

Einfluss verschiedener Zusätze auf die Funktionalität, Proteinzusammensetzung und Sekundärstruktur von Gluten

Zur Erlangung des akademischen Grades einer

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

M.Sc. Nina Sophia Höller

1. Referentin: Prof. Dr. Katharina Scherf

2. Referent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2024

Publikationsliste

Diese Arbeit wurde im Rahmen des FEI Projekts 21289 N der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) durchgeführt und durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Klimaschutz (BMWK) aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert. Im Zuge der Projektarbeit wurden Teile dieser Arbeit in jährlichen Projekttreffen und -berichten präsentiert.

Publikationen in Fachzeitschriften

Höller, N., Scherf, KA. Influence of Salts on the Protein Composition and Functionality of Gluten. Journal of Cereal Science 2024, 118, 103978, DOI: 10.1016/j.jcs.2024.103978.

Publikationen in Vorbereitung

Höller, N., Alpers, T., Becker, T., Scherf, KA. Synergistic Effect of Milieu and Process Parameters on Gluten Protein Composition and Functionality. (Voraussichtlich 2025).

Weitere Publikationen

Höller, N., Scherf KA. Einfluss verschiedener Prozessparameter und Zusätze auf die Funktionalität von Gluten. Lebensmittelchemie 2022, 76(S1): S1-142, DOI: 10.1002/lemi.202258009.

Höller, N., Scherf KA. Brot: Vielfalt, Inhaltsstoffe, Herstellung und aktuelle Trends. Ernährungs Umschau 2023, 12, M744-M754.

Vorträge auf Fachtagungen

Höller N., Scherf KA. Einfluss verschiedener Prozessparameter und Zusätze auf die Funktionalität von Gluten. Arbeitstagung des Regionalverbandes Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Online, 29.-30.03.2022.

Höller N., Scherf KA. Process-Structure Correlation of the Wheat Protein Vital Gluten. 19th European Young Cereal Scientists and Technologists Workshop (EYCSTW), Valencia, Spanien, 05.-08.06.2022.

Höller N., Scherf KA. Anpassung der Funktionalität von Weizenkleber durch unterschiedliche Zusätze. Verband der Getreide-, Mühlen- und Stärkewirtschaft e. V. (VGMS), 14./15.11.2022.

Alpers, T., Höller, N., Scherf, KA, Becker, T. Prozess-Struktur-Beziehungen bei Vitalkleber. Frühjahrstagung Weihenstephaner Institut für Getreideforschung (WIG), 05./06.03.2024.

Höller N., Scherf KA. Influence of Different Process Parameters and Additives on the Structure and Functionality of Gluten. 17th ICC International Cereal and Bread Congress, Nantes, Frankreich, 22.-25.04.2024.

Posterpräsentationen auf Fachtagungen

Höller N., Scherf KA. Influence of Different Salts on the Structure and Functionality of Gluten.
Cereals & Grains Annual Meeting, Schaumburg, USA, 18.-20.10.2023.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	XI
Summary	XVI
Zusammenfassung	XVII
1. Einleitung	1
1.1. Vitalkleber	1
1.1.1. Definition	1
1.1.2. Herstellungsprozess	3
1.1.3. Verwendung	4
1.2. Glutenproteine	5
1.2.1. Zusammensetzung	5
1.2.2. Bindungstypen	8
1.2.3. Sekundärstrukturelemente	11
1.2.4. "Train and Loop"-Modell	12
1.3. Zusätze	13
1.3.1. Salze	13
1.3.2. Polysorbat 20	14
1.3.3. Ascorbinsäure	15
1.3.4. Enzyme	17
1.4. Rheologische Methoden zur Bestimmung funktioneller Eigenschaften	18
1.4.1. Mikrozugversuch	18
1.4.2. Oszillationsrheologie	18
1.5. Chemisch-analytische Methoden zur Bestimmung der Glutenproteinzusammensetzung und Sekundärstruktur	19
1.5.1. Osborne-Fraktionierung und Analyse per Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	19
1.5.2. Fraktionierung der Natriumdodecylsulfat-löslichen Proteine und des Glutenninmakropolymer per Größenausschlusschromatographie	20
1.5.3. Bestimmung der freien und gebundenen Thiole per Ellman-Assay	20
1.5.4. Massenspektrometrie	21
1.5.5. Raman-Spektroskopie	22
2. Zielsetzung	24
3. Ergebnisse und Diskussion	25
3.1. Etablierung eines Workflows für die Herstellung von Feucht- und Vitalkleberproben	25
3.2. Einfluss der Prozessparameter auf die Glutenproteinzusammensetzung	27
3.2.1. Einfluss der Trocknungstemperatur	27
3.2.2. Einfluss der Vermahlungsbedingungen	28
3.3. Einfluss von Zusätzen auf die Glutenproteinfunktionalität	31
3.3.1. Einfluss von Zusätzen auf die uniaxiale Dehnung von Gluten	31
3.3.1.1. Salze	31

3.3.1.2. Polysorbat 20	34
3.3.1.3. Ascorbinsäure	36
3.3.1.4. Enzyme	37
3.3.2. Effekt von Zusätzen auf die dynamisch-rheologischen Eigenschaften von Gluten	38
3.3.2.1. Salze	38
3.3.2.2. Polysorbat 20	43
3.3.2.3. Ascorbinsäure	45
3.3.2.4. Enzyme	47
3.4. Einfluss von Zusätzen auf die Glutenproteinzusammensetzung	49
3.4.1. Rohproteingehalt	49
3.4.1.1. Salze	49
3.4.1.2. Polysorbat 20	50
3.4.1.3. Ascorbinsäure	51
3.4.2. Gehalt an Gliadinen und Gluteninen	51
3.4.2.1. Salze	51
3.4.2.2. Polysorbat 20	55
3.4.2.3. Ascorbinsäure	57
3.4.3. Gehalt an Natriumdodecylsulfat-löslichen Proteinen und Glutenin- makropolymer	58
3.4.3.1. Salze	58
3.4.3.2. Polysorbat 20	62
3.4.3.3. Ascorbinsäure	63
3.4.4. Gehalt an freien und gebundenen Thiolen	64
3.4.4.1. Salze	64
3.4.4.2. Polysorbat 20	67
3.4.4.3. Ascorbinsäure	68
3.4.5. Massenspektrometrische Bestimmung von Glutenproteintypen	69
3.5. Einfluss von Zusätzen auf die Sekundärstruktur von Gluten	74
3.5.1. Salze	74
3.5.2. Polysorbat 20	79
3.5.3. Ascorbinsäure	81
3.6. Synergistischer Effekt aus Milieu- und Prozessbedingungen	83
3.7. Einfluss von Zusätzen auf die Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität verschiedener Mehlqualitäten und -sorten	92
3.8. Herausforderungen und Perspektiven bei der funktionellen und chemisch- analytischen Charakterisierung von Gluten	98
4. Fazit und Ausblick	101
5. Material und Methoden	105
5.1. Chemikalien und Materialien	105
5.2. Workflow für die Herstellung von Feucht- und Vitalkleberproben	108

5.3. Rheologische Methoden zur Bestimmung funktioneller Eigenschaften	109
5.3.1. Mikrozugversuch	109
5.3.2. Oszillationsrheologie	109
5.4. Chemisch-analytische Methoden zur Bestimmung der Glutenproteinzusammensetzung und Sekundärstruktur	111
5.4.1. Rohproteinbestimmung	111
5.4.2. Osborne-Fraktionierung und Analyse per Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	111
5.4.3. Fraktionierung der Natriumdodecylsulfat-löslichen Proteine und des Gluteninmakropolymer per Größenausschlusschromatographie	112
5.4.4. Bestimmung der freien und gebundenen Thiole per Ellman-Assay	113
5.4.5. Massenspektrometrie	115
5.4.5.1. Probenaufarbeitung	115
5.4.5.2. LC-MS/MS-Analyse	115
5.4.5.3. Auswertung der massenspektrometrischen Analysen	117
5.4.6. Raman-Spektroskopie	117
5.5. Statistik	119
6. Literaturverzeichnis	120
A. Anhang	133
A.1. Einfluss der Prozessparameter auf die Glutenproteinzusammensetzung	134
A.2. Einfluss von Zusätzen auf die Glutenproteinfunktionalität	136
A.2.1. Mikrozugversuch	136
A.2.2. Oszillationsrheologie	137
A.3. Einfluss von Zusätzen auf die Glutenproteinzusammensetzung	139
A.3.1. Rohproteingehalt	139
A.3.2. Gehalt an Gliadinen und Gluteninen	140
A.3.3. Gehalt an Natriumdodecylsulfat-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer	142
A.3.4. Gehalt an freien und gebundenen Thiolen	144
A.3.5. Prozentuale Abweichungen von Messparametern	146
A.3.6. Massenspektrometrische Bestimmung von Glutenproteintypen	150
A.4. Einfluss von Zusätzen auf die Sekundärstruktur von Gluten	154
A.5. Synergistischer Effekt aus Milieu- und Prozessbedingungen	161
A.6. Einfluss von Zusätzen auf die Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität verschiedener Mehlqualitäten und -sorten	166
A.7. Glutenproteinzusammensetzung der verwendeten Mehle	175
A.8. Glutenproteinzusammensetzung industrieller Vitalkleber	176

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse <i>Engl.: Analysis of Variance</i>
AS	Ascorbinsäure
AO	Ascorbat-Oxidase
CAA	2-Chloracetamid
CLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie <i>Engl.: Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
CSH	Cystein
CSSC	Cystin
CV	Variationskoeffizient <i>Engl.: Coefficient of Variation</i>
DAD	Diodenarray-Detektor
DATEM	Diacetylweinsäureester von Mono- und Diglyceriden <i>Engl.: Diacetyl Tartaric Acid Esters of Mono- and Diglycerides</i>
DDA	datenabhängige Aufzeichnung <i>Engl.: Data Dependent Acquisition</i>
DHA	Dehydroalanin
DH-AS	Dehydroascorbinsäure
DIA	datenunabhängige Aufzeichnung <i>Engl.: Data Independent Acquisition</i>
DTNB	5,5´-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (Ellman Reagenz)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E_{max}	Maximale Dehnbarkeit im Mikrozugversuch vor Strangriss
ESI	Elektrospray-Ionisation
F	Einbuchstabencode Phenylalanin
FDR	Anzahl der falsch-positiv identifizierten Übereinstimmungen zwischen Peptiden und Proteinen in der Proteomanalyse <i>Engl.: False Discovery Rate</i>
G´	Speichermodul

G“	Verlustmodul
ggg	<i>gauche-gauche-gauche</i> -Konformation der Disulfidbindung
Glia	Gliadine
Glut	Glutenine
GMP	Gluteninmakropolymer
GSH	Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin), reduziert
GSH-DH	Glutathion-Dehydrogenase
GSSG	Glutathion, oxidiert
GT	Gefriertrocknung
HCD	Gas gefüllte Stoßzelle <i>Engl.: Higher-energy Collisional Dissociation</i>
HMW-GMP	<i>High-Molecular-Weight</i> Gluteninmakropolymer <i>Engl.: High-Molecular-Weight Glutenin Macropolymer</i>
HMW-GS	<i>High-Molecular-Weight</i> Glutenin-Untereinheit <i>Engl.: High-Molecular-Weight Glutenin Subunit</i>
HLB	Maß für die relative Wirksamkeit der hydrophilen bzw. lipophilen Gruppe in Emulgatoren <i>Engl.: Hydrophilic-lipophilic Balance</i>
LAN	Lanthionin (S-[(2R)-2-Amino-2-carboxyethyl]-L-cystein)
LAL	Lysinoalanin ((2S)-6-Amino-2-{2-[(1S)-1-carboxyethyl]hydrazino}hexansäure)
LFQ	markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung <i>Engl.: Label-free Quantification</i>
LMW-GMP	<i>Low-Molecular-Weight</i> Gluteninmakropolymer <i>Engl.: Low-Molecular-Weight Glutenin Macropolymer</i>
LMW-GS	<i>Low-Molecular-Weight</i> Glutenin-Untereinheit <i>Engl.: Low-Molecular-Weight Glutenin Subunit</i>
LVE	Linear-viskoelastischer Bereich
MMW	<i>Medium-Molecular-Weight</i>
m/z	Verhältnis aus Masse zu Ladung
N	Stickstoff

P	Einbuchstabencode Prolin
PC	Hauptkomponente <i>Engl.: Principal Component</i>
PCA	Hauptkomponentenanalyse <i>Engl.: Principal Component Analysis</i>
PWG	<i>Prolamin Working Group</i>
PS 20	Polysorbat 20
PSSC	Mischdisulfid aus Protein und Cystein
PSSG	Mischdisulfid aus Protein und Glutathion
Q	Einbuchstabencode Glutamin
R_{max}	Maximaler Dehnwiderstand im Mikrozugversuch vor Strangriss
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie <i>Engl.: Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat <i>Engl.: Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese <i>Engl.: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SDSL	in Natriumdodecylsulfat (SDS)-lösliche Proteine
SEC	Größenausschlusschromatographie <i>Engl.: Size-Exclusion Chromatography</i>
SH	freie Thiole
SPE	Festphasenextraktion <i>Engl.: Solid-phase Extraction</i>
SRC	Wasserbindungskapazität <i>Engl.: Solvent Retention Capacity</i>
SS	gebundene Thiole
SSL	Natriumstearoyl-2-lactylat <i>Engl.: Sodium Stearoyl-2-Lactylate</i>
Tan δ	Verlustfaktor (G''/G')
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid
TFA	Trifluoressigsäure

TG	Transglutaminase
<i>tgg</i>	<i>trans-gauche-gauche</i> -Konformation der Disulfidbindung
<i>tgt</i>	<i>trans-gauche-trans</i> -Konformation der Disulfidbindung
TNB⁻	2-Nitro-5-thiobenzoat
UHPLC	Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie <i>Engl.: Ultra High-Performance Liquid Chromatography</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV/VIS	ultraviolette/sichtbares Licht <i>Engl: Ultraviolet/Visible Light</i>
VK	Vitalkleberprobe
WP	Wendepunkt
WU-AX	wasserunlösliche Arabinoxylane

Summary

Vital gluten is primarily used in the bakery industry to enhance the baking quality of flours with low protein content. Its low cost also makes it a popular protein source in other industries, offering an alternative to more expensive animal or plant-based proteins.

Due to natural environmental fluctuations in the raw material wheat and the resulting manufacturer-related adjustments of the process parameters of starch extraction, a large number of different qualities of the by-product vital gluten with varying gluten protein composition and functionality are commercially available. This circumstance limits the use of vital gluten for product optimization of baked goods and end products in other application areas.

Since starch extraction is a self-contained, well established process, a downstream after-treatment step of isolated gluten to modify the vital gluten properties would be practicable. Therefore, the salts NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, the emulsifier polysorbate 20, ascorbic acid and the enzymes transglutaminase, lipase, xylanase and cellulase were added to a pre-isolated, fully developed, native gluten network in different concentrations and the samples were dried at 40 °C and 80 °C and then milled under standardized conditions.

The gluten samples produced on a laboratory scale were comprehensively analysed chemically for their gluten protein composition. These analyses were supplemented by rheological measurements to determine functional properties.

The characterisation of the wet and vital gluten samples showed that all additives except the enzymes influenced the gluten properties to varying degrees. All additives led to a change in the gluten protein composition and functionality, while the salts also influenced the proportions of secondary structure elements and the conformation of disulphide bonds. The observed changes indicated alterations in covalent and non-covalent bonds induced by the additives. The effect of the salts could not be attributed to the order of the ions in the Hofmeister series, but the behavior of monovalent and divalent salts was similar.

The addition of salts to gluten in an after-treatment step revealed possibilities for compensating temperature effects on gluten protein composition and functionality. In addition, the quality of the flour had a significant influence on the effect of the additives, but the reasons for the different properties of the resulting gluten samples were probably due to factors other than the protein content alone.

The study thus demonstrated the potential for post-translational modifications of gluten protein composition and functionality by various additives. This knowledge unlocks and broadens both new and existing applications for the use of vital gluten in the food and non-food industry.

Zusammenfassung

Vitalkleber wird hauptsächlich in der Backwarenindustrie zur Verbesserung der Backqualität von Mehlen mit geringem Proteingehalt eingesetzt. In anderen Industriezweigen stellt Vitalkleber auf Grund des geringen Preises ebenfalls eine gefragte Proteinquelle gegenüber teureren tierischen oder pflanzlichen Proteinen dar.

In Folge natürlicher Umweltschwankungen des Rohstoffs Weizen und der dadurch herstellerbedingten Anpassung der Prozessparameter der Stärkeextraktion, sind eine Vielzahl unterschiedlicher Qualitäten des Nebenprodukts Vitalkleber mit veränderlicher Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität kommerziell erhältlich. Dieser Umstand schränkt die Nutzung von Vitalkleber für die Produktoptimierung von Backwaren und Endprodukten in anderen Anwendungsbereichen ein.

Da die Stärkegewinnung einen in sich geschlossenen, etablierten Prozess darstellt, wäre ein der Glutenisolation nachgeschalteter Schritt zur Modifikation der Vitalklebereigenschaften praktikabel. Daher wurden die Salze NaCl, KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, der Emulgator Polysorbat 20, Ascorbinsäure und die Enzyme Transglutaminase, Lipase, Xylanase und Cellulase in verschiedenen Konzentrationen in ein isoliertes, vollständig ausgebildetes, natives Glutennetzwerk eingearbeitet und die Proben anschließend bei 40 °C und 80 °C getrocknet und unter standardisierten Bedingungen vermahlen.

Die im Labormaßstab hergestellten Glutenproben wurden umfassend chemisch-analytisch auf ihre Glutenproteinzusammensetzung und Sekundärstruktur untersucht. Ergänzt wurden diese Analysen durch rheologische Messungen zur Bestimmung funktioneller Eigenschaften.

Die Charakterisierung der Feucht- und Vitalkleberproben zeigte, dass alle Zusätze bis auf Enzyme in der Lage waren, die Gluteneigenschaften in unterschiedlichem Ausmaß zu beeinflussen. Alle Zusätze führten zu einer Änderung der Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität. Die Salze beeinflussten zudem die Anteile der Sekundärstrukturelemente sowie die Konformation der Disulfidbindungen. Die beobachteten Veränderungen ließen auf durch die Zusätze induzierte Änderungen kovalenter und nicht-kovalenter Bindungen schließen. Der Effekt der Salze konnte dabei nicht auf die Anordnung der Ionen in der Hofmeisterreihe zurückgeführt werden. Es zeigte sich jedoch ein ähnliches Verhalten monovalenter und divalenter Salze.

Der Zusatz von Salzen in einer der Glutenisolation nachgeschalteten Behandlung zeigte Möglichkeiten zum Ausgleich von Temperatureffekten auf die Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität auf. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Mehlsqualität die Wirkungsweise der Zusätze maßgeblich mitbestimmt, die Gründe für unterschiedliche Eigenschaften der resultierenden Glutenproben aber vermutlich in anderen Faktoren als allein im Proteingehalt begründet sind.

Die Studie zeigte somit das Potential zur posttranslationalen Änderung der Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität durch verschiedene Zusätze auf. Dieses Wissen eröffnet und erweitert neue und bestehende Anwendungsmöglichkeiten für den Einsatz von Vitalkleber in der Lebensmittel- und Non-Food-Industrie.

1. Einleitung

1.1. Vitalkleber

1.1.1. Definition

Vitalkleber findet bereits seit Mitte des 20. Jahrhunderts in der Backwarenindustrie Anwendung. Seit dem enormen Marktwachstum vegetarischer und veganer Fleischersatzprodukte gewinnt Vitalkleber in der modernen Lebensmittelindustrie zunehmend an Bedeutung. In den Jahren 2022–2023 nahm die Produktion von Fleischersatzprodukten um fast 17 % zu, seit 2019 stieg die Produktion um 114 % bis ins Jahr 2023 (Statistisches Bundesamt, 2024). Der Anteil der Vegetarier in Deutschland steigt, gerade unter jüngeren Personen, und mindestens 53 % aller Konsumenten kauften im Jahr 2023 mindestens ein Mal Fleischersatzprodukte. Dabei sind Produkte auf Basis von Getreide 87 % der Konsumenten bekannt (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2023). Den meisten Endverbrauchern dürfte die Bezeichnung „Vitalkleber“ jedoch nicht geläufig sein, denn im Zutatenverzeichnis diverser Lebensmittel wird Vitalkleber häufig unter dem Namen „Weizenprotein“ oder „Weizengluten“ geführt. Alle Begriffe benennen dabei sehr ähnliche Produkte.

Nach Codex Alimentarius Standard 163-1987 wird Vitalkleber zum Einsatz in der Lebensmittelindustrie als Lebensmittel definiert, das durch Trennung von Nicht-Protein Bestandteilen wie Stärke oder anderen Kohlenhydraten aus Weizen oder Weizenmehl gewonnen wird und bei Rehydratisierung eine hohe Viskoelastizität aufweist (Codex Alimentarius, 2001; Joye et al., 2009). Direkt nach dem Auswaschen, im noch feuchten Zustand, wird Gluten als Feuchtkleber bezeichnet. Das schonend getrocknete, pulverisierte Produkt wird als Vitalkleber definiert. Der Begriff Gluten schließt sowohl die Bezeichnung Feucht- als auch Vitalkleber ein, da sich diese beiden Produkte lediglich im Wassergehalt, nicht aber in der Zusammensetzung unterscheiden (siehe Abbildung 1). Vitalkleber muss nach Codex Alimentarius-Definition einen Proteingehalt von mindestens 80 % ($N \times 6,25$), einen Feuchtigkeitsgehalt von unter 10 %, einen Aschegehalt von weniger als 2 % sowie einen geringeren Ballaststoffgehalt als 1,5 % aufweisen. Ursprünglich bezeichnete Gluten nur die aus Weizen gewonnene Proteinfraktion. Der Begriff wurde allerdings, auch von offizieller Seite durch die Codex Alimentarius Kommission, auf Roggen, Gerste, Hafer sowie deren Kreuzungen, ausgedehnt und wird ebenso für Zein, die Proteinfraktion aus Mais, verwendet (Maisgluten) (Codex Alimentarius, 2001; Wieser et al., 2020).

Auf technologischer Ebene kann Gluten als „gummiartige Masse, die zurückbleibt, wenn Weizen teig gewaschen wird, um Stärkekörner und wasserlösliche Bestandteile zu entfernen“ (Wieser, 2007) oder als „kohäsives, viskoelastisches eiweißhaltiges Material, das als Nebenprodukt bei der Isolierung von Stärke aus Weizenmehl“ (Day et al., 2006) verbleibt, definiert werden. Direkt nach dem Auswaschen wird der so erhaltene Feuchtkleber durch Trocknung und Vermahlung zu dem in Lebensmitteln einsetzbaren Vitalkleber, der bei Rehydratisierung die charakteristischen viskoelastischen Eigenschaften des Feuchtklebers aufrecht erhält (siehe Abbildung 1). Die Eigenschaften und (lebensmittel-)technologische Nutzbarkeit des so gewonnenen, rehydratisierten Vitalklebers zeichnen sich insbesondere durch seine Viskosität, Elastizität, Kohäsivität und Dehnbarkeit sowie durch eine hohe Wasseraufnahmefähigkeit, eine gute Gashaltekapazität und die damit verbundene Erzielung eines hohen Brotvolumens aus (Wieser et al., 2020).

Biologisch gesehen wird Gluten als Speicherprotein des Getreidekorns betrachtet, welches in den Endospermzellen lokalisiert ist. Das Endosperm macht etwa 80 % des Korngewichts aus und besteht zu 60–70 % aus Stärke, welche in der Keimungsphase des Getreidekorns zur Energiegewinnung genutzt wird. Die für das Pflanzenwachstum erforderlichen Wachstumsbausteine stellen die in der Proteinfraction enthaltenen Proteine zur Verfügung. Die Proteinfraction macht circa 13 % des Endosperms aus, von denen wiederum 20–32 % auf Albumine und Globuline, 50–60 % auf Gliadine und 16–26 % auf Glutenine entfallen (Belitz et al., 2007; Wieser et al., 2020). Diese verschiedenen Glutenproteintypen unterscheiden sich in der Aminosäurezusammensetzung der Proteine, sowie in der Länge und Struktur der proteinbildenden Polypeptidketten (siehe Abbildung 2).

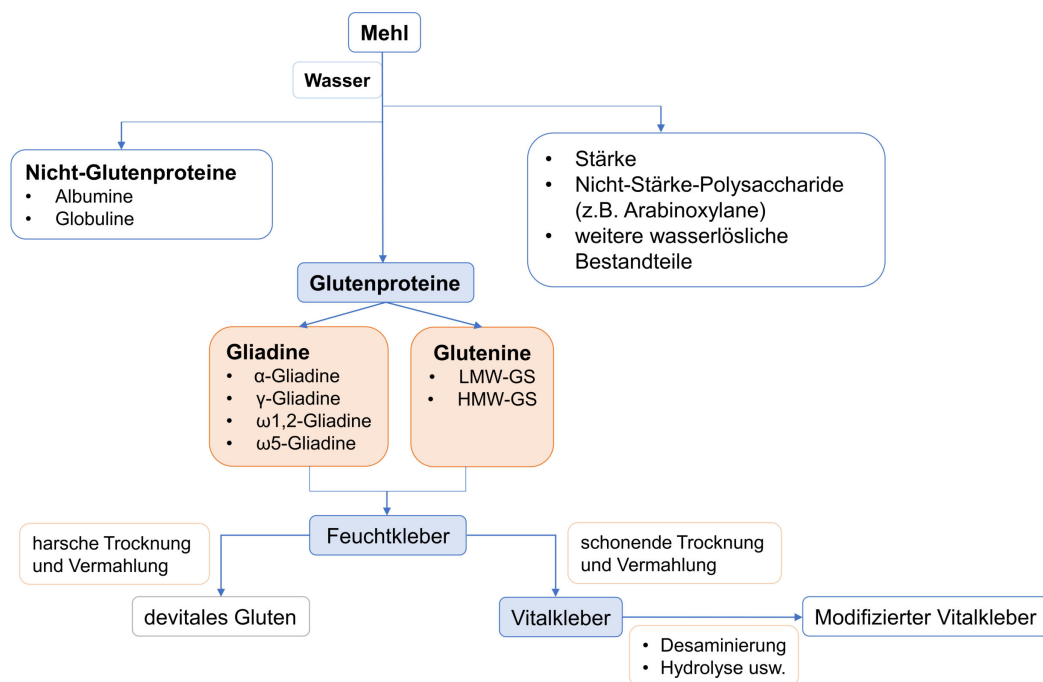


Abbildung 1: Darstellung der Gewinnung von Feucht- und Vitalkleber und Zusammensetzung der Glutenproteine. HMW-GS: *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten, LMW-GS: *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten.

Vitalkleber besteht zu 75–85 % aus Protein (Wieser, 2007). Die sonstigen im Endosperm des Getreidekorns enthaltenen Bestandteile wie Albumine, Globuline, Stärke oder Nicht-Stärke Polysaccharide wie Arabinoxylane sowie weitere wasserlösliche Bestandteile werden während des Waschschriffs zur Isolierung von Gluten weitgehend entfernt (siehe Abbildung 1). Restbestandteile an Stärke und Kohlenhydraten verbleiben im Endprodukt, da sie während des Waschschriffs in die kohäsive Glutenmatrix eingeschlossen werden und die Entfernung mit zunehmendem Proteingehalt erschwert wird (Day et al., 2006). Ein Stärkegehalt von 2,7–15,5 % in industriell hergestelltem Vitalkleber ist üblich (Sayaslan et al., 2010; Schopf et al., 2021)). Ein Großteil der im Mehl enthaltenen Lipide interagiert während des Auswaschprozesses mit den überwiegend hydrophoben Proteinen. Aufgrund der Hydrophobizität der Lipide werden sie mit Wasser kaum aus der Glutenmatrix entfernt (Day et al., 2006). Der Lipidgehalt in Gluten ist deshalb vergleichbar mit dem des Mehls und liegt in Industrievitalkleber zwischen 0,6 % und 2,7 % (Macmurray, 1970; Ortolan et al., 2017; Prabhasankar & Haridas Rao, 1999; Prabhasankar & Haridas Rao,

2001; Schopf et al., 2021). In Teigen verbessern die mit Gluten assoziierten Lipide durch die Stabilisierung von Gasblasen die Netzwerkstabilität (Pareyt et al., 2011).

