste Zusammenhang mit der Albumin- und Globulin-Fraktion und dem Löslichen Stickstoff. Hierbei wurde die erste Hauptkomponente von Peak 17 und 18 bestimmt. Es wurde je Modell zwischen 3 bzw. 2 Hauptkomponenten als optimal angenommen. Die höchste Hauptkomponente wurde jeweils von den Peaks 15, 16 und 22 beeinflusst. Alle diese Peaks wiesen unterschiedliche Vorzeichen bei den b-Koeffizienten auf, die Ausnahme zeigte Peak 17, denn dieser hatte in allen Modellen ein positives Vorzeichen. Es bestand also offenbar kein reproduzierbarer Zusammenhang zwischen den Peaks mit den höchsten Variabilitäten und dem löslichen Stickstoff. Die Kalibration der Albumin- und Globulin-Modellen lag zwischen 31,7 % und 40,6 %, die bei Validierung berechneten Werte lagen zwischen 23,8 % und 28,9 %. Die bei den Validierungen erhaltenen Korrelationskoeffizienten nahmen

nach Durchschreiten des Optimums in allen Modellen wieder ab (Abb. 60, Abb. 61, Abb. 62).

Die erste Hauptkomponente in der Hordein-Fraktion wurde wieder von Peak 60 und 61 dominiert, die beide einen positiven b-Koeffizienten besaßen. Dieser Einfluss war aber offenbar nicht ausreichend, um eine eindeutige Korrelation zwischen Messung und Vorhersage zu gewährleisten. Bei der Kalibration wurde ein  $R^2 = 0,292$  und bei der Validierung ein  $R^2 = 0,163$  ermittelt. Es war vielmehr zu vermuten, dass einerseits eine Kovarianz zwischen den Peaks 60 und 61 und den löslichen Proteinen und andererseits mit dem Gesamtproteingehalt besteht (Abb. 63, Abb. 64, Abb. 65).

Zwischen dem Löslichen Stickstoff und der Hordenin-Fraktion war aufgrund der berechneten Modelle kein Zusammenhang feststellbar. Die Korrelationskoeffizienten der Kalibration lagen zwischen  $R^2 = 0,049$  und  $R^2 = 0,182$  (Abb. 66, Abb. 67, Abb. 68). Bei den Validierungen war ersichtlich, dass es sich nur noch um Scheinkorrelationen handelte.

Eigentlich besteht zwischen Löslichem Stickstoff und dem Proteingehalt im Gerstenkorn ein unmittelbarer Zusammenhang. Mittels der Rechenmodelle konnten aber nur eine sehr schwache Korrelationen festgestellt werden, die fast ausschließlich durch die Albumin- und Globulin-Fraktion zustande kamen. Es konnten auch kaum Peaks identifiziert werden, die einen starken Einfluss auf den Zielparameter ausübten.

Die Kolbachzahl beschreibt das Verhältnis des Löslichen Stickstoffs zum Gesamtstickstoff des Malzes in Prozent, es besteht somit ein inniges Verhältnis zwischen diesen beiden Parametern und es konnte deshalb davon ausgegangen werden, dass sie von den gleichen Faktoren beeinflusst werden. Es erklärte sich somit auch die weitgehend fehlende Übereinstimmung etwaiger Peaks mit der Kolbachzahl. Die Rechenmodelle beider Parameter waren sehr unsicher und stark zufallsbelastet, es konnten die zu erwarteten Korrelationen nicht festgestellt werden. Auf eine Darstellung der Rechenmodelle für die Kolbachzahl wurde daher verzichtet.

Tab. 5: b-Koeffizienten: Löslicher Stickstoff

b-Koeffizienten, Löslicher Stickstoff								
Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Albumine	Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Hordeine	Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Hordenine
1	1603	-2892	34	1	-3	68	-1892	2202
2	0	-20794	35	1815	4534	69	4778	-1
3	44957	31853	36	-8620	-7314	70	2524	2365
4	-57698	-52340	37	6740	9352	71	-24322	-3007
5	13749	6540	38	9822	13606	72	-18550	-15259
6	-6272	-26657	39	3004	4323	73	17417	17709
7	-10686	-6354	40	0	-0.871	74	-13685	-4537
8	16313	9612	41	-6212	-8603	75	-5366	-3366
9	-28689	-49603	42	18036	21162	76	-25249	-4632
10	18632	28537	43	-56292	-56408	77	13148	2168
11	19761	1175	44	-27750	-19911	78	-1507	-1
12	-7889	-10724	45	-16368	13371	79	13408	6113
13	17035	25037	46	26843	26233	80	-17930	-2367
14	-10825	-12608	47	18546	9034	81	16327	4717
15	9483	-4720	48	7109	-7598	82	1210	-2785
16	-25126	-11762	49	10306	4321	83	24119	5737
17	20567	30261	50	5531	20675	84	4473	-6127
18	31454	25153	51	25005	22656	85	-8659	3470
19	14153	28956	52	14040	23523	86	61	-1837
20	11542	10380	53	21125	24085	87	31797	2433
21	18031	25107	54	7558	-8921	88	11923	1
22	-10123	-5114	55	12927	10257	89	6833	1
23	14885	16082	56	18299	18772	90	15894	15000
24	31240	32718	57	-10250	-4923	91	1651	8037
25	7553	5220	58	4003	-4919	92	13378	21947
26	7921	9907	59	-1	-4750	93	7021	12494
27	-3526	-1711	60	2447	3765	94	-5152	-11633
28	33165	34347	61	2372	4498	95	-9928	7303
29	57656	68605	62	2839	-0.810	96	-23940	-24232
30	-19026	-22437	63	-17185	-19611	97	2851	2600
31	-7755	-4122	64	-13091	-13992	98	-1086	-1143
32	12451	16372	65	-23141	-21740			39

Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Albumine	Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Hordeine	Peak Nr.	Albumine Hordeine Hordenine	Hordenine
33	-3369	-2335	66	-10735	-8295			
			67	11443	2431			