1.1.2. Herstellungsprozess

Der italienische Wissenschaftler J.B. Beccari entdeckte 1745 durch ein einfaches Auswaschexperiment Gluten als Bestandteil von Weizenmehl. Die Herstellung von Gluten im industriellen Maßstab begann zunächst aufgrund des Bedarfs an Stärke und weniger angesichts der Nachfrage nach Vitalkleber. Gluten wurde als unvermeidlich anfallendes, unbrauchbares Nebenprodukt sogar verworfen. Der neuseeländische Konditor Harry Maltwood Williams erkannte in der 1930er Jahren das Potential zur Nutzung von Gluten als Lebensmittelzutat und begann mit der Gewinnung von Gluten aus fermentiertem Teig unter Salzzugabe. Das mit Gluten angereicherte Brot wies ein erhöhtes Volumen und eine verbesserte Krumenstruktur auf und wurde als „Procera“-Brot patentiert und vertrieben. Etwa zur gleichen Zeit nahm der Australier Nigel Love den Vertrieb des sogenannten „Promax“-Brot aus Mehl mit hohem Proteingehalt auf. Schon bald entstand durch den Auswaschprozess des Glutens allerdings das Problem, dass das stärkehaltige Waschwasser Abflüsse und kommunale Abwasserkanäle blockierte. So entstand der Bedarf nach einem Prozess, der getrockneten Vitalkleber hervorbringt und Stärke zur Weiternutzung in Lebensmitteln in getrockneter Form zurückgewinnt. Folglich kam auch die Forderung nach einer schonenden Methode zur Glutentrocknung auf, die vitales Gluten liefert (siehe Abbildung 1). Dazu wurde Feuchtkleber in trockenem Mehl gerollt und anschließend unter Temperatureinwirkung getrocknet. Der heute zur Trocknung von Gluten genutzte Prozess der Ringtrocknung beruht noch immer auf diesem Prinzip. Ab Mitte des 20. Jahrhunderts etablierte sich Vitalkleber mehr und mehr als vielseitige Lebensmittelzutat und wird heutzutage im Millionen-Tonnen-Maßstab produziert (Day et al., 2006).

Über die Jahrzehnte haben sich verschiedene Auswaschprozesse zur industriellen Gewinnung von Vitalkleber entwickelt, die im Grunde auf dem gleichen Prinzip beruhen, das schon Beccari anwendete. Mehl wird mit Wasser vermengt, wodurch sich das Glutennetzwerk vollständig ausbildet oder eine Gluten-angereicherte Phase mit einem teilweise entwickelten Glutennetzwerk entsteht. Es wird zwischen drei grundlegenden Prozessen unterschieden: dem Dough-, dem Dough-Batter- und dem Batter-Prozess. Die Prozesse unterscheiden sich in Parametern wie der zugeführten Wassermenge, der Temperatur während des Auswaschprozesses, dem Maß der Glutenaggregation oder der Ausbeute an Stärke und Gluten. Der traditionelle Martin-Prozess (Dough-Prozess) beruht auf der Herstellung eines festen Teiges mit 40–60 % Wasseranteil und der Ausbildung eines ideal entwickelten Glutennetzwerks. Stärke und andere wasserlösliche Bestandteile werden während des Waschens in einem kontinuierlichen Kneten entfernt (Sayaslan et al., 2010; Van Der Borght et al., 2005). In den moderneren Dough-Batter- und Batter-Prozessen wird mehr Wasser verwendet, um eine Mehl-Wasser-Suspension zu formen, in der sich das Glutennetzwerk nur teilweise ausbildet (Sayaslan et al., 2010). Im Batter-Prozess werden dabei Wassertemperaturen von 40–55 °C angewendet; im davon abweichenden Fesca-Prozess werden die Temperaturen auf 30 °C herabgesetzt, um eine ausgeprägte Glutenagglomeration zu verhindern (Johnston & Fellers, 1971; Van Der Borght et al., 2005). In weiteren Anpassungen dieser Prozesse können Enzyme wie Lipasen, Cellulasen oder Hemicellulasen eingesetzt wer-

den, um die Trennung von Stärke und Gluten zu verbessern (Melis et al., 2017; Weegels et al., 1992).

Die Abtrennung von Stärke und Gluten erfolgte ursprünglich auf Grundlage der unterschiedlichen Partikelgrößen von Gluten und Stärke über Siebe oder sich drehende Trommeln. Die heutigen Trennprinzipien basieren auf der höheren Dichte von Stärke und es werden Zentrifugen, Dekanter oder Hydrozyklone wie im Alfa-Laval/Raisio-Prozess eingesetzt. Der anschließende Trocknungsschritt ist für die Erhaltung der Vitalität des Vitalklebers essentiell. Gefrier-trocknung stellt die schonendste Trocknungsmethode dar, ist aber aus ökonomischen Gesichtspunkten nicht industrietauglich, weshalb hauptsächlich auf Ringtrocknung und Sprühtrocknung zurückgegriffen wird (Van Der Borght et al., 2005). Durch hohe Trocknungstemperaturen entstehendes devitales Gluten besitzt die charakteristischen viskoelastischen Eigenschaften von Vitalkleber nicht, weist aber noch dieselbe Unlöslichkeit und hohe Wasseraufnahmekapazität auf. Devitales Gluten kann in Prozessen, bei denen Glutenkohäsivität nicht gewünscht ist, Anwendung finden (Day et al., 2006).

1.1.3. Verwendung

Die funktionellen Eigenschaften von Vitalkleber ermöglichen eine umfassende Anwendung in diversen Lebensmittel- und Non-Food-Produkten. Gluten enthält unter anderem die hydrophilen, basischen oder sauren Aminosäuren Arginin, Lysin, Glutamin- und Asparaginsäure. Diese bedingen eine hohe Quell- und Wasseraufnahmekapazität, Gelbildung und in modifizierter Form eine gute Löslichkeit. In Kombination mit dem hydrophoben Anteil der Glutenproteine (Aminosäuren wie Cystein, Tyrosin oder Leucin) verfügt Vitalkleber über emulgierende und schaum-bildende Funktionen und eine gute Fettbindekapazität. Da Vitalkleber zudem günstiger als Soja- und Molkenproteinisolat oder Caseinat ist, stellt Gluten einen gefragten Rohstoff für diverse Industriezweige dar (Day et al., 2006).

Der Haupteinsatzbereich für Vitalkleber weltweit ist die Backwarenindustrie. Speziell in Europa wird Vitalkleber in erster Linie zur Anreicherung von proteinschwachen Weizenmehlen verwendet, um den Einsatz von teurem Mehl mit hohem Proteingehalt zu reduzieren. Vitalkleber kann zudem genutzt werden, um den Proteingehalt gezielt an den jeweiligen Anwendungsbedarf anzupassen.

In Fleischprodukten wird Vitalkleber aufgrund seiner Fähigkeit, gleichzeitig Fett und Wasser zu binden, zur Restrukturierung und Formgebung von Fleischabschnitten genutzt. Mit dem Boom der vegetarischen Ersatzprodukte findet Gluten in einem weiteren Industriezweig Anwendung. Durch Temperatureinwirkung, Hochdruckbehandlung und/oder Texturierung durch Extrusion kann eine physische Veränderung von Vitalkleber hervorgerufen werden, die zur Erzeugung einer faserigen, fleischähnlichen Konsistenz führt. Diese Verfahren können zur Herstellung von Fleisch- und Meeresfrüchteanaloga genutzt werden. Auch in Tiernahrung und Fischfutter wird Vitalkleber verwendet (Day et al., 2006). Die Thermoplastizität und filmbildenden Eigenschaften ermöglichen den Einsatz von Gluten in biologisch abbaubaren oder essbaren Verpackungen (Day et al., 2006; Lagrain et al., 2010b; Liu et al., 2018; Wang et al., 2022).

Die Modifikation von Vitalkleber und die dadurch erzielbare Löslichkeit ermöglicht den Einsatz von Gluten in weiteren Anwendungsbereichen (siehe Abbildung 1). Durch alkalische oder saure

Desaminierung wird die Aminogruppe der Glutaminreste entfernt und in die korrespondierende Carbonsäure umgewandelt. Das resultierende Produkt weist eine bessere Löslichkeit und verbesserte emulgierende und schaumbildende Eigenschaften auf, beispielsweise für die Verwendung in thermostabilen Emulsionen (Abedi & Pourmohammadi, 2021; Liao et al., 2010; Wang et al., 2017b). Durch enzymatische Hydrolyse mit Enzymen wie Papain, Subtilisin und Trypsin erhöht sich durch die Kürzung der Polypeptidketten die Löslichkeit von Gluten (Kong et al., 2007). Hydrolysiertes Gluten wird beispielsweise zur Emulgierung und Stabilisation in Kosmetika eingesetzt (Laurière et al., 2006; Pecquet et al., 2004). Weitere Modifikationsmöglichkeiten bestehen in der Behandlung mit Zitronen- oder Phosphorsäure für eine bis zu 78-fach erhöhte Wasserbindkapazität (Chiou et al., 2013; Robertson et al., 2014). Als Superabsorber kann modifizierter Vitalkleber als biologisch abbaubare Alternative zu den üblicherweise genutzten synthetischen Polymeren in Hygieneprodukten Anwendung finden (Robertson et al., 2014).

1.2. Glutenproteine

1.2.1. Zusammensetzung

Glutenproteine bzw. Proteine im Allgemeinen setzen sich aus einer Vielzahl verknüpfter Peptide (Polypeptide) zusammen, die wiederum aus Aminosäuren bestehen, die über Amidbindungen miteinander verbunden sind. Die Eigenschaften der Glutenproteine werden durch die Aminosäuresequenz, d.h. die enthaltenen Aminosäuren, deren Häufigkeit und Reihenfolge (Primärstruktur), durch Wechselwirkungen innerhalb eines Proteins (Sekundärstruktur) und mit anderen Proteinen (Tertiärstruktur) oder Proteinaggregaten (Quartärstruktur) bestimmt.

Die Hauptkomponenten der Proteinfraction, die Gluten seine charakteristische Fähigkeit verleihen aus Mehl und Wasser oder durch Rehydratisierung von Vitalkleber viskoelastische Teige zu bilden, sind Gliadine und Glutenine. Der Chemiker Thomas B. Osborne ordnete 1907 erstmals Getreideproteine anhand ihrer Löslichkeit verschiedenen Gruppen zu (Osborne, 1907). Albumine sind wasserlöslich, Globuline können durch Salzlösung extrahiert werden und Prolamine sind in 60%igem Alkohol löslich. Der verbleibende unlösliche Rückstand besteht aus Glutelinen und kann durch reduzierende Mittel unter Hitzeeinwirkung in lösliche Proteinbestandteile überführt werden. Die Begriffe Prolamin und Glutelin sind hierbei Überbegriffe für Proteine, die in ähnlicher Form in allen Getreidearten zu finden sind und getreidespezifisch benannt werden. Allerdings haben nur die Proteine aus Weizen aufgrund ihrer Proteinstruktur und anteiligen Zusammensetzung aus Prolaminen und Glutelinen die spezifischen netzwerkbildenden Eigenschaften inne. Bei Weizen werden Prolamine als Gliadine und Gluteline als Glutenine bezeichnet.

Neben vergleichbaren Löslichkeitseigenschaften werden als Gliadine und Glutenine verschiedene Glutenproteintypen mit ähnlicher elektrophoretischer Mobilität bzw. vergleichbarer Primärstruktur zusammengefasst. Die monomeren Gliadine können daher weiter unterteilt werden in α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine (siehe Tabelle 1) (Wieser, 1996). Die Gliadin-Glutenproteintypen unterscheiden sich durch Substitution, das Fehlen oder Vorhandensein einzelner Aminosäurereste in der Aminosäuresequenz voneinander (Wieser, 2007). Die α - und γ -Gliadine besitzen sechs bzw. acht Cysteinreste über die sie drei bis vier intramolekulare Disulfidbindungen ausbilden können, ω -Gliadine enthalten dagegen kein Cystein (siehe Abbildung 2) (Grosch & Wieser, 1999; Wieser, 2007). Gliadine gehen nur durch Punktmutationen in α -, γ - oder ω -Gliadinen, die zu ei-

ner ungeraden Anzahl an Cysteinresten führen, intermolekulare Bindungen mit Gliadinen oder Gluteninen ein (Shewry & Belton, 2024; Wieser, 2007). Solche Gliadine fungieren als Terminatoren der Glutenpolymerisation. Durch die kovalente Bindung wird dieser Typ an Gliadinen teils in der alkoholunlöslichen Gluteninfraktion extrahiert und als ω b-Gliadine bezeichnet (Wieser, 2007). Der relative Anteil der einzelnen Gliadinproteintypen hängt von der Weizensorte und den Wachstumsbedingungen wie der Bodenbeschaffenheit, dem Klima und der Düngung ab. In der Regel sind aber α - und γ -Gliadine in größerem Umfang vertreten als ω -Gliadine (Wieser & Kieffer, 2001).

Tabelle 1: Einteilung der Glutenproteintypen anhand der Proteinzusammensetzung und des prozentualen Anteils am Gesamtproteingehalt der *High-Molecular-Weight* (HMW)-, *Medium-Molecular-Weight* (MMW)- und *Low-Molecular-Weight* (LMW)-Untereinheiten (GS), m: monomere Einheit, p: polymere Einheit. Tabelle modifiziert nach Grosch & Wieser 1999 und Wieser et al. (2023).

	HMW		MMW		LMW		
	HMW-GS (p)		ω -Gliadine (m)		α -Gliadine	γ -Gliadine	LMW-GS
	x	y	ω 5	ω 1,2	(m)	(m)	(p)
Molekulargewicht [Dalton]	83 000-88 000	67 000-74 000	49 000-55 000	39 000-44 000	28 000-35 000	31 000-35 000	32 000-39 000
Anzahl der Aminosäurereste	770-827	627-684	420	370	262-298	272-308	281-333
Anteil der Glutenproteine [%]	4-9	3-4	3-6	4-7	28-33	23-31	19-25
Anzahl an Cysteinresten	4	7	0	0	6	8	8

Glutenine werden anhand ihres Molekulargewichts in *High-Molecular-Weight* (HMW)-Untereinheiten (HMW-GS) und *Low-Molecular-Weight* (LMW)-Untereinheiten der Glutenine (LMW-GS) unterteilt (siehe Tabelle 1). LMW-GS sind strukturell ähnlich zu α - und γ -Gliadinen und besitzen acht Cysteinreste (Grosch & Wieser, 1999; Wieser, 2007). Davon sind sechs an der gleichen Stelle wie in α - und γ -Gliadinen positioniert, welche ebenfalls intramolekular verknüpft sind (siehe Abbildung 2). Die zwei zusätzlichen Cysteinreste bilden, vermutlich aufgrund der Sterik, intermolekulare Disulfidbindungen zu LMW-GS oder HMW-GS aus. Die Glutenproteintypen mit dem größten Molekulargewicht sind aufgrund der langen Domäne mit repetitiven Aminosäuresequenzen die HMW-GS (siehe Abbildung 2). HMW-GS werden detailliert unterschieden anhand des codierenden Genoms (A, B, D), des Typs, der auf dem Molekulargewicht beruht (x oder y) und der Mobilität (1–12) in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). LMW-GS machen etwa 20 % aller Glutenproteine aus, HMW-GS sind zu 10 % vertreten. Natives Gluten besteht aus einem Polymerrückgrat aus HMW-GS, von dem über Disulfidbindungen verknüpfte LMW-GS abzweigen. HMW-GS, die über die zwei bis sieben enthaltenen Cysteinreste polymerisieren, können Proteinaggregate mit über 10 Millionen Dalton ausbilden. Damit zählt das Glutenproteinnetzwerk zu einem der größten in der Natur vorkommen-

den Proteine. Dieses sogenannte Gluteninmakropolymer (GMP) ist mit einer hohen Teigstärke und hohem Backvolumen assoziiert (Wieser, 2007). Die Gesamtheit der Glutenproteine kann entsprechend der Molekulargewichte der einzelnen Glutenproteintypen in drei Gruppen untergliedert werden. Die Gruppe der hochmolekularen Proteine enthält die HMW-GS mit 770–827 Aminosäureresten und Molmassen von 67 000–88 000 Dalton. Die Gruppe mittleren Molekulargewichts setzt sich aus ω 5-Gliadinen (etwa 420 Aminosäurereste, 49 000–55 000 Dalton) und ω 1,2-Gliadinen (etwa 370 Aminosäurereste) mit Molmassen von 39 000–44 000 Dalton zusammen. Eine dritte Gruppe bilden die niedermolekularen α - und γ -Gliadine und LMW-GS mit Molmassen von 28 000–39 000 Dalton und 262–333 Aminosäureresten (siehe Tabelle 1) (Grosch & Wieser, 1999; Wieser et al., 2023).

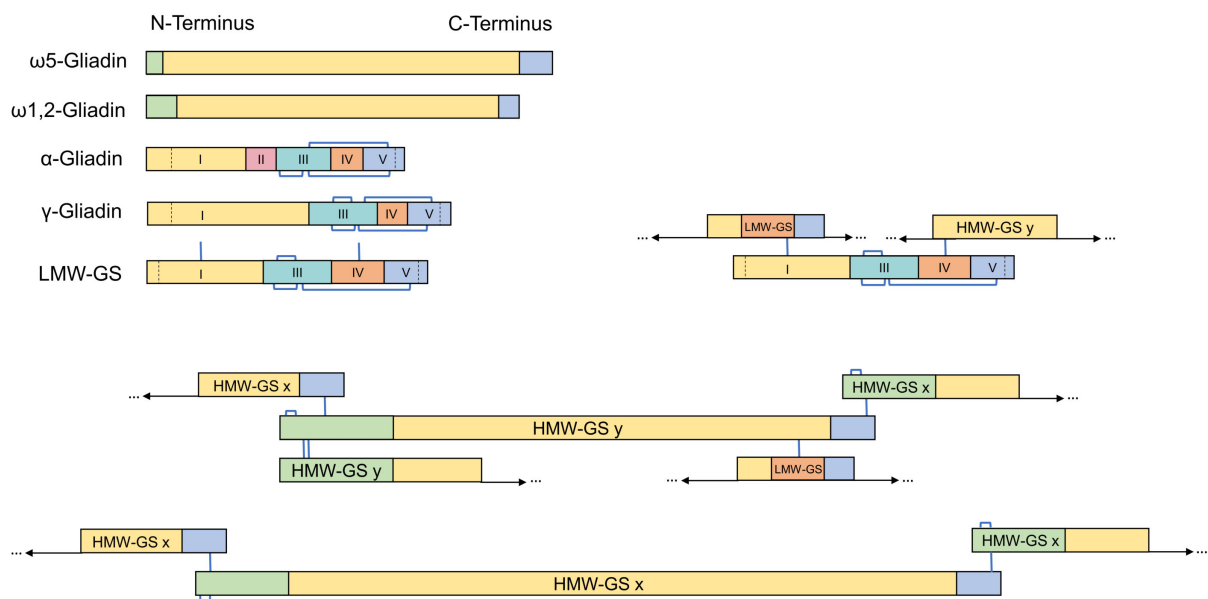


Abbildung 2: Aufbau der Aminosäuresequenzen mit der Positionierung intra- und intermolekularer Disulfidbindungen (blaue Verbindungslinien) in den verschiedenen Glutenproteintypen sowie Darstellung der intermolekularen Disulfidverknüpfungen zwischen verschiedenen Glutenproteintypen. Die Segmente I–V bezeichnen strukturelle Aminosäureabschnitte. HMW-GS: *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten, LMW-GS: *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten. Abbildung modifiziert nach Wieser et al. (2023).

Alle Glutenproteintypen weisen einen hohen Gehalt der Aminosäuren Glutamin und Prolamin auf und zeigen Übereinstimmungen im Aufbau aus repetitiven Domänen bestehend aus 3–12 Aminosäuren und variablen Domänen der Aminosäuresequenz. Die ω 1,2- und ω 5-Gliadine, sowie die HMW-GS gleichen sich im Aufbau ebenso wie die α - und γ -Gliadine und LMW-GS. Letztere sind durch eine höhere Variabilität als ω -Gliadine und HMW-GS gekennzeichnet und setzen sich aus verschiedenen repetitiven und nicht-repetitiven Aminosäuresequenzen zusammen, die sich jeweils in den verschiedenen Glutenproteintypen ähneln (siehe Abbildung 2). Die Anzahl der repetitiven Domänen bestimmt die Länge und das Molekulargewicht der Proteine. Die Zusammensetzung der Aminosäuresequenz ist für die einzelnen Glutenproteintypen spezifisch. So sind ω -Gliadine durch einen hohen Gehalt an Phenylalanin und HMW-GS durch häufiges Auftreten der Aminosäure Glycin gekennzeichnet. Die Anordnung der Aminosäuresequenz verleiht

den Glutenproteintypen ihre charakteristischen Eigenschaften. Die Anzahl der Cysteinreste bestimmt über die Fähigkeit Quervernetzungen zu anderen Proteinen und polymere Strukturen zu bilden. Die Amidgruppe in Glutamin bildet vermehrt Wasserstoffbrückenbindungen zu anderen Proteinen oder Wasser aus und Prolin verleiht dem Polypeptidrückgrat eine gewisse Steifigkeit. Glutenproteine weisen eine geringe Ladung auf, da die Aminosäuresequenzen vor allem neutrale Aminosäuren enthalten. Basische oder saure Aminosäuren wie Lysin sind nicht in den langen, repetitiven Domänen, sondern in den N- oder C-terminalen Regionen lokalisiert (Shewry & Belton, 2024).

1.2.2. Bindungstypen

Die Glutenproteinzusammensetzung, die Glutenfunktionalität sowie die damit verbundenen rheologischen Eigenschaften hängen von Wechselwirkungen zwischen Glutenproteinen ab. Die Bindungen und Interaktionen können kovalenter oder nicht-kovalenter Natur sein. Das Gerüst des Glutennetzwerks bilden über Disulfidbrücken intra- oder intermolekular kovalent verknüpfte Gluteninpolymere. Die Aminosäure Cystein ist in der Lage über die enthaltene freie Thiolgruppe solche Disulfidbrücken zu anderen Cysteinresten auszubilden. Obwohl Cystein nur etwa 2 % aller Aminosäuren in Gluten ausmacht, ist die Aminosäure deshalb essentiell für die Glutenstruktur (Grosch & Wieser, 1999). Bereits eine geringe Zunahme an Disulfidbindungen kann einen großen strukturellen Effekt verursachen und nur wenige Quervernetzungen zwischen großen Gluteninpolymeren sind nötig, um das Glutennetzwerk wesentlich zu erweitern (Delcour et al., 2012).

Durch Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen (SH-SS) kann das endogene Tripeptid Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin, GSH) als Terminator der Glutenpolymerisation fungieren oder das vorhandene Glutennetzwerk depolymerisieren. Hitzeeinwirkung führt dagegen dazu, dass sich Glutenproteine durch SH-SS-Austauschreaktionen weiter vernetzen (Lagrain et al., 2005; Schofield et al., 1983). Das Ausmaß an Disulfidbindungen in Gluten hängt von genetischen Faktoren wie dem Gehalt an Polymerisationsterminatoren, Umweltbedingungen wie Schwefelmangel, Hitze- oder Trockenstress oder der Existenz reduzierender oder oxidierender Agentien ab (Wieser, 2007). In Abbildung 3 sind Bildungswege für intra- oder intermolekulare kovalente SS-Bindungen unter der Beteiligung von proteingebundenem Cystin und Cystein dargestellt. Disulfidbindungen tragen mit Abstand am meisten zur Ausbildung des Glutennetzwerks bei.

Bei hohen Temperaturen oder alkalischen pH-Werten können zusätzlich Abbaureaktionen ablaufen, bei denen durch eine β -Eliminierung inter- und intramolekulare Disulfidbindungen gespalten werden und teils neue, nicht-SS-Bindungen ausgebildet werden (siehe Abbildung 3). Dadurch wird eine SH-Gruppe und eine reaktive Dehydroalanin-Verbindung (DHA) als Zwischenprodukt freigegeben. Die freie SH-Gruppe kann mit einem Cysteinrest reagieren oder eine SH-SS-Austauschreaktion eingehen, wodurch neue SS-Quervernetzungen entstehen (siehe Abbildung 3). Auf diese Weise können Gliadine, die keine freien SH-Gruppen besitzen, da die verfügbaren Cysteinreste in intramolekularen SS-Brücken gebunden sind, in das Gluteninnetzwerk eingebaut werden (Lagrain et al., 2008). Die so neu geknüpften SS-Bindungen sind unter reduzierenden Bedingungen umkehrbar. Das durch die β -Eliminierung entstandene DHA kann außerdem intra- oder intermolekular mit Cysteinresten reagieren und eine Lanthionin-Verbindung (LAN) bilden

oder mit der ϵ -Aminogruppe von Lysin zu Lysinoalanin (LAL) reagieren (siehe Abbildung 3). Beide Verbindungen sind unter reduzierenden Bedingungen nicht reversibel (Rombouts et al., 2010).

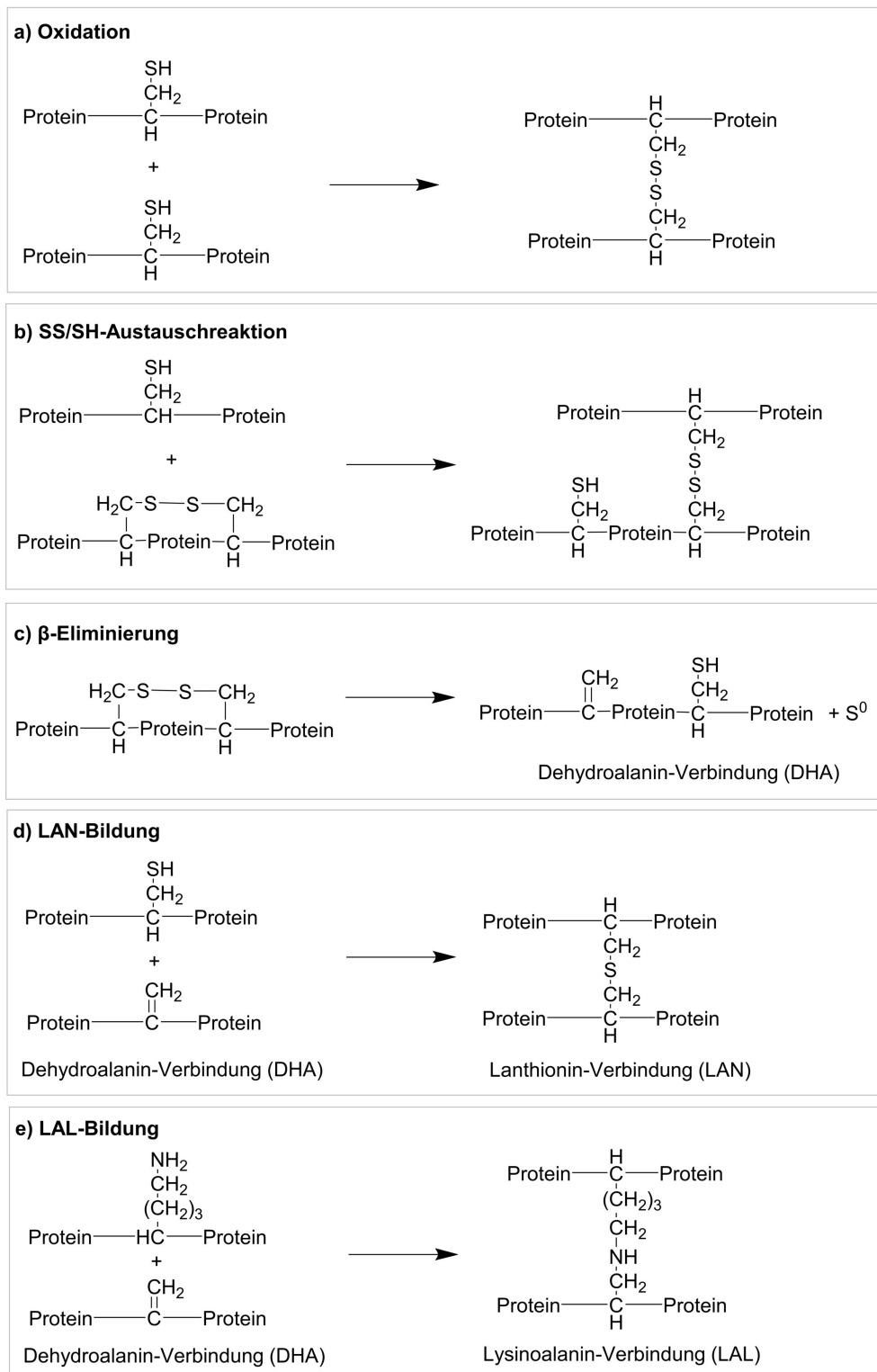


Abbildung 3: Übersicht möglicher Reaktionen für die Bildung kovalenter Bindungen in Gluten unter Beteiligung von proteingebundenen freien Thiolen oder Disulfiden. Abbildung modifiziert nach Delcour et al. (2012) und Friedman (1999).

Bei Erhitzung von Gluten können sich weitere kovalente Bindungen wie Isopeptidbindungen zwischen der ϵ -Aminogruppe der Aminosäure Lysin und den seitenständigen β - oder γ -Carboxylgruppen von Asparagin- oder Glutaminsäure bilden. Daraus entstehen die nicht reduzierbaren Verbindungen ϵ -(γ -Glutamyl)lysin oder ϵ -(β -Aspartyl)lysin (Asquith et al., 1974; Rombouts et al., 2011).

Weitere kovalente Bindungen in Gluten stellen Tyrosin-Tyrosin-Bindungen dar, die während des Knet- oder Backvorgangs in Teig entstehen können und so zur Vernetzung des Glutennetzwerks beitragen (Hanft & Köhler, 2005; Tilley et al., 2001). Es wird allerdings davon ausgegangen, dass weniger als 0,1 % der in Gluten vorhandenen Tyrosinreste kovalent miteinander verknüpft sind und Tyrosin-Tyrosin-Quervernetzungen somit einen marginalen Stellenwert bei der Ausbildung des Glutennetzwerks einnehmen (Hanft & Köhler, 2005; Peña et al., 2006; Rodriguez-Mateos et al., 2006). Die Dityrosinbildung erfolgt vermutlich über einen Radikalmechanismus mit endogener Peroxidase (Hanft & Köhler, 2005). Des Weiteren ist die Bildung von kovalenten Quervernetzungen zwischen Dehydroferulasäure aus Arabinoxylanresten in Gluten und Tyrosin aus Glutenproteinen möglich. Es ist allerdings davon auszugehen, dass diese Verknüpfung nur in sehr geringem Umfang im Glutennetzwerk vorhanden ist (Piber & Köhler, 2005).

Neben kovalenten Bindungen wird die Interaktion der Glutenproteine durch nicht-kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe und ionische Interaktionen, elektrostatische Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte ergänzt. Diese Bindungsarten sind zwar labiler als kovalente Bindungen, sind aber vor allem für die Aggregation von Gliadinen und Gluteninen, die Aufrechterhaltung der Sekundär- und Tertiärstruktur und somit für die gesamte Glutenstruktur und die korrespondierenden funktionellen Eigenschaften ausschlaggebend (Némethy, 1967; Wieser, 2007).

Wasserstoffbrückenbindungen werden zwischen Proteinen und Wasser oder zwischen Proteinen ausgebildet. Die kontinuierliche Spaltung und Neubildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Glutaminresten der HMW-GS stellt die Grundlage für die Glutenelastizität dar (Belton, 1999; Delcour et al., 2012). Die Bindungen sind thermisch labil, weshalb die Interaktion zwischen Gliadinen und Gluteninen unter Temperatureinwirkung minimiert wird und Gluten eine bessere Löslichkeit aufweist (Apichartsrangkoon et al., 1998; Shewry & Belton, 2024).

Hydrophobe Interaktionen entstehen durch die Tendenz nicht-polarer Moleküle zur Aggregation, um die Wechselwirkungen mit Wasser zu reduzieren (Némethy, 1967). Hydrophobe Molekülteile liegen daher im nativen Zustand im Inneren des Proteins isoliert und sind der Hauptgrund für Proteinfaltung (Shewry & Belton, 2024). Die Intensität hydrophober Interaktionen nimmt bei Temperaturen bis 60 °C zu (Apichartsrangkoon et al., 1998).

Ionische Interaktionen über elektrostatische Wechselwirkungen finden zwischen Aminosäuren entgegengesetzter Ladung, z.B. zwischen der basischen Aminosäure Lysin und Asparaginsäure oder Glutaminsäure statt. Salzionen können ebenfalls mit geladenen Aminosäuren wechselwirken (Shewry & Belton, 2024).

1.2.3. Sekundärstrukturelemente

Polypeptidketten liegen in der Regel nicht gestreckt vor, sondern ordnen sich je nach Aufbau der Primärstruktur entsprechend bestimmter Sekundärstrukturelemente an. Die häufigsten Sekundärstrukturelemente sind α -Helices, parallele und antiparallele β -Faltblatt-Strukturen und β -Schleifen bei Krümmung der Polypeptidkette, die je nach Bindungswinkeln und Abständen zwischen Aminosäuren in weitere Subtypen unterteilt werden können. Die Stabilisierung der Strukturen erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen sowie intramolekulare Disulfidbindungen. Die Kombination mehrerer Sekundärstrukturelemente, beispielsweise umeinander gedrehte α -Helices (*coiled-coil* α -Helix) oder α -Helices in Kombination mit β -Strukturen werden Supersekundärstrukturen genannt. Je nach Primärstruktur und Geometrie werden bestimmte Sekundärstrukturelemente bevorzugt gebildet. Vier aufeinanderfolgende Aminosäurereste können eine Krümmung der Polypeptidkette verursachen, wobei häufig Prolin und Glycin beteiligt sind. Globuläre Proteine weisen einen besonders großen Anteil an α -Helix-Strukturen auf.

Die Sekundärstruktur der α - und γ -Gliadine liegt in α -Helices und β -Faltblatt-Strukturen vor und wird in erster Linie über Disulfidbindungen und Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Tatham & Shewry, 1985). Die ω -Gliadine enthalten vor allem β -Schleifen, aber keine α -Helices und β -Faltblatt-Strukturen. Die Sekundärstruktur wird durch starke hydrophobe Wechselwirkungen aufrechterhalten (Tatham & Shewry, 1985). Die Sekundärstruktur der LMW-GS unterscheidet sich durch die ähnliche Primärstruktur nur wenig von der der α - und γ -Gliadine, ist jedoch durch die zusätzlichen Cysteinreste auch durch intermolekulare Disulfidbindungen charakterisiert (Delcour et al., 2012). HMW-GS sind durch α -Helices in der C- und N-terminalen Domäne geprägt. Die Glutamin-, Prolin- und Glycin-reiche repetitive Domäne besteht aus mehreren Typen β -Schleifen, die eine Supersekundärstruktur ausbilden (Shewry et al., 1992).

Werden Proteine hydratisiert, kommt es zunächst zur Zunahme an β -Faltblatt-Strukturen und zu einer damit einhergehenden geordneten Proteinstruktur. Mit zunehmender Hydratation der Proteine, bilden sich mehr Schleifen-Regionen aus und statt Protein-Protein-Interaktionen werden vermehrt Protein-Lösungsmittel-Interaktionen ausgebildet, die die Mobilität der Proteinstränge erhöhen. Dadurch sinkt der Anteil an β -Faltblatt-Strukturen zu Gunsten der Ausbildung hydratisierter Schleifenregionen mit ausgedehnten β -Schleifen (Belton, 1999).

Die Ausrichtung der strukturbestimmenden Disulfidbindungen nimmt Einfluss auf die Tertiärstruktur von Proteinen. Die in Proteinen vorhandenen Disulfidbindungen können je nach Bindungswinkeln in drei verschiedenen Formen als Rotationsisomere mit abnehmender Stabilität vorliegen: in *gauche-gauche-gauche*- (*ggg*), in *trans-gauche-gauche*- (*tgg*) und in *trans-gauche-trans*-Konformation (*tgt*) (Ackermann et al., 2009). Die Energiedifferenzen zwischen den Rotameren sind gering, es wird jedoch immer selektiv die je nach Struktur energieärmste Konformation favorisiert (Görbitz, 1994).

1.2.4. „Train and Loop“-Modell

Die charakteristische Viskoelastizität von Weizengluten beruht auf einem bestimmten Verhältnis aus Gliadinen und Gluteninen und deren Zusammenspiel durch verschiedene kovalente und nicht-kovalente Interaktionen. Im Getreidekorn beträgt das Gliadin/Glutenin-Verhältnis etwa 2:1. Die quantitative Zusammensetzung der Proteine ist entscheidend für die Eigenschaften von Gluten und damit von Teigen, weil die Proteine verschiedene, sich ergänzende Funktionen erfüllen. Glutenine bilden polymere Proteinaggregate aus, die das Proteingerüst des Glutennetzwerks formen, während monomere Gliadine als „Lösungsmittel“ agieren. Glutenine tragen daher zur Elastizität bzw. zur Erhöhung des Dehnwiderstandes von Gluten bei, Gliadine erhalten die Viskosität und Dehnbarkeit aufrecht (Wieser et al., 2020).

Für die Visualisierung des elastischen Verhaltens von Gluteninen und die Erklärung rheologischer Eigenschaften von Gluten, stellte Peter S. Belton (1999) das „Train and Loop“-Modell vor, das inzwischen weithin anerkannt ist. Das Modell entstand aus dem Bedarf einer Erklärung für das elastische Verhalten von Gluten, da die Plastizität und der Dehnwiderstand von Gluten zwar durch die Quervernetzung von Glutenproteinen erklärt werden kann, nicht jedoch die Rückkehr in den Ausgangszustand nach Verformung, da Deformation das Brechen von Quervernetzungen bedingt. Des Weiteren beruht das Modell auf früheren Erkenntnissen, dass HMW-GS reich an Glutamin, Glycin und Prolin sind, sich bestimmte Peptidsequenzen in der repetitiven Domäne wiederholen und die Proteine insbesondere durch die Glutaminreste hydrophil sind und durch ihre Struktur zahlreiche intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. HMW-GS weisen außerdem einen hohen Grad an Mobilität bei Hydratisierung auf (Belton, 1999).

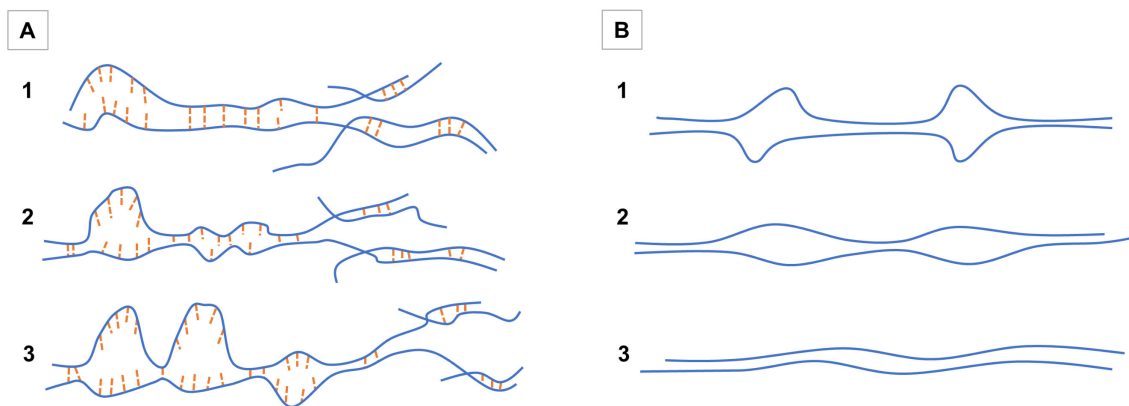


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Verhaltens von *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten bei zunehmender Hydratation (1-3) („Train and Loop“-Modell), Wasserstoffbrückenbindungen in orange mit gestrichelten Linien dargestellt (A) und Verhalten der *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten bei zunehmender Deformation (1-3) (B). Abbildung modifiziert nach Belton (1999).

Im „Train and Loop“-Modell werden HMW-GS vereinfacht als lange Proteinketten dargestellt, die durch ihre Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen zu formen „klebrig“ sind. Die globulären Enden der HMW-GS enthalten Cysteinreste, die über Disulfidbrücken das Glutennetzwerk erweitern können. Liegen Glutenproteine ohne Lösungsmittel vor, interagieren die HMW-GS über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander und bilden ein dichtes Netzwerk (siehe Abbildung 4)

(Belton, 1999).

Werden die Proteine hydratisiert, lösen sich intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zu Gunsten von Wasser-Protein-Interaktionen auf. Aufgrund der Vielzahl an intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der HMW-GS lösen sich nicht alle Bindungen zeitgleich, sondern es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Wasser-Protein- und Protein-Protein-Wasserstoffbrückenbindungen ein. So entstehen die charakteristischen Elemente des „*Train and Loop*“-Modells: ungebundene, mobile Regionen, die sogenannten „*loops*“ oder Schleifen, die durch Protein-Lösungsmittel-Interaktionen charakterisiert sind und gebundene Regionen, in denen intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen HMW-GS vorherrschen, die als „*trains*“ oder Bahnen bezeichnet werden (siehe Abbildung 4) (Belton, 1999).

Wird das Glutennetzwerk deformiert, verformen sich zunächst die Schleifenregionen, da hierfür weniger Energie aufgewendet werden muss, und schließlich die Bahnen, sodass die Proteinstränge übereinander gleiten können. Bei Relaxation kehrt das System durch die wirkende Rückstellkraft in den Gleichgewichtszustand aus Schleifen und Bahnen zurück. Dieser Vorgang erklärt die Elastizität des Glutennetzwerks. Gliadine werden von Belton des Weiteren als globuläre Proteine dargestellt, die mit HMW-GS durch nicht-kovalente Bindungen wie van-der-Waals-Kräfte interagieren, und für die linearen, elastischen Proteinstränge der HMW-GS eine viskose Umgebung bilden (Belton, 1999).

1.3. Zusätze

Die Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität kann mit üblicherweise in Teig verwendeten Zusätzen wie NaCl und weiteren Salze, dem Emulgator Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) modifiziert werden.

1.3.1. Salze

NaCl wird in Konzentrationen von 1,5–2 % traditionell in Teigen zu Zwecken der Teigstärkung, der Verzögerung der Teigentwicklungszeit, der Erhöhung der Gashaltekapazität und der Vergrößerung des Brotvolumens eingesetzt (Carcea et al., 2020; McCann & Day, 2013; Wehrle et al., 1997). Der Effekt des Salzes auf die rheologischen Eigenschaften beruht auf der Änderung der Konformation der Glutenproteine auf molekularer Ebene. Durch die Interaktion von Na^+ und Cl^- mit den Glutenproteinen und dem umgebenden Wasser ändert sich die Teigmatrix und es werden sowohl mehr intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polypeptidketten als auch mehr nicht-kovalente Interaktionen zwischen Gliadinen und Gluteninen ausgebildet. Dies führt zu einem dichteren, kompakteren Glutennetzwerk und den genannten rheologischen Veränderungen des Teiges (Fu et al., 1996; Tuhumury et al., 2014).

Die Eigenschaften von Na^+ und Cl^- können zusammen mit weiteren Anionen und Kationen anhand der Hofmeisterreihe beurteilt werden. Die Hofmeisterreihe ordnet Anionen und Kationen, entsprechend ihrer Fähigkeit, Proteine in Lösung auszufällen, in kosmotrope und chaotrope Ionen. Die Einordnung von Anionen und Kationen in der Hofmeisterreihe wurde empirisch durch Experimente zur Fällung von Hühnereiweiß mit verschiedenen Salzen zwischen 1880 und 1890 von Franz Hofmeister etabliert (Kunz et al., 2004). Die Anordnung der in dieser Arbeit verwen-

deten Kationen entspricht $K^+ < Na^+ < Mg^{2+} < Ca^{2+}$, wobei das Kation stärker kosmotrope Eigenschaften aufweist, je weiter links in der Skala es angeordnet ist und die mit chaotropen Eigenschaften verbundenen Kationen weiter rechts in der Skala platziert sind (Kunz et al., 2004; Kunz, 2010). Kosmotrope Ionen fördern die Proteinstabilität und verursachen die Fällung von Proteinen, wohingegen chaotrope Ionen die Proteinstabilität verringern und zur Verbesserung der Proteinlöslichkeit beitragen (Kunz, 2010; Zhang & Cremer, 2006).

In ursprünglichen Theorien wurden kosmotrope Ionen als „Wasserstrukturförderer“ und chaotrope Ionen als „Wasserstrukturbrecher“ bezeichnet (Zhang & Cremer, 2006). Tatsächlich beeinflussen die Ionen die Struktur und Dynamik von Wasser, allerdings sind die Auswirkungen eher gering und lokal begrenzt (Lo Nostro & Ninham, 2012; Xie & Gao, 2013). Vielmehr wird inzwischen davon ausgegangen, dass Salze auch unmittelbar mit Proteinen über geladene Aminosäuren in Seitenketten oder mit dem Polypeptidrückgrat interagieren können (Kunz, 2010; Okur et al., 2017; Preston, 1981; Xie & Gao, 2013). Die Beurteilung individueller Einflüsse einzelner Ionen gestaltet sich dabei schwierig, da die belegbaren Effekte von Anionen und Kationen nicht additiv sind, sondern synergistisch wirken und damit jedes Salz eine spezifische Wirkung auf Proteine hat (Xie & Gao, 2013). Im Allgemeinen fördern Salze jedoch die Aggregation gliadinreicher Proteine. Daher wird angenommen, dass die Intensität der Gliadinaggregation auf individuellen Interaktionen mit spezifischen Aminosäuren des Proteins beruht und die resultierende Wirkung auf die Eigenschaften des Proteins durch den Ionentyp und die Salzkonzentration bestimmt werden (Kinsella & Hale, 1984; Preston, 1981; Ukai et al., 2008).

1.3.2. Polysorbat 20

Emulgatoren sind amphiphile Tenside, die aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Molekülteil bestehen. Da Emulgatoren die Oberflächenspannung reduzieren und so zur Bildung von Emulsionen aus zwei normalerweise nicht mischbaren Phasen beitragen können, werden sie auch grenzflächenaktive Stoffe genannt. Dieser Mechanismus erhöht die Stabilität eines thermodynamisch instabilen Systems (Gómez et al., 2004). Je nach Wirkung des hydrophoben bzw. hydrophilen Molekülteils, können Emulgatoren Öl-in-Wasser- oder Wasser-in-Öl-Emulsionen stabilisieren. Zur Einordnung dieser Eigenschaften kann ein Wert für die „*hydrophilic-lipophilic balance*“ (HLB), ein Maß für den prozentualen Anteil bzw. die relative Wirksamkeit der hydrophilen bzw. lipophilen Gruppe herangezogen werden. Der HLB-Wert kann Hinweise auf die Möglichkeiten der Anwendung und das Verhalten im Anwendungsfall geben. PS 20 eignet sich mit einem HLB-Wert von 16,7 beispielsweise für die Herstellung von Öl-in-Wasser-Emulsionen (Belitz et al., 2007).

Neben dem HLB-Wert können Emulgatoren entsprechend ihrer Ionisierbarkeit in ionische und nicht-ionische Emulgatoren unterteilt werden. Ionische Emulgatoren dissoziieren in Wasser und können je nach Ladung anionisch oder kationisch sein. Kationische Emulgatoren finden keine Anwendung in Lebensmitteln. Amphotere Emulgatoren enthalten sowohl anionische als auch kationische Gruppen, deren grenzflächenaktive Eigenschaften daher pH-Wert-abhängig sind. Nicht-ionische Emulgatoren wie PS 20 besitzen aufgrund ihrer kovalenten Bindungen keine ionisierbaren Gruppen.

In Lebensmitteln verwendete Emulgatoren sind Mono- oder Diglyceride von Fettsäuren, die mit

Alkoholen wie Glycerin oder Sorbit verestert sind und weiter mit Ethylenoxid oder durch Veresterung mit organischen Säuren wie Essig- oder Weinsäure modifiziert sein können. Daneben existieren natürliche Emulgatoren wie Lecithin aus Sojabohnen (Krog, 1977). Polysorbate sind Tenside, die aus polyoxyethylierten Fettsäureestern von Sorbitan mit einer Gesamtmenge von 20 Ethylenoxid-Äquivalenten pro Molekül bestehen (Ding & Yang, 2013). Unterschiede zwischen verschiedenen Polysorbaten liegen in der Art der veresterten Fettsäure, der Anzahl der Polyoxyethyleinheiten im Molekül und in der Zahl der veresterten Einheiten. Die zwei- oder dreistellige Zahl in der Bezeichnung der Polysorbate bezieht sich auf die spezifische Zusammensetzung der Moleküle. Polysorbate werden auch unter der geschützten Handelsbezeichnung „Tween“ vertrieben.

In Backwaren werden Emulgatoren unter anderem zur Verbesserung der Teigeigenschaften, des Gebäckvolumens, der Frischhaltung und der Krumenstruktur eingesetzt. Dabei können Emulgatoren entsprechend ihrer Funktion in zwei Kategorien eingeteilt werden. Emulgatoren, die teigfestigend wirken, interagieren hauptsächlich mit Gluten und erhöhen das Gebäckvolumen. Dazu zählen Polysorbate, Diacetylweinsäureester von Mono- und Diglyceriden (DATEM) oder Natriumstearoyl-2-lactylat (SSL). SSL fungiert sowohl als Teigstärker, als auch als Krumenweichmacher und fällt damit zusätzlich in die zweite Gruppe der Emulgatoren, die bevorzugt mit Stärke wechselwirken. Auch Mono- und Diglyceride sowie Lecithin weisen eine weichmachende Wirkung der Krume auf (Stampfli & Nersten, 1995).

Um den Wirkmechanismus von Emulgatoren in Teig zu erklären, kann Teig als 3-Phasensystem betrachtet werden. Das Glutennetzwerk bildet dabei die kontinuierliche Glutenphase, die durch die enthaltenen Proteine überwiegend hydrophob ist (Jekle & Becker, 2011). Die zweite kontinuierliche Phase besteht aus Wasser, Stärke und weiteren wasserlöslichen Bestandteilen und fein verteiltes Gas bildet die dritte Phase (Breuillet et al., 2002; Jekle & Becker, 2011). Emulgatoren binden mit ihrem hydrophoben Teil an die Glutenphase und tragen so zu einer verstärkten Aggregation der Proteine bei, wodurch ein verbessertes Gashaltevermögen bewirkt wird. Der lipophile Molekülteil bildet dagegen Komplexe mit Stärke aus.

Emulgatoren werden in Teigen in Dosen bis maximal 1 % eingesetzt, da höhere Konzentrationen die Teigbildung verhindern (Gómez et al., 2013b).

1.3.3. Ascorbinsäure

L-*threo*-Ascorbinsäure (AS) wird als Mehlbehandlungsmittel zur Teigfestigung und damit zur Erhöhung des Brotvolumens, Verminderung der Teigklebrigkeit und zur Verbesserung der Krumenstruktur eingesetzt. Der teigstärkende Effekt der reduzierend wirkenden AS beruht auf der Umwandlung von AS in Dehydroascorbinsäure (DH-AS), die als oxidierendes Agens die eigentlich teigstärkende Wirkung innehat (siehe Abbildung 5). Des Weiteren beruht die Funktion von AS bzw. DH-AS auf der Entfernung von GSH, welches natürlicherweise in Mehl enthalten ist und als Kettenterminator durch die spezifische Spaltung intermolekularer Disulfidbrücken zwischen LMW-GS die Depolymerisation des Glutennetzwerks befördert (Abbildung 5, Reaktion 3) (Grosch & Wieser, 1999; Hahn & Grosch, 1998).

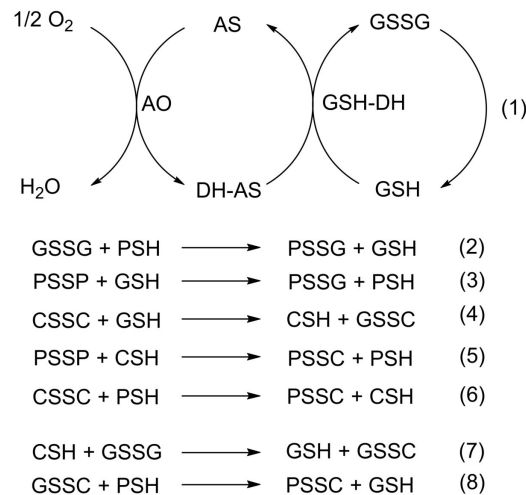


Abbildung 5: Reaktionsmechanismus von Ascorbinsäure mit Mehlbestandteilen zur Erklärung der teigstärkenden Eigenschaften. L-*threo*-Ascorbinsäure (AS), Dehydroascorbinsäure (DH-AS), Ascorbat-Oxidase (AO), Glutathion, reduziert (GSH), Glutathion, oxidiert (GSSG), freies Thiol in Glutenproteinen (PSH), Mischdisulfid aus Gluten und Glutathion (PSSG), Cystein (CSH), Cystin (CSSC), Mischdisulfid aus Gluten und Cystein oder Cystin (PSSC), Mischdisulfid aus Glutathion und Cystein oder Cystin (GSSC). Abbildung modifiziert nach Hahn & Grosch 1998, Grosch & Wieser 1999 und Joye et al. (2009).

Die Umwandlung von AS zu DH-AS kann enzymatisch über endogene Ascorbat-Oxidase (AO) oder nicht-enzymatisch über Sauerstoff während des Teigknetens erfolgen. AO wirkt stereospezifisch. Die stereoisomeren Formen der L-*threo*-Ascorbinsäure, D-*threo*-Ascorbinsäure, D-*erythro*-Ascorbinsäure (Isoascorbinsäure) und L-*erythro*-Ascorbinsäure, üben daher kaum teigverbessernde Wirkung aus (Grosch & Wieser, 1999; Kieffer et al., 1990).

DH-AS oxidiert als Co-Substrat des Enzyms Glutathion-Dehydrogenase (GSH-DH) GSH zum Dimer GSSG (Abbildung 5, Reaktion 1). GSSG kann im weiteren Verlauf mit freien Thiolen in Gluten reagieren (Abbildung 5, Reaktion 2). Somit bildet sich ein gewisser Anteil an Mischdisulfiden aus Protein und GSSG (PSSG) sowie freies GSH. Der Gehalt an frei verfügbarem GSH wird jedoch erneut durch AS reduziert. Zudem ist GSSG weniger aktiv als GSH und bevorzugt die Reaktion mit freien Thiolen der Proteine (PSH), sodass keine negativen Auswirkungen nach Abbildung 5, Reaktion 3 auf das Glutennetzwerk entstehen (Hahn & Grosch, 1998; Köhler, 2003a). Durch Minimierung an freiem GSH verringert AS auch die Bildung von Cystein (CSH) durch Verhinderung der SH-SS-Austauschreaktion zwischen GSH und Cystin (CSSC) (Abbildung 5, Reaktion 4). Freies CSH depolymerisiert Glutenproteine (Abbildung 5, Reaktion 5). CSSC kann stattdessen an SH-SS-Austauschreaktion mit freien Glutenthiohlen unter Bildung von Mischdisulfiden (PSSC) beteiligt sein, deren Bildung aber keinen negativen Effekt auf die Teig rheologie hat (Abbildung 5, Reaktion 5 (Grosch & Wieser, 1999; Hahn & Grosch, 1998; Sarwin et al., 1993). Da das GSH für eine potentielle Reaktion nach Abbildung 5, Reaktion 4 jedoch durch den Zusatz von AS entzogen wird, läuft bevorzugt Reaktion 6 ab (siehe Abbildung 5). Das dabei entstehende CSH wird über die Reaktion mit GSSG aus dem System entfernt und damit das Potential zur Spaltung intermolekular vernetzter Glutenine (Abbildung 5, Reaktion 7). Das anfallende GSH wird wiederum durch DH-AS aufgefangen und zu GSSG umgewandelt (Abbildung 5, Reaktion

1). Das Mischdisulfid aus CSH und GSSG (GSSC) reagiert mit freien Glutenthioilen (Abbildung 5, Reaktion 8) (Joye et al., 2009; Kieffer et al., 1990; Sarwin et al., 1993).

Solange GSH durch AS aus dem System entfernt wird, laufen die Reaktionen 1 und 2 in Abbildung 5 wiederholend ab. AS wird dabei regeneriert, weshalb kleine Mengen zur Mehilverbesserung bereits ausreichend sind. Die Wirkung von AS kommt zum Erliegen, wenn kein freies GSH mehr verfügbar ist, weshalb AS nicht überdosiert werden kann. Insofern ist der Einsatz einer Ascorbinsäurekonzentration ab 150 mg/kg in Backwaren, abhängig von der eingesetzten Weizensorte, der Mehllagerung und dem Verarbeitungsprozess, nicht sinnvoll, da keine Effektsteigerung hervorgerufen wird. Üblich sind Ascorbinsäurekonzentrationen von 20–150 mg/kg (Köhler, 2003a).

1.3.4. Enzyme

Enzyme beeinflussen in vielfältiger Weise die Teigeigenschaften und die Charakteristika der Endprodukte. In Backwaren werden Enzyme gegenüber anderen Zusatzstoffen bevorzugt eingesetzt, da sie entsprechend der *Clean Labelling*-Praktik nicht im Zutatenverzeichnis kenntlich gemacht werden müssen (Dai & Tyl, 2021; Vargas & Simsek, 2021).

Transglutaminase (TG, EC 2.3.2.13) zählt als Acyltransferase zu der Enzymklasse der Transferasen und findet in der Lebensmittelindustrie Anwendung in Fleisch- und Fischprodukten sowie Backwaren. Transglutaminase vermittelt die Ausbildung der intra- oder intermolekularen Isopeptidbindung ϵ -(γ -Glutamyl)lysin durch einen Acyltransfer zwischen Lysin und Glutamin (Nonaka et al., 1989). Damit trägt das Enzym zur Proteinvernetzung und Zunahme der Teigstärke bei (Bardini et al., 2018; Ceresino et al., 2020; Gerrard et al., 1998). Glutenproteine enthalten in etwa gleich viel Glutamin; HMW-GS weisen allerdings einen höheren Gehalt an Lysin auf als andere Glutenproteintypen (ca. 36 mol-% Glutamin/Glutaminsäure, 0,7–1,1 mol-% Lysin) (Belitz et al., 2007). Deshalb entstehen durch Transglutaminase gebildete Isopeptidbindungen hauptsächlich in HMW-GS. In einer Nebenreaktion kann TG die Umwandlung von Glutamin in Glutaminsäure katalysieren. Die dadurch hydrophileren Glutenproteine zeigen eine Steigerung der Wasseraufnahmefähigkeit (Gerrard et al., 1998).