Rot: Positive Vorzeichen in allen 3 Modellen

Schwarz: Vorzeichen in den 3 Modellen waren nicht gleich

Blau: Negative Vorzeichen in allen 3 Modellen

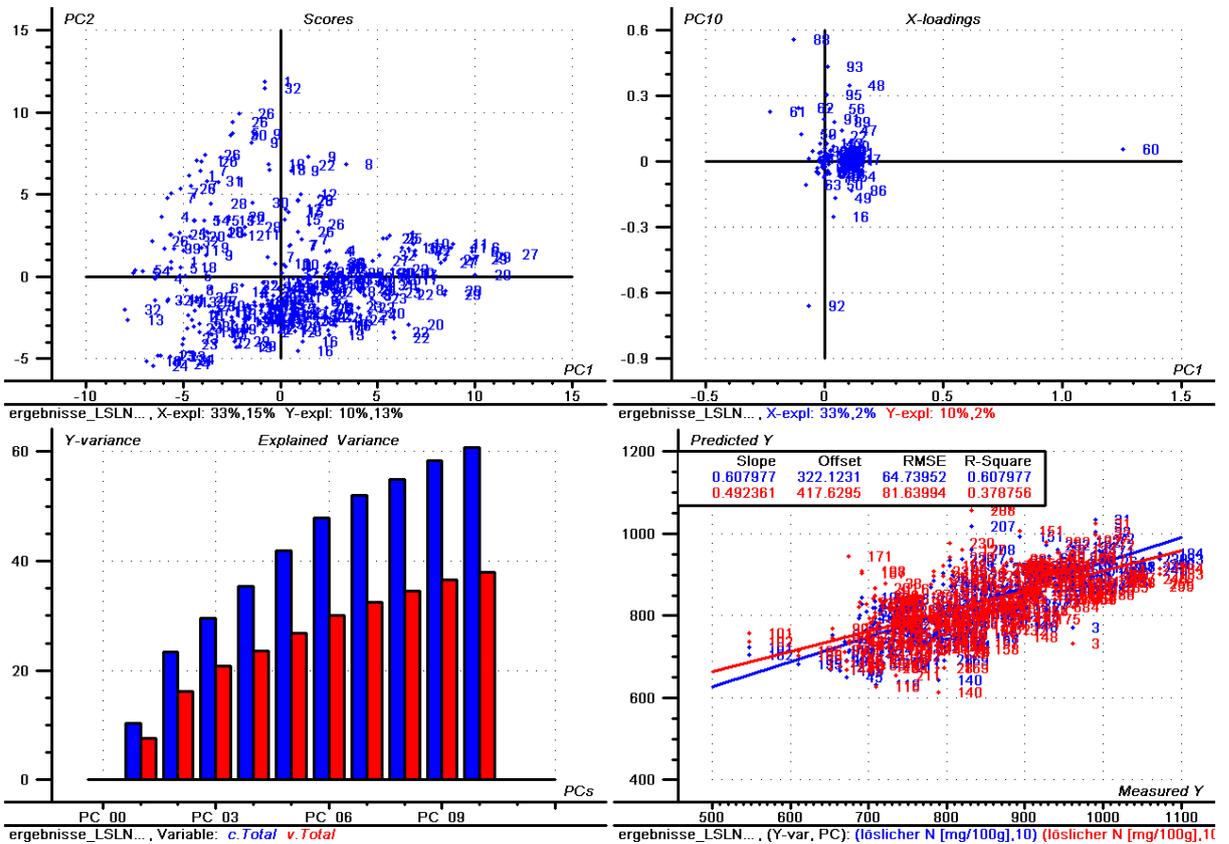


Abb. 57: Löslicher Stickstoff, alle Fraktionen, alle Proben

# Ergebnisse und Diskussion

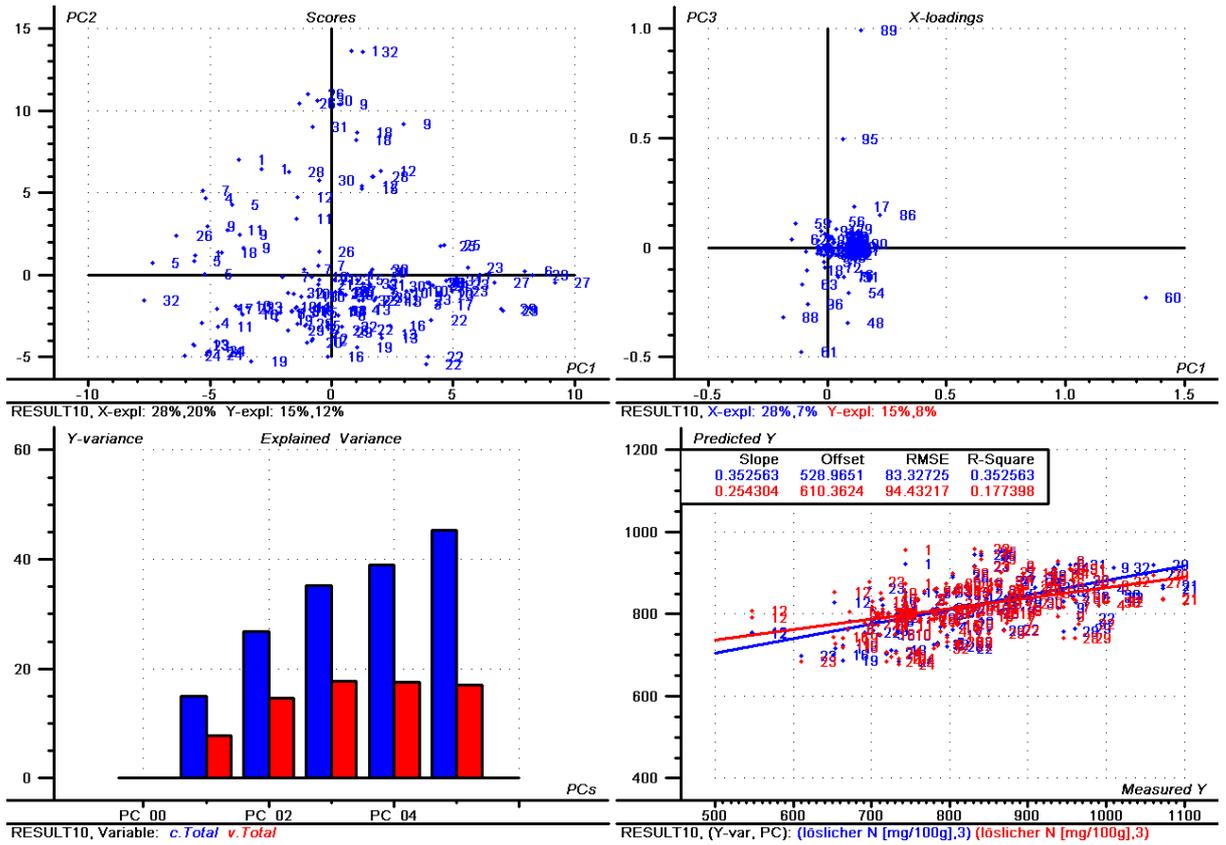


Abb. 58: Löslicher Stickstoff, alle Fraktionen, 1. Teilprobenmenge

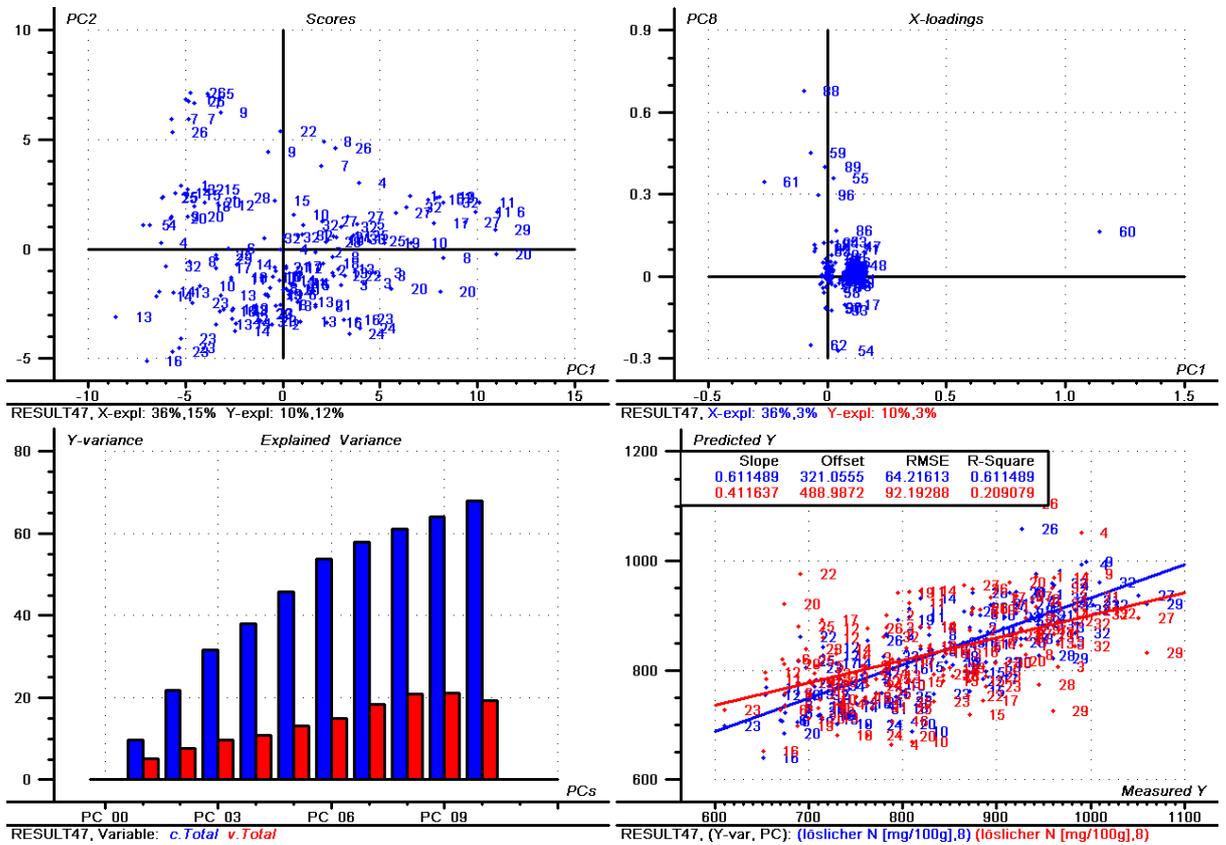


Abb. 59: Löslicher Stickstoff, alle Fraktionen, 2. Teilprobenmenge

# Ergebnisse und Diskussion

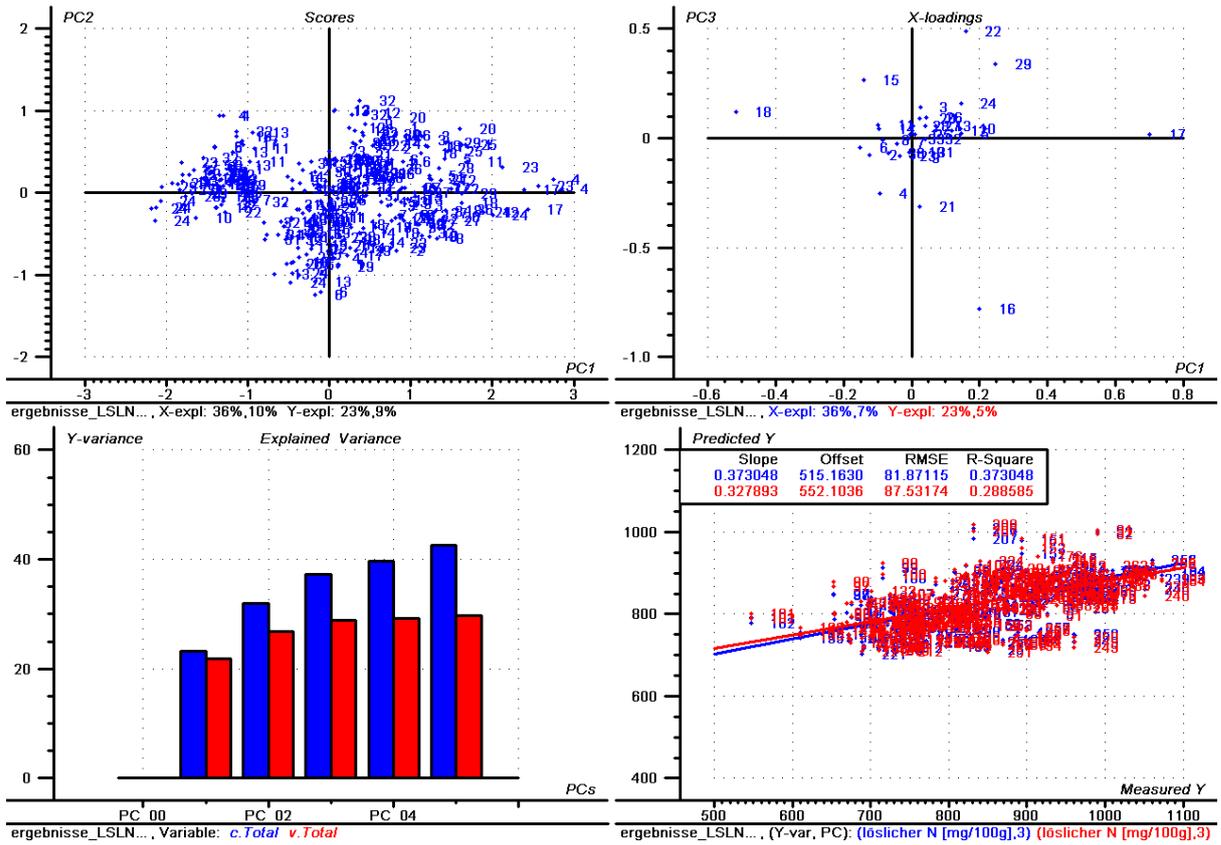


Abb. 60: Löslicher Stickstoff, Albumine, alle Proben

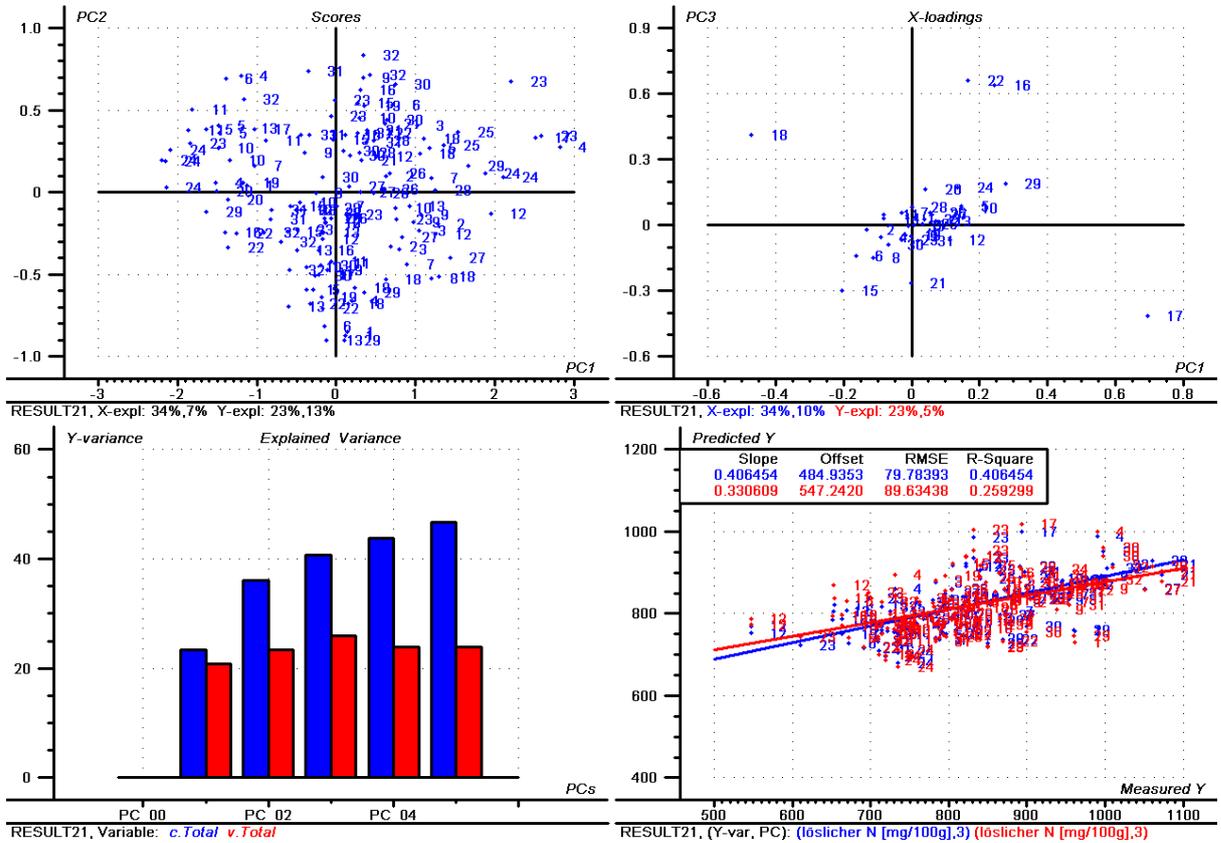


Abb. 61: Löslicher Stickstoff, Albumine, 1. Teilprobenmenge

# Ergebnisse und Diskussion

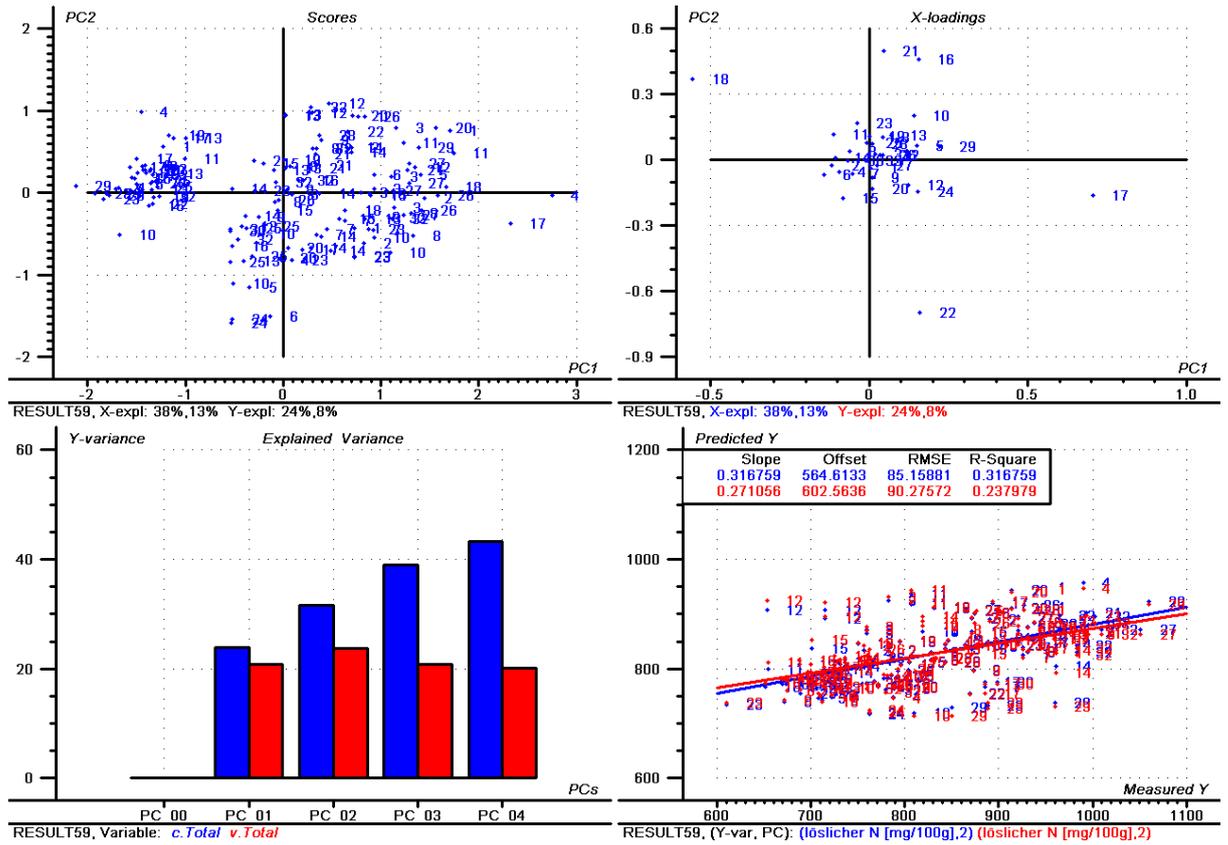


Abb. 62: Löslicher Stickstoff, Albumine, 2. Teilprobenmenge