Das Substrat von Lipasen (EC 3.1.1.3) sind nicht-polare Lipide (Triacylglyceride), die durch das Enzym in Glycerin, Mono- oder Diglyceride und polare, freie Fettsäuren hydrolysiert werden (Gerits et al., 2014). Lipasen tragen zur Weichheit der Krume, einer verbesserten Teigkonsistenz, der Erhöhung der Elastizität und der Reduktion der Klebrigkeit sowie einer verbesserten Haltbarkeit des Endprodukts bei (Colakoglu & Özkaya, 2012; Moayedallaie et al., 2010; Pourmohammadi & Abedi, 2021b). Es existieren verschiedene mögliche Funktionsmechanismen für Lipasen. Zum einen wird davon ausgegangen, dass die durch die Lipase entstandenen amphiphilen, polaren Lipide die Glutenaggregation zwischen hydrophilen Gliadinen und hydrophoben Gluteninen vermitteln. Zum anderen ist eine Aktivierung endogener Lipoxxygenase durch die bei der Lipolyse entstandenen Fettsäuren möglich, was zur Bildung von Fettsäurehydroperoxiden führt (Frazier et al., 1973; Pourmohammadi & Abedi, 2021b). Diese Hydroperoxide können in nachfolgenden Reaktionen zu Wasserstoffperoxid abgebaut werden. Wasserstoffperoxid kann über einen Radikalmechanismus zur Bildung von Disulfidbindungen führen (Hoseney & Faubion, 1981; Manu & Prasada Rao, 2011; Pourmohammadi & Abedi, 2021b).

Xylanasen (EC 3.2.1.8) katalysieren in Teigen die Hydrolyse von Arabinoxylanen. Durch den Abbau der Arabinoxylane verringert sich unter anderem die Wasserbindekapazität der wasserunlöslichen Arabinoxylane (WU-AX). Dies führt zu einer verbesserten Glutenaggregation und Glutendehnbarkeit, da WU-AX aufgrund der Konkurrenz um Wasser die Glutenbildung stören. Zudem können WU-AX ein Netzwerk ausbilden, das die Mobilität und damit die Netzwerkbildung von Gluteninen beeinträchtigt (Courtin & Delcour, 2002; Wang et al., 2003; Wang et al., 2005). Der Einsatz von Xylanase während der Stärke-Gluten-Trennung im Waschschrift kann negative Effekte auf die Glutenausbeute verhindern (Christophersen et al., 1997).

Cellulasen (EC 3.2.1.4) sind hydrolytische Enzyme, die Cellulose in die Grundbausteine Cellobiose, Glucose und weitere Oligosaccharide umwandeln. Die Anwendung von Cellulase in Teig führt zur Entwicklung eines kontinuierlichen Glutennetzwerks und einer geringeren Krumenhärte, verbesserten sensorischen Eigenschaften und verzögertem Altbackenwerden im Endprodukt (Chauhan et al., 2023; Pourmohammadi & Abedi, 2021a; Weegels et al., 1992).

1.4. Rheologische Methoden zur Bestimmung funktioneller Eigenschaften

1.4.1. Mikrozugversuch

Der Mikrozugversuch wurde 1981 von Rolf Kieffer entwickelt und im Nachhinein einheitlich standardisiert (Kieffer et al., 1981a, 1981b; Scherf & Köhler, 2018). Der Versuchsaufbau ist eine Weiterentwicklung von Versuchen zur Bestimmung rheologischer Größen wie dem Extensographen oder Farinographen, der im Gegensatz zu den ursprünglichen Methoden nur einen Bruchteil an Probenmaterial benötigt (Scherf & Köhler, 2018). Der Versuch beruht auf der uniaxialen Auslenkung von Teig- oder Glutensträngen mit einer definierten Kraft und Geschwindigkeit bis es zum Strangriss der ausgelenkten Probe kommt. Die Auswertung der dabei aufgezeichneten Kraft-Weg-Diagramme gibt Werte wie den maximalen Dehnwiderstand (R_{\max}), die maximale Dehnbarkeit (E_{\max}), die Fläche unterhalb der Kurve (A_{\max}) oder das Verhältnis aus Dehnwiderstand und Dehnbarkeit (R_{\max}/E_{\max}) aus. Die bestimmten Parameter geben objektive Rückschlüsse über die Glutenqualität (Kieffer et al., 1981b; Scherf & Köhler, 2018).

1.4.2. Oszillationsrheologie

Rheologische Messungen geben Aufschluss über das intrinsische Polymerverhalten bei Kraft- und/oder Temperatureinwirkung. Die Messung unter kleiner Deformation gibt dabei einen besseren Eindruck der intakten Struktur und deren Veränderung unter Deformation auf molekularer Ebene als dies unter großen Verformungen wie dem Mikrozugversuch der Fall ist (Ma et al., 2020; Singh & Singh, 2013).

Somit ermöglichen rheologische Messungen Aussagen über die Funktionalität, die Zusammensetzung und die Veränderung des Glutennetzwerks bei mechanischer oder thermischer Beanspruchung. Rheologische Bestimmungen sind Deformationsmessungen eines Materials infolge einer auf das Material ausgeübten Kraft. Die Kraft pro Flächeneinheit wird dabei als Spannung definiert, die resultierende Verformung als Scherung (Belton, 2005; Marsh & Rummel, 2024).

In der Oszillationsrheologie wird die sinusförmig angelegte Scherkraft über zwei Platten auf

das dazwischenliegende Untersuchungsmaterial übertragen. Die Schubspannung wird als in x-Richtung wirkende Kraft an die obere Platte angelegt, während die untere Platte statisch ist und das Material mit Verformung auf die einwirkende Scherkraft reagiert. Ideal elastische Materialien kehren nach Beendigung der Krafteinwirkung in den Ausgangszustand zurück. Diese Eigenschaft der Probe wird als elastisches Modul oder Speichermodul G' beschrieben, da die angelegte Kraft als Energie vom Material absorbiert wird und dadurch der Ausgangszustand wiederhergestellt werden kann. Die meisten Materialien sind nicht rein elastisch, sondern weisen zu einem gewissen oder überwiegenden Anteil ein viskoses Modul oder Verlustmodul G'' auf. Dieses korreliert mit Energieverlust, da durch die Krafteinwirkung Moleküle im Zuge einer Strukturänderung vorübergehend verschoben werden (Marsh & Rummel, 2024).

Wie ein Material auf die Krafteinwirkung reagiert, hängt davon ab mit welcher Frequenz die Krafteinwirkung erfolgt. Bei hoher Frequenz bezogen auf die Zeit, die ein System zur Reorganisation der intrinsischen Struktur benötigt, verhält sich das Material als Festkörper, da das System die Scherkraft vor einer erneuten Deformation nicht durch Relokalisation der Struktur aufnehmen kann. Somit ist das Speichermodul hoch. Bei niedriger Frequenz kann das System der Scherspannung durch Umstrukturierung entgegenwirken und das Speichermodul ist niedrig. Wie sich G' und G'' bei unterschiedlichen Frequenzen verhalten, wird im Frequenzsweep getestet (Belton, 2005). Die Wirkung von kontinuierlicher Temperaturerhöhung auf die Materialstruktur bei gleichbleibender Frequenz kann während eines Temperatursweeps getestet werden und somit die Strukturveränderung von Gluten bei Erhitzung, beispielsweise während des Backprozesses, nachvollzogen werden (Belton, 2005; Marsh & Rummel, 2024).

1.5. Chemisch-analytische Methoden zur Bestimmung der Glutenproteinzusammensetzung und Sekundärstruktur

1.5.1. Osborne-Fraktionierung und Analyse per Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die nach Osborne (1907) in 60%igem Alkohol bzw. unter reduzierenden Bedingungen und Hitze extrahierten Proteine der Gliadin- und Gluteningraktion können chromatographisch jeweils weiter in die einzelnen Glutenproteintypen aufgetrennt und quantifiziert werden. Dafür wird die Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) verwendet, die auf der unterschiedlich stark ausgeprägten Interaktion der Analyten mit der unpolaren stationären Phase und der polaren, mobilen Phase beruht. Aufgrund des Lösungsmittelgradienten der mobilen Phase werden die Analyten je nach Molekülstruktur und der damit verbundenen Oberflächenhydrophobizität und Wechselwirkungen mit den Phasen zu unterschiedlichen Zeitpunkten in einer festgelegten Reihenfolge eluiert. Die Detektion erfolgt über einen Detektor, der ultraviolettes (UV) und sichtbares (VIS) Licht ausstrahlen und messen kann (UV/VIS-Detektor), im Speziellen einen Diodenarray-Detektor (DAD) (Wieser et al., 1998). Die Quantifizierung kann mittels einer Kalibriergerade aus *Prolamin Working Group*-Gliadin (PWG-Gliadin) durchgeführt werden. PWG-Gliadin setzt sich aus Proteinen aus 28 Weizensorten zusammen, welche repräsentativ für die europäischen Hauptproduktionsländer für Weizen, Frankreich, Großbritannien und Deutschland, ausgewählt wurden (Van Eckert et al., 2006). PWG-Gliadin wurde umfassend charakteri-

siert und wird mittlerweile als Standard in der Proteinquantifizierung verwendet (Gabler & Scherf, 2020; Pronin et al., 2020; Segura et al., 2021; Van Eckert et al., 2006; Xhaferaj & Scherf, 2024).

1.5.2. Fraktionierung der Natriumdodecylsulfat-löslichen Proteine und des Gluteninmakropolymers per Größenausschlusschromatographie

GMP stellt als hochmolekulares Gluteninaggregat einen qualitätsbestimmenden Parameter der Proteinfractionen bezüglich der Glutenfunktionalität und Backqualität dar (Thanhaeuser et al., 2014; Wieser, 2007). GMP wird in einem zweistufigen Extraktionsprozess gewonnen, welcher die Extraktion der SDS-löslichen (SDSL) Proteine in einem ersten Schritt und die Extraktion des Rückstands unter reduzierenden Bedingungen in einem zweiten Schritt umfasst. Durch die Analyse mit Größenausschlusschromatographie (SEC-HPLC) kann die GMP-Fraktion weiter in einen niedermolekularen (LMW-GMP) und hochmolekularen Anteil (HMW-GMP) aufgetrennt werden. Die Quantifizierung erfolgt analog der Osborne-Fraktionierung mit PWG-Gliadin. Die Zuordnung der Molekulargewichtsbereiche wird über einen Mix aus verschiedenen Größenmarkern mit bekanntem Molekulargewicht und deren entsprechender Retentionszeit durchgeführt.

1.5.3. Bestimmung der freien und gebundenen Thiole per Ellman-Assay

Die Bestimmung der freien und gebundenen Thiole kann Aufschluss über Vorgänge auf molekularer Ebene innerhalb des Glutennetzwerks geben wie beispielsweise SH-SS-Austauschreaktionen oder die Bildung neuer Disulfidbrücken und die damit zunehmende Vernetzung des Glutennetzwerks und Konformationsänderungen (Chen et al., 2018; Gómez et al., 2013b; Tuhumury et al., 2014). Freie Thiole können aufgrund ihrer hohen Reaktivität direkt nachgewiesen werden, Disulfide müssen dagegen zunächst reduziert werden. Die Entfernung des reduzierenden Agens ist dabei essentiell, da dieses ansonsten das Nachweisreagenz degradiert und die Messung verfälscht (Winther & Thorpe, 2014). Eine einfache Methode zur Thiolbestimmung wurde 1959 von George L. Ellman (1959) entwickelt. Diese beruht auf der kolorimetrischen Thioldektion mittels in leicht alkalischem Medium wasserlöslicher 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) (Ellman, 1959). DTNB wird stöchiometrisch durch freie Thiole des Analyten reduziert und bildet dabei Mischdisulfide sowie ein Molekül 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB^-) (siehe Abbildung 6). Das Mischdisulfid kann zwar durch die Reaktion mit einem weiteren Analytmolekül aufgelöst werden, jedoch bildet sich damit ein weiteres Molekül TNB^- (siehe Abbildung 6). TNB^- zeigt im Gegensatz zu DTNB eine stark gelbe Färbung und kann bei einer Wellenlänge von 412 nm photometrisch detektiert werden (Ellman, 1959; Winther & Thorpe, 2014).

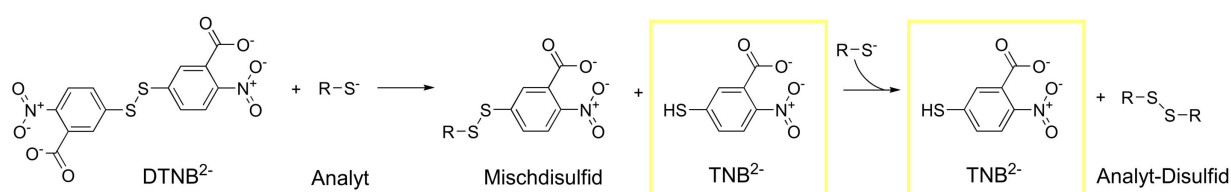


Abbildung 6: Reaktion von freien Thiolen mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) zur kolorimetrischen Detektion von 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB) im Ellman-Assay. Abbildung modifiziert nach Winther & Thorpe 2014.

1.5.4. Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse von Proteinen (Proteomanalyse oder *Proteomics*) kann über *Top-down*- oder *Bottom-up-Proteomics* erfolgen. *Top-down-Proteomics* umschreibt die massenspektrometrische Analyse intakter Proteine, während bei *Bottom-up-Proteomics* die Proteine vor der massenspektrometrischen Analyse enzymatisch zu Peptiden verdaut werden. *Bottom-up-Proteomics* liefert Informationen über die Masse und Aminosäurezusammensetzung der enthaltenen Peptide und ermöglicht so Rückschlüsse auf die Identität der zugehörigen Proteine. Auf diese Weise können die in der Probe enthaltenen Proteine bzw. Peptide identifiziert und quantifiziert werden (Gross, 2019; Matissek & Fischer, 2021). So lassen sich beispielsweise bestimmte immunreaktive Peptide nachweisen, die als Auslöser für Zöliakie oder andere mit Weizen oder Gluten in Verbindung stehende Erkrankungen gelten (Alves et al., 2019).

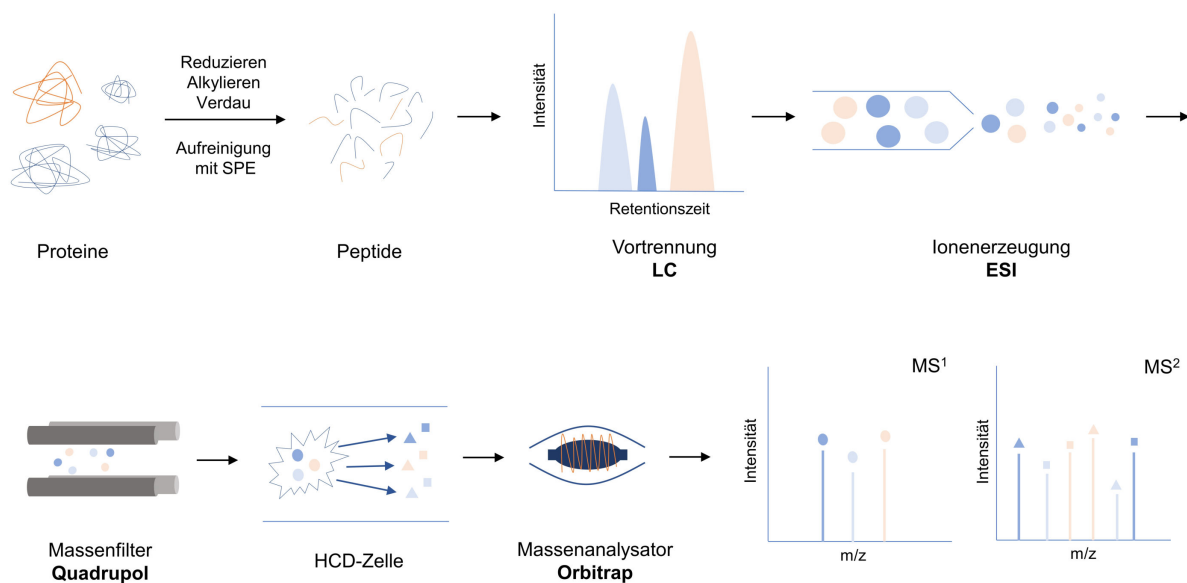


Abbildung 7: Übersicht der *Bottom-up-Proteomics* von der Aufarbeitung der Proteine bis zur massenspektrometrischen Messung per Tandem-Massenspektrometrie mit Flüssigkeitschromatographie (LC-MS/MS). SPE: Festphasenextraktion, LC: Flüssigkeitschromatographie, HCD-Zelle: mit Gas gefüllte Stoßzelle, ESI: Elektrospray-Ionisation, m/z : Masse/Ladungs-Verhältnis. Abbildung modifiziert nach Michalski et al. (2011), Li et al. (2021), Sochorová et al. (2022) und Meyer et al. (2022).

Für *Bottom-up-Proteomics* wird häufig Tandem-Massenspektrometrie gekoppelt mit Flüssigkeitschromatographie (LC-MS/MS) verwendet (siehe Abbildung 7). Der Standard-Workflow schließt die Reduzierung intra- und intermolekularer Disulfidbindungen, die Alkylierung freier Thiole und den anschließenden Verdau der Proteine mit Enzymen (z.B. Trypsin) zu Peptiden sowie die Aufreinigung über Festphasenextraktion (*Solid-Phase Extraction*, SPE) ein (Lottspeich et al., 2022; Matissek & Fischer, 2021; Suttapitugsakul et al., 2017). Vor der massenspektrometrischen Analyse wird die Probe durch ein vorgeschaltetes HPLC-System von störenden Matrixbestandteilen befreit und aufgetrennt.

Für die Massenbestimmung müssen Peptide als positiv geladene Teilchen vorliegen. Der Vortrennung per HPLC folgt daher eine Ionisationsquelle, in der bei flüssigkeitschromatographischer

Trennung unter anderem das Lösungsmittel, in dem sich der Analyt befindet, entfernt wird. Eine häufig verwendete Methode ist die Elektrospray-Ionisation (ESI), bei der die Probe in einem Hochspannungsfeld mit einem Inertgas vernebelt wird und in geladene Teilchen übergeht. Im darauffolgenden Massenfilter, beispielsweise einem Quadrupol, werden Analyten mit bestimmten Masse/Ladungs-Verhältnissen (m/z) selektiert. Bei nicht zielgerichteten (*untargeted*) Analysen kann ein Massenbereich als Filter ausgewählt werden. Zielgerichtete (*targeted*) Analysen ermöglichen die selektive Identifizierung und Quantifizierung einzelner m/z -Verhältnisse.

Die Selektion und weitere Fragmentierung der Ionen kann durch unterschiedlich konzipierte Bauteile erfolgen, basiert aber auf ähnlichen Prinzipien. In einer mit Gas gefüllten Stoßzelle (z.B. *Higher-energy Collisional Dissociation* (HCD)-Zelle) werden die Ionen in MS/MS-Systemen weiter zu kleineren Tochterionen fragmentiert. Diese Fragmente werden bei Orbitrap-Systemen schließlich in die Orbitrap-Ionenfalle geleitet, in der die m/z -Verhältnisse bestimmt werden. Bei datenabhängiger Aufzeichnung (*Data Dependent Acquisition*, DDA) wird zunächst ein Übersichtsscan (MS^1) aller eluierender Peptide erstellt. Aus diesem werden durch eine Software die intensitätsstärksten Signale zur weiteren Fragmentierung ausgewählt und in einem weiteren Spektrum (MS^2) aufgezeichnet (siehe Abbildung 7). Bei der datenunabhängigen Aufzeichnung (*Data Independent Acquisition*, DIA) werden dagegen unabhängig von der Intensität der Vorläuferionen Fragmentationen produziert und aufgezeichnet (Lottspeich et al., 2022).

Durch spezifische Fragmentierungsmuster der Peptide kann zunächst die Aminosäuresequenz der Peptide bestimmt werden. Durch bestimmte Software (z.B. MaxQuant mit der integrierten Suchmaschine Andromeda) und den Vergleich mit Datenbanken, die Einträge von Proteinen des Weizenproteoms enthalten (z.B. UniProt), können die identifizierten Peptide anschließend über einen probabilistischen Ansatz bestimmten Proteinen zugeordnet werden (Matissek & Fischer, 2021; Meyer et al., 2022). Hierbei können Parameter wie variable oder feste Modifikationen der Proteine, das zum Verdau verwendete Enzym oder der Wert für die Anzahl der falsch-positiv identifizierten Übereinstimmungen zwischen Peptiden und Proteinen (*False Discovery Rate*, *FDR*) angepasst werden.

1.5.5. Raman-Spektroskopie

Die Raman-Spektroskopie ist eine nicht-invasive Methode zur Untersuchung der Schwingungsspektren von Molekülen und Kristallen. Sie dient unter anderem zur Strukturaufklärung, zur Identifikation der Sekundärstruktur, zur Identifikation der chemischen Zusammensetzung oder des Einflusses thermischer und mechanischer Belastung von Stoffen. Schwingungsspektren entstehen durch die elastischen Bindungen zwischen Atomen und ihre Eigenschaft bei Anregung zu schwingen. Die Frequenzen und Intensitäten werden dabei durch die Molekülstruktur bestimmt. Da jede Bindung eines Moleküls ein Signal bei einer charakteristischen Frequenz zeigt, entstehen molekülspezifische „Fingerabdrücke“, die zur Identifizierung von Stoffen genutzt werden können (Schrader, 1973). Bei der Untersuchung von Vitalkleber werden Ramanspektren in erster Linie zur Aufklärung der Sekundärstruktur genutzt (Ferrer et al., 2011; Nawrocka et al., 2015; Nawrocka et al., 2016a, 2016b; Sadat et al., 2022).

Molekülschwingungen können durch die Einstrahlung von Photonen angeregt werden (Schrader, 1973). Im Falle der Raman-Spektroskopie werden hierfür monochromatische UV/VIS-Licht-

quellen oder Nahinfrarot-Strahlung wie beispielsweise Laser verwendet (Sadat et al., 2019). Der Großteil der einfallenden Strahlung wird von den Molekülen elastisch gestreut, d.h. die Energie des einfallenden Lichts gleicht der Energie des gestreuten Lichts (Rayleigh Streuung). Bei einem kleinen Teil der Photonen ist die Energie des gestreuten Lichts jedoch ungleich der Energie des einfallenden Lichts. Diese unelastische oder Raman-Streuung wird Stokes-Raman-Streuung bei einer Energieabnahme der Photonen genannt und als Anti-Stokes-Raman-Streuung bezeichnet, wenn die Energie der gestreuten Photonen höher ist als die der eingestrahlt. Die Energiedifferenz aus einfallendem und gestreutem Licht wird als Raman Verschiebung bezeichnet (Sadat et al., 2019).

Die zur Auswertung von Ramanspektren von Proteinen am häufigsten genutzte Raman-Bande ist die Amid I-Bande (Ferrer et al., 2011; Nawrocka et al., 2015; Nawrocka et al., 2016a, 2016b; Sadat et al., 2022). Diese entsteht in erster Linie durch $C=O^-$ und einen geringeren Anteil N-H-Streckschwingungen des Polypeptidrückgrats der Aminosäuren ohne großen Einfluss der Aminosäureseitenketten. Daher eignet sich dieser Spektrumbereich besonders zur Auswertung von Sekundärstrukturelementen. Die einzelnen Sekundärstrukturelemente weisen spezifische Positionen der Raman Verschiebungen innerhalb der Amid I-Bande auf und können daher exakt zugeordnet werden. Auch einzelne Aminosäuren zeigen charakteristische Raman Verschiebungen. Phenylalanin verursacht durch die Schwingung des Benzenrings ein Signal, das unempfindlich gegenüber Konformationsänderungen ist und daher zur Normalisierung des Ramanspektrums genutzt werden kann. Tryptophan kann durch die Vibration des Indolrings und Tyrosin über den typischen Doppelpeak identifiziert werden (Kuhar et al., 2021).

Der Vorteil der Raman-Spektroskopie im Vergleich zur komplementär genutzten Infrarot-Spektroskopie (IR-Spektroskopie) liegt in der Detektion unpolarer Moleküle oder symmetrischer Bindungen wie Disulfidbindungen, die nicht IR-aktiv sind, da sie kein veränderbares oder induzierbares Dipolmoment besitzen. Die Raman-Spektroskopie beruht auf der Polarisierbarkeit eines Moleküls. Weitere Vorteile der Raman-Spektroskopie bestehen in der guten Eignung von Wasser als Lösungsmittel, da dieses nur ein schwaches Raman-Signal verursacht und in der unproblematischen Messung von farbigen, stark absorbierenden Stoffen. Lediglich fluoreszierende Materialien interferieren mit der Raman-Messung, da der Raman-Effekt im Vergleich zur Fluoreszenz sehr schwach ausgeprägt ist (Sadat & Joye, 2020). Die Raman-Spektroskopie von Gluten in dieser Arbeit dient zur Aufklärung von Veränderungen in der Sekundärstruktur und Konformationsänderungen der Proteine durch unterschiedliche Zusätze und kann so Aufschluss über die Wirkungsweise der Zusätze und die Interaktion zwischen Zusatz und Proteinen geben.

2. Zielsetzung

Als Naturprodukt ist Weizen natürlichen Umweltbedingungen wie Klima und Bodenbeschaffenheit sowie steuerbaren, aber standortbedingten Faktoren wie Düngung ausgesetzt. Dadurch weist der Rohstoff Weizen Qualitätsunterschiede auf, die sich unweigerlich auf die aus Weizen gewonnenen Erzeugnisse Stärke und Gluten übertragen. Die Prozessparameter der Stärkegewinnung werden primär auf eine gleichbleibende Stärkequalität ausgerichtet, beeinflussen damit aber zeitgleich die Eigenschaften des Nebenprodukts Vitalkleber. Dieser Umstand bedingt die Existenz zahlreicher verschiedener Vitalkleberqualitäten auf dem Markt. Die Anpassung der Vitalkleberqualität erfordert eine Adaption der Prozessparameter. Die Stärkegewinnung beruht auf einem in sich geschlossenen, etablierten Prozess. Ein der Glutenisolation nachgeschalteter Modifikationsschritt ließe sich daher leichter in den konventionellen Prozessablauf integrieren.

Das Ziel der vorliegenden Studie war aus diesem Grund die systematische Untersuchung des Einflusses der Nachbehandlung von Gluten in Kombination mit verschiedenen Trocknungs- und Vermahlungsbedingungen auf die Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität sowie Sekundärstruktur. In einem der Glutenisolation folgenden Schritt sollten dazu verschiedene Zusätze wie Salze (NaCl , KCl , MgCl_2 , CaCl_2), der Emulgator Polysorbat 20, Ascorbinsäure und die Enzyme Transglutaminase, Lipase, Xylanase und Cellulase in verschiedenen Konzentrationen in den Feuchtkleber einer industrieüblichen Weizenmehlmischung eingearbeitet werden.

Der Einfluss der Zusätze auf die Glutenfunktionalität sollte durch dehn- und scherrheologische Messungen der behandelten Feuchtkleber evaluiert werden. Zur Bewertung der Veränderung der Glutenproteinzusammensetzung sollten diese Messungen durch chemisch-analytische Methoden zur Bestimmung der Glutenproteintypen per Osborne-Fraktionierung und RP-HPLC, der Analyse des Gehalts an SDS-löslichen Proteinen und GMP per SEC-HPLC sowie der Untersuchung des Gehalts an freien und gebundenen Thiolen per Ellman-Assay erweitert werden. Ergänzt werden sollten diese Analysen durch die Bestimmung der Sekundärstruktur der Vitalkleberproben über Raman-Spektroskopie sowie durch massenspektrometrische *Proteomics*-Untersuchungen per LC-MS/MS.

Ein weiteres Ziel bestand in der Aufklärung des synergistischen Effekts aus der Behandlung von Gluten mit Salzen und Temperatur während des Auswaschens und nach erfolgter Glutenisolation. Zudem sollten zur Bewertung des Einflusses verschiedener Mehlqualitäten und -sorten die effektstärksten Zusätze neben der industrieüblichen Weizenmehlmischung in zwei weiteren, sortenreinen Mehlen getestet werden.

Die Literatur bietet bereits zahlreiche Publikationen zu den Effekten verschiedener Zusätze auf Teigeigenschaften und die Qualität von Endprodukten. Bisher wurden jedoch noch keine Untersuchungen zur Nachbehandlung von Gluten durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie sollen daher zum einen Aufschluss über die Möglichkeiten einer gezielten Steuerung der Vitalkleberqualität geben, sie sollen aber auch grundsätzliche Erkenntnisse über die posttranslationale Veränderbarkeit eines bereits vollständig ausgebildeten Glutennetzwerks leisten. Eine anwendungsorientierte und gezielte Produktion von Vitalkleber mit definierten Eigenschaften soll die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von Vitalkleber in der Lebensmittel- und Non-Food-Industrie verbessern und ausbauen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Etablierung eines Workflows für die Herstellung von Feucht- und Vitalkleberproben

Für die Herstellung von Feucht- und Vitalkleberproben wurde ein Standard-Workflow etabliert. Der Workflow wurde so konzipiert, dass einzelne Prozessparameter, d.h. variable, steuerbare Größen während des Herstellungsprozesses der Vital- und Feuchtkleberproben, separat angepasst werden konnten. So konnte sowohl der individuelle als auch synergistische Einfluss von Größen wie der Salzkonzentration, der Trocknungstemperatur der Feuchtkleberproben und der Vermahlungsbedingungen auf die Glutenproteinzusammensetzung bzw. -funktionalität beurteilt werden.