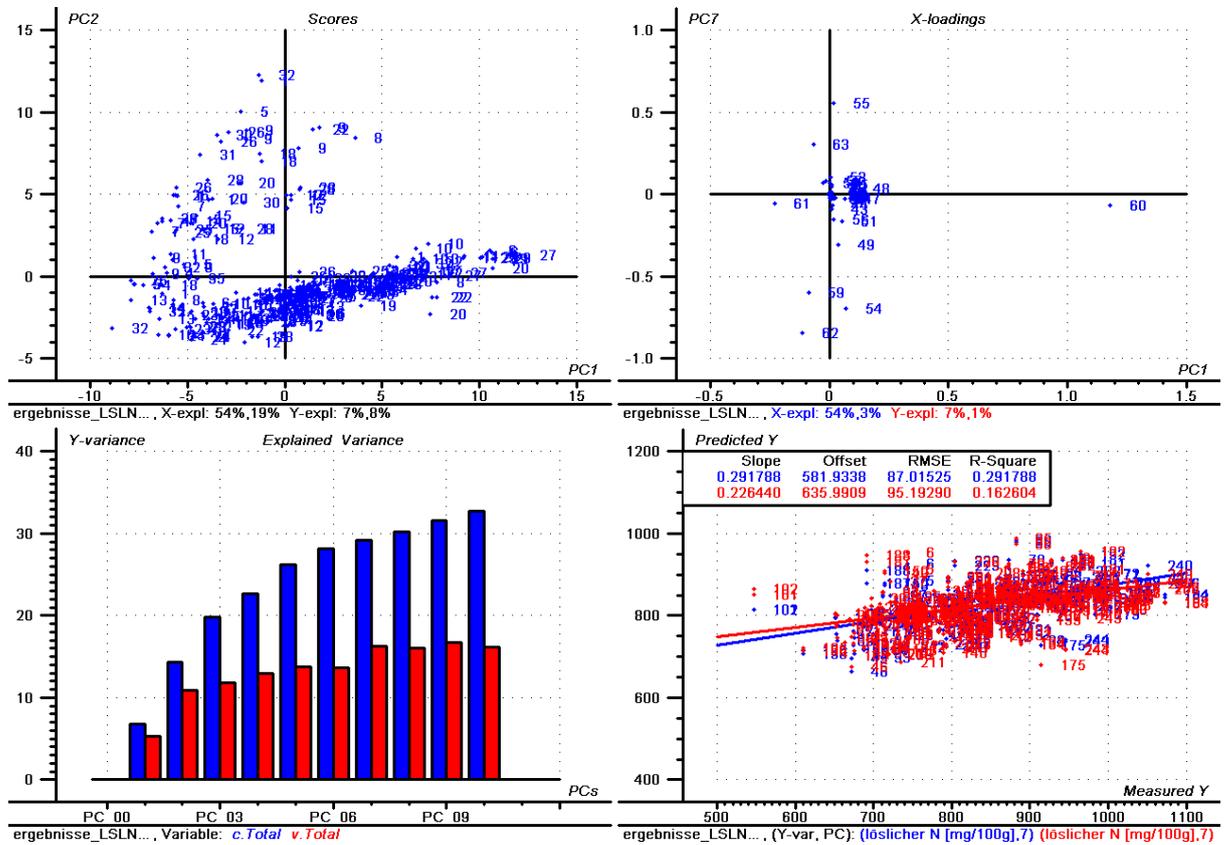


Abb. 63: Löslicher Stickstoff, Hordeine, alle Proben

# Ergebnisse und Diskussion

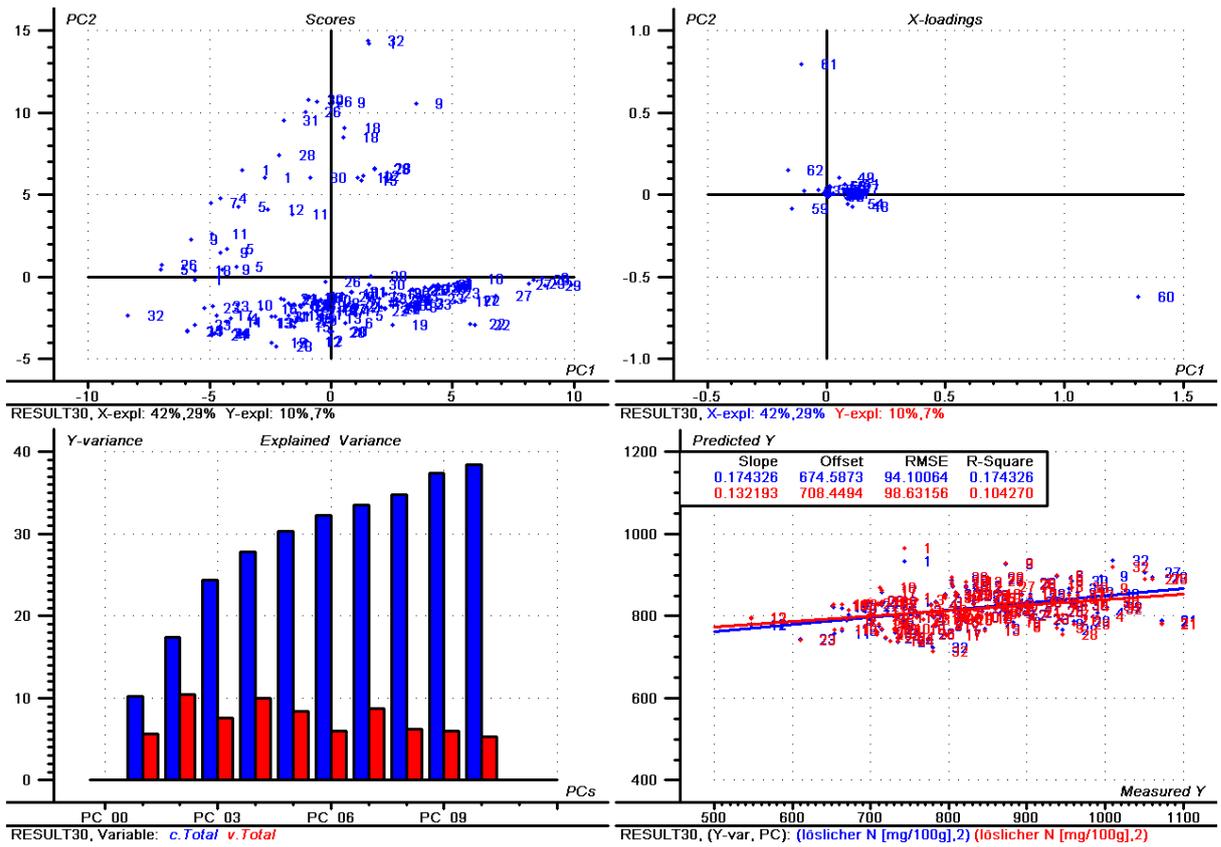


Abb. 64: Löslicher Stickstoff, Hordeide, 1. Teilprobenmenge

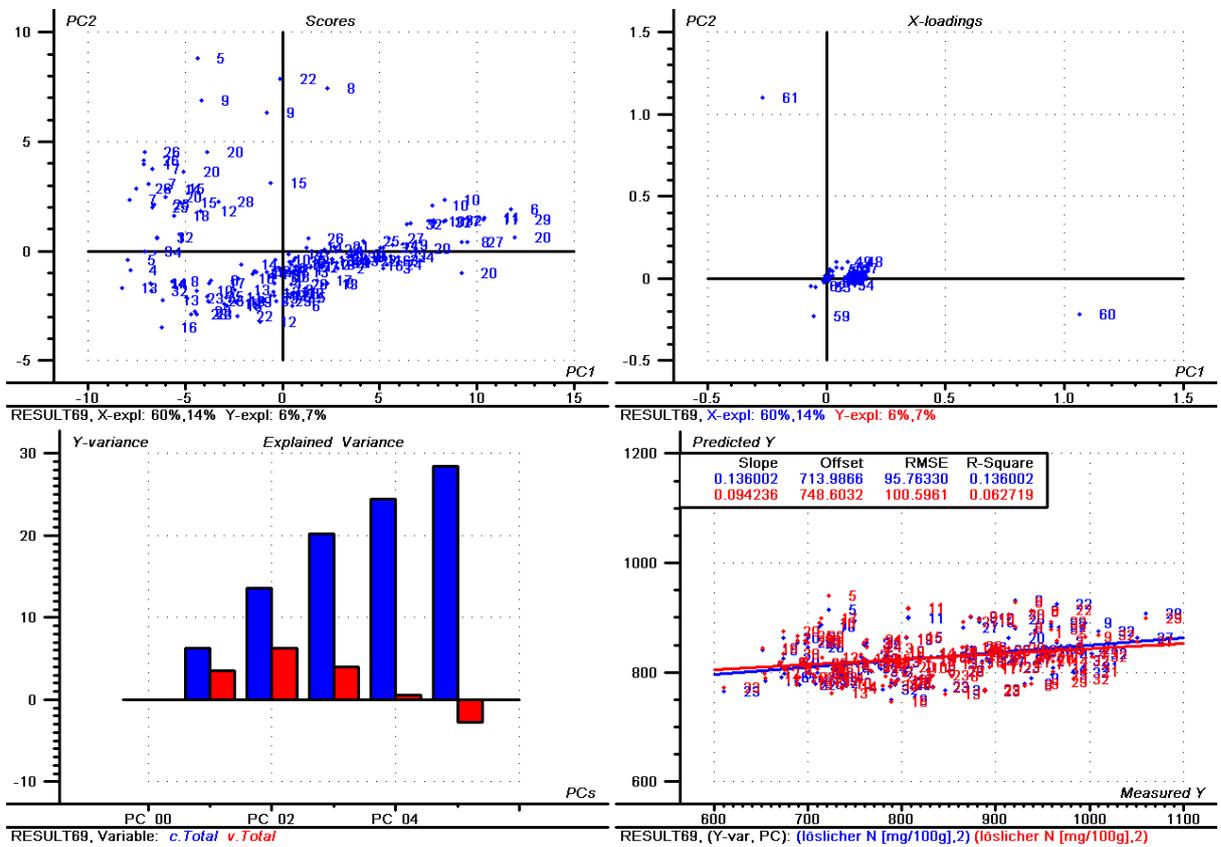


Abb. 65: Löslicher Stickstoff, Hordeide, 2. Teilprobenmenge

# Ergebnisse und Diskussion

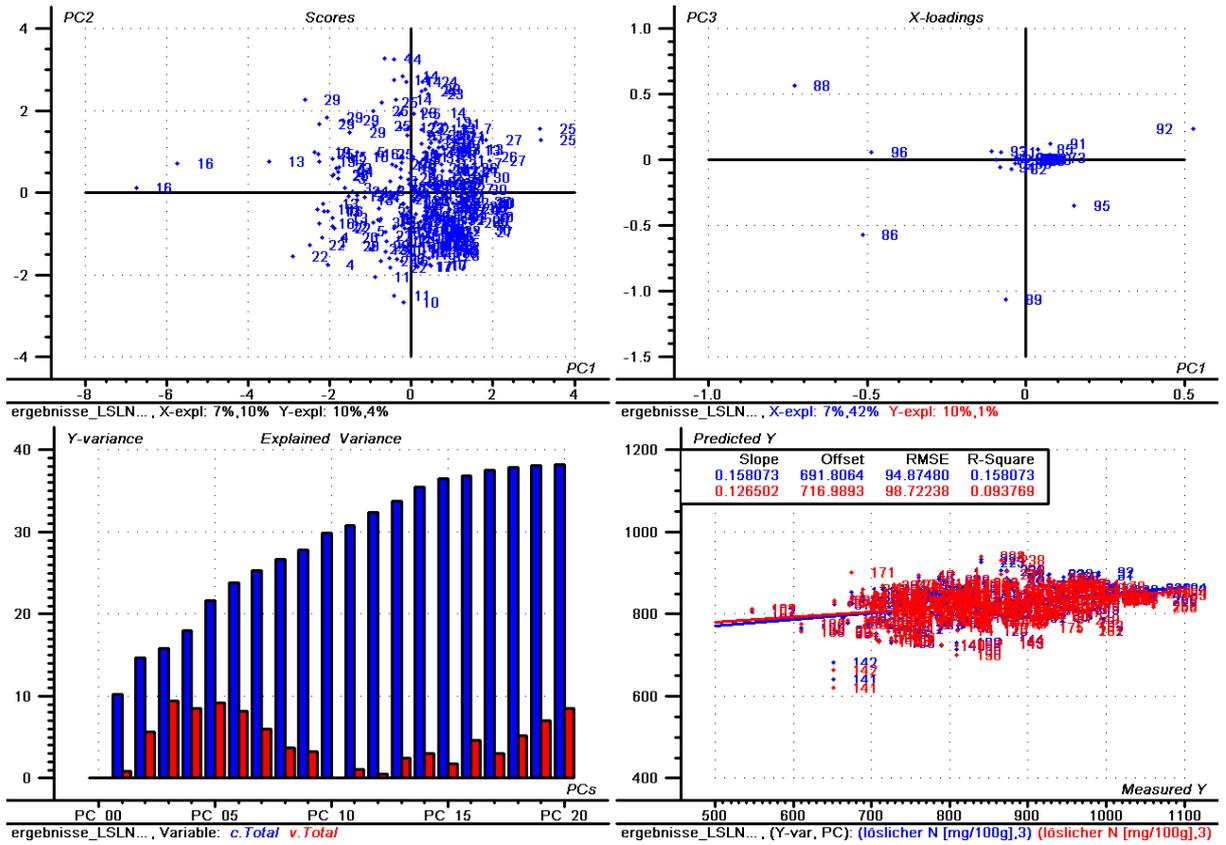


Abb. 66: Löslicher Stickstoff, Hordenine, alle Proben

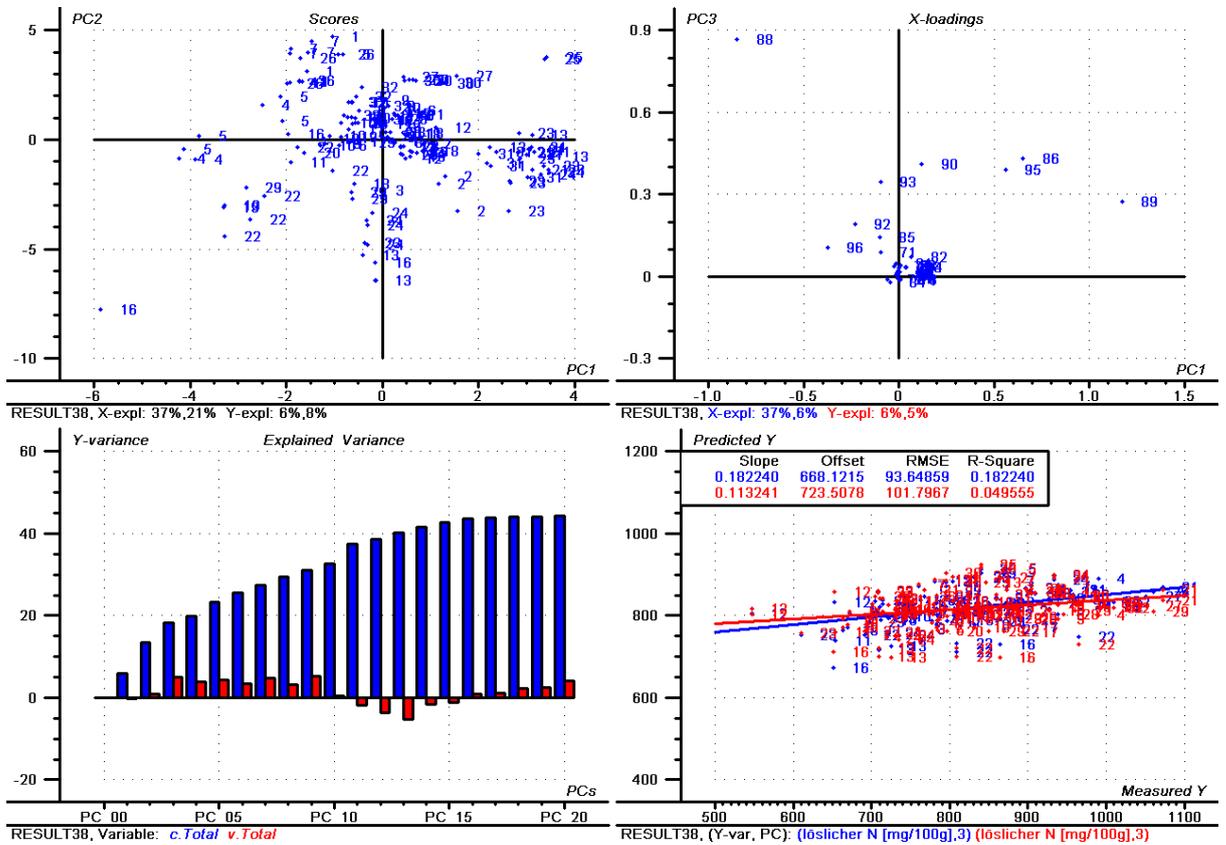


Abb. 67: Löslicher Stickstoff, Hordenine, 1. Teilprobenmenge

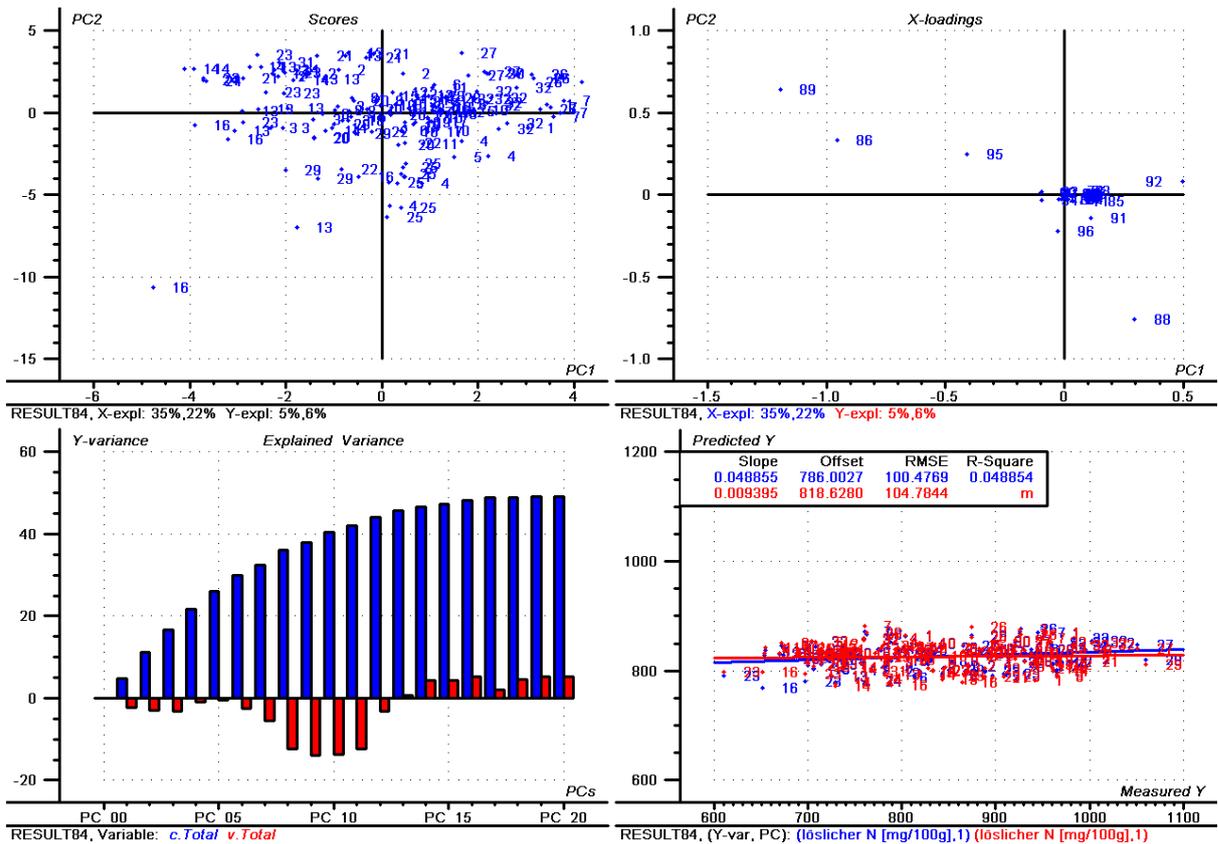


Abb. 68: Löslicher Stickstoff, Hordenine, 2. Teilprobenmenge

## 6.2 Mälzung

Die Feuchtigkeit der Gerste wurde zu Beginn der Mälzung mit einem Wert von 12,92 ermittelt und das fertige Darrmalz wies einen Feuchtigkeitsgehalt von 4,48 auf.

Während des Mälzungsprozesses konnte die Entwicklung der Gerstenkörner zum Malz visuell verfolgt werden. Nach 24 Stunden (Abb. 70) war nur ein geringer Unterschied gegenüber dem Zustand der frischen Gerste (Abb. 69) zu erkennen, die Wurzel- und Blattkeime waren noch weitestgehend von den Spelzen bedeckt. Nach 48 Stunden waren bereits deutliche weiße Punkte an den Spitzen der Körner zu sehen (Abb. 71). Nach 72 Stunden waren bereits fadenförmige Wurzelkeime ausgebildet (Abb. 72). Ab der 96. Stunde kam es auch zu einem Austreten der Blattkeime aus dem Korn (Abb. 73, Abb. 74, Abb. 75). Nach dem Darrprozess konnten die getrockneten Blatt- und Wurzelkeime durch Reibung entfernt werden (Abb. 76).

Gefriergetrocknete Gerste nach unterschiedlichen Mälzungsstunden: Keimentwicklung  
während des Kleinmälzungsprozesses.



**Abb. 69: Kleinmälzung: Gerste 0h**



**Abb. 70: Kleinmälzung: Gerste 24h**



**Abb. 71: Kleinmälzung: Gerste 48h**



**Abb. 72: Kleinmälzung: Gerste 72h**



**Abb. 73: Kleinmälzung: Gerste 96h**



**Abb. 74: Kleinmälzung: Gerste 120h**



Abb. 75: Kleinmälzung: Gerste 164h



Abb. 76: Kleinmälzung: Darrmalz

Anhand der folgenden Diagramme (Abb. 76 - 81) kann man gut die Veränderung der Peaks während des Kleinmälzungsversuchs erkennen. Vor allem die Entwicklung einzelner Peaks, die teilweise um das Doppelte zunahmten oder auch stark abnahmen, konnte beobachtet werden.

Bei den Albuminen ändert sich das Proteinspektrum stetig, vor allem bei Peak Nr. 2 und Peak Nr. 25 hat sich deren Proteinmenge am Ende mindestens verdoppelt (Abb. 77, Abb. 78).

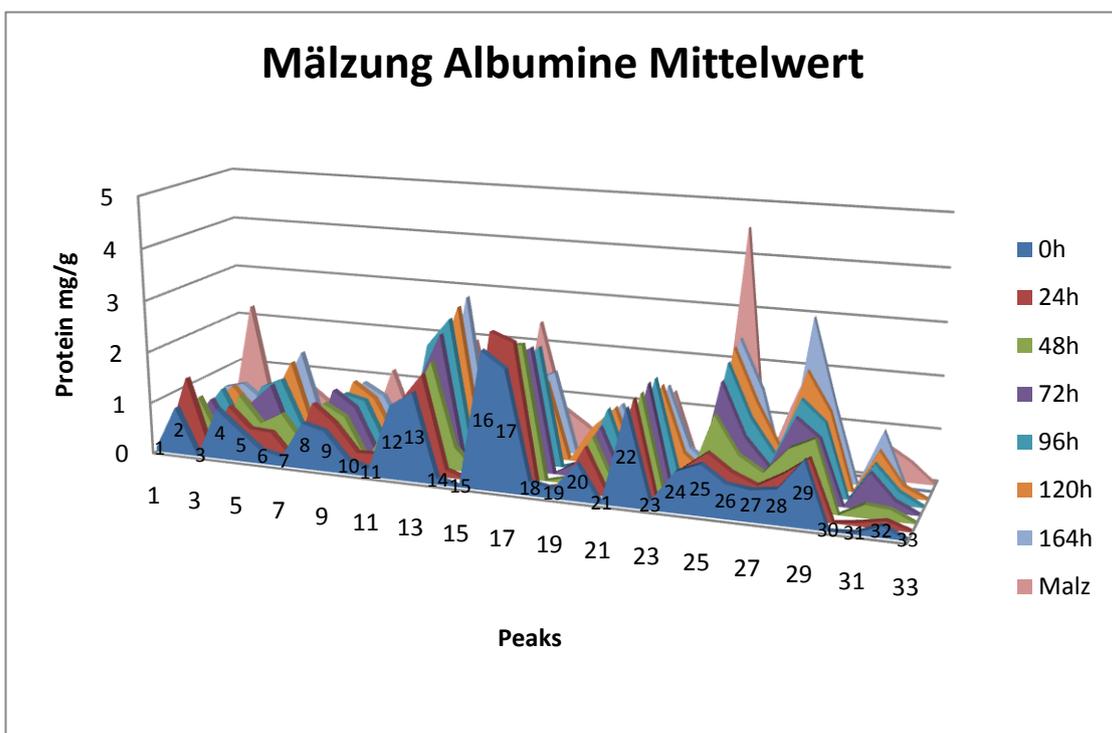


Abb. 77: Mälzung Albumine

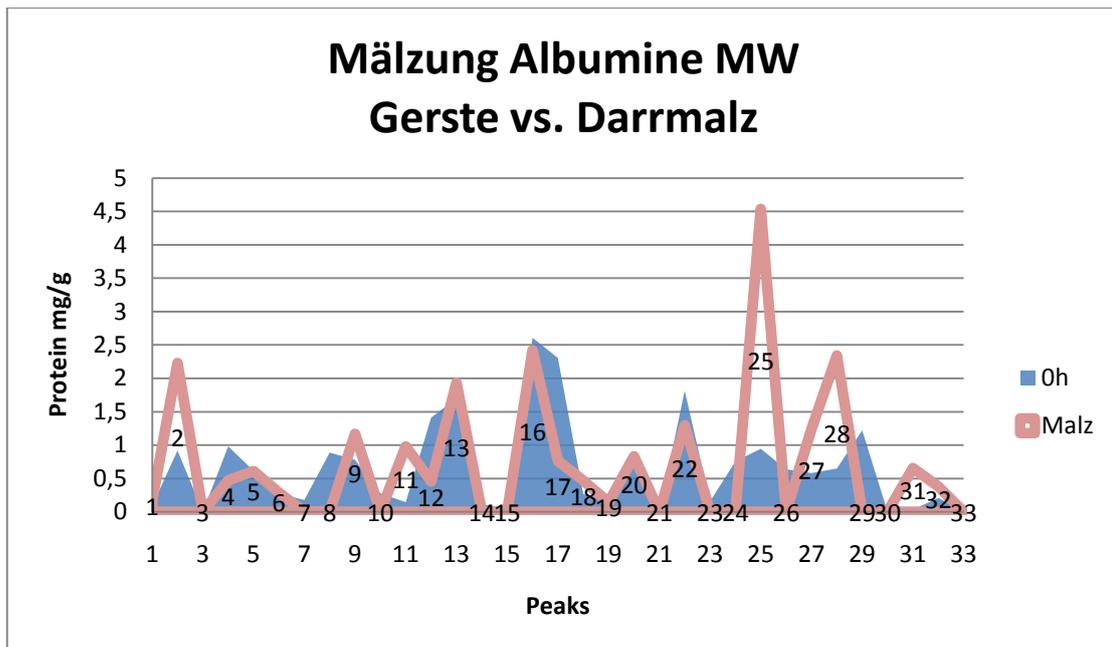


Abb. 78: Mälzung Albumine: Gerste vs. Darmmalz

Bei den Hordeinen ist vor allem Peak Nr. 60 (Peak mit negativem b-Koeffizienten bei der Extraktausbeute) zu Beginn sehr dominant, dieser nimmt bis zum fertigen Darmmalz stetig ab (Abb. 79), aber im Vergleich zu den anderen Peaks bleibt dieser Peak, bezogen auf die Proteinmenge im Darmmalz, dominant (Abb. 80).

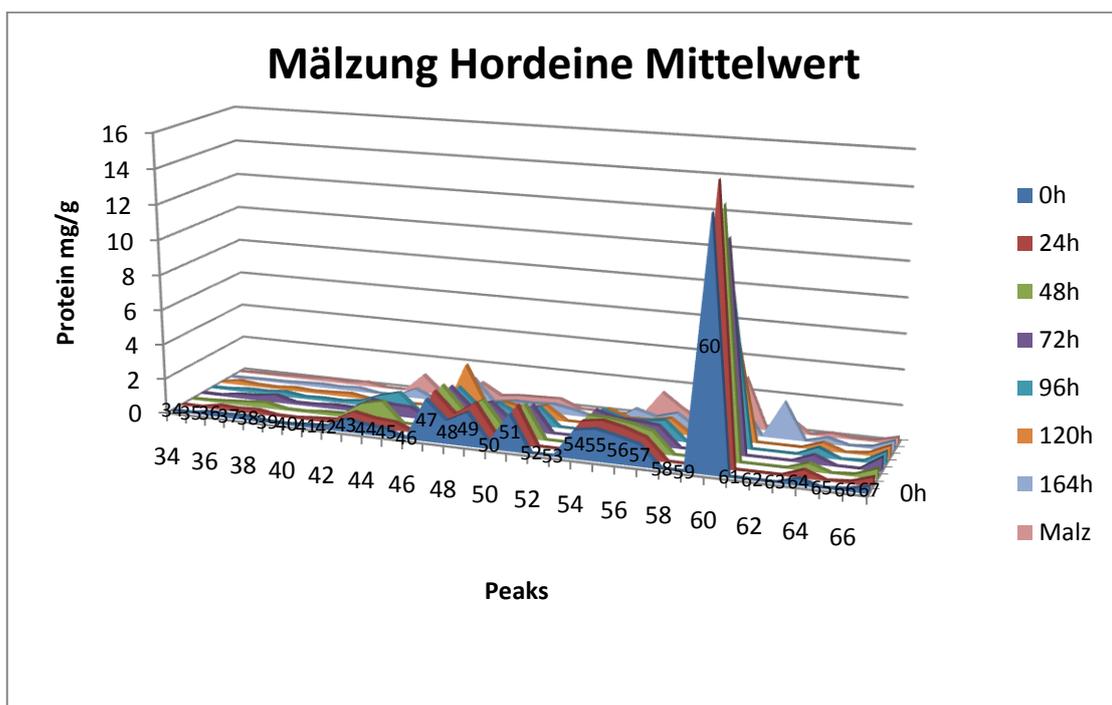


Abb. 79: Mälzung Hordeine

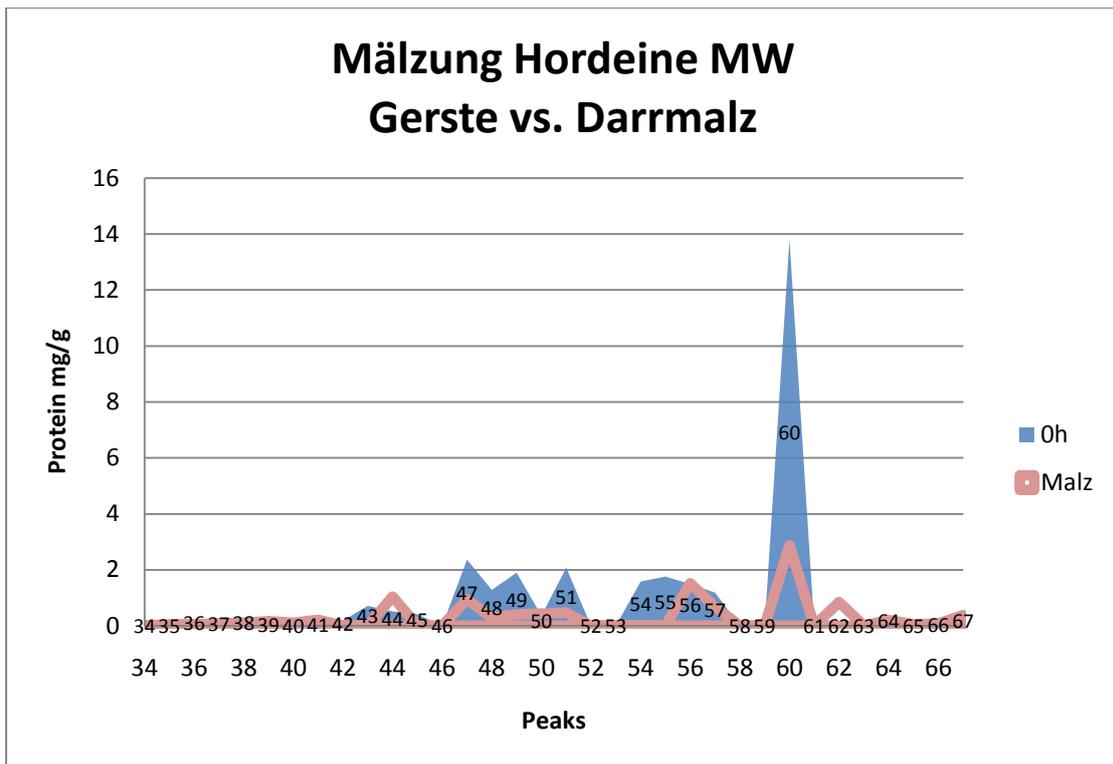


Abb. 80: Mälzung Hordeine: Gerste vs. Darmmalz

Bei den Hordeninen nehmen die Proteinmengen aller Fraktionen bis zum fertigen Darmmalz stetig ab, Ausnahme Peak Nr. 91, dieser bleibt fast auf gleichem Niveau wie zu Beginn (Abb. 81, Abb. 82).