Zunächst wurde im Farinographen die ideale Wasseraufnahmemenge der industrieüblichen Mehlmischung zur Erreichung einer Teigkonsistenz von 500 Brabender-Einheiten ermittelt. Dies gewährleistet eine gleichmäßige Teigkonsistenz und verringert die Variabilität der resultierenden Glutenqualität. Dieser Ansatz wurde auf das Mischen von Mehl und Wasser in einem Becherglas mit einem Spatel herunterskaliert. Die Knetdauer entsprach dabei der zuvor im Farinographen ermittelten Teigentwicklungszeit. Der anfängliche Mischschritt in den Glutomatic-Waschkammern, der nach ICC-Norm 137/1 zur Bestimmung des Feuchtglutengehalts in Weizenmehl durchgeführt wird, um trockenes Mehl und Wasser zu verkneten, wurde übersprungen, um ein Verstopfen der Polyamidsiebe der Waschkammern zu vermeiden.

Der Teig wurde anschließend mit der Glutomatic ausgewaschen. Gemäß der ICC-Norm 137/1 wird als Waschlösung für die Glutenisolierung standardmäßig eine 2%ige NaCl-Lösung verwendet. Da in dieser Studie jedoch u.a. der Einfluss von Salzen auf die Zusammensetzung und Funktionalität der Glutenproteine untersucht wurde, wurde stattdessen entsalztes Wasser verwendet. Nach dem Auswaschen wurde der isolierte Feuchtkleber in die Glutomatic-Zentrifuge gegeben, um überschüssiges Wasser aus dem vorherigen Waschschrift zu entfernen. Zur Einarbeitung der Zusätze wurde das feuchte Gluten mit der entsprechenden Menge des Zusatzstoffs (Salz in fester Form, PS 20 als viskose Flüssigkeit, AS als Lösung) in einer elektrischen Kaffeemühle eingearbeitet.

Die Dosage der Salze wurde jeweils auf die Kationenkonzentration angepasst. Dies bedeutet, dass in jeder Probe unabhängig vom verwendeten Salz die gleiche Anzahl positiver Ladungen enthalten war, um die Vergleichbarkeit des Einflusses der Kationen zu wahren. Die molare Konzentration und die Menge des zugegebenen Salzes basierten auf der Menge von 3 % bzw. 0,5 % NaCl (w/w) in einer definierten Menge Feuchtkleber. Demnach wurden für die einwertigen Salze KCl und NaCl eine niedrige Dosis von 0,086 mmol/g Feuchtkleber bzw. eine hohe Dosis von 0,513 mmol/g Feuchtkleber dosiert. Für die zweiwertigen Salze $MgCl_2$ und $CaCl_2$ wurde die erforderliche Menge entsprechend halbiert (0,043 mmol/g und 0,257 mmol/g). Die exakten Salzdosierungen sind in Tabelle 20 angegeben.

Für die Trocknung des Feuchtklebers wurden verschiedene Trocknungsmethoden getestet. Der Feuchtkleber wurde von Hand zu Kügelchen mit einem Durchmesser von etwa 4 mm gerollt und in einem Trockenschrank durchgehend getrocknet. Da der Feuchtkleber jedoch durch bestimmte Zusatzstoffe sehr klebrig wurde und die Trocknungszeit bei 40 °C selbst bei diesem kleinen

Durchmesser 5 h betrug, war diese Methode sehr zeitaufwändig und daher wenig praktikabel. Im Folgenden wurde der Feuchtkleber zwischen zwei Teflonformen zu flachen Plättchen gepresst. Dies gewährleistete eine gleichmäßige Dicke des Feuchtklebers und damit eine gleichmäßige Trocknung im Trockenschrank. Zur Trocknung der Feuchtkleberproben wurden Temperaturen von 40 °C, 65 °C und 80 °C sowie Gefriertrocknung (GT) getestet (Ergebnisse siehe 3.2.1).

Die Trocknungszeit wurde für alle Temperaturen, bei denen die Glutentrocknung getestet wurde, auf 4 h festgelegt, um den Einfluss des Zeitfaktors bei der Untersuchung des Temperatureinflusses zu eliminieren. Nach dem Trocknen wurden die Glutenproben in der Ultrazentrifugalmühle vermahlen. Es wurden verschiedene Siebmaschenweiten und Drehzahlen getestet, um den Einfluss dieser Parameter auf die Zusammensetzung der Glutenproteine zu beurteilen (Ergebnisse siehe 3.2.2). Die Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung wurde durch die separate Herstellung von drei Replikaten sichergestellt, die mittels Osborne-Fraktionierung analysiert wurden. Der Gehalt der Glutenproteintypen der drei Replikate unterschied sich nicht signifikant voneinander (ANOVA, Tukey's-Test, $p > 0,05$). Die Glutenausbeute des optimierten Arbeitsablaufs ausgehend von 20 g Mehl betrug ca. 5 g Feuchtkleber, aus dem sich etwa 2 g Vitalkleber ergaben.

3.2. Einfluss der Prozessparameter auf die Glutenproteinzusammensetzung

Um die Gewichtung der Auswirkung verschiedener Prozesseinflüsse abschätzen zu können, wurden einzelne Prozessparameter zunächst separat analysiert. Zur Bewertung des Einflusses der Temperatur während der Trocknung von Feuchtkleber sowie der Vermahlungsbedingungen zur Pulverisierung von Gluten auf die Glutenproteinzusammensetzung der Vitalkleberproben wurde die Osborne-Fraktionierung durchgeführt.

3.2.1. Einfluss der Trocknungstemperatur

Um den Einfluss der Temperatur auf die Glutenproteinzusammensetzung zu untersuchen, wurde Feuchtkleber analog des standardisierten Workflows ohne Zusatzstoffe 4 h lang bei 40 °C, 65 °C und 80 °C in einem Trockenschrank getrocknet bzw. gefriergetrocknet. Die getrockneten Glutenproben wurden anschließend in einer Ultrazentrifugalmühle mit einer mittleren Siebmauschengröße von 200 µm und einer mittleren Drehzahl von 18 930 × g gemahlen. Anschließend wurden die Proben mittels Osborne-Fraktionierung (siehe 5.4.2) auf ihre Glutenproteinzusammensetzung hin untersucht.

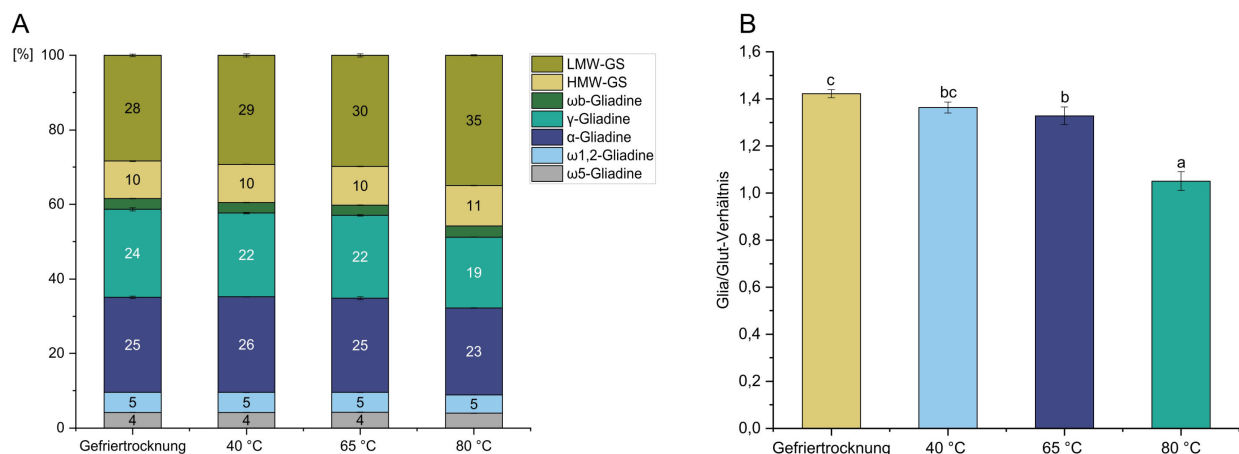


Abbildung 8: Anteile der *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS) und der Glutenproteintypen α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine bei verschiedenen Trocknungstemperaturen (A) und das Verhältnis von Gliadin zu Glutenin (GliA/Glut) (B). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n = 3$). Signifikante Unterschiede zwischen den Vitalkleberproben sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet (ANOVA, Tukey's-Test, $p \leq 0,05$).

Der Gehalt an Gliadinen reichte von 419,4 mg/g bis 483,7 mg/g (siehe Abbildung 8 und Tabelle 21). Er war am höchsten in der gefriergetrockneten Probe und nahm mit steigender Trocknungstemperatur ab, war jedoch in der bei 65 °C getrockneten Probe höher als in der bei 40 °C getrockneten Probe. Der Verlust an Gliadinen war hauptsächlich auf den reduzierten Gehalt von α - und γ -Gliadinen durch die Wärmebehandlung zurückzuführen. Der Gehalt an Gluteninen reichte von 319,2 mg/g in der bei 40 °C getrockneten Probe bis zu 396,8 mg/g in der bei 80 °C getrockneten Probe. Der Gluteningehalt nahm mit steigender Trocknungstemperatur zu. Die bei 65 °C getrocknete Probe enthielt allerdings mehr Glutenine als die gefriergetrocknete Probe. Der Unterschied im Gluteningehalt ist durch eine höhere Extrahierbarkeit von LMW-GS in Proben, die

bei einer höheren Temperatur behandelt wurden, zu begründen.

Ein Grund für die unterschiedliche Proteinextrahierbarkeit von Proben, die bei verschiedenen Temperaturen behandelt wurden, ist die Bildung von kovalenten Disulfidbindungen und nicht-kovalenten Bindungen. Bei hoher Feuchtigkeit und Temperatur während der Trocknung können die cysteinhaltigen Glutenine intra- und intermolekulare Disulfidbrücken bilden, wodurch es zur Entstehung großer Gluteninaggregate kommen kann. Die cysteinhaltigen Gliadinproteintypen α - und γ -Gliadine können entweder durch SH-SS-Austauschreaktionen oder durch eine ungerade Anzahl an Cysteinresten und die Ausbildung intermolekularer Verbindungen in das Gluteninnetzwerk eingebaut werden. Dies geschieht bevorzugt, wenn α - und γ -Gliadine Hitze ausgesetzt sind (Lagrain et al., 2011; Tatham & Shewry, 1985).

Proteine, die intermolekulare Disulfidbindungen aufweisen, können nur nach Reduktion der Disulfidbindung extrahiert und analysiert werden. Da die Gliadinfraktion bei der Osborne-Fraktionierung jedoch unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit wässriger Ethanollösung extrahiert wird, ist die Extrahierbarkeit von α - und γ -Gliadinen in temperaturbehandelten Proben reduziert (Lagrain et al., 2011). Die Extrahierbarkeit von ω 5- und ω 1,2-Gliadinen bleibt bei 40 °C bzw. 80 °C weitgehend unverändert, da ω -Gliadine keine Cysteinreste aufweisen und daher keine SS-Brücken bilden können (Rombouts et al., 2012; Tatham & Shewry, 1985).

Die Erhitzung von Gluten bedingt die Exposition hydrophober Bereiche. Dies führt zu Protein-Protein-Wechselwirkungen unter Entstehung weiterer nicht-kovalenter Bindungen, sowie der Stabilisierung der entstandenen Proteinaggregate durch Disulfidbindungen mit zunehmender Temperatur (Weegels et al., 1994). Kovalente SS-Bindungen sind unter den reduzierenden Bedingungen der Gluteninextraktion der Osborne-Fraktionierung reversibel, sodass die Proteinextrahierbarkeit durch die Bildung von SS-Quervernetzungen nicht negativ beeinträchtigt wird.

Neben der Analyse der Gehalte der einzelnen Proteinunterfraktionen ist das Gliadin/Glutenin-Verhältnis ein hilfreiches Instrument zur Veranschaulichung der durch die Temperaturbehandlung verursachten relativen Veränderungen der Proteinverteilung. Der Vergleich ist insbesondere deshalb hilfreich, da die Gesamtproteinextrahierbarkeit zwischen Proben mit unterschiedlicher Behandlung leicht abweichen kann und die Betrachtung der relativen Werte bzw. des Verhältnisses aussagekräftiger als die absoluten Werte ist.

Das Gliadin/Glutenin-Verhältnis der temperaturbehandelten Proben lag zwischen 1,42 und 1,06. Es war bei der gefriergetrockneten Probe am höchsten und nahm mit steigender Trocknungstemperatur ab. Im Gegensatz zu den absoluten Gliadin- und Gluteningehalten folgte das Gliadin/Glutenin-Verhältnis damit einem klaren Trend bezüglich der Trocknungstemperatur.

3.2.2. Einfluss der Vermahlungsbedingungen

Um die Wirkung verschiedener Siebmaschengrößen und Drehzahlen bei der Pulverisierung von getrocknetem Gluten zu Vitalkleber zu untersuchen, wurden Proben ohne Zusätze bei 40 °C getrocknet und in einer Ultrazentrifugalmühle vermahlen. Getestet wurde die Kombination von Siebmaschenweiten von 80 μ m, 200 μ m und 500 μ m und Drehzahlen von 4 030 \times g und 44 800 \times g. Die so erhaltenen Vitalkleberproben wurden der Osborne-Fraktionierung unterzogen, um die Auswirkung der Mahlparameter auf die Zusammensetzung der Glutenproteine be-

werten zu können.

Der Gehalt an Gliadinen war bei 4030 × g am geringsten und war zudem umso niedriger, je größer die Siebmaschengröße war (siehe Abbildung 9 und Tabelle 22). Der Gehalt an Gluteninen zeigte den gegenteiligen Effekt und war bei höherer Drehgeschwindigkeit und bei kleineren Siebmaschengrößen geringer. Diese Beobachtungen spiegelten sich auch in den Gliadin/Glutenin-Verhältnissen wider, die bei geringerer Siebmaschengröße höher waren, ebenso wie bei der höchsten Drehzahl. Somit wirkte eine höhere mechanische Belastung bei höherer Drehzahl und geringerer Siebmaschengröße auf die Glutenproben. Unterschiede zwischen den Proben wurden daher vor allem zwischen der kleinsten und der größten Siebmaschengröße in Kombination mit der niedrigsten und der höchsten Drehzahl oder bei Glutenproteintypen festgestellt (siehe Abbildung 9 und Tabelle 22).

Die Abnahme des Gliadiningehalts und die Zunahme der Glutenine mit zunehmender Siebmaschengröße und die damit verbundene Veränderung des Gliadin/Glutenin-Verhältnisses weisen auf strukturelle Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur der Glutenproteine während der Vermahlung hin (Vogel et al., 2018). Die Abnahme des Gliadiningehalts kann durch einen Transfer der ethanollöslichen Gliadine in die Gluteninfraktion erklärt werden. (Kieffer et al., 2007; Vogel et al., 2018). α - und γ -Gliadine enthalten Cysteinreste, die in einer SH-SS-Austauschreaktion mit Gluteninen vernetzt werden können. Solche strukturellen Veränderungen in der Gliadinfraktion treten bei hoher mechanischer und thermischer Belastung auf. Da ω 5- und ω 1,2-Gliadine keine Cysteinreste enthalten, werden diese Proteinfractionen durch mechanische und thermische Belastung kaum beeinflusst (Vogel et al., 2018).

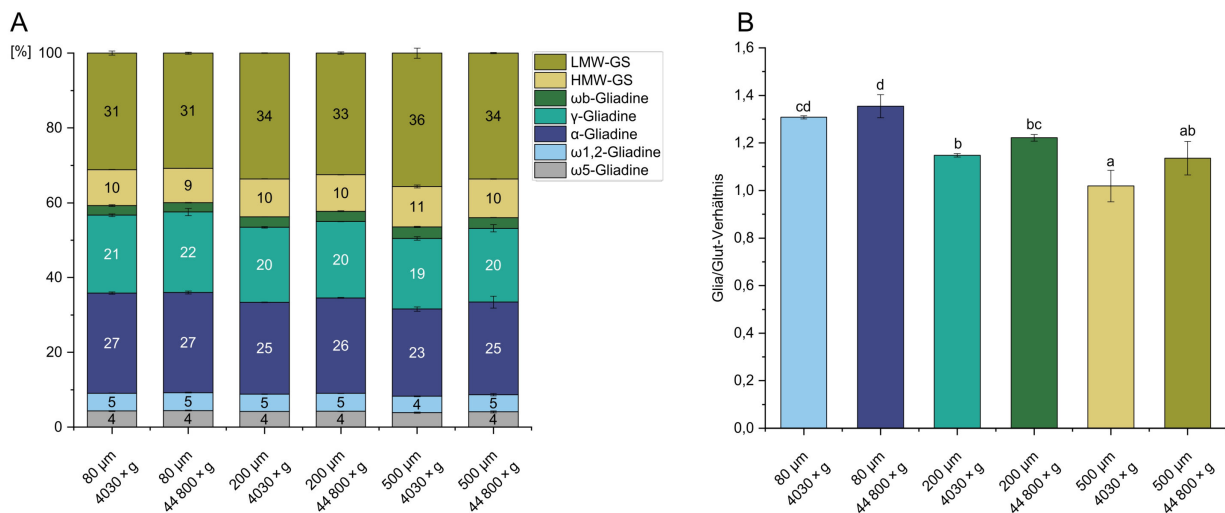


Abbildung 9: Anteile der *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS) und der Glutenproteintypen α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine bei verschiedenen Vermahlungsparametern (A) und das Verhältnis von Gliadin zu Glutenin (Glia/Glut) (B). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n = 3$). Signifikante Unterschiede zwischen den Vitalkleberproben sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet (ANOVA, Tukey's-Test, $p \leq 0,05$).

Eine weitere Erklärung für die Veränderung des Gehalts an Gliadin- und Gluteninproteinen könnte die Entstehung von Aggregaten sein, die Nicht-SS-Bindungen wie Isopeptide, Thioether oder Amidbindungen wie LAN enthalten, die sich aufgrund von mechanischer und thermischer Belastung während des Mahlvorgangs bilden. Solche Aggregate sind unter den reduzierenden Bedingungen der Osborne-Fraktionierung nicht extrahierbar und können daher nicht mittels Osborne-Fraktionierung bestimmt werden, reduzieren aber die Proteinextrahierbarkeit (Vogel et al., 2018).

Zu einem gewissen Teil kann die veränderte Extrahierbarkeit der Glutenproteine durch ein Brechen der eher labilen Disulfidbindungen durch den mechanischen Energieeintrag begründet werden. MacRitchie (1975) zeigte, dass beim Kneten von Teig unter hohem Energieeintrag zum einen zuerst schwache Bindungen gebrochen werden (Disulfidbindungen sind labiler als Peptidbindungen) und zum anderen große Proteinaggregate bevorzugt degradiert werden.

Die Unterschiede zwischen den Proben wurden insgesamt als so gering erachtet, dass eine Variation der Mahlbedingungen nicht weiterverfolgt wurde. Stattdessen wurden für die weitere Probenvorbereitung eine mittlere Siebmaschengröße (200 µm) und eine mittlere Drehgeschwindigkeit ($18\,930 \times g$) verwendet, um die Verweilzeit und den Temperatureffekt in der Ultrazentrifugalmühle möglichst gering zu halten. Da nur kleine Probenmengen ($< 2\text{ g}$) in der Ultrazentrifugalmühle in kurzer Zeit ($< 10\text{ s}$) gemahlen wurden, ist es somit unwahrscheinlich, dass die thermische und mechanische Belastung der Vermahlung in großem Umfang zu den genannten Effekten beitrug. Außerdem ist davon auszugehen, dass das Einbringen der Zusätze in der Kaffeemühle und der vierstündige Trocknungsprozess einen deutlich größeren mechanischen bzw. Temperatureffekt auf die Glutenproteine bewirkt als die Vermahlung und der Einfluss auf die Proteine während des Mahlvorgangs daher vernachlässigbar gering sind.

3.3. Einfluss von Zusätzen auf die Glutenproteinfunktionalität

Die Inhalte aus 3.3.1.1 und 3.3.2.1 wurden teilweise bereits im Journal of Cereal Science veröffentlicht Höller & Scherf (2024).

Die in Feuchtkleber getesteten Zusätze sind allesamt als Zusatzstoffe in Lebensmitteln zugelassen und stellen überwiegend in der Backwarenindustrie bewährte Zusätze dar. Die Salze wurden so ausgewählt, dass lediglich das Kation, nicht aber das Anion verändert wurde, um den Einfluss des Kations auf die Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität entsprechend der Hofmeisterreihe bewerten zu können. Für die Konzentrationen der Zusätze wurde eine geringere und eine höhere Dosis der üblicherweise in der Industrie verwendeten Dosierung des jeweiligen Zusatzes eingesetzt, um zwei Extrema der Wirkung der Zusätze auf die Glutenproteine abbilden zu können.

Die Funktionalität der Feuchtkleberproben wurde durch den dehn rheologischen Mikrozugversuch und mit scherrheologischen Versuchen am Rheometer (Amplitudensweep, Frequenzsweep, Temperatursweep) bestimmt. Rheologische Unterschiede unter anderem in der Dehnbarkeit, der Elastizität und der Viskosität zwischen den Feuchtkleberproben ermöglichten Rückschlüsse auf durch die Zusätze hervorgerufene Veränderungen im Glutennetzwerk. Darüber konnte eine Einschätzung der Funktionalität angestellt werden.

3.3.1. Einfluss von Zusätzen auf die uniaxiale Dehnung von Gluten

3.3.1.1. Salze

Der Mikrozugversuch dient zur Bestimmung des Dehnwiderstands (R_{\max}) und der Dehnbarkeit (E_{\max}) eines Teig- oder Glutenstrangs durch Messung der Kraft und der Ausdehnung, die aufgebracht werden muss, um einen Strang zum Reißen zu bringen. Der Test wurde für alle Salze mit einer hohen und niedrigen Salzdosierung durchgeführt. Die beiden Parameter Dehnwiderstand und Dehnbarkeit sind von besonderem Interesse für die Bewertung der Funktionalität der Feuchtkleberproben.

Der Dehnwiderstand lag bei allen salzbehandelten Feuchtkleberproben und der Kontrollprobe ohne Zusatz zwischen 0,91 N und 1,47 N (-34,1 % bis +5,5 % Ab-/Zunahme im Vergleich zur Kontrolle) (siehe Abbildung 10, Tabelle 23 und 31). Für alle einwertigen (KCl und NaCl) und zweiwertigen ($MgCl_2$ und $CaCl_2$) Kationen ergaben sich ähnliche Werte für den Dehnwiderstand. Die Proben mit 3,00 % NaCl (1,47 N) und 3,83 % KCl (1,4 N) zeigten den größten Dehnwiderstand, unterschieden sich jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$) von der Kontrollprobe (+6,5 % bzw. +1,5 %). Im Gegensatz dazu zeigten die Feuchtkleberproben mit 0,48 % $CaCl_2$ (0,91 N) und 2,44 % $MgCl_2$ (0,91 N) den geringsten Dehnwiderstand im Vergleich zu der Kontrollprobe ohne Salzzusatz (jeweils -34,1 %). Die Proben mit 2,85 % $CaCl_2$ (0,95 N) und 0,41 % $MgCl_2$ (1,05 N) unterschieden sich kaum von diesen Proben. Beide Dosierungen der zweiwertigen Salze verringerten den Dehnwiderstand signifikant. Der größte, signifikante Unterschied zwischen zwei Konzentrationen eines Salzes wurde bei KCl beobachtet. Die Probe mit 0,64 % KCl zeigte einen Dehnwiderstand von 1,11 N, der niedriger war als der der Probe mit 3,83 % KCl (1,4 N) und auch niedriger als der der Kontrollprobe (-19,6 %).

Die Dehnbarkeit der mit Salz behandelten Proben und der Kontrollprobe reichte von 84,3 mm bis 123,3 mm. Alle Feuchtkleberproben mit Salzzusatz zeigten eine höhere Dehnbarkeit als die Glutenprobe ohne Salzzusatz (+13,7 % bis +46,3 %, siehe Tabelle 31), die die niedrigste Dehnbarkeit aufwies. Die Proben mit CaCl_2 waren die am wenigsten dehnbaren Glutenproben, während die Proben mit 3,00 % NaCl und 3,83 % KCl die größte Dehnbarkeit aufwiesen und sich damit signifikant von der Kontrolle unterschieden. Da die Dehnbarkeit für die salzbehandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle stark stieg und sich der Dehnwiderstand in einem geringeren Umfang reduzierte, erhöhte sich für alle Salze das Verhältnis aus E_{\max} und R_{\max} signifikant im Vergleich zur Kontrolle (+25,0 % bis +97,5 %), insbesondere für die divalenten Salze (+67,2 % bis +97,5 %). Insgesamt führte die Zugabe hoher Salzdosierungen zu Feuchtkleber zu größeren Abweichungen von der Kontrolle als die Zugabe niedriger Salzkonzentrationen. Höhere Salzkonzentrationen haben daher möglicherweise einen größeren Einfluss auf die Protein-Protein-Wechselwirkungen in Feuchtkleber.

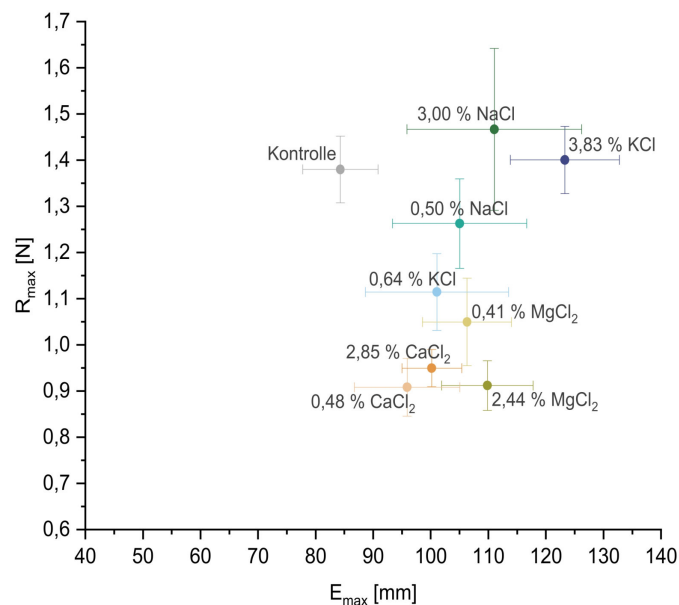


Abbildung 10: Per Mikrozugversuch bestimmter Dehnwiderstand (R_{\max}) und Dehnbarkeit (E_{\max}) von Feuchtkleberproben ohne Zusatz und mit Salzzusatz. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n = 12$). Abbildung modifiziert nach Höller & Scherf (2024).

Tuhumury et al. (2016b) stellten in einer Studie ebenfalls einen geringeren Dehnwiderstand bei Gluten fest, das mit Salz ausgewaschen wurde. Sie beobachteten auch, dass Gluten aus Teig, das mit CaCl_2 -Lösung geknetet und ausgewaschen wurde, im Vergleich zu den in der Studie getesteten Salzen NH_4Cl , KCl, NaCl und MgCl_2 die geringste Dehnbarkeit aufwies. Allerdings verringerte sich auch die Dehnbarkeit bei allen getesteten Salzen, wenn auch meist nicht signifikant. Diese Beobachtung machten Tuhumury et al. bereits in einer früheren Veröffentlichung von 2014. In der gleichen Studie stellten die Wissenschaftler, allerdings unter Verwendung einer anderen Mehlsorte fest, dass die Zugabe von NaCl zu einer verstärkten Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und damit auch zu einer erhöhten Dehnbarkeit führte, wenngleich diese nicht signifikant ausfiel (Tuhumury et al., 2014). Dies bestätigt die Ergebnisse der vorliegenden Studie. Die durch Tuhumury et al. (2014) erzielten Unterschiede in der Dehnbarkeit von

Gluten durch Salzzusatz können in der Verwendung verschiedener Mehlsorten in den jeweiligen Studien begründet sein. Da die entscheidende Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen während der Hydratation und des Knetvorgangs der Glutenherstellung vonstattengeht, spielt der Probenvorbereitungsprozess eine entscheidende Rolle (siehe 1.2.4 und Abbildung 4). Eben dieser Prozess ist in den beiden Studien von Tuhumury et al. (2014, 2016b) wenig vergleichbar, da in der älteren Studie ein deutlich größerer Ansatz (300 g Mehl) verwendet wurde und der Auswaschprozess manuell durchgeführt wurde (Tuhumury et al., 2014). In der neueren Studie wurden dagegen nur 4 g Mehl verwendet, welches standardisiert in einem MicrodoughLAB Mixer verarbeitet wurde (Tuhumury et al., 2016b). Die Ergebnisse von Tuhumury et al. (2014, 2016b) sind wiederum nicht uneingeschränkt mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar, da die Salze in der vorliegenden Studie erst in das bereits entwickelte Glutennetzwerk eingearbeitet wurden und nicht bereits während des Knetens oder Auswaschens von Teig zugesetzt wurden.

Zur Erklärung der Unterschiede, die die Salze im Dehnwiderstand und in der Dehnbarkeit verursachen, kann das „*Train and Loop*“-Modell von Belton herangezogen werden (siehe 1.2.4 und Abbildung 4). Es beruht auf der Überlegung, dass sich das Glutennetzwerk aus unassozierten, mobilen Schleifen und weniger mobilen Bahnen zusammensetzt. Wird das Glutennetzwerk während des Mikrozugversuchs uniaxial beansprucht, so benötigt die Deformation der Schleifen weniger Energie als die Verformung der Bahnen, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen HMW-GS interagieren. Die Energie, die zur Dehnung des Glutennetzwerks benötigt wird, und damit der Dehnwiderstand, hängt also maßgeblich von dem Verhältnis aus Schleifen und Bahnen ab.