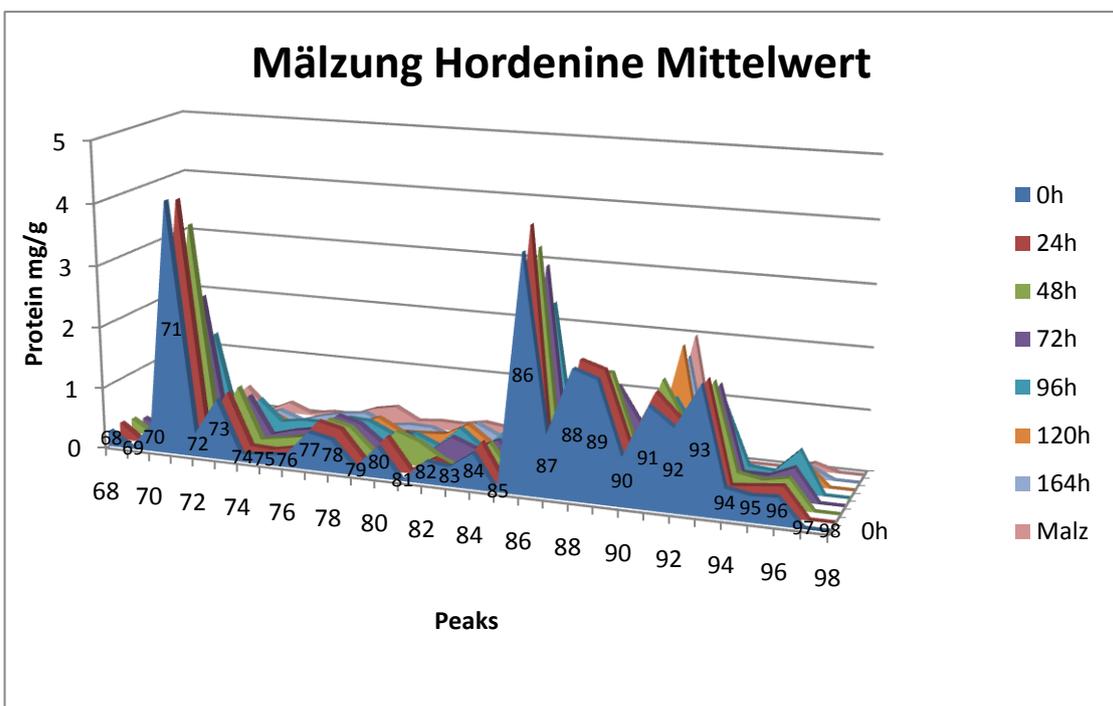


Abb. 81: Mälzung Hordenine

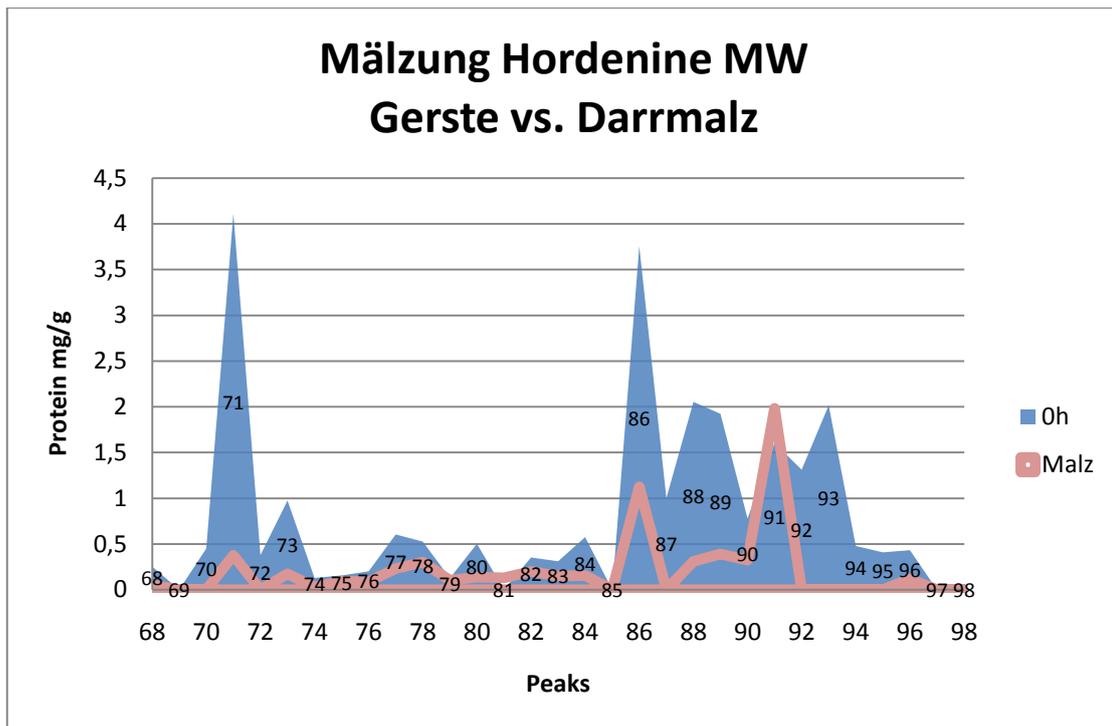


Abb. 82: Mälzung Hordenine: Gerste vs. Darmalz

### 6.2.1 Feinschrot-Extraktausbeute

Aus Tab. 3 ist ersichtlich, dass bei den Albuminen Peak 9 durch einen hohen positiven und die Peaks 16, 22 und 32 durch einen stark negativen b-Koeffizienten gekennzeichnet sind. Abb. 77 zeigt, dass die Peaks 2, 9, 13, 25 und 28 während der Mälzung zunehmen, 17, 22 und 29 hingegen abnehmen. Daraus geht hervor, dass Peak 9 einen positiven Einfluss auf die Extraktausbeute hat und somit in Braugerstensorten reichlich vorhanden bzw. mit einem guten Entwicklungspotential während der Mälzung ausgestattet sein sollte. Ein Nachweis der amylolytischen Aktivität einzelner Peaks war leider nicht möglich, da die Enzyme offenbar durch die HPLC-Trennung denaturiert wurden. Die Peaks 13, 17 und 22 scheinen, wie ihre b-Koeffizienten annehmen lassen, einen negativen Einfluss auf die Extraktausbeute zu haben, eine Minimierung dieser Peaks durch Züchtung bzw. ein rascher Abbau während der Mälzung hätte daher wahrscheinlich positiven Einfluss auf die Brauqualität der Gerste. Bei den Hordeinen und Hordeninen (Abb. 79 und Abb. 81) sind negative b-Koeffizienten vorherrschend. Ebenso ist insbesondere bei den Hordeninen ein Abnehmen der Peakhöhe während der Mälzung feststellbar, d.h. eine Minimierung dieser Fraktionen bzw. eine starke Abnahme während der Mälzung scheinen züchterisch erstrebenswert.

### 6.2.2 Diastatische Kraft

Der Albumin-Peak Nr. 13 nimmt während der Mälzung stark zu und ist mit einem hohen positiven b-Koeffizienten ausgestattet. Peak 16 nimmt während der fortschreitenden Mälzungsdauer etwas ab und ist mit einem negativen b-Koeffizienten gekennzeichnet, während Peak 17 ebenfalls abnimmt und mit einem positiven b-Koeffizienten gekennzeichnet ist. Eine Minimierung von 16 und Maximierung von 17 wäre daher erstrebenswert. Eben solche Pärchen mit unterschiedlichem Vorzeichen der b-Koeffizienten stellen die Peaks 25 und 26 sowie 28 und 29 dar. Alle genannten Peaks nehmen mit fortschreitender Mälzungsdauer bei negativem b-Koeffizienten stark zu und bei positivem b-Koeffizienten stark ab (Abb. 77, Tab. 4).

Aufgrund der geringen erreichbaren erklärbaren Variabilität kann eine Interpretation der Ergebnisse von Hordeinen und Hordeninen unterbleiben.

## 6.3 Amylaseaktivität

### 6.3.1 Optimale Wellenlänge

Um die optimale Wellenlänge für die Amylaseaktivität zu bestimmen, wurden zuvor Stärkelösungen unterschiedlicher Konzentration hergestellt und aufgrund der im optimalen Messbereich liegenden Extinktion die Stärkelösung mit der geringsten Konzentration 25  $\mu\text{L}/5\text{ mL}$  verwendet (Tab. 6). Die maximale Extinktion wurde bei 580 nm ermittelt (Abb. 83). Diese Wellenlänge wurde für alle weiteren Messungen verwendet.

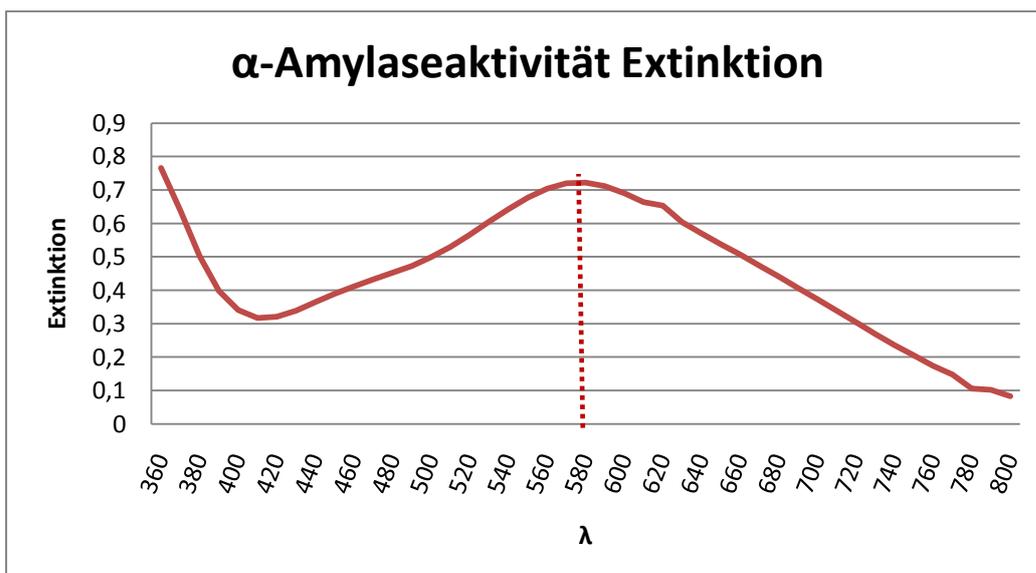


Abb. 83: Amylaseaktivität: optimale Wellenlänge

**Tab. 6: Amylaseaktivität: unterschiedliche Konzentrationen**

Extinktion	c [ $\mu\text{L}/5\text{ mL}$ ]
0,722	25
1,315	50
2,081	100
2,425	150
2,520	200
2,566	300

Bezüglich der Enzymaktivität der Extrakte ergab sich aus Vorversuchen mit Malzextrakt, dass nach 15 Minuten bei 70°C sowohl bei Zugabe des unverdünnten Malzextraktes als auch bei Zugabe von 1:10 bzw. 1:100 verdünntem Extrakt keine Jod-Stärkereaktion mehr auftrat. D.h. die Enzymaktivität sollte, sofern sie nur durch die Verdünnung während der Probenaufbereitung und HPLC-Trennung herabgesetzt wird, auf jeden Fall für einen Nachweis in den Chromatographie-Fraktionen ausreichend sein.

### 6.3.2 Ergebnisse Amylaseaktivität

Die gemessenen Extinktionen der eluierten Albumin-Fraktionen der Gerstensorte Xanadu und des daraus hergestellten Darmmalzes (Abb. 84) entspricht dem HPLC-Gradientenverlauf (Abb. 85). Sowohl bei Albuminen als auch bei Hordeinen, bei der Gerste und auch beim Darmmalz kamen jedes Mal in etwa die gleichen Ergebnisse zustande. Zu Beginn des Gradienten war eine intensive Blaufärbung, die stetig abnahm bis ca. Minute 20.

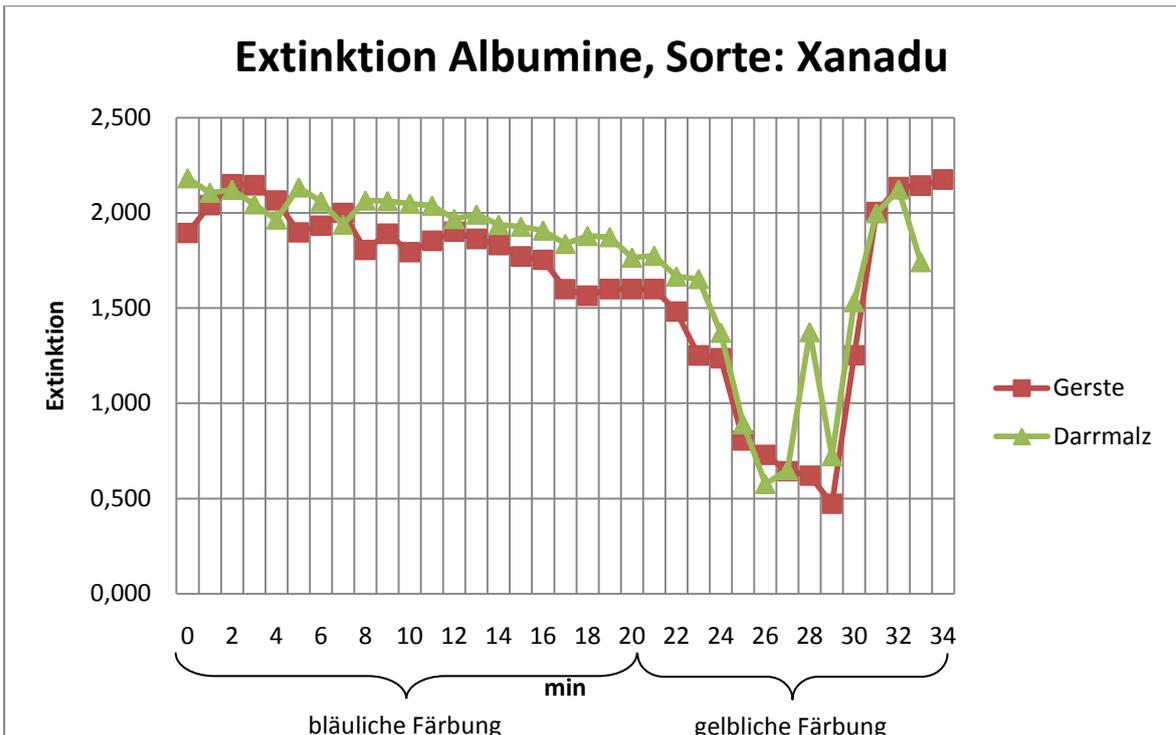


Abb. 84: Amylaseaktivität: Extinktion

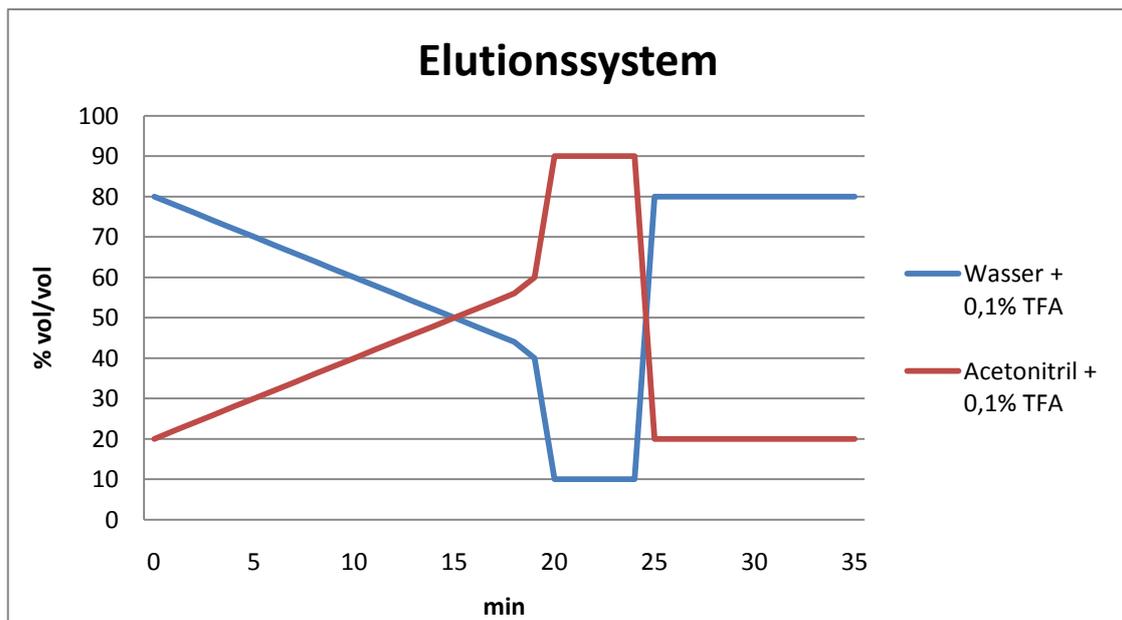


Abb. 85: Elutionssystem

Bei Vorversuchen wurde überdies festgestellt, dass bei unverdünnter Zugabe von Eluat offenbar durch den Anteil an Acetonitril eine Ausfällung der Stärke stattfindet. Die Versuche zur Bestimmung der Amylaseaktivität wurden daher mit 1:100 verdünntem Eluat durchgeführt. Die Beeinträchtigung der Stärkekonzentration durch das Acetonitril des Eluates konnte dennoch, wie dem abnehmendem Verlauf der Extinktion der Probenansätze zu entnehmen ist, nicht gänzlich verhindert werden.

Dennoch hätte sich bei Vorliegen aktiver Amylase in den Eluaten eine deutliche Abnahme der Extinktion bei den entsprechenden Fraktionen zeigen müssen. Die Amylase wird offenbar durch das Laufmittel inaktiviert. Eine Inaktivierung durch den Extraktionspuffer (Lösung A, Seite 21) ist auszuschließen, da bei der unmittelbaren Verwendung des Malzextraktes noch ausreichend Aktivität vorhanden war.

#### 6.4 ELISA

Die R5-Antikörper dieses Tests sind nicht speziell auf Zöliakie auslösende Aminosäuresequenzen spezifisch und somit kein Maßstab für die Anwesenheit von gesundheitsschädlichen Peptiden für Zöliakiepatienten. Der Test wurde dennoch zur Evaluierung der Methode angewandt, da die pathogenspezifischen ELISAs zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht verfügbar waren.

Für den ELISA-Test wurde jeweils der Trocknungsrückstand von 1 mL HPLC-Eluat verwendet, dies entsprach dem HPLC-Analysedurchlauf von einer Minute. Bei den Hordeninen wurden Eluat-Proben zusammengefügt, gut durchgemischt und 1 mL dieser Probenlösung unter Vakuum getrocknet. Aus den im Testkit enthaltenen Standardlösungen resultiert die dargestellte Eichkurve (Tab. 7, Abb. 86). Obwohl im Bereich zwischen 0 und 20 ppb ein offenbar linearer Anstieg der Kurve vorlag, zeigte sich bei 40 und 80 ppb der typische exponentielle Verlauf der Kalibrierfunktion.

**Tab. 7: ELISA-Test: Messung Standards**

Standards	1. Messung	2. Messung
0ppb	0,1457	0,1407
10ppb	0,3651	
20ppb	0,5958	
40ppb	0,9463	
80ppb	1,1065	

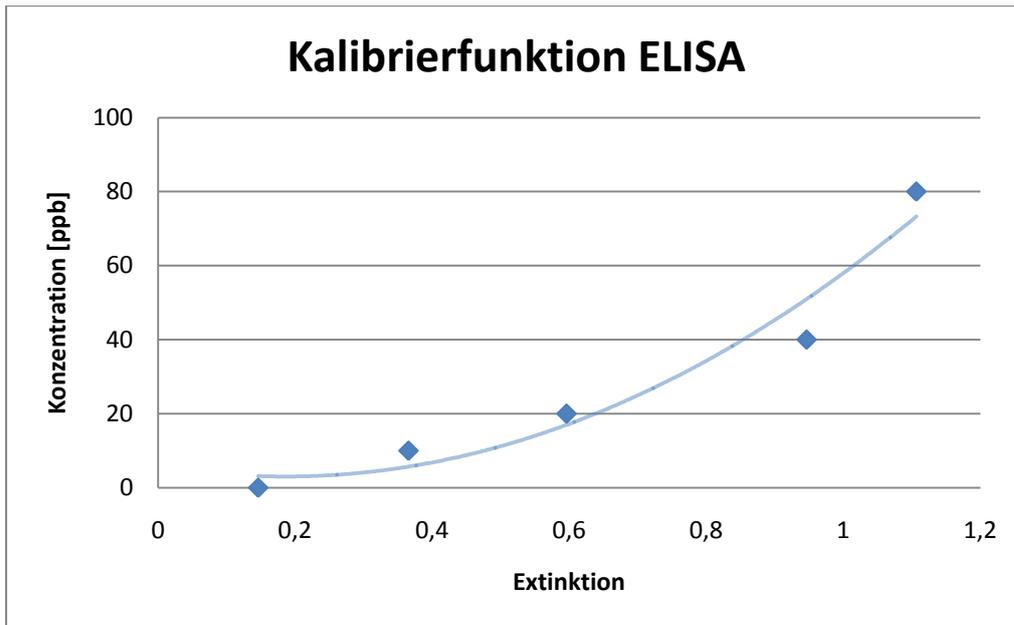


Abb. 86: ELISA-Test: Eichkurve Standards

In allen Bereichen der Chromatogramme der Hordeine und Hordenine gab es eine positive Reaktion mit dem angewandten R5-Antikörper. D.h. es wurden folgende Epitope in praktisch allen Peaks oder Peakgruppen der untersuchten Fraktionen gefunden: QQFPF, QQQFP, LQPFP und QLPFP (Aminosäure-Einbuchstabenbezeichnung: Q Glutamin, P Prolin, F Phenylalanin, L Leucin [BELITZ et al., 2008]). Diese Epitope sind nicht pathogen [VALDES et al., 2003], aber es zeigte sich die Anwendbarkeit von ELISA zur immunologischen Charakterisierung von HPLC-Fraktionen. Es kommt offenbar zu keiner Veränderung der Nachweisbarkeit von Glutenpeptiden durch die angewandten Extraktionsschritte und die chromatographische Trennung und die in den HPLC-Fraktionen enthaltenen Proteinmengen sind für die Durchführung von ELISA ausreichend. Es konnte aber festgestellt werden, dass die Reaktion des ELISA nicht bei allen Peakgruppen gleich empfindlich war. So war etwa deutlich zu erkennen, dass die Hordein-Peaks mit Laufzeiten zwischen 19 und 26 min bestenfalls als Spuren erkennbar sind. Ebenso zeigte sich bei den Hordeninen, dass ausschließlich Peaks der Gruppe Nr. 3 eine deutliche Reaktion zeigten, diese Gruppe enthält aber nur sehr kleine Peaks. Die Methode ist somit sehr gut zur Differenzierung der Peaks nach immunologischen Eigenschaften geeignet. Das Resultat des Versuches kann somit positiv beurteilt werden.

Die Mikrotiterplatten wurden im Photometer ca. achtmal hintereinander gemessen und im Anschluss der Durchschnittswert und die Standardabweichungen ermittelt (Tab. 8, Tab. 9, Abb. 88, Abb. 90). Bei den Chromatogrammen von Probe A und B bei Hordein und Hordenin wurde jeweils ein ähnlicher Verlauf festgestellt (Abb. 89, Abb. 91).

Eine quantitative Auswertung der Konzentrationen von Hordein- und Hordeninpeaks durch ELISA war nicht möglich, da in einigen Fraktionen der Eichkurvenbereich deutlich überschritten wurde.

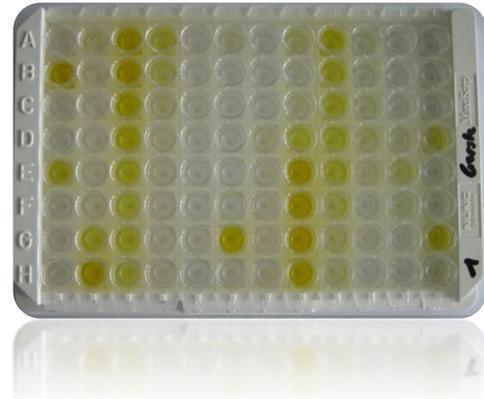


Abb. 87: ELISA-Test: messfertige Mikrotiterplatte Gerste

Messung Hordein

Tab. 8: ELISA-Test: Messung Extinktion Hordein

Ergebnisse ELISA-Gerste-Hordein											
min	A	S <sub>Probe A</sub>	B	S <sub>Probe B</sub>	Peaks	min	A	S <sub>Probe A</sub>	B	S <sub>Probe B</sub>	Peaks
1	0,140	0,008	0,116	0,017		24	0,534	0,010	0,685	0,010	
2	1,806	0,009	1,728	0,011		25	0,578	0,008	0,445	0,014	
3	0,127	0,006	0,130	0,008		26	0,391	0,007	0,357	0,012	
4	0,149	0,005	0,166	0,011		27	0,217	0,006	0,286	0,018	
5			0,156	0,017		28	0,165	0,007	0,213	0,010	Peak 64
6	0,138	0,004	0,127	0,009		29	0,156	0,011	0,198	0,009	
7	0,142	0,008	0,206	0,006		30	0,155	0,012	0,224	0,011	Peak 67
8	0,125	0,012	0,108	0,005		31	0,167	0,009	0,289	0,009	
9	0,267	0,009	0,108	0,005	Peak 34	32	0,174	0,007	0,226	0,010	
10	0,165	0,005	0,115	0,008	Peak 35	33	0,168	0,004	0,170	0,009	
11	0,152	0,005	0,125	0,014	Peak 36-37	34	0,158	0,011	0,198	0,010	
12	0,154	0,004	0,319	0,009	Peak 38	35	0,153	0,004	0,142	0,017	
13	0,134	0,006	0,149	0,012		36	0,148	0,005	0,161	0,010	
14	0,176	0,009	0,179	0,007	Peak 40-41	37	0,133	0,005	0,166	0,009	
15	0,729	0,006	0,592	0,006	Peak 42-43	38	0,134	0,004	0,136	0,011	
16	1,825	0,006	1,807	0,011	Peak 44-47	39	0,141	0,009	0,226	0,010	
17	1,810	0,005	1,784	0,011	Peak 48-50	40	0,154	0,010	0,373	0,007	
18	1,820	0,007	1,806	0,009	Peak 51	41	0,231	0,012	0,239	0,009	
19	1,607	0,006	1,672	0,007		42	0,145	0,006	0,135	0,015	
20	1,240	0,009	1,123	0,010	Peak 55	43	0,132	0,007	0,139	0,024	
21	0,883	0,006	0,877	0,012	Peak 57-58	44	0,119	0,009	0,198	0,012	
22	0,651	0,004	0,748	0,008	Peak 60	45	0,110	0,012	0,209	0,010	
23	0,732	0,008	0,685	0,015							

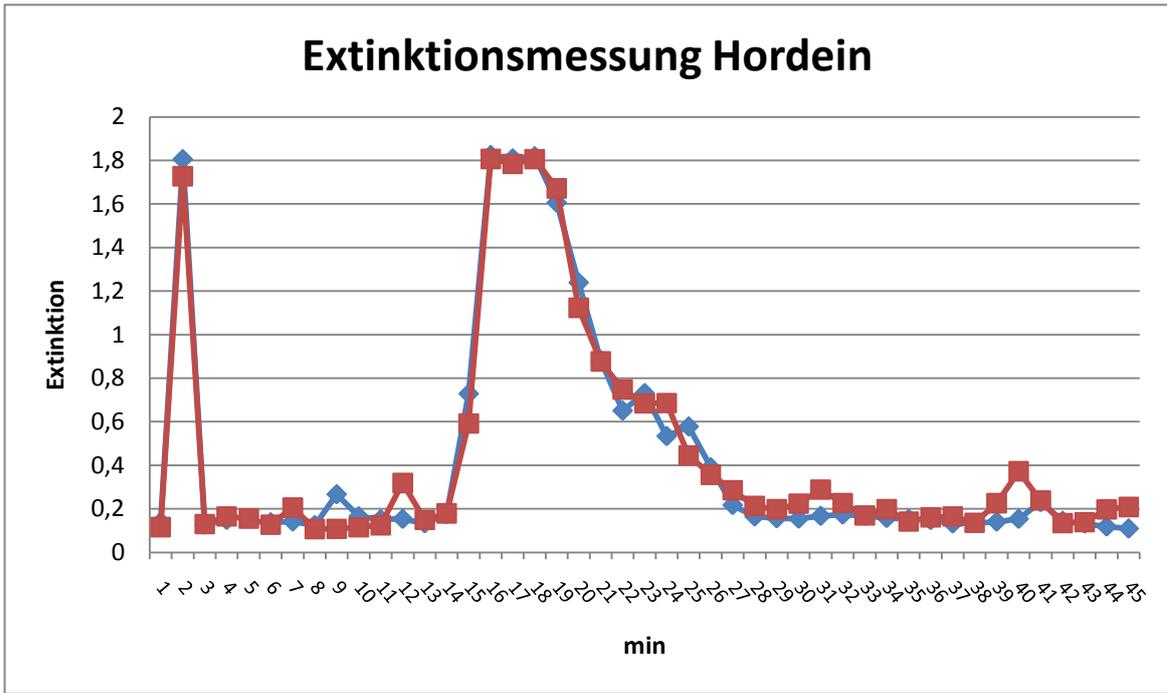


Abb. 88: ELISA-Test: Messung Hordein

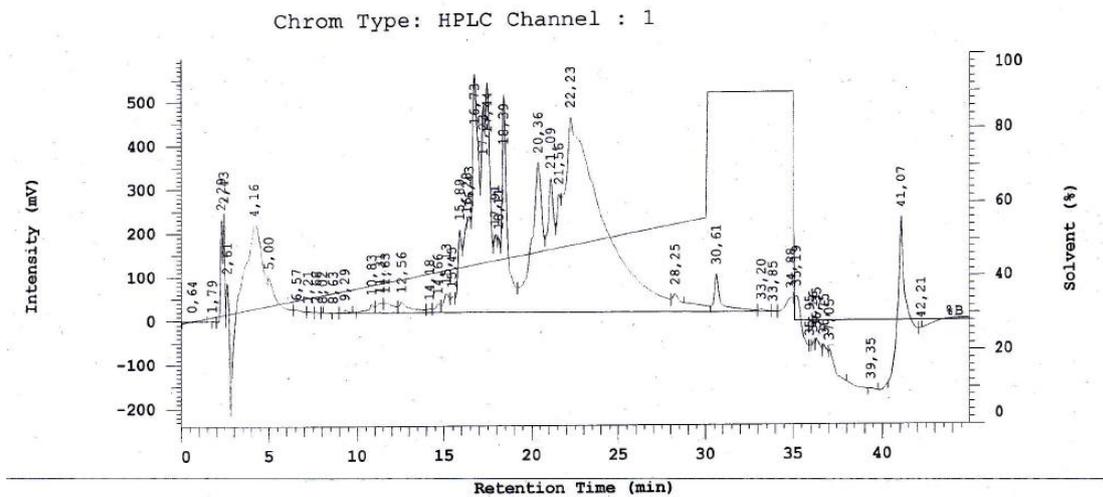


Abb. 89: ELISA-Test: HPLC-Chromatogramm Hordein, Probe A

Messung Hordenin

Tab. 9: ELISA-Test: Messung Extinktion Hordenin

Ergebnisse ELISA-Gerste-Hordenin						
Fraktion	Minuten	A	S <sub>Probe A</sub>	B	S <sub>Probe B</sub>	Peaks
1	1 bis 9	0,199	0,014	0,518	0,010	
2	10 bis 14	0,190	0,013	0,507	0,010	Peak 68-73
3	15 bis 18	1,064	0,011	1,185	0,005	Peak 74-80
4	19 bis 20	0,222	0,021	0,225	0,007	Peak 81-83



## 7 Schlussfolgerungen

Grundsätzlich scheint die Voraussage von Malz-Qualitätsparametern bei Gerste schwierig. Einerseits kann eine Vorhersage der Qualität aus den Proteinspektren mit offenbar sehr komplexen Zusammenhängen zwischen den vorhandenen Proteinkomponenten und den Qualitätsparametern getroffen werden, andererseits scheinen in einigen Fällen gar keine Zusammenhänge zwischen einzelnen Proteinen und den betreffenden Parametern zu bestehen. Dies kann zum Teil an den Eigenschaften der statistischen Auswertungsmethode, der Hauptkomponentenanalyse, liegen, die eine chromatographisch definierte Proteinfraction nur dann als funktionell erkennen kann, wenn eine ausreichende Variabilität vorliegt.

Bei der statistischen Berechnung waren sehr viele Hauptkomponenten für die einzelnen Auswertungen – sowohl der Ergebnisse aus der Gesamtprobenmenge als auch aus Teilprobenmengen und einzelnen Osborne-Fractionen – notwendig. Mit der ersten Hauptkomponente konnte meist nur ein Bruchteil (~ 20 %) der Daten erklärt werden. Man kann mit ziemlich großer Sicherheit sagen, dass die Einflüsse auf die einzelnen Qualitätsparameter sehr komplex sind. Dies wird noch mehr verdeutlicht, wenn man beachtet, dass die für die Malzqualität entscheidende Enzymaktivierung vor allem bei der Mälzung erfolgt, die Proteinspektren aber in der ungemälzten Gerste analysiert wurden.