Wird das „*Train and Loop*“-Modell auf die Eigenschaften der in dieser Studie getesteten Glutenproben angewendet, so kann durch den höheren Dehnwiderstand der Proben mit 3,83 % KCl und 3,00 % NaCl im Vergleich zur Kontrolle geschlossen werden, dass die monovalenten Salze in hoher Konzentration zu mehr Bahnen und damit mehr Wasserstoffbrückenbindungen führen. Der gegenüber der Kontrolle verringerte Dehnwiderstand aller anderen Salzproben, insbesondere der divalenten Salze, lässt dagegen ein vermehrtes Aufkommen von Schleifen im Glutennetzwerk und damit vermehrte Lösungsmittel-Protein-Interaktionen vermuten.

Tuhumury et al. (2016b) führten Unterschiede zwischen den Salzen in Bezug auf den Dehnwiderstand und die Dehnbarkeit im Einklang mit dem „*Train and Loop*“-Modell auf subtile mikrostrukturelle Veränderungen innerhalb des Glutennetzwerks zurück. Die Theorie hinter dieser Hypothese beruht auf der Überlegung, dass die Unterschiede in der Glutenmikrostruktur durch unterschiedlich starke Ausprägungen der Wasserstoffbrückenbindung verursacht wurden, die durch die Glutenhydratation oder -mischung mit verschiedenen Salzen induziert wurden. Sie bewiesen die Annahme mikrostruktureller Veränderungen innerhalb des Glutennetzwerks, indem sie die Glutenstruktur mithilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) visualisierten, die sich bei einwertigen Salzen als faserig herausstellte, durch divalente Salze dagegen eher einer Wabenstruktur glich (Tuhumury et al., 2016b).

Die Ergebnisse des Mikrozugversuchs in der vorliegenden Studie zeigen, dass sich ein bereits vollständig ausgebildetes Glutennetzwerk im Nachhinein durch Salze modifizieren lässt. Die Beobachtungen lassen sich außerdem in Einklang mit den Überlegungen des „*Train and Loop*“-Modells von Belton sowie den Beobachtungen von Tuhumury et al. (2014, 2016b) bringen. Die

Ergebnisse legen die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen durch hohe Konzentrationen an KCl und NaCl sowie eine vermehrte Lösungsmittel-Protein-Interaktion, insbesondere durch divalente Salze, nahe.

3.3.1.2. Polysorbat 20

Der Dehnwiderstand der mit 0,25 % PS 20 bzw. 1 % PS 20 behandelten Feuchtkleberprobe betrug 1,18 N bzw. 1,04 N (siehe Abbildung 11 und Tabelle 23). Somit war der Dehnwiderstand für beide PS 20-Dosierungen gegenüber der Kontrolle (1,38 N) signifikant ($p \leq 0,05$) herabgesetzt (-14,5 % bzw. -24,6 %). Die Dehnbarkeit war mit 82,8 mm für 0,25 % PS 20 im Vergleich zur Kontrolle mit 84,3 mm leicht reduziert (-1,8 %), für 1 % PS 20 war E_{\max} mit 110,1 mm signifikant erhöht (+30,6 %). Das E_{\max}/R_{\max} -Verhältnis erhöhte sich für beide Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (+14,7 % bzw. +73,6 %), die Zunahme war aber nur für 1 % PS 20 signifikant. Zwischen den PS 20-Konzentrationen unterschieden sich die Dehnbarkeit und das E_{\max}/R_{\max} -Verhältnis signifikant.

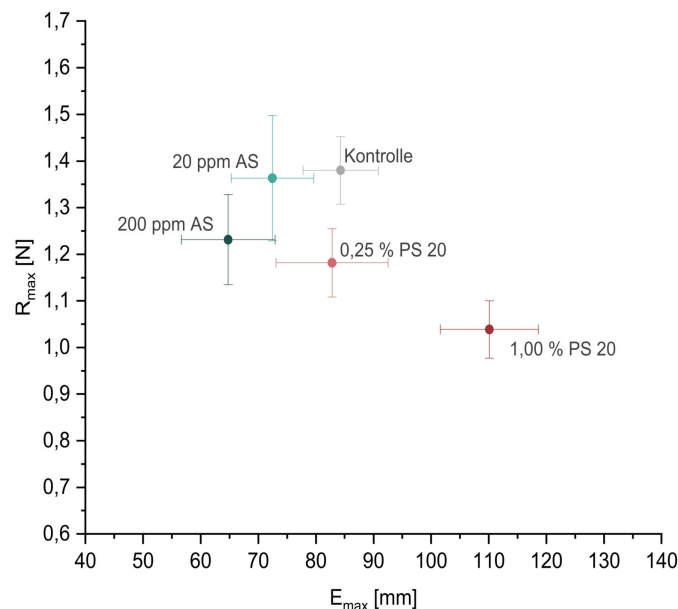


Abbildung 11: Per Mikrozugversuch bestimmter Dehnwiderstand (R_{\max}) und Dehnbarkeit (E_{\max}) von Feuchtkleberproben ohne Zusatz und mit Zusatz von Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n = 12$).

Polysorbate werden als Teigfestiger in der Backwarenindustrie eingesetzt, weshalb zu erwarten ist, dass der Zusatz von PS 20 den Dehnwiderstand erhöht (Stampfli & Nersten, 1995). In der Literatur sind dazu allerdings unterschiedliche Beobachtungen zu finden, was unter anderem damit zusammenhängt, dass unterschiedliche Polysorbate mit abweichender chemischer Struktur und unterschiedliche Konzentrationen der Emulgatoren eingesetzt wurden (Bak & Podgórska, 2016; Ding & Yang, 2013; Gómez et al., 2013a; Tebben et al., 2022). Polysorbate können mit verschiedenen Fettsäuren verestert werden und unterscheiden sich daher in der Struktur und Kettenlänge des lipophilen Teils. Sie besitzen die gleiche hydrophile Kopfgruppe, weshalb die Unterschiede in der Grenzflächenaktivität vom hydrophoben Teil des Moleküls stammen.

PS 20 und PS 80 unterscheiden sich beispielsweise in der Kettenlänge und im Aufbau der veresterten Fettsäure, da PS 80 mit Ölsäure (C18:1) verestert ist, welche eine längere Kettenlänge als Laurinsäure (C12:0) in PS 20 aufweist und zudem einfach ungesättigt vorliegt. Diese Eigenschaften wirken sich auf den HLB-Wert aus, der für PS 80 aufgrund des größeren hydrophoben Effekts niedriger ausfällt (Knoch et al., 2021). Zudem spielt die eingesetzte Emulgatorkonzentration eine große Rolle, wobei stets Konzentrationen unter 1 % verwendet werden, da ansonsten keine Teigbildung mehr möglich ist. Zudem können qualitätsabhängige Unterschiede zwischen den Polysorbaten festgestellt werden (Dewettinck et al., 2008; Gómez et al., 2013b; Knoch et al., 2021; Tebben et al., 2022).

Durch die unterschiedliche chemische Struktur und eingesetzte Konzentration der Polysorbate, können abweichende Ergebnisse verschiedener Veröffentlichungen erklärt werden. Die Ergebnisse der Literatur sind aufgrund der verwendeten Emulgatoren und deren unterschiedlichen Eigenschaften, auch innerhalb der Gruppe der Polysorbate, nur bedingt mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie vergleichbar. Tebben et al. (2022) beobachteten eine bei einer PS 80 Konzentration von 0,2 % und 0,5 % in Weizenvollkornteig nicht signifikante Zunahme und bei Konzentrationen ab 0,5 % eine Reduzierung des Dehnwiderstandes, ebenso wie eine von der Konzentration abhängende signifikante Erhöhung der Dehnbarkeit. Gómez et al. (2013a) maßen in Weizenteig mit PS 80 einen geringeren Dehnwiderstand im Vergleich zur Kontrolle und beobachteten eine Erweichung des Teiges. Ding und Yang (2013) stellten eine signifikante Erhöhung sowohl des Dehnwiderstandes als auch der Dehnbarkeit in mit PS 60 behandeltem Weizenteig fest.

Da Emulgatoren zur Verbesserung der Teig- und Backeigenschaften verwendet werden, existieren fast ausschließlich Publikationen, die die Auswirkung von Emulgatoren auf Teigeigenschaften und Endprodukte untersuchen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Emulgatoren mit Stärke und Lipiden in Mehl Protein-Stärke-Lipid-Interaktionen eingehen und diese Komponenten daher einen maßgeblichen Einfluss auf die Wirkung des Emulgators nehmen (Stampfli & Nersten, 1995). Wie sich Emulgatoren speziell auf das Glutennetzwerk auswirken ist daher bisher weniger erforscht. Veröffentlichungen, die die Interaktionen von Emulgator und Glutenproteinen untersuchten, konzentrierten sich auf die Emulgatoren SSL und DATEM (Chompoorat et al., 2013, 2022; Gómez et al., 2013b; Köhler & Grosch, 1999).

Auch wenn in der Literatur andere Emulgatoren eingesetzt wurden als in der vorliegenden Studie, können daraus grundsätzliche Funktionsmechanismen und Interaktionsmuster zwischen Gluten und Polysorbaten zur Erklärung des Verhaltens von PS 20 herangezogen werden. Polysorbate können mit ihrem hydrophilen Teil Wasserstoffbrückenbindungen zu geladenen Aminosäureseitenketten der Glutenproteine ausbilden. Die Polyoxyethyleneinheiten verbessern dabei die hydrophilen Eigenschaften. So kann Polysorbat in Gluten ein dichtes, festes Netzwerk ausbilden (Ding & Yang, 2013). Es kann allerdings auch dazu kommen, dass Polysorbat Wasserstoffbrückenbindungen mit Wasser bildet, wodurch das Glutennetzwerk dehydriert und der Teig folglich einen geringeren Dehnwiderstand und eine weichere Konsistenz aufweist (Gómez et al., 2013a). Tatsächlich zeigt Teig mit PS 60 eine höhere Wasserabsorption als Teig ohne Zusatz (Ding & Yang, 2013). Die unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur lassen sich also auch durch verschiedene Emulgatorkonzentrationen und Variationen in der Probenvorbereitung wie die Menge an zugegebenem Wasser erklären. Der geringere Dehnwiderstand in den mit

PS 20 behandelten Proben in der vorliegenden Studie spricht für die Interaktion von Emulgator und Wasser und einer dadurch bedingten Dehydrierung des Glutennetzwerks, die zu einem geringeren Dehnwiderstand insbesondere bei der hohen PS 20-Konzentration führt. Mit dieser Teigverweichung geht eine Erhöhung der Dehnbarkeit einher.

3.3.1.3. Ascorbinsäure

Der Dehnwiderstand lag für die mit 20 mg/kg AS behandelte Probe bei 1,35 N und für die höhere Dosierung bei 1,04 N und wurde somit durch 200 mg/kg AS stärker gegenüber der Kontrolle herabgesetzt (-18,6 % bzw. -26,3 %) (siehe Abbildung 11 und Tabelle 23). Die Dehnbarkeit betrug 71,9 mm bzw. 64,8 mm für die mit 20 mg/kg bzw. 200 mg/kg AS versetzte Probe und war damit für beide Proben im Vergleich zur Kontrolle verringert (-14,7 % bzw. -23,2 %). Für die höhere Dosierung AS war die Abnahme signifikant. Der Dehnwiderstand wurde durch AS weniger stark als durch PS 20 und die divalenten Salze verringert. AS war der einzige Zusatz, der die Dehnbarkeit, wenn auch nicht signifikant, verringerte. Das E_{\max}/R_{\max} -Verhältnis war gegenüber der Kontrolle nicht signifikant herabgesetzt (-11,7 % bzw. -13,6 %).

AS wird in der Backwarenindustrie unter anderem zur Steigerung der Teigstärke eingesetzt und erhöht demnach üblicherweise den Dehnwiderstand im Mikrozugversuch bei einem gleichzeitigen Rückgang der Dehnbarkeit (Aamodt et al., 2003; Grosch & Wieser, 1999; Kieffer et al., 1990). Die Ergebnisse des Mikrozugversuchs in der vorliegenden Studie stehen also im Kontrast zu diesen Beobachtungen.

Die Ergebnisse des Mikrozugversuchs mit den AS behandelten Proben deutet darauf hin, dass der Zusatz in bereits isoliertem Feuchtkleber nicht den für AS typischen, Gluten stärkenden Effekt ausübt. AS kann in Teig im Gegensatz zu anderen Reduktionsmitteln wie Bromat nicht überdosiert werden, da die Wirkung von AS zum Erliegen kommt, wenn das natürlicherweise in Proteinen verfügbare GSH als Dimer oder an Glutenproteine gebunden vorliegt. Der oxidierenden Wirkung des Reduktionsmittels AS liegt allerdings zunächst die Umwandlung von AS in DH-AS, katalysiert durch das Enzym AO, zugrunde (siehe 1.3.3 und Abbildung 5). Wird das wasserlösliche Enzym AO durch den Waschschrift zur Glutenisolierung entfernt, kann die Bildung von DH-AS im Zuge der Nachbehandlung mit AS nicht mehr stattfinden (Bonner, 1957; Dong & Hoskeney, 1995). Demnach liegt AS in seiner Funktion als Reduktionsmittel vor, welches Disulfidbrücken spalten kann und das Glutennetzwerk somit depolymerisiert. Dieser Vorgang erklärt den geringeren Dehnwiderstand und die verringerte Dehnbarkeit in der Probe mit der höheren AS-Konzentration.

Die GSH-Bindungsstellen der Glutenproteine unterscheiden sich in Teig und in ausgewaschenem Gluten nicht voneinander (Grosch & Wieser, 1999). Dabei bindet GSH bevorzugt an die reaktiven Cysteinreste in LMW-GS, die in der Lage sind, intermolekulare Bindungen auszubilden (Grosch & Wieser, 1999; Köhler, 2003b). Der Großteil an freiem GSH wird vermutlich ausgewaschen, da das Tripeptid wasserlöslich ist. Die nachträgliche Zugabe von AS zu Gluten kann demnach kein GSH mehr aus dem System entfernen und die an Protein gebundenen GSH-Moleküle verhindern eine nachträgliche Vernetzung der LMW-GS (Joye et al., 2009).

3.3.1.4. Enzyme

Der Dehnwiderstand für alle mit verschiedenen Konzentrationen Transglutaminase, Xylanase, Lipase und Cellulase behandelten Proben betrug zwischen 1,26 N und 1,47 N (siehe Abbildung 12). Die Dehnbarkeit betrug 70,5–90,4 mm. Damit unterschied sich keine der Enzymbehandlungen signifikant von der Kontrolle. Für jedes Enzym wurde eine Dosierung gewählt, die der Empfehlung der Herstellerangaben entsprach, eine Dosierung, die der mindestens dreifachen Menge der Empfehlungen entsprach und eine weitere Dosierung, die mindestens das Zehnfache der idealen Dosierung ausmachte. Keine der Dosierungen bewirkte einen Effekt in Feuchtkleber, der sich signifikant von der Kontrolle unterschied. Ebenso konnte kein Trend bezüglich der Dosierungen festgestellt werden. Da keine Änderung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden konnte, wurde der Mikrozugversuch nur in Doppelbestimmung (2×3 Messungen) durchgeführt. Auch durch Inkubation des Feuchtklebers mit den eingearbeiteten Enzymen für 30 min bzw. 60 min konnte kein Unterschied zur entsprechenden Kontrolle beobachtet werden (Daten werden nicht gezeigt). Demnach liegt die Vermutung nahe, dass keines der Enzyme in einem bereits ausgebildeten Glutennetzwerk noch katalytische Funktionen erfüllen kann, die zu einer Änderung der Dehneigenschaften führen.

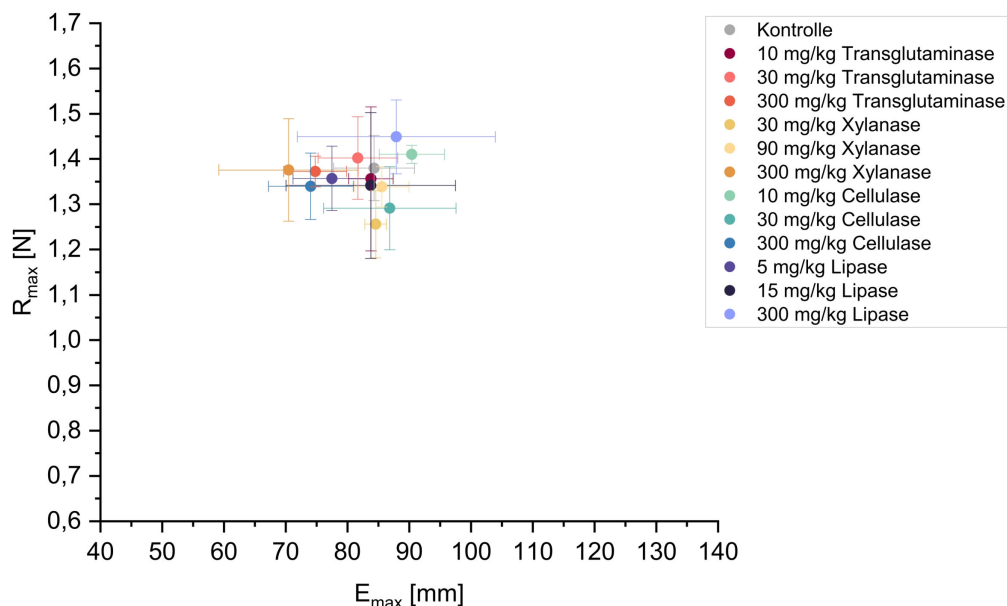


Abbildung 12: Per Mikrozugversuch bestimmter Dehnwiderstand (R_{\max}) und Dehnbarkeit (E_{\max}) von Feuchtkleberproben ohne Zusatz und mit Zusatz von Enzymen. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n = 6$).

Die Ursache dafür könnte sein, dass im Fall von TG Glutamin und Lysin bereits anderweitig im Glutennetzwerk gebunden sind. Im Gegensatz zu den in dieser Studie angestellten Beobachtungen stellten Primo-Martín et al. (2006) durch das Besprühen der Teigoberfläche von Brot mit Transglutaminase-Lösung vor dem Backen einen teils schnelleren Verlust der Knusprigkeit der gebackenen Brote fest. Allerdings konnten die Forscher keine Zunahme vernetzter Proteine feststellen. Daher stammte die Veränderung der Kruste möglicherweise von der Interaktion mit TG und anderen wasserlöslichen Mehlbestandteilen, weshalb in isoliertem Feuchtkleber keine Wirkung mehr feststellbar ist. Lipide werden während des Auswaschvorgangs in die Glu-

tenmatrix eingebunden und sind unter Umständen in isoliertem Feuchtkleber für Lipasen nicht mehr zugänglich (Day et al., 2006). Da ausgewaschenes Gluten nur noch etwa 5 % Ballaststoffe enthält (Wieser & Scherf, 2018), liegt die Vermutung nahe, dass die Enzyme Xylanase und Cellulase keine oder eine nicht messbare Veränderung der Glutenfunktionalität in isoliertem Feuchtkleber entfalten.

3.3.2. Effekt von Zusätzen auf die dynamisch-rheologischen Eigenschaften von Gluten

3.3.2.1. Salze

Der linear-viskoelastische (LVE) Bereich, der durch den Amplitudensweep bestimmt wird, beschreibt den Bereich der Scherverformung, in dem rheologische Tests durchgeführt werden können, ohne die innere Struktur der Probe zu zerstören. So können erste Rückschlüsse auf die Funktionalität des Glutennetzwerks gezogen werden. Der LVE-Bereich der Feuchtkleberproben lag zwischen 7,06 % und 11,88 % und nahm durch den Zusatz von 3,83 % KCl und 3,00 % NaCl im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusatz ab (-15,8 % bzw. -20,2 %), was auf eine Schwächung des Glutennetzwerks bei großen Verformungen aufgrund der Zugabe hoher Konzentrationen dieser Salze hindeutet (siehe Tabelle 2). Weitgehend unverändert blieb der LVE-Bereich, wenn geringe Konzentrationen an KCl, NaCl und CaCl_2 hinzugefügt wurden (+2,8 % bis +10,4 %, siehe Tabelle 31). Im Vergleich zur Kontrolle war der LVE-Bereich bei Glutenproben mit einer niedrigen und hohen MgCl_2 -Konzentration und einer hohen CaCl_2 -Dosis signifikant erhöht (+23,4 % bzw. +34,2 %).

Der Frequenzsweep charakterisiert das rheologische Verhalten einer Probe bei gleichzeitig steigender Frequenz und gleichbleibender Deformation und Amplitude. Das Speichermodul G' entspricht der elastischen Verformung der Probe, während das Verlustmodul G'' dem Fließverhalten zugeordnet wird. G' und G'' aller Proben mit Salz und der Kontrolle waren frequenzabhängig, da G' und G'' mit zunehmender Frequenz anstiegen, was auf ein zunehmend viskoses Verhalten der Proben bei höheren Frequenzen hindeutet (siehe Abbildung 30). Für alle salzbehandelten Proben, unabhängig von der Art des Kations oder der Salzkonzentration, sowie für die Kontrolle, war G' während des Frequenzsweeps stets höher als G'' . Dies deutet auf eine relativ hohe Mobilität der Proteinstränge innerhalb des Glutennetzwerks hin (Singh & Singh, 2013). Alle Proben wiesen damit ein für vernetzte Polymernetzwerke typisches feststoffähnliches, viskoelastisches Verhalten auf.

Zur besseren Vergleichbarkeit und statistischen Auswertung wurden alle Werte von G' und G'' , die bei verschiedenen Frequenzen gemessen wurden, addiert (siehe Tabelle 2). Die Summe von G' reichte von 39 250 Pa bis 76 980 Pa. Die Summe von G'' lag bei 21 995 Pa bis 40 222 Pa. Proben mit 3,83 % KCl und 3,00 % NaCl wiesen jeweils vergleichbare Werte für G' und G'' auf, die höher lagen als die entsprechenden Module der Kontrolle ohne Zusatz (prozentuale Abweichungen von der Kontrolle siehe Tabelle 31). Die Zugabe hoher Konzentrationen an CaCl_2 und MgCl_2 zeigte ebenfalls ähnliche G' - und G'' -Werte, die jedoch niedriger waren als die G' - und G'' -Werte der Kontrollprobe. Das Speichermodul der Glutenproben mit niedriger Salzdosierung lag niedriger als bei der Kontrolle und wies für die monovalenten bzw. divalenten Salze jeweils sehr ähnliche Kurvenverläufe auf. Auch die Summen von G' und G'' ähnelten sich bei den ent-

sprechenden Proben.

Tabelle 2: Rheologische Charakterisierung mit oszillierendem Amplituden- und Frequenzsweep. Linear-viskoelastischer Bereich (LVE), Summe des Speichermoduls G' , des Verlustmoduls G'' und des Verlustfaktors $\tan \delta$ von salzbehandelten Feuchtkleberproben und der Kontrollprobe ohne Salz. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n = 3$). Die Daten wurden bereits in Höller & Scherf (2024) veröffentlicht.

Probe	LVE	Stabw.	Summe Speicher- modul G'	Stabw.	Summe Verlust- modul G''	Stabw.	Summe $\tan \delta$	Stabw.
	[%]		[Pa]		[Pa]		[1]	
Kontrolle	8,85	0,80	71 853	7256	33 421	2670	9,88	0,19
0,64 % KCl	9,10 ^B	0,77	62 196 ^{A,B}	215	29 965 ^{A,B}	452	10,10 ^B	0,08
3,83 % KCl	7,45 ^{A,B}	0,17	74 983 ^B	237	38 653 ^{A,B}	849	10,73 ^{A,B}	0,15
0,50 % NaCl	9,19 ^B	0,45	65 423 ^B	3477	31 650 ^B	1964	10,15 ^B	0,17
3,00 % NaCl	7,06 ^{A,B}	0,70	76 980 ^B	3090	40 222 ^{A,B}	1923	10,85 ^{A,B}	0,10
0,41 % MgCl ₂	10,64 ^A	0,57	49 956 ^A	2212	25 922 ^A	856	10,70 ^{A,B}	0,12
2,44 % MgCl ₂	10,92 ^A	0,12	43 244 ^A	1378	24 690 ^A	970	11,74 ^{A,B}	0,14
0,48 % CaCl ₂	9,77 ^B	0,19	47 703 ^A	907	23 879 ^A	504	10,33 ^{A,B}	0,18
2,85 % CaCl ₂	11,88 ^{A,B}	1,05	39 250 ^A	1888	21 995 ^A	865	11,50 ^{A,B}	0,38

^A Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

^B Signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen desselben Salzes (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

In Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie stellten auch Tuhumury et al. (2016b) bei rheologischen Messungen mit Gluten aus Mehl, das mit verschiedenen Salzlösungen behandelt wurde, fest, dass G' und G'' für kosmotrope Kationen höher lag als für chaotrope Kationen. Eine Erklärung für diese Beobachtung kann die durch unterschiedliche Kationen verschieden stark beeinflusste Interaktion von Protein und verfügbarem Wasser sein, die zu ungleichen Wassergehalten in den Glutenproben führt. Zum einen kann es je nach Salz zu spezifischen Ion-Protein-Wechselwirkungen mit geladenen Regionen der Gliadin- und Gluteninmoleküle kommen. Zum anderen sind individuelle Ionen-Wasser-Wechselwirkungen ausschlaggebend dafür, wie stark ein Ion hydratisiert wird. Von diesen Faktoren hängt wiederum die Ausprägung der Protein-Lösungsmittel- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen ab (Tuhumury et al., 2016b).

Tuhumury et al. (2016b) führt die beobachtete geordnete, faserige Glutenstruktur durch die Behandlung mit NaCl auf solche individuellen Wechselwirkungen zwischen Ion, Protein und Wasser zurück, die zu vermehrten Wechselwirkungen zwischen Gluteninen und somit in größerem Maße zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen HMW-GS führen. Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen HMW-GS kann außerdem die erhöhte Elastizität in Glutenproben mit monovalenten Salzen, die neben der vorliegenden Studie auch in der Studie von Tuhumury et al. (2016b) beobachtet wurde, erklärt werden (siehe Tabelle 2). Bei großen Deformationen können ebendiese Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Gluteninketten brechen, wodurch es zum Übereinandergleiten von Proteinsträngen kommen kann (Belton, 1999). Dieses Phänomen kann auch der Grund für das verbesserte Fließverhalten von Proben mit NaCl und KCl im Vergleich zur Kontrolle bei oszillatorischen Tests mit geringer Deformation sein.

Die durch zweiwertige Salze verursachte aggregierte Wabenstruktur bedingt eine höhere Reibung innerhalb des Glutennetzwerks, welches somit weniger fließfähig ist und folglich zu einem niedrigeren G'' führt (Tuhumury et al., 2016b). Jedoch kann aus den Experimenten der vorliegenden Studie nicht geschlossen werden, ob Ionen-Wasser- oder Ionen-Protein-Wechselwirkungen stärker ausgeprägt sind. Im Allgemeinen sind die spezifischen Ionen-Effekte konzentrationsabhängig und sollten daher bei der höheren Salzkonzentration dominanter sein (Kunz, 2010).

Der Verlustfaktor $\tan \delta$ wird aus dem Verhältnis von G'' zu G' gebildet und beschreibt das viskoelastische Verhalten der Probe. Materialien gehen ab einem Verlustfaktor > 1 in ein Fließverhalten über. Bei allen Salzen und der Kontrolle war das Ansteigen des Speicher- und Verlustmoduls bei zunehmender Frequenz mit einem proportional steigenden Verlustfaktor verbunden. Da G'' stärker anstieg als G' , erhöhte sich $\tan \delta$ progressiv, nahm über den gesamten Frequenzbereich jedoch keine Werte > 1 an. Somit zeigten die Glutenproben auch bei hohen Frequenzen noch ein festkörperähnliches, viskoelastisches Verhalten, das typisch für Glutennetzwerke ist (Tuhumury et al., 2014). Die Summe von $\tan \delta$ unterschied sich mit 9,88–11,74 nur wenig zwischen den verschiedenen Proben, da alle Proben ein grundsätzlich ähnliches Verhalten in Bezug auf G' und G'' im Verlauf des Frequenzsweeps zeigten. Jedoch unterschieden sich alle Proben bis auf die geringe Konzentration an KCl und NaCl durch eine signifikante Erhöhung von $\tan \delta$ von der Kontrolle. Tuhumury et al. (2014) schlugen die Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen als Grund für die erhöhten $\tan \delta$ -Werte im Vergleich zur Kontrolle beim Frequenzsweep vor.

Um das rheologische Verhalten der Glutenproben während eines Back- oder Extrusionsprozesses zu imitieren und so auf die Glutenfunktionalität in Abhängigkeit von der Temperatur schließen zu können, wurden Temperatursweeps durchgeführt. Die Ergebnisse des Amplituden- und Frequenzsweeps zeigten, dass die hohe Salzkonzentration eine größere Zu- oder Abnahme der rheologischen Parameter im Vergleich zur Kontrolle bewirkte als die geringe Salzkonzentration. Dies deutet auf eine stärkere Einflussnahme auf die innere Struktur der Glutenproben durch hohe Salzkonzentrationen hin. Der Effekt der hohen Salzkonzentration auf das Glutennetzwerk bei gleichzeitigem Temperatureinfluss wurde daher im Zuge der Temperatursweeps getestet. Diese wurden bei gleichbleibender Frequenz und Amplitude ausgeführt, während die Temperatur kontinuierlich von 25 °C auf 95 °C anstieg. Alle beobachteten rheologischen Änderungen des Glutennetzwerks können somit auf den Einfluss von Temperatur in Kombination mit der Salzbehandlung zurückgeführt werden.

G' aller Proben mit Salz und ohne Zusatz lag über den gesamten Temperaturbereich höher als G'' , was auf ein elastisches Verhalten der Proben hinweist (siehe Abbildung 13) (Ahmed et al., 2013). Alle Proben mit Salz zeigten ein höheres G' als die Kontrolle. G' stieg in allen Proben ab etwa 60 °C an, G'' erhöhte sich ab etwa 55 °C stark. Für KCl und NaCl waren G' und G'' im Verlauf des Temperatursweeps sehr ähnlich. Für $MgCl_2$ und $CaCl_2$ war G' ebenfalls ähnlich, G'' lag jedoch für $MgCl_2$ höher und zeigte insbesondere ab 60 °C einen rasch ansteigenden Kurvenverlauf. Da G' und G'' während des Temperatursweeps ähnlich zum Frequenzsweep proportional anstiegen, zeigten sich wenige Unterschiede im Verlustfaktor der Proben (siehe Abbildung 13).

Auf den ersten Blick ließ sich jeweils eine Ähnlichkeit der Kurvenverläufe des Verlustfaktors beider einwertiger und zweiwertiger Salze feststellen. Bei Zusatz von KCl und NaCl war $\tan \delta$

fast identisch. Bei Proben mit MgCl_2 und CaCl_2 folgte $\tan \delta$ einem ähnlichen Verlauf, nahm aber für CaCl_2 niedrigere Werte an. $\tan \delta$ fiel bei Proben mit MgCl_2 und CaCl_2 von Anfang an schnell ab, im Gegensatz dazu nahm $\tan \delta$ bei Proben mit NaCl und KCl nur langsam ab. Die Kontrolle zeigte zu Beginn des Temperatursweeps eine größere Übereinstimmung zum Kurvenverlauf der monovalenten Salze, folgte allerdings bis 55 °C einem Aufwärtstrend. Ab etwa 63 °C nahm $\tan \delta$ der Kontrolle, ähnlich wie die Temperaturkurve der Probe mit CaCl_2 , ab. $\tan \delta$ lag bei allen Proben über die gesamte Temperaturrampe < 1 und fiel mit steigender Temperatur ab. Zudem war $\tan \delta$ für fast alle Salzproben stets höher als für die Kontrolle, welche damit ein tendenziell viskoseres Verhalten als die Kontrolle ohne Zusatz aufwies.

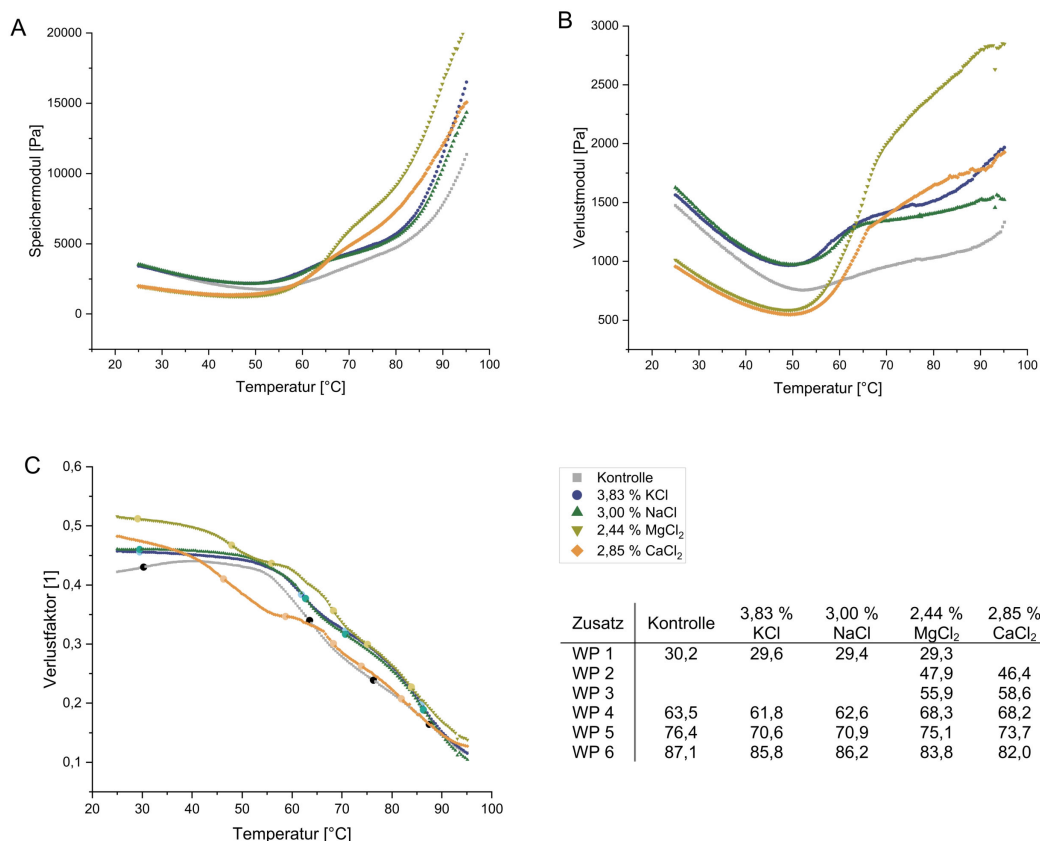


Abbildung 13: Rheologische Charakterisierung von Feuchtkleberproben mit oszillierendem Temperatursweep. Kurven des Speichermoduls G' (A), des Verlustmoduls G'' (B) und des Verlustfaktors $\tan \delta$ (C) mit den Wendepunkten (WP) der mit Salz behandelten Feuchtkleberproben und der Kontrollprobe ohne Salz. Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben ($n = 3$). Abbildung modifiziert nach Höller & Scherf (2024).

Zur genaueren Betrachtung des Temperatureinflusses auf den Feuchtkleber können die Wendepunkte (WP) der Kurven berechnet werden. Jeder WP zeigt eine Änderung der Viskosität bzw. Elastizität an und kann somit Auskunft über strukturelle Veränderungen im Polymernetzwerk wie die Denaturierung von Proteinen geben (Wehrli et al., 2021). Bei allen Feuchtkleberproben konnten über den gesamten Temperatursweep hinweg vier bis sechs WP ermittelt werden. Alle Zusätze bis auf 2,85 % CaCl_2 wiesen einen ersten WP bei 29,3–29,6 °C auf, wobei die WP der Proben mit Zusatz alle niedriger lagen als der der Kontrolle. Weitere WP, die alle Proben gemein hatten, lagen bei 61,8–68,3 °C, 70,6–75,1 °C und 82,0–86,2 °C.

Die monovalenten Salze wiesen jeweils sehr ähnliche, jedoch leicht herabgesetzte WP im Vergleich zur Kontrolle auf. Die divalenten Salze zeigten ebenfalls ähnliche WP zur Kontrolle, allerdings entfiel bei CaCl_2 der erste Wendepunkt. Die darauffolgenden WP bei 68,3 °C bzw. 68,2 °C waren höher als der vergleichbare WP der Kontrolle; alle anderen WP der salzbehandelten Proben lagen allerdings niedriger als der jeweilige WP der Kontrolle. Beide zweiwertigen Salze zeigten zusätzlich zu den bereits genannten vier WP zwei weitere Wendepunkte bei 47,9 °C und 46,4 °C bzw. bei 55,9 °C und 58,6 °C, die bei den anderen Proben nicht festgestellt werden konnten.

Die Feuchtkleberproben zeigten typische Kurvenverläufe für unter Hitzeeinfluss stehendes Gluten. Zu Beginn der Temperaturerhöhung lösen sich zunächst ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Glutenmolekülen auf (Wang et al., 2017a). Deshalb sinkt G' zu Beginn des Temperatursweeps zunächst ab (Singh & Singh, 2013). Mit zunehmender Temperatur kommt es zur Proteinentfaltung, wodurch hydrophobe Bereiche und Thiole, die normalerweise im Inneren der Glutenstruktur verborgen sind, freigelegt werden und die Oberflächenhydrophobizität erhöhen (Schofield et al., 1983; Wang et al., 2017a; Weegels et al., 1994). Durch diese Konformationsänderung kann es zur Bildung von Quervernetzungen zwischen Proteinen kommen, wodurch sich größere Glutenaggregate bilden. Das durch die Umstrukturierung der Proteine anwachsende Glutennetzwerk führt zu einem Anstieg von G' und G'' ab etwa 60 °C (Schofield et al., 1983; Wang et al., 2017a).

Die Form der Kurvenverläufe war für ein- und zweiwertige Salze jeweils ähnlich, wies aber insbesondere bei MgCl_2 und CaCl_2 individuelle Abweichungen und Merkmale auf. Die unterschiedlichen Kurvencharakteristika und damit die Position der WP können auf die Interaktion von Salz, Protein und Temperatureinfluss und die dadurch individuell beeinflusste Reorganisation des Proteinnetzwerks zurückgeführt werden (Belton, 2005). Die bei niedrigeren Temperaturen auftretenden Wendepunkte bei monovalenten Salzen deuten darauf hin, dass durch den Zusatz von NaCl und KCl entsprechende durch Hitze induzierte Prozesse auf molekularer Ebene bereits früher zum Tragen kommen als in der Kontrollprobe. Das frühe und häufige Auftreten von WP in Feuchtkleber mit MgCl_2 und CaCl_2 im Vergleich zur Kontrolle kann ein Indiz dafür sein, dass divalente Salze komplexere Änderungen des Proteinnetzwerkes auslösen, die mehrfach zu Strukturänderungen führen.

Die Übereinstimmungen und Unterschiede zwischen den Salzen könnten deren kosmotroper oder chaotroper Natur, sowie der damit verbundenen Wirkung auf die Verfügbarkeit von freiem Wasser im Feuchtkleber zugeschrieben werden (Tuhumury et al., 2016b). Ein erhöhter Wassergehalt ist mit dem Absinken der Denaturierungstemperatur von Gluteninen verknüpft (León et al., 2003). Nach Kunz (2010) liegen Ca^{2+} und Mg^{2+} stärker hydratisiert vor als K^+ und Na^+ , womit in Proben mit divalenten Salzen weniger frei verfügbares Wasser vorliegt. Diese Hypothese steht im Einklang mit dem in Richtung höhere Temperaturen verschobenen Auftreten von WP im Bereich von 55–75 °C in Proben mit divalenten Salzen. In diesem Temperaturbereich sind besonders Glutenine von hitzebedingten Veränderungen betroffen (Schofield et al., 1983). Die Literatur legt allerdings auch nahe, dass in Proteinen beobachtete Veränderungen durch Salze nicht ausschließlich durch die Wirkung von Ionen auf die Wasserstruktur zustande kommen, sondern dass es sich vielmehr um ein Zusammenspiel aus der Interaktion zwischen Ionen, Wasser und Proteinen handelt (Lo Nostro & Ninham, 2012; Okur et al., 2017; Xie & Gao, 2013).

Die Temperatursweeps zeigten somit, dass alle Salze in unterschiedlichen Ausprägungen, durch die Wechselwirkung von Ionen, Wasser und Proteinen in Kombination mit Temperatur zu Konformationsänderungen des Proteinnetzwerks führen, die mit der Entfaltung von Proteinen und dem Auflösen bzw. (erneuten) Knüpfen kovalenter und nicht-kovalenter Interaktionen verbunden sind.

3.3.2.2. Polysorbat 20

Der LVE-Bereich war für die Probe mit 0,25 % PS 20 mit einem Wert von 9,04 % leicht erhöht und für den Zusatz von 1 % PS 20 mit 8,13 % wenig herabgesetzt gegenüber der Kontrolle (+2,1 % bzw. -8,1 %) (siehe Tabelle 3). Im Frequenzsweep stiegen G' und G'' für den Zusatz von PS 20 mit zunehmender Frequenz an (siehe Tabelle 3 und Abbildung 31). Das rheologische Verhalten der Proben zeigte somit Frequenzabhängigkeit. Im Frequenzsweep war die Summe von G' für 0,25 % PS 20 signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle (+14,2 %). Der Zusatz von 1 % PS 20 reduzierte G' nicht signifikant (-2,0 %). Ebenso verhielt sich die Summe von G'' , wobei die Zu- bzw. Abnahme bei beiden PS 20-Dosierungen nicht signifikant ausfiel. Da $\tan \delta$ über den gesamten Frequenzsweep hinweg < 1 blieb, konnte den Proben viskoelastisches Verhalten zugeschrieben werden. Die Summe des Verlustfaktors erniedrigte bzw. erhöhte sich entsprechend für 0,25 % PS 20 signifikant (-5,7 %) und für 1 % PS 20 nicht signifikant (+2,3 %). Mit dem Zusatz von 0,25 % PS 20 entstand somit ein signifikant elastischeres Glutennetzwerk im Vergleich zur Kontrolle und auch gegenüber den salzbehandelten Proben (siehe Tabelle 2). Zwischen den PS 20-Konzentrationen zeigten sich signifikante Unterschiede in der Summe des Speichermoduls sowie des Verlustfaktors.

Tabelle 3: Rheologische Charakterisierung mit oszillierendem Amplituden- und Frequenzsweep. Linear-viskoelastischer Bereich (LVE), Summe des Speichermoduls G' , des Verlustmoduls G'' und des Verlustfaktors $\tan \delta$ von Feuchtkleberproben mit Polysorbat 20 (PS 20) und der Kontrollprobe ohne Zusatz. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n = 3$).

Probe	LVE	Stabw.	Summe Speichermodul G'	Stabw.	Summe Verlustmodul G''	Stabw.	Summe $\tan \delta$	Stabw.
	[%]		[Pa]		[Pa]		[1]	
Kontrolle	8,85	0,80	71 853	7256	33 421	2670	9,88	0,19
0,25 % PS 20	9,04	0,65	82 063 ^{A,B}	1260	35 661	612	9,32 ^{A,B}	0,05
1 % PS 20	8,13	0,28	70 393 ^B	2016	33 251	1243	10,11 ^B	0,28

^A Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

^B Signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen Polysorbat 20 (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

Da die Unterschiede zwischen den Konzentrationen für PS 20 sowohl im Mikrozugversuch als auch im Amplituden- und Frequenzsweep geringer ausfielen als für die Salze, wurden im Temperatursweep beide PS 20-Konzentrationen getestet, um zu beurteilen, ob die Temperatur einen konzentrationsabhängigen Effekt hervorrufen kann.

1 % PS 20 zeigte zu Beginn des Temperatursweeps ein höheres Verlustmodul als 0,25 % PS 20 und die Kontrolle (siehe Abbildung 14). Die Form der Kurvenverläufe war für beide Konzentrationen sehr ähnlich und verlief zwischen 40 °C und 60 °C fast linear abnehmend. Für die Kontrolle konnte in diesem Bereich nur ein leichter Abwärtstrend festgestellt werden. Ab etwa 60 °C passten sich beide mit PS 20 behandelte Proben deutlich an den Kurvenverlauf der Kontrolle an. Zwischen den Konzentrationen verringerten sich die Unterschiede zwischen den beiden Dosierungen ebenfalls deutlich und das Glutennetzwerk mit 1 % PS 20 veränderte sich von einem viskoserem Netzwerk gegenüber der Kontrolle, welches auch im Frequenzsweep festgestellt wurde, mit Temperatureinwirkung hin zu einem elastischeren Netzwerk. Die Kurvenverläufe mit PS 20 wiesen bis etwa 84 °C bzw. 91 °C einen niedrigeren Verlustfaktor als die Kontrolle auf und verursachten somit bei höheren Temperaturen ein elastischeres Glutennetzwerk.

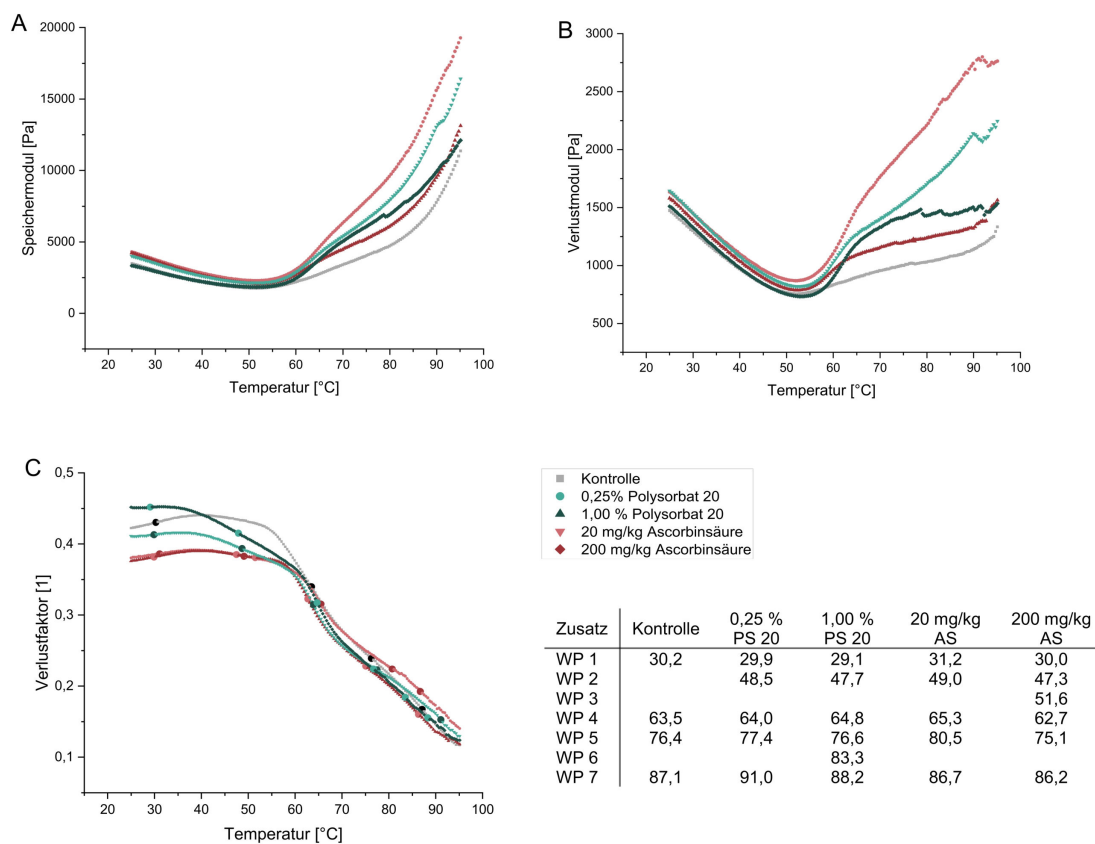


Abbildung 14: Rheologische Charakterisierung von Feuchtkleberproben mit oszillierendem Temperatursweep. Kurven des Speichermoduls G' (A), des Verlustmoduls G'' (B) und des Verlustfaktors $\tan \delta$ (C) mit den Wendepunkten der mit Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) behandelten Feuchtkleberproben und der Kontrollprobe ohne Zusatz. Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben ($n = 3$).

Mit sechs WP konnten in der Temperatursweepkurve von 1 % PS 20 zwei WP mehr festgestellt werden als bei der Kontrolle. Der erste zusätzliche WP befand sich ähnlich wie bei 2,44 % $MgCl_2$ und 2,85 % $CaCl_2$ bei 47,7 °C. Die WP markieren eine Änderung des Verhältnisses aus viskosem und elastischem Verhalten der Probe und zeigen somit Änderungen der inneren Struktur des Glutennetzwerks an (Wehrli et al., 2021). Durch die Temperatureinwirkung kommt es zur Entfaltung der Proteine, wodurch die Oberflächenhydrophobizität steigt (Schofield et al., 1983;

Wang et al., 2017a; Weegels et al., 1994). Der hydrophobe Teil des Emulgators könnte hier in einer Weise mit den Glutenproteinen interagieren, die zu einer schnelleren Umstrukturierung des Netzwerkes und einer Zunahme der Elastizität führt. Dies würde auch die lineare Abnahme des Verlustfaktors in diesem Bereich erklären. Ein weiterer WP, der sonst bei keiner anderen Probe berechnet werden konnte, befand sich bei 83,3 °C. Das Auftreten der zusätzlichen WP könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Glutennetzwerk durch den Emulgatorzusatz mobiler wird, da die Ausrichtung der Proteine als Reaktion auf die Temperatureinwirkung schneller veränderbar ist.

Die WP für 0,25 % PS 20 waren ähnlich positioniert, bis auf den WP bei 64,0 °C aber leicht erhöht gegenüber der höheren Emulgatorkonzentration. Vor allem der letzte WP lag mit 91,0 °C höher als bei allen anderen Zusätzen. Zudem fehlte der WP bei etwa 83 °C.

Chompoorat et al. (2013, 2022) stellten durch den Zusatz von DATEM in Mehl einen Anstieg der Viskosität des korrespondierenden Glutens fest. Die Elastizität und Viskoelastizität wurde dadurch herabgesetzt (Chompoorat et al., 2013, 2022). Sie führten den Anstieg der Viskosität auf die zunehmende Aggregation der Glutenproteine aufgrund einer verringerten Abstoßung zwischen den Proteinen durch die Interaktion zwischen Emulgator und hydrophoben Protein-domänen zurück. Der Anstieg der Viskosität wurde außerdem durch eine erhöhte Steifigkeit des Glutennetzwerkes begründet (Chompoorat et al., 2013). Bei Deformation des Netzwerkes kann ein steifes, wenig mobiles Netzwerk nicht durch Reorganisation der Glutenproteine auf die mechanische Einwirkung reagieren. Stattdessen kommt es zum Bruch der ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Gluteneinheiten, die Proteinstränge gleiten folglich übereinander und die Viskosität wird erhöht (Belton, 1999, 2005). Da $\tan \delta$ im Frequenzsweep durch den Zusatz von 1 % PS 20 im Vergleich zur Kontrolle erhöht wurde, kann diese Erklärung auch auf das Glutennetzwerk mit einer hohen Dosierung PS 20 zutreffen. Der Zusatz von 0,25 % PS 20 im Frequenzsweep und die Temperatureinwirkung bei beiden Konzentrationen führten allerdings zu einem Anstieg an Elastizität und deuten daher auf ein mobileres, weniger vernetztes Glutennetzwerk hin.

3.3.2.3. Ascorbinsäure

Der LVE-Bereich unterschied sich mit 9,76 % (20 mg/kg AS) und 9,73 % (200 mg/kg AS) nur geringfügig zwischen den mit AS behandelten Proben und war für beide Proben höher als für die Kontrolle (+10,3 % bzw. +9,9 %) (siehe Tabelle 4).

G' und G'' erhöhten sich im Frequenzsweep mit steigender Frequenz kontinuierlich (siehe Abbildung 31). Die Summe beider Module war für die AS-Proben jeweils höher als für die Kontrolle (siehe Tabelle 4). Nur die Zunahme von G' für 20 mg/kg AS war gegenüber der Kontrolle signifikant (+16,7 %). Der Verlustfaktor überstieg den Wert 1 über den gesamten Frequenzsweep hinweg nicht und die Proben zeigten somit viskoelastisches Verhalten. Die Summe des Verlustfaktors war für die AS-behandelten Proben signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt (-5,8 % bzw. -5,4 %). Die Proben mit AS zeigten somit ein elastischeres Verhalten gegenüber der Kontrolle und auch gegenüber den salzbehandelten Proben. Keiner der rheologischen Parameter ergab signifikante Unterschiede bezüglich der verschiedenen zugesetzten Konzentrationen an AS.

Tabelle 4: Rheologische Charakterisierung mit oszillierendem Amplituden- und Frequenzsweep. Linearer-viskoelastischer Bereich (LVE), Summe des Speichermoduls G' , des Verlustmoduls G'' und des Verlustfaktors $\tan \delta$ von Feuchtkleberproben mit Ascorbinsäure (AS) und der Kontrollprobe ohne Zusatz. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n = 3$).

Probe	LVE	Stabw.	Summe Speicher- modul G'	Stabw.	Summe Verlust- modul G''	Stabw.	Summe $\tan \delta$	Stabw.
	[%]		[Pa]		[Pa]		[1]	
Kontrolle	8,85	0,80	71 853	7256	33 421	2670	9,88	0,19
20 mg/kg AS	9,76	0,48	83 833 ^A	5285	36 621	1463	9,31 ^A	0,18
200 mg/kg AS	9,73	0,34	79 003	1677	34 995	724	9,35 ^A	0,04

^A Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

^B Signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen Ascorbinsäure (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

Die Auswirkung der unterschiedlichen Konzentrationen an AS im Mikrozugversuch, Amplituden- und Frequenzsweep fielen noch geringer als für PS 20 aus, weshalb auch für AS beide Konzentrationen im Temperatursweep gemessen wurden, um den synergistischen Effekt der AS-Konzentration in Kombination mit einer Temperaturerhöhung bewerten zu können.

Der Kurvenverlauf des Temperatursweeps der AS-Proben ähnelte dem der Kontrolle, wies aber bis 60 °C einen niedrigeren Verlustfaktor auf (siehe Abbildung 14). Bis 60 °C verliefen die Kurven für 20 mg/kg und 200 mg/kg AS nahezu identisch. Bei weiterem Temperaturanstieg erhöhte sich der Verlustfaktor der 20 mg/kg AS-Probe und überstieg ab etwa 72 °C den Verlustfaktor der Kontrolle. Der Verlustfaktor der Probe mit 200 mg/kg AS blieb stets niedriger als der der Kontrolle. Somit wies die Probe mit geringer AS-Dosierung zunächst ein elastischeres Verhalten und bei erhöhten Temperaturen ein viskoseres Verhalten auf als die Kontrolle, während die Zugabe von 200 mg/kg der Probe ein durchgehend elastischeres Verhalten verlieh.

Für AS konnten 5 bzw. 6 WP bestimmt werden, von denen jeweils vier WP ähnlich zu denen der Kontrolle waren (siehe Abbildung 14). Bei höherer AS-Dosierung traten die WP im Vergleich zur Kontrolle verfrüht auf, bei niedriger Dosierung dagegen tendenziell bei höheren Temperaturen. Bei beiden Konzentrationen konnte ein zusätzlicher WP bei 49,0 °C bzw. 47,3 °C ermittelt werden, der bei 200 mg/kg AS-Zusatz durch einen sechsten WP bei 51,6 °C ergänzt wurde.

In der Literatur wurde einstimmig festgestellt, dass der Zusatz von AS zu Teig das Speichermodul erhöht (Berland & Launay, 1995; Chompoorat et al., 2013; Dong & Hosney, 1995; Miller & Hosney, 1999; Yeh & Shiau, 1999). Jedoch gab es unterschiedliche Resultate für das Verhalten der Viskoelastizität, die in verschiedenen Studien zu- oder abnahm (Chompoorat et al., 2013; Miller & Hosney, 1999; Yeh & Shiau, 1999). Die unterschiedlichen Ergebnisse können durch diverse Konzentrationen an AS zustande gekommen sein, die für die Versuche jeweils verwendet wurden oder mit verschiedenen Bedingungen bei der Teigherstellung und der damit verbundenen Sauerstoffzufuhr zusammenhängen. In der Literatur wurde diskutiert, dass durch eine unzureichende Sauerstoffzufuhr während des Anteigens AS nur unzureichend in DH-AS umgewandelt wird (Berland & Launay, 1995). Die dabei verbleibende AS würde demnach das

Glutennetzwerk durch ihren reduzierenden Effekt schwächen. Beghin et al. (2022) belegten allerdings, dass Teige, die mit AS unter einer limitierten Sauerstoffatmosphäre geknetet wurden, zwar mehr freie Thiole aufwiesen; das resultierende Brotvolumen war aber dennoch signifikant höher als das der Kontrolle ohne Zusatz. Das Brotvolumen unterschied sich zudem nicht von dem Volumen des Teiges, das mit der gleichen AS-Dosis unter erhöhter Sauerstoffatmosphäre angeteigt wurde. Beghin et al. (2022) schlussfolgerten daraus, dass das Enzym AO den zur Verfügung stehenden Sauerstoff sehr effektiv nutzen kann.

Geht man allerdings wiederum davon aus, dass in der vorliegenden Studie AS durch die fehlende AO als Reduktionsmittel vorliegt, ist die signifikant höhere Elastizität im Frequenzsweep und in Teilen des Temperatursweeps der mit AS behandelten Proben gegenüber der Kontrolle unerwartet. Werden Disulfidbrücken durch Reduktion gespalten, wäre eher eine erhöhte Mobilität der Proteine, eine dadurch ermöglichte Reorganisation der Proteine bei Deformationen und ein damit einhergehendes viskoseres Verhalten zu erwarten (Belton, 2005; Singh & Singh, 2013).