Bei der Feinschrot-Extraktausbeute konnte erst nach Einbeziehung von 9 Hauptkomponenten ein Modell erstellt werden, welches mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,57$  einen Zusammenhang zum Zielparameter herstellte. Dass das Modell dennoch für den untersuchten Probensatz Gültigkeit haben dürfte, kann mit einiger Wahrscheinlichkeit angenommen werden, da der Unterschied zwischen den Korrelationskoeffizienten  $R^2$  von Kalibrierung und Validierung relativ gering war und auch Modelle aus den berechneten Teilprobenmengen mit ähnlicher Qualität erstellt werden konnten. Daraus kann geschlossen werden, dass in den Proben einige zuverlässig vorkommende Proteinkomponenten ausreichende Variabilität aufweisen und für die Vorhersage des Zielparameters geeignet sind. Vor allem Peaks aus der Hordein- und Hordeininfraction wiesen eine große Streuung auf, wobei die Hordeine einen hohen negativen Einfluss ausübten, dies bestätigt auch die in der Literatur erwähnte negative Korrelation der Malzqualität mit den Hordeinspeicherproteinen [WANG et al., 2007;

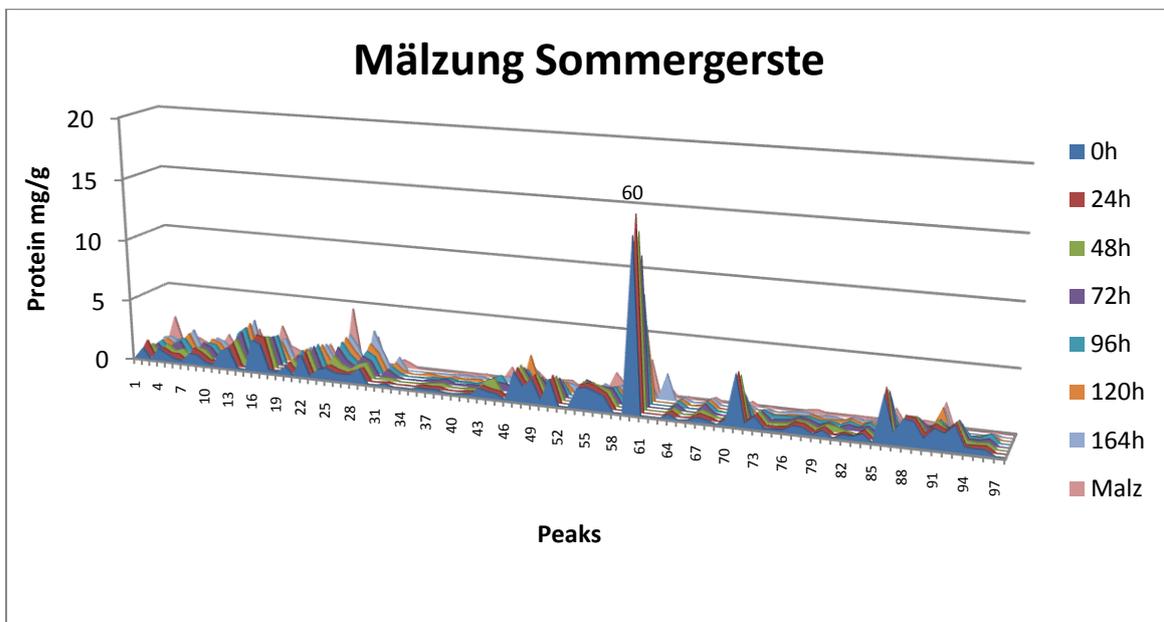
MacGREGOR und BHATTY, 1993] und die negative Korrelierung der Extraktausbeute mit dem Proteingehalt und den B-Hordeinen [QI et al., 2005; MOLINA-CANO<sup>2</sup> et al., 2000; WANG et al., 2007]. Der negative Einfluss des Proteingehalts ist vor allem durch die Hordeine erklärbar, da diese Fraktion den mengenmäßig größten Anteil im Gerstenkorn ausmacht. Bei den Hordeninen konnte nur ein geringer Zusammenhang, bei den Albuminen und Globulinen jedoch ein hoher positiver Zusammenhang festgestellt werden.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam es im Modell für die Diastatische Kraft. Während bei der Extraktausbeute sowohl aus der Albumin- und Globulin-Fraktion als auch aus der Hordeinfraktion brauchbare Modelle erstellt werden konnten, zeigte sich bei der Diastatischen Kraft nur die Albumin- und Globulin-Fraktion zur Errechnung von Modellen geeignet, obwohl Peaks aus der Hordein- und Hordeninfraktion erneut eine große Variabilität aufwiesen. Bei genauerer Betrachtung der Fraktionen wurden bei der Albumin- und Globulin-Fraktion ein hoher positiver Einfluss, bei der Hordeinfraktion ein vermutlich positiver Einfluss und bei der Hordeninfraktion kein Zusammenhang festgestellt. Die insgesamt positive Korrelation der Proteinkonzentration mit der Diastatischen Kraft kann somit bestätigt werden, wobei Hordenin in Literaturangaben negativ korreliert [WANG et al., 2007]. Die Diastatische Kraft wird hauptsächlich durch einen enzymatischen Effekt hervorgerufen [LI et al., 2008], vor allem durch die amylolytischen Enzyme in der Albumin&Globulin-Fraktion.

Beim Löslichen Stickstoff und der Kolbachzahl konnte das Modell nicht angewandt werden. Durch die großen Differenzen zwischen den in Kalibrierung und Validierung erreichbaren Korrelationskoeffizienten  $R^2$ , insbesondere bei den aus Teilprobenmengen erstellten Modellen, kann daraus geschlossen werden, dass hier die Beziehung zwischen Chromatogramm und Parameter für den vorliegenden Probensatz errechnet wurde, dem jedoch keine Allgemeingültigkeit zukommt. Beide Rechenmodelle stellten sich als unsicher heraus, die Zufälligkeit der Stichprobenauswahl hatte einen großen Einfluss auf die Rechenmodelle und es wurden keine Korrelationen festgestellt, es gab kaum Peaks, die einen nachweisbaren Einfluss auf diese Zielparameter ausübten. Die negative Korrelation der Proteinkonzentration und Hordeinfraktion mit den Parametern [WANG et al., 2007] konnte mit diesen Rechenmodellen nicht bestätigt werden. Ein noch deutlicheres Beispiel für das Fehlen von Zusammenhängen zwischen

Proteinkomponenten und Zielparmter stellt die Extrakt Differenz dar, auch hier konnte kein brauchbares Rechenmodell erstellt werden.

Eine Zuordnung der Einflüsse einzelner Osborne-Fractionen auf bestimmte Qualitätsparameter ist zwar möglich, aber einzig die Modelle der Extrakt ausbeute und der Diastatischen Kraft zeigen dies. Mittels der Unterschiede in den Chromatogrammen und mithilfe der berechneten b-Koeffizienten konnten Rückschlüsse auf qualitätsrelevante Peaks und Fractionen gezogen werden. Die Komplexität der Zusammenhänge wird klar, wenn die b-Koeffizienten von Extrakt ausbeute und Diastatische Kraft mit den Chromatogrammen aus den verschiedenen Stadien der Kleinmälzung in Verbindung gebracht werden. Neben den durch die b-Koeffizienten dargestellten positiven oder negativen Einflüssen dieser Peaks ist auch die Entwicklung der betreffenden Proteinfraction während des Mälzungs Vorganges zu beachten. Mithilfe der durchgeführten Kleinmälzung konnten die Veränderungen der Peaks während des Kleinmälzungsprozesses durch eine tägliche Probenentnahme dargestellt werden. Auffallend war vor allem Peak Nr. 60 aus der Hordein fraction, dieser war sehr hoch im Vergleich zu den anderen Peaks aller Fractionen (Abb. 92). Bei genauerer Betrachtung von Peak Nr. 60 übte dieser auf die Feinschrot extrakt ausbeute einen negativen Einfluss und auf die Diastatische Kraft einen positiven Einfluss aus.



**Abb. 92: Gesamtproteinkonzentrationsänderung aller Fractionen beim Mälzungsprozess**

Ein direkter Nachweis der Funktionalität der verschiedenen Peaks, etwa als stärkeabbauende Enzyme, war leider nicht möglich. Die Hauptmenge der  $\alpha$ -Amylase

bildet sich aber erst bei der Mälzung aus [KUNZE, 2007] und die meisten Enzyme befinden sich in der Albumin- und Globulinfraktion [DELCOUR und HOSENEY, 2010].

Die Unterscheidung von Sorten war zwar nicht das Ziel der vorliegenden Arbeit, es besteht aber generell die Möglichkeit der Sortenerkennung durch chromatographische Verfahren. Es zeigte sich jedoch, dass im Gegensatz zu Weizen, bei den Scores im Zuge der Hauptkomponentenanalyse keine Gruppenbildung auftrat und somit bei Gerste keine Sortenerkennung aus den Score-Diagrammen möglich war.

Das Gerstenkorn unterliegt den verschiedensten Einflüssen (z.B.: Sorten-, Umwelteinfluss und Einfluss der Mälzungstechnologie) und der Zusammenhang einzelner Proteinkomponenten mit den Qualitätsparametern ist von vielen Faktoren abhängig. Für die Qualität nehmen die Proteine im gesamten Prozess eine wichtige Rolle ein. Zusammenfassend kann der Schluss gezogen werden, dass aufgrund von Proteinspektren trotz der Vielfalt an Einflussfaktoren Einblicke in die Funktionalität des Proteoms in Bezug auf Extraktausbeute und Diastatische Kraft gewonnen werden können und die HPLC-Methode auch eine geeignete Art der Probenvorbereitung für die Untersuchung von Proteinfraktionen durch ELISA darstellt.

## 8 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Einflüsse der Proteine von Gerste auf die technologischen Eigenschaften zu bestimmen und Methoden zur Untersuchung der immunologischen Eigenschaften mittels ELISA vorzubereiten. Es wurden insgesamt 144 Proben aus der Ernte 2009, bestehend aus 32 Sorten- und Prüfstämmen aus 5 Standorten, in Doppelbestimmung untersucht. Zuerst wurden die Proteine nach dem Schema einer modifizierten Osborne Fraktionierung nach WIESER et al., 1998 aufgetrennt und anschließend jede der extrahierten Fraktionen durch Proteinspektren mittels RP-HPLC dargestellt. Die chromatographischen Peaks wurden in [mg Protein/g Korntrockenmasse] umgerechnet. Die berechneten Proteinkonzentrationen wurden in Beziehung gesetzt mit den nach EBC-Methoden festgestellten Qualitätsparametern: Extraktausbeute, Extrakt Differenz, Diastatische Kraft, Löslicher Stickstoff und Kolbachzahl. Außerdem wurden die Veränderungen der Konzentrationen der einzelnen Proteinfractionen während der durchgeführten Kleinmälzung durch die tägliche Probenentnahme von der Rohgerste bis zum fertigen Darrmalz sichtbar gemacht. Einige Peaks mit hohen b-Koeffizienten unterliegen starken Veränderungen während des Mälzungsprozesses.

Für die Extraktausbeute und die Diastatische Kraft konnten Modelle erstellt werden. Die Extraktausbeute wird durch die Albumin- und Globulinfraktion positiv und durch die Hordeinfraktion negativ beeinflusst. Die Diastatische Kraft steht allein mit der Albumin- und Globulinfraktion in direkter Korrelation. Mittels der b-Koeffizienten konnten darüber hinaus chromatographische Peaks mit positiven und negativen Effekten auf die jeweiligen Zielparameter erkannt werden. Bei Extrakt Differenz, löslichem Stickstoff und Kolbachzahl konnten keine brauchbaren Modelle erstellt werden.

Abschließend wurde ein ELISA mit R5-Antikörper zur Erkennung spezifischer Epitope in Proteinfractionen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Proteinmenge im HPLC-Eluat ausreichend für die Durchführung des Tests war und dass eine gute Differenzierung hinsichtlich des Gehaltes der Fraktionen an gesuchten Epitopen möglich ist.

## 9 Summary

The object of this work was to analyse the influences of barley proteins on technological properties and to arrange an ELISA-method to analyse immunological properties. Altogether 144 samples of the harvest 2009, divided into 32 species and test-strains from 5 different locations, have been analysed in repeat determination. At first the proteins were extracted according to the Osborne Fractionation procedure modified by WIESER et al., 1998. Then each of the extracting fractions were analysed by RP-HPLC and characterised by the spectrum of proteins. The chromatographic peaks were converted into [mg protein/g anhydrous mass of grain]. The calculated concentrations of proteins were correlated to the following quality parameters: malt extract, extract difference, diastatic power, soluble nitrogen and Kolbach index analysed according by EBC-methods. Furthermore, during the malting process of barley to kiln-dried malt, the change of concentrations of each of the protein-fractions was visualized by taking samples every day. Some of the chromatographic peaks with high b-coefficients showed intense variations during the malting process.

It was possible to accomplish models of malt extract and diastatic power. Malt extract is affected positively by the Albumin- and Globulin-fraction and affected negatively by the Hordein-fraction. Diastatic power is directly correlated to the Albumin- and Globulin-fraction. Chromatographic peaks with positive and negative effects on the parameters of quality were identified by the calculated b-coefficients. No statistic models could be created for extract difference, soluble nitrogen and Kolbach index.

Additionally an ELISA with R5-antibodies was performed to identify specific epitopes in protein-fractions. As a result, the amount of protein in the HPLC-Eluat was sufficient for performing the test. Moreover, fractions of the investigated epitopes could be clearly differentiated.

## 10 Literaturverzeichnis

- ANALYTICA-EBC: Analysekomitee der EBC; Vorsitzender ENARI, T. M: ANALYTICA-EBC. Schweizer Brauerei-Rundschau 3. Ausgabe, Zürich (1975) D 25-D 36.
- ANDERSON, R. P.; DEGANNO, P.; GODKIN, A. J.; JEWELL, D. P.; HILL, A. V: In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nature Medicine* 6 (2000) 337-342.
- ARENDS, A. M.; FOX, G. P.; HENRY, R. J.; MARSCHKE, R. J.; SYMONS, M. H: Genetic and environmental variation in the diastatic power of Australian barley. *Journal of Cereal Science* 21 (1995) 63-70.
- ARENZT-HANSEN, H.; KÖORNER, R.; MOLBERG, O.; QUARSTEN, H.; VADER, W.; KOOY, Y. M. C.; LUNDIN, K. E. A.; KONING, F.; ROEPSTORFF, P.; SOLLID, L. M.; McADAM, S. N: The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *Journal of the Experimental Medicine Exp Med* 191 (2000) 603-612.
- ARENZT-HANSEN, H.; McADAM, S. N.; MOLBERG, O.; FLECKENSTEIN, B.; LUNDIN, K. E. A.; JORGENSEN, T. J. D.; JUNG, G.; REOPSTORFF, P.; SOLLID, L. M: Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in prolin residues. *Gastroenterology* 123 (2002) 803-809.
- ASANO, K.; SHINAGAWA, K.; HASHIMOTO, N: Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 40 (1982) 147-154.
- BATHGATE, G. N: Quality requirement for malting. *Aspects of Applied Biology* 15 (1987) 18-32.
- BAXTER, E. D: Hordein in barley and malt. A review. *Journal of the Institute of Brewing* 87 (1981) 173-176.
- BECKER, H. G: Buchweizen, Dinkel, Gerste, Hafer, Hirse, Mais, Reis, Müsli. Mitteldeutsche Druckanstalt, Heidenau 1194 (1994) 1-30.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P: Getreide und Getreideprodukte; Alkoholische Getränke (Bier). In: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer-Verlag, Berlin 6. Auflage, Heidelberg (2008) 691-765, 921-934.

- BISHOP, L. R.; DAY, F. E: The effect of variety on the relation between nitrogen content and extract. *Journal of the Institute of Brewing* 39 (1993) 545-551.
- BURGER, W. C.; LaBERGE, D. E: Malting and brewing quality. In: Rasmusson, D.C. (Ed.). *Barley Agronomy Monograph No. 26 ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI* (1985) 387.
- CELUS, I.; BRIJS, K.; DELCOUR, J. A: The effects of malting and mashing on barley protein extractability. *Journal of Cereal Science* 44 (2006) 203-211.
- CODEX ALIMENTARIUS: Standard for Gluten-Free Foods. *Codex Stan 118 Vol. 4* (1981)  
Online unter: [http://www.codexalimentarius.net/web/more\\_info.jsp?id\\_sta=291](http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=291)  
(15.12.10)
- DELCOUR, J. A.; HOSENEY, R. C: Proteins of cereals; Malting and Brewing. In: *Principles of cereal science and technology*. AACC International, St. Paul 3. Auflage (2010) 53-69, 161-174.
- DUFFUS, C. M.; COCHRANE, M. P: Formation of the barley grain – Morphology, physiology and biochemistry. In: MacGregor, A. W., Bhatta, R. S. (eds.), *Barley: Chemistry and Technology*, AACC, St. Paul, Minnesota, USA (1993) 31-72.
- EBERMANN, R.; ELMADFA, I: Getreidearten. In: *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung*. Springer-Verlag, Wien (2008) 330-336.
- ENARI, T. M.; SOPANEN, T: Mobilisation of endospermal reserves during the germination of barley-centenary review. *Journal of the Institute of Brewing* 92 (1986) 25-31.
- EU VERORDNUNG: Zusammensetzung und Kennzeichnung von Lebensmitteln, die für Menschen mit einer Glutenunverträglichkeit geeignet sind. *Amtsblatt der Europäischen Union*. Verordnung (EG) Nr. 41/2009 der Kommission (2009) Online unter: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:016:0003:0005:DE:PDF> (18.05.11)
- EVANS, E.; van WEGEN, B.; MA, Y. F.; EGLINTON, J: The impact of the thermostability of  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, and limit dextrinase on potential wort fermentability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. *Am. Soc. Brew. Chem.* 61 (2003) 210-218.
- FOX, G. P.; PANOZZO, J. F.; LANCE, R. C. M.; INKERMAN, P. A.; HENRY, R. J: Molecular basis of barley quality. *Australian Journal of Agricultural Research* 54 (2003) 1081-1101.
- GASTL, M: Qualitätsprodukt Braugerste – Fortschritt in der Braugerstenzüchtung. *Brauwelt* Nr. 5-6 (2010) 125-129.

- GEORG-KRAEMER, J. E.; MUNDSTOCK, E. C.; CAVALLI-MOLINA, L: Developmental expression of amylase during barley malting. *Journal of Cereal Science* 33 (2001) 172-177.
- GORJANOVIC, S: Barley Grain Non-specific Lipid-Transfer Proteins (ns-LTPs) in Beer Production and Quality. *Journal of the Institute of Brewing* 113 (2007) 310-324.
- HAMM, M.; HOSBACH, E: Zöliakie und Gerste. In: *Vital mit Korn und Kernen: die Kraft der bioaktiven Schutz- und Nährstoffe in Getreide und Ölsaaten*. Mosaik-Verlag, München (1998) 14-41.
- HEYLAND, K. U.; HANUS, H.; KELLER, E. R: Gerste. In: *Handbuch des Pflanzenbaues 2: Getreidearten und Futtergräser*. Ulmer-Verlag, Stuttgart (2008) 382-402.
- HORSLEY, R. D.; SCHWARZ, P. B.; HAMMOND, J. J: Genetic diversity in malt quality of north american six-rowed spring barley. *Crop Science* 35(1) (1995) 113-118.
- HOWARD, K. A.; GAYLER, K. R.; EAGLES, H. A.; HALLORAN, G. M: The relationship between D hordein and malting quality in barley. *Journal of Cereal Science* 24(1996) 47-53.
- JANES, P. W.; SKERRITT, J. H: High performance liquid chromatography of barley proteins: relative quantities of hordein fractions correlate with malt extract. *Journal of The Institute of Brewing* Vol. 99 (1993) 77-84.
- JONES, B. L: Endoproteases of barley and malt. *Journal of Cereal Science* 42 (2005) 139-156.
- KACZMAREK, Z.; ADAMSKI, T.; SURMA, M.; JEZOWSKI, S.; LESNIEWSKA-FRATCZAK, M: Genotype-environment interaction of barley doubled haploids with regard to malting quality. *Plant Breeding* 118 (1999) 243-247.
- KESSLER, W: *Multivariate Datenanalyse: für die Pharma-, Bio- und Prozessanalytik*. WILEY-VCH Verlag, Weinheim (2007) 1-290.
- KIRSCHENBAUM, D. M: Molar absorptivity and A1 %/1 cm values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions. *Analytical Biochemistry* 68 (1975) 465 – 484.
- KUNZE, W: Gerste; Herstellen des Malzes; Herstellen des Bieres. In: *Technologie Brauer & Mälzer*. VLB Berlin, Berlin 9. Auflage (2007) 39-61, 117-221, 433-632.
- LI, Y.; SCHWARZ, P. B.; BARR, J. M.; HORSLEY, R. D: Factors predicting malt extract within a single barley cultivar. *Journal of Cereal Science* 48 (2008) 531-538.

- MacGREGOR, A. W.; BHATTY, R. S: Barley Seed Proteins; Malting Technology and the uses of malt. In: Barley, : Chemistry and Technology. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA (1993) 131-198, 297-354.
- MARCHYLO, B. A.; KRUGER, J. E.; HATCHER, D: High-performance liquid chromatography and electrophoretic analysis of hordein during malting for two barley varieties of contrasting malting quality. *Cereal Chemistry* 63 (1986) 219-231.
- MITEA, C.; KOOY-WINKELAAR, Y.; VEELLEN, P.; RU, A.; DRIJFHOUT, J. W.; KONING, F.; DEKKING, L: Fine specificity of monoclonal antibodies against celiac disease-inducing peptides in the gluteome. *American Journal of Clinical Nutrition* (2008) 88:1057-66.
- MOLBERG, O.; SOLHEIM, F. N.; JENSEN, T.; LUNDIN, K. E. A.; ARENTZ-HANSEN, H.; ANDERSON, O. D.; UHLEN, A. K.; SOLLID, L. M: Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology* 125 (2003) 337-344.
- MOLINA-CANO, J. L.; RAMO, T.; ELLIS, R. P.; SWANSTON, J. S.; BAIN, H.; URIBE-ECHEVERRIA, T.; PÉREZ-VENDRELL, A. M: Effect of grain composition on water uptake by malting barley hordein fractions on malt extract yield. *Journal of the Institute of Brewing* (1995) 79-83.
- MOLINA-CANO<sup>1</sup>, J. L.; RUBIO, A.; IGARTUA, E.; GRACIA, P.; MONTOYA, J. L: Mechanisms of malt extract development in barleys from different european regions: I. Effect of environment and grain protein content on malt extract yield. *Journal of The Institute of Brewing* Volume 106, No. 2 (2000) 111-116.
- MOLINA-CANO<sup>2</sup>, J. L.; POLO, J. P.; SOPENA, A.; VOLTAS, J.; PÉREZ-VENDRELL, A. M.; ROMAGOSA, I: Mechanisms of malt extract development in barleys from different european regions: II. Effect of barley hordein fractions on malt extract yield. *Journal of The Institute of Brewing* Volume 106, No. 2 (2000) 117-124.
- NARZISS, L: Abriss der Bierbrauerei. WILEY-VCH, Weinheim 7. Auflage (1999) 86.
- ÖGE Österreichische Gesellschaft für Ernährung: Zöliakie bzw. Weizenunverträglichkeit 23.10.2007. Online unter: <http://www.oege.at/> Suchbegriff: Zöliakie (16.12.2010).
- Österreichische beschreibende Sortenliste 2009 Landwirtschaftliche Pflanzenarten. Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH Schriftenreihe 21/2009, Wien (2009) 70-81.
- PERROCHEAU, L.; ROGNIAUX, H.; BOIVIN, P.; MARION, D: Probing heat-stable water-soluble proteins from barley to malt and beer. *Proteomics* 5 (2005) 2849-2858.

- POMERANZ, Y: Modern cereal Technology. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1987) 423 – 427.
- QI, J. C.; CHEN, J. X.; WANG, J. M.; WU, F. B.; CAO, L. P.; ZHANG, G. P: Protein and hordein fraction content in barley seeds as affected by sowing date and their relations to malting quality. *Journal of Zhejiang University Science* 6B(11) (2005) 1069-1075.
- ROBINSON, L. H.; HEALY, P.; STEWART, D. C.; EGLINTON, J. K.; FORD, C. M.; EVANS, D. E: The identification of a barley haze active protein that influences beer haze stability: The genetic basis of a barley malt haze active protein. *Journal of Cereal Science* 45 (2007) 335-342.
- ROUMELIOTIS, S.; COLLINS, H. M.; LOGUE, S. J.; WILLSMORE, K. L.; JEFFERIES, S. P.; BARR, A. R: Implications of thin husk in barley. In: *Proceeding of the Ninth Australian Barley Technical Symposium* (1999).
- SHAN, L.; MOLBERG, O.; PARROT, I.; HAUSCH, F.; FILIZ, F.; GRAY, G. M.; SOLLID, L. M.; KHOSLA, C: Structural basis for gluten intolerance in celiac spure. *Scinencce* 297 (2002) 2275-2279.
- SHEWRY, P. R: Plant storage proteins. *Biol Rev Camb Philos Soc* 70 (1995) 375-426.
- SHEWRY, P.R: Barley seed proteins. In: MacGregor, A. W., Bhatta R. S. (Eds.), *Barley: Chemistry and Technology*. American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, USA (1993) 131-197.
- SHEWRY, P. R.; MILES, M. J.; TATHAM, A. S: The prolamin storage proteins of wheat and related cereals. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 61 (1994) 37-59.
- SHEWRY, P. R.; TATHAM, A. S: The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. *The Biochemical Journal* 267 (1990) 1-2.
- SKERRITT, J. H.; HILL, A. S: Monoclonal Antibody Sandwich Enzyme Immunoassays for Determination of Gluten in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38 (1990) 1771 – 1778.
- SKERRITT, J. H.; JANES, P. W: Disulphide-bonded gel protein aggregates in barley: quality-related differences in composition and reductive dissociation. *Journal of Cereal Science* 16 (1992) 219-235.
- SMITH, D. B: Seed protein and its effects on malting and brewing quality. *Plant Varieties Seeds* 3 (1990) 63-80.

- SORENSEN, S. B.; BECH, L. M.; MULDBJERG, M.; BEENFELDT, T.; BREDDAM, K: Barley lipid transfer protein 1 is involved in beer foam formation. *Technical Quarterly* 30 (1993) 136-145.
- TATHAM, A. S.; SHEWRY, P. R: The S-poor prolamins of wheat, barley and rye. *Journal of Cereal Science* 22 (1995) 1-16.
- VADER, L. W.; STEPNIAK, D. T.; BUNNIK, E. M.; KOOY, Y. M. C.; DeHAAN, W.; DRIJFHOUT, J. W.; Van VEELLEN, P. A.; KONING, F: Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology* 125 (2003) 1105-1113.
- VALDES, I.; GARCIA, E.; LIORANTE, M.; MENDEZ, E: Innovative approach to low level gluten determination in foods using a novel sandwich enzym-linked immunosorbent assay protocol. *European Journal of Gastroenterol. Hepatol* 15 (2003) 465-474.
- Van de WAL, Y.; KOOY, Y. M.; van VEELLEN, P. A.; PENA, S. A.; MEARIN, L. M.; MOLBERG, O.; LUNDIN, K. E. A.; SOLLID, L. M.; MUTIS, T.; BENCKHUIJSEN, W. E.; DRIJFHOUT, J. W.; KONING, F: Small intestinal T cells of celiac disease patients recognize a natural pepsin agreement of gliadin. *Proceedings of the National Academy of Sciences Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 10050-10054.
- Van de WAL, Y.; KOOY, Y. M.; Van VEELLEN, P.; VADER, W.; AUGUST, S. A.; DRIJFHOUT, J. W.; PENA, S. A.; KONING, F: Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *European Journal of Immunology* 29 (1999) 3133-3139.
- 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.; MOTHESS, T.; NOVALIN, S.; OSMAN, A.; RUMBO, M.; STERN, M.; THORELL, L.; WHIM, A.; WIESER, H: Towards a new gliadin reference material-isolation and characterisation. *Journal of Cereal Science* 43 (2006) 331 – 341.
- WALLACE, W.; LANCE, R. C. M: The protein reserves of the barley grain and their degradation during malting and brewing. *Journal of the Institute of Brewing* 96 (1988) 379-386.
- WANG, J. M.; CHEN, J. X.; DAI, F.; WU, F. B.; YANG, J. M.; ZHANG, G. P: Protein fractions in barley grains as affected by some agronomic factors and their relationships to malt quality. *Cereal Research Communications* 35 (2007) 129-140.

- WIESER, H.; ANTES, S.; SEILMEIER, W: Quantitative Determination of Gluten Protein Types in Wheat Flour by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Chemistry* (1998) 644-650.
- WIESER, H.; KOEHLER, P: The biochemical basis of celiac disease. *Cereal Chemistry* 85(1) (2008) 1-13.
- WRIGLEY, C: Barley/Malting. In: *Encyclopedia of grain science*. Elsevier Academic Press, Amsterdam Band 1 [A-F] (2004) 68-76.
- YALCIN, E.; CELIK, S.; IBANOGLU, E: Foaming properties of barley protein isolates and hydrolysates. *European Food Research and Technology* (2008) 226:967-974.
- YIN, C.; ZHANG, G. P.; WANG, J. M.; CHEN, J. X: Variation of beta-amylase activity in barley as affected by cultivar and environment and its relation to protein content and grain weight. *Journal of Cereal Science* 36 (2002) 307-312.
- ZHANG, G.; CHEN, J.; WANG, J.; DING, S: Cultivar and Environmental Effects on (1→3,1→4)-β-D-Glucan and Protein Content in Malting Barley. *Journal of Cereal Science* 34 (2001) 295-301.

**Stephanie Kirchmayr**  
 Dempschergasse 20/18, 1180 Wien  
 ☎: (0650) 560 95 46  
 E-mail: kirchmayr\_stephanie@hotmail.com

## LEBENS LAUF

### Persönliche Angaben

Geburtstag	11. Dezember 1985
Geburtsort	Linz
Staatsbürgerschaft	Österreich

### Ausbildung

seit Sept. 2005	Studium Ernährungswissenschaften an der Universität Wien Schwerpunkt: Lebensmittelproduktion und –technologie
2000-2005	Höhere Lehranstalt für Umwelt und Wirtschaft in Yspertal, Niederösterreich (Matura)

### Berufserfahrungen und Praktika

01-06/2010	Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH, Institut Sortenwesen, Wien (wissenschaftliche Mitarbeiterin, Diplomandin)
06-07, 11-12/2009	Ankerbrot AG, Wien (Mitarbeiterin im Qualitätsmanagement)
07-09/2008	Ankerbrot AG, Wien (Mitarbeiterin im Qualitätsmanagement)
07/2007	Kinderfreunde Lenzing, Bad Hall (Ferienlagerbetreuerin)
02/2007	Arbeitsgemeinschaft klinische Ernährung (AKE), Wien (Mitarbeiterin „nutritionDay in Europe“)
08-09/2006	Landesabfallverwertungsunternehmen, Wels (Angestellte)
07/2004	Oberbank, Wels (Angestellte)
08-09/2003	Welser Abfallverwertung, Wels (Mitarbeiterin im Labor)
06/2003	Life Radio, Linz (Mitarbeiterin der Redaktion)

### Zusatzausbildungen

Interner Auditor (2007)  
 Qualitätsmanagerin für kleine und mittlere Betriebe (2005)  
 Sicherheitsvertrauensperson (2005)  
 Abfallbeauftragte (2003)  
 ehem. Gefahrgutbeauftragte (2004)

### Kompetenzen

Fremdsprache	Englisch	fließend in Wort und Schrift
	Französisch	Maturaniveau
EDV	sehr gute Computerkenntnisse: MS Office, Internet Explorer, Bildbearbeitung, Statistik (Multivariate Datenanalyse, SPSS) Nährwertberechnung: (nutritional.software, DGE-Programm)	
Methodik	High-performance liquid chromatography (HPLC), Photometer, Gaschromatographie (GC), Massenspektrometer (MS), ELISA	
Führerschein	ABCE	