Lucas et al. (2018) stellten fest, dass mit zunehmender AS-Konzentration in Teig der Verzweigungsgrad und damit die Netzwerkkonnektivität und die durchschnittliche Proteinlänge vermehrt sanken. Eine damit nicht proportional einhergehende Schwächung des Glutennetzwerks ließ vermuten, dass AS die Proteinaggregation stellenweise fördert und zu kontrahierten Proteinen mit irregulärer Verteilung führt. Dies wurde durch das Entstehen dickerer Proteinstränge und das Vorhandensein eines Glutennetzwerks mit einer Struktur, die teils große Abstände zwischen den Proteinsträngen aufwies, belegt. Dicke Proteinstränge verursachen ein stärkeres Netzwerk. Der sinkende Verzweigungsgrad der Proteine könnte allerdings ein Hinweis darauf sein, dass, zumindest auf mikroskopischer Ebene, durch AS die Vernetzung nicht gefördert wird, sondern Proteine durch eine veränderte Anordnung stärkere Proteinstränge bilden, die zu einem elastischeren Verhalten führen (Lucas et al., 2018). Inwiefern diese Beobachtung bei Zugabe von AS zu Feuchtkleber zutrifft, kann im Umfang dieser Studie nicht belegt werden, da hierfür bildgebende Verfahren wie CLSM benötigt werden.

3.3.2.4. Enzyme

Um die Ergebnisse aus dem Mikrozugversuch zu überprüfen, die zeigten, dass die Einarbeitung von Enzymen in Feuchtkleber keinen Effekt mehr auf die Glutenproteine unter großer Deformation bewirkt (siehe 3.3.1.4), wurden zusätzlich Rheometer-Messungen unter kleiner Deformation durchgeführt. Hierfür wurden Frequenzsweeps mit einer geringen und mittleren Dosierung der Enzyme durchgeführt (siehe Tabelle 5).

Die Summe des Speichermoduls zeigte nur für 30 mg/kg Xylanase eine signifikante Zunahme im Vergleich zur Kontrolle. Für die Summe des Verlustmoduls konnten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle oder zwischen den Enzymkonzentrationen festgestellt werden. 30 mg/kg Xylanase, 10 mg/kg Cellulase und 5 mg/kg Lipase verringerten die Summe des Verlustfaktors zwar signifikant. Da im Mikrozugversuch durch die Zugabe von Enzymen zu Feuchtkleber allerdings keinerlei Veränderungen beobachtet werden konnten und der Effekt auf die rheologischen Eigenschaften gering war, wurde kein Einfluss der Enzyme auf die Glutenproteinzusammensetzung erwartet. Weitere chemisch-analytische Versuche von enzymbehandelten Proben wurden daher nicht durchgeführt.

Tabelle 5: Rheologische Charakterisierung mit oszillierendem Frequenzsweep. Summe von Speichermodul G' , Verlustmodul G'' und Verlustfaktor $\tan \delta$ von Feuchtkleberproben mit Enzymzusatz und der Kontrollprobe ohne Zusatz. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm halbe Differenz der Mittelwerte angegeben ($n = 2$). TG: Transglutaminase.

Probe	Summe Speicher- modul G' [Pa]	Stabw.	Summe Verlust- modul G'' [Pa]	Stabw.	Summe $\tan \delta$ [1]	Stabw.
Kontrolle	71 853	7256	33 421	2670	9,88	0,19
10 mg/kg TG	76 475	5777	34 775	2403	9,66	0,06
30 mg/kg TG	76 910	3281	35 447	1350	9,80	0,05
30 mg/kg Xylanase	89 860 ^A	10451	38 719	4237	9,23 ^A	0,08
90 mg/kg Xylanase	74 110	113	33 551	240	9,64	0,00
10 mg/kg Cellulase	81 860	3776	35 568	2442	9,24 ^A	0,25
30 mg/kg Cellulase	76 795	2892	34 880	869	9,70	0,16
5 mg/kg Lipase	81 660	2687	35 726	1486	9,31 ^A	0,09
15 mg/kg Lipase	74 455	1336	33 452	594	9,57	0,05

^A Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

^B Signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen desselben Enzyms (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

3.4. Einfluss von Zusätzen auf die Glutenproteinzusammensetzung

Die chemisch-analytischen Bestimmungen des Vitalklebers wurden durchgeführt, um Einflüsse der Zusätze in Kombination mit Temperaturbehandlung auf die Glutenproteine und deren Interaktion untereinander bewerten zu können. Die Glutenproteinzusammensetzung wurde per Osborne-Fraktionierung und RP-HPLC, durch SDSL/GMP-Fraktionierung und SEC-HPLC sowie durch Bestimmung der freien und gebundenen Thiole per Ellman-Assay charakterisiert. Des weiteren wurde die Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente per Raman-Spektroskopie bestimmt und ausgewählte Proben massenspektrometrisch durch nicht-zielgerichtete LC-MS/MS analysiert. Die Inhalte aus 3.4.1.1, 3.4.2.1, 3.4.3.1 und 3.4.4.1 wurden teilweise bereits im Journal of Cereal Science veröffentlicht (Höller & Scherf, 2024).

3.4.1. Rohproteingehalt

3.4.1.1. Salze

Der nach Dumas bestimmte Rohproteingehalt variierte zwischen 71,4 % und 82,5 % für alle mit Salz behandelten Proben (siehe Tabelle 6). Alle salzbehandelten Proben wiesen einen niedrigeren Proteingehalt als die entsprechenden Kontrollproben auf (-0,1 % bis - 9,6 %, siehe Tabelle 32). Da der Proteingehalt der bei 80 °C getrockneten Proben höher ausfiel als der bei 40 °C getrockneten Proben, wurde vermutet, dass die bei niedriger Temperatur getrockneten Proben mehr Restfeuchte beinhalten. Diese Vermutung wurde durch die Messung des Wassergehalts mittels Karl-Fischer-Titration an dem Probensatz mit KCl-Zusatz überprüft. Die Ergebnisse bestätigten, dass sich der Wassergehalt der Proben unterscheidet (5,46–9,35 %), und höher bei niedriger Trocknungstemperatur und hoher Salzdosierung ausfällt, da die Salze hygroskopisch sind. Wird der Wassergehalt bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt, werden die beobachteten Trends allerdings nur wenig beeinflusst oder sogar verstärkt. Die Ergebnisse und Schlussfolgerungen bleiben also auch unter Annahme eines einheitlichen Wassergehalts bestehen.

Tabelle 6: Rohproteingehalt der mit Salz behandelten Proben und der Kontrollproben ohne Salz bei verschiedenen Trocknungstemperaturen. Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben (n = 3). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben. Die Daten wurden bereits in Höller & Scherf (2024) veröffentlicht.

Probe	Trocknungstemperatur	Rohproteingehalt [%]
Kontrolle	40 °C	78,8 ^B
0,64 % KCl	40 °C	77,2 ^{A,B,C}
3, 83 % KCl	40 °C	73,9 ^{A,B,C}
0,50 % NaCl	40 °C	78,8 ^{B,C}
3,00 % NaCl	40 °C	73,7 ^{A,B,C}
0,41 % MgCl ₂	40 °C	77,5 ^{A,B,C}
2,44 % MgCl ₂	40 °C	71,4 ^{A,B,C}
0,48 % CaCl ₂	40 °C	77,7 ^{A,B,C}
2,85 % CaCl ₂	40 °C	72,5 ^{A,B,C}
Kontrolle	80 °C	82,5 ^B
0,64 % KCl	80 °C	81,0 ^{A,B,C}
3, 83 % KCl	80 °C	76,9 ^{A,B,C}
0,50 % NaCl	80 °C	82,0 ^{A,B,C}
3,00 % NaCl	80 °C	77,0 ^{A,B,C}
0,41 % MgCl ₂	80 °C	81,6 ^{A,B,C}
2,44 % MgCl ₂	80 °C	74,6 ^{A,B,C}
0,48 % CaCl ₂	80 °C	80,7 ^{A,B,C}
2,85 % CaCl ₂	80 °C	75,5 ^{A,B,C}
CV		0,04

^A Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-test, $p \leq 0,05$, n = 3).

^B Signifikanter Unterschied zwischen der gleichen Probe bei verschiedenen Trocknungstemperaturen (ANOVA mit Tukey's Test, $p \leq 0,05$, n = 3).

^C Signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen desselben Salzes bei gleicher Trocknungstemperatur (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, n = 3).

3.4.1.2. Polysorbat 20

Der Rohproteingehalt der mit 0,25 % und 1 % PS 20 behandelten Proben lag bei 79,2 % und 77,6 % für die bei 40 °C getrockneten Proben und bei 81,3 % und 80,2 % für die bei 80 °C getrockneten Proben und lag damit jeweils im Rahmen der für die salzbehandelten Proben gemessenen Werte (siehe Tabelle 24 und 32). Für beide PS 20-Konzentrationen und Trocknungstemperaturen unterschied sich der Rohproteingehalt kaum von der Kontrolle (-2,82 % bis +0,45 %, siehe Tabelle 33).

3.4.1.3. Ascorbinsäure

Für die mit 20 mg/kg bzw. 200 mg/kg behandelten Glutenproben wurde ein Rohproteingehalt von 78,8 % und 78,2 % für die bei 40 °C getrockneten Proben bestimmt und ein Wert von 80,2 % und 81,5 % für die bei 80 °C getrockneten Proben (siehe Tabelle 24). Die Rohproteingehalte glichen den Werten, die für die Proben mit Salz und PS 20 bestimmt wurden (siehe Tabelle 6 und 24) und unterschieden sich wenig von der jeweiligen Kontrollprobe (-2,77 % bis +0,01 %, siehe Tabelle 32).

3.4.2. Gehalt an Gliadinen und Gluteninen

3.4.2.1. Salze

Um Informationen über die Glutenproteinzusammensetzung der Vitalkleberproben zu erhalten, wurden die Gliadine, einschließlich der Glutenproteintypen $\omega 5$ -, ωb -, $\omega 1,2$ -, α - und γ -Gliadine, und Glutenine mit LMW-GS und HMW-GS durch Osborne-Fraktionierung und RP-HPLC bestimmt. Der Gliadinegehalt lag zwischen 419,4 mg/g und 514,6 mg/g (siehe Abbildung 15 und Tabelle 25). In allen salzbehandelten Proben und insbesondere in Proben, die mit zweiwertigen Salzen behandelt wurden, waren signifikant mehr $\omega 5$ -, ωb -, $\omega 1,2$ -, α - und γ -Gliadine vorhanden als in der entsprechenden Kontrollprobe (+1,2 % bis +17,3 %, siehe Tabelle 32) und damit der Gesamtgliadinegehalt erhöht. Die einzige Ausnahme bildete die Vitalkleberprobe (VK) mit 2,44 % $MgCl_2$, die bei 40 °C getrocknet wurde (Proben werden im Folgenden auch nach dem Schema VK (2,44 % $MgCl_2$, 40 °C) bezeichnet). Die Probe enthielt signifikant weniger Gliadine als die Kontrolle (-2,5 %), da weniger α - und γ -Gliadine extrahiert werden konnten. Insgesamt wies diese Probe den geringsten Gesamtproteingehalt innerhalb des Probensets der salzbehandelten Proben auf. Im Allgemeinen führte die geringe Salzkonzentration zu einer stärkeren Zunahme an Gliadinen im Vergleich zur Kontrolle als die hohe Salzkonzentration.

Der Glutenin-Gehalt lag zwischen 257,6 mg/g und 396,8 mg/g. Proben, die bei 80 °C getrocknet wurden, wiesen einen höheren Glutenin-Gehalt auf als Proben, die bei 40 °C getrocknet wurden. Die salzbehandelten Proben enthielten weniger LMW-GS und HMW-GS als die jeweilige Kontrolle und damit einen geringeren Gluteningehalt (-7,5 % bis -22,5 %, siehe Tabelle 32). In den bei 80 °C getrockneten Proben wurden weniger Gliadine, aber mehr Glutenine extrahiert als in den bei 40 °C getrockneten Proben. Die hohe Salzdosisierung verminderte die Extrahierbarkeit der Proteine bei allen Salzen deutlicher als eine geringe Zugabe von Salz.

Hinsichtlich der relativen Gehalte der einzelnen Glutenproteintypen unterschieden sich die salzbehandelten Proben und die Kontrollproben aufgrund der unterschiedlichen Extrahierbarkeiten nicht wesentlich voneinander. Dennoch verursachten die Behandlungen der Proben bei Betrachtung der absoluten Werte fast ausschließlich signifikante Änderungen des Gehalts der Glutenproteintypen im Vergleich zur Kontrolle, verglichen mit der jeweils anderen Temperatur sowie in der Gegenüberstellung der beiden Konzentrationen eines Salzes (siehe Tabelle 25).

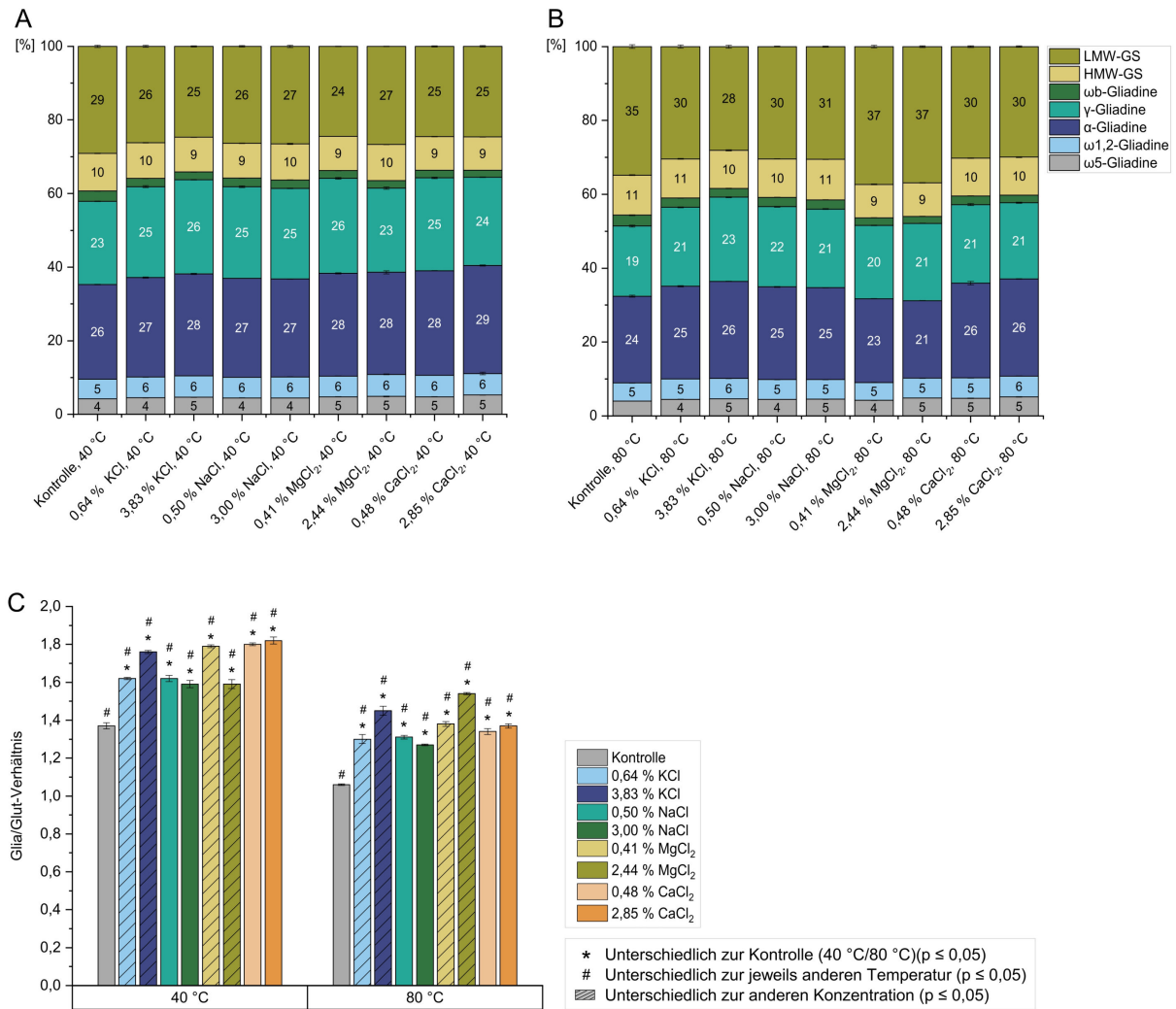


Abbildung 15: Anteile der *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS) und der Glutenproteintypen α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine bei 40 °C (A) und 80 °C (B) Trocknungstemperatur und das Verhältnis von Gliadin zu Glutenin (Gliadin/Glut) (C) in salzbehandelten Proben und Kontrollproben ohne Salz. Werte unter 4 % sind nicht dargestellt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n = 3$). In Teil (C) zeigen die Sternchen einen signifikanten Unterschied zu der jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). Das Doppelkreuz zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Trocknungstemperaturen 40 °C und 80 °C für die gleiche Probe (ANOVA mit Tukey's Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). Schraffierte Balken zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen verschiedenen Konzentrationen des gleichen Salzes bei derselben Trocknungstemperatur (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). Abbildung modifiziert nach Höller & Scherf (2024).

Das Verhältnis aus Gliadinen und Gluteninen verdeutlicht, wie verschiedene Salze, Salzkonzentrationen und Temperaturen die Zusammensetzung der Glutenproteine beeinflussen. Unterschiede zwischen Probensets können auf diese Weise leicht verglichen werden. Das Gliadin/Glutenin-Verhältnis stellt außerdem ein hilfreiches Instrument zur Einschätzung der Vitalkleberfunktionalität dar, da Gliadine die Dehnbarkeit und Viskosität erhöhen und Glutenine als Elastizitäts- und Festigkeitsgeber fungieren. Für alle salzbehandelten Proben war das Gliadin/Glutenin-Verhältnis höher als das der jeweiligen Kontrolle (+16,1 % bis +45,3 %, siehe Tabelle 32). Bei 40 °C Trocknungstemperatur lagen die Werte zwischen 1,37 und 1,82, die bei

80 °C getrockneten Vitalkleberproben bewegten sich im Bereich zwischen 1,06 und 1,54. Die bei hoher Temperatur getrockneten Proben wiesen insgesamt ein niedrigeres Gliadin/Glutenin-Verhältnis auf, da für diese Proben weniger Gliadin und mehr Glutenin extrahiert werden konnte als für das 40 °C-Probenset. Bei niedriger Salzdosierung zeigte sich, dass das Gliadin/Glutenin-Verhältnis für die monovalenten und divalenten Salze sowie für beide Trocknungstemperaturen jeweils sehr ähnlich ausfiel. Insofern konnte ein systematischer Effekt der Wertigkeit der Salze auf die Gliadin/Glutenin-Extrahierbarkeit festgestellt werden.

Neben der Wertigkeit der Salze könnte dieser Effekt auch auf die kosmotropen oder chaotropen Eigenschaften der Salze zurückzuführen sein. Dieser Trend war bei hoher Salzdosierung nicht mehr zu beobachten, da die Gliadin/Glutenin-Verhältnisse je nach Trocknungstemperatur zwischen den Salzen erheblich variierten. Die Probe mit CaCl_2 zeigte das höchste Gliadin/Glutenin-Verhältnis von 1,82 bei hoher Dosierung und einer Trocknungstemperatur von 40 °C, während das Verhältnis für MgCl_2 nur 1,67 betrug. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass die Salze in hoher Dosierung einen stärkeren individuellen Effekt auf die Glutenproteintypen ausüben. Bei KCl und MgCl_2 war der Unterschied zwischen den Konzentrationen besonders ausgeprägt und unabhängig von der Trocknungstemperatur signifikant.

Charakteristische chaotrope und kosmotrope Effekte von Salzen, die zu einer verzögerten oder beschleunigten Entfaltung von Proteinen beitragen, treten erst ab einer Konzentration von etwa 0,5 mol/L ein. Elektrostatische Kräfte sind bei solchen Salzkonzentrationen vernachlässigbar. Stattdessen sind hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen für Interaktionen zwischen Proteinen, Salz und Lösungsmittel relevant (Kinsella & Hale, 1984; Preston, 1981). Bei Salzkonzentrationen von $< 0,3$ mol/L, die der niedrigen Dosierung der Salze in der vorliegenden Studie entspricht, schirmen die Ionen der Salze die elektrostatischen Kräfte der Proteine ab. Durch die Neutralisation der geladenen funktionellen Gruppen der Proteine wird die Proteinaggregation gefördert. Bei geringen Salzkonzentrationen ist daher ein weitgehend ähnlicher Effekt der Salze auf Glutenproteine erwartbar (Fu et al., 1996; Kinsella & Hale, 1984; Preston, 1981; Ukai et al., 2008). Dies trifft auf die beobachteten Effekte der Salze auf die Glutenproteinzusammensetzung nur bedingt zu, da bei niedriger Salzdosierung zwar ähnliche Effekte auf das Gliadin/Glutenin-Verhältnis festgestellt werden konnten, monovalente und divalente Salze sich aber dennoch deutlich unterschieden. Es liegt daher nahe, dass die in unterschiedlichem Maße ausgeprägten Gliadin/Glutenin-Verhältnisse auf einen synergistischen Effekt zwischen Kation, Konzentration und Trocknungstemperatur zurückzuführen sind.

In der Literatur existieren bisher keine Publikationen zur Nachbehandlung von Gluten. Daher können die vorliegenden Ergebnisse lediglich mit Studien verglichen werden, in denen vor der Glutenextraktion Salz in den Teig eingearbeitet wurde oder Gluten mit Salzlösungen aus dem Teig ausgewaschen wurde. Viele Studien untersuchen zudem häufig lediglich rheologische Kenngrößen oder Backeigenschaften und weniger die Proteinzusammensetzung der Feucht- oder Vitalkleber. Zwei Veröffentlichungen, die den Gliadiningehalt in Vitalkleber analysierten, kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Fu et al. (1996) fand mehr Gliadine in mit NaCl behandeltem Teig und dem daraus resultierenden Gluten sowie weniger unlösliches Protein. Chen et al. (2018) extrahierte dagegen weniger Gliadine, aber mehr Glutene in Gluten aus mit NaCl behandeltem Teig. Für die gegensätzlichen Beobachtungen kann die Proteinzusammensetzung der Mehle oder Unterschiede in der Probenherstellung ursächlich sein. Die Ergebnisse aus der

Literatur sind zudem nur bedingt mit den Resultaten der vorliegenden Studie vergleichbar, da in einem regulären Auswaschprozess stets Stärke involviert ist, welche mit Salzen und Proteinen interagiert und so ein weiterer Faktor für die Beeinflussung der Proteinzusammensetzung vorliegt (Chen et al., 2018). Da in dieser Arbeit Salze erst in bereits isoliert vorliegenden Feuchtkleber eingearbeitet wurden, kann eine vorherrschende Interaktion von Salzen und Protein mit Stärke ausgeschlossen werden.

Die Glutenproteinzusammensetzung kann mit den rheologischen Ergebnissen verknüpft werden, um mehr Erkenntnisse über die Beeinflussung der Proteine durch die Salzbehandlung zu erhalten. Der höhere Gehalt an Gliadinen der salzbehandelten Proben deckt sich mit der Zunahme der Dehnbarkeit im Mikrozugversuch, für die die Gliadine verantwortlich sind. Jedoch stimmt der höchste Gliadinegehalt der bei 40 °C behandelten und getrockneten Proben nicht mit der größten Dehnbarkeit im Mikrozugversuch überein. Da Glutenine für die Festigkeit des Glutennetzwerks sorgen, lässt sich die Abnahme des Gluteningehalts in den Salzproben in Übereinstimmung mit einer Abnahme des Dehnwiderstandes bringen. Eine Ausnahme stellen hier die Proben mit der hohen Konzentration an KCl und NaCl dar, die zwar weniger Glutenin als die Kontrolle beinhalten, aber zu einer, wenn auch nicht signifikanten, Erhöhung des Dehnwiderstandes führten.

Das Verhältnis aus Gliadinen und Gluteninen kann ein guter Indikator zur Abschätzung der Dehnbarkeit und des Dehnwiderstandes sein, da Gliadine zur Dehnbarkeit beitragen und Glutenine durch Netzbildung den Dehnwiderstand erhöhen. Allerdings lässt das Gliadin/Glutenin-Verhältnis in dieser Studie auf kein systematisches Muster bei den Dehneigenschaften im Mikrozugversuch schließen. Ebenso folgt die Einordnung der Verhältnisse aus Gliadinen und Gluteninen der unterschiedlichen Salzbehandlungen nicht dem Verhältnis aus Dehnbarkeit und Dehnwiderstand im Mikrozugversuch (siehe Tabelle 25 und 23).

Die Ergebnisse der Osborne-Fraktionierung bestätigen die Vorgänge auf molekularer Ebene während des Temperatursweeps. Ab 60 °C stiegen G' und G'' aufgrund von Konformitätsänderungen innerhalb des Glutennetzwerks an. Bei höheren Temperaturen kommt es durch Konformationsänderungen der Proteine zur Einbindung von Gliadinen in das Gluteninnetzwerk. Die Vernetzung zwischen Gliadinen und Gluteninen bedingt die Bildung von Glutenaggregaten (Lagrain et al., 2008; Schofield et al., 1983; Singh & Singh, 2013). Übereinstimmend dazu konnten in den bei 80 °C getrockneten Vitalkleberproben weniger Gliadine, aber mehr Glutenine extrahiert werden. Da Gliadine das viskoelastische Verhalten des Glutennetzwerks beeinflussen und Gliadine temperaturstabiler als Glutenine sind, kann der Gliadin- oder Gluteningehalt in eine direkte Verbindung mit der Position der WP des Temperatursweeps gebracht werden. Je weniger Gliadin in einer Glutenprobe enthalten ist, desto früher treten Umstrukturierungen des Proteinnetzwerkes im Laufe der Temperaturerhöhung ein (Schofield et al., 1983; Wehrli et al., 2021). In der vorliegenden Studie stimmte die Reihenfolge der WP jedoch nicht mit der Menge an Gliadin überein, die in den Proben durch die Osborne-Fraktionierung nachgewiesen wurde. Dies lässt sich auf eine Beeinflussung der Interaktion zwischen Gliadinen und Gluteninen durch die Zugabe von Salzen zurückführen. Diese Beeinflussung wurde bereits durch die rheologischen Messungen nachgewiesen (siehe 3.3).

Eine Einschränkung im Vergleich zwischen den Mikrozugversuch- und Rheometerergebnissen

und der Bestimmung der Glutenproteintypen liegt im unterschiedlichen Zustand der Proben bei Versuchsdurchführung. Für die rheologischen Versuche wurden die Proben im noch feuchten Zustand verwendet. Während der Trocknung des Feuchtklebers bei 40 °C und der anschließenden Vermahlung zur Herstellung der Vitalkleberproben wirken zwar keine extremen thermischen oder mechanischen Einflüsse auf die Proben (siehe 3.2.2). Dennoch kann durch diese Prozessparameter eine Beeinflussung der Glutenproteine nicht ausgeschlossen werden. Die Resultate der Osborne-Fraktionierung legen außerdem nahe, dass es sich bei der Temperatureinwirkung um keinen systematischen Einfluss handelt, der sich auf jede Probe gleichermaßen auswirkt, sondern dass es zu synergistischen Effekten von Salzbehandlung und Temperatur kommt, welche die Glutenproteine in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen.

Zusammenfassend führte der Zusatz von Salzen zu Feuchtkleber zu einer geringeren Glutenin-, aber erhöhten Gliadinextrahierbarkeit der Vitalkleberproben. Im Vergleich zu den Kontrollen und zwischen den Salzkonzentrationen konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden, was belegt, dass die Unterschiede im Gehalt der Glutenproteintypen nicht allein durch die Temperatur zustande kamen. Mono- und divalente Salze glichen sich in den Effekten auf den Gehalt der Glutenproteintypen. Für alle Salze bewirkte die geringe Salzkonzentration einen stärker positiven Effekt auf die Gliadine und die höhere Salzkonzentration führte zu einer größeren negativen Veränderung des Gluteningehalts.

3.4.2.2. Polysorbat 20

Der Gliadiningehalt der mit PS 20 behandelten Proben lag zwischen 454,6 mg/g und 487,1 mg/g und war sowohl für die niedrigere Trocknungstemperatur als auch für die niedrigere PS 20-Dosierung höher (siehe Abbildung 16 und Tabelle 26). Für alle Proben konnten signifikant mehr Gliadine extrahiert werden als für die vergleichbare Kontrollprobe (+8,4 % bis +11,0 %, siehe Tabelle 32); allerdings war der Gehalt an ω 5-Gliadinen signifikant erniedrigt.

Der Gluteningehalt lag bei 349,8 mg/g bis 398,6 mg/g und zeigte einen höheren Gehalt für die bei 80 °C und mit 0,25 % PS 20 behandelten Proben auf. Bei 40 °C Trocknungstemperatur konnten in den Emulgatorproben signifikant mehr Glutenine extrahiert werden als bei der Kontrolle (+9,6 % bis +11,7 %, siehe Tabelle 33), bei 80 °C Trocknungstemperatur unterschieden sich die PS 20-Proben kaum von der Kontrolle (-0,9 % bis +0,5 %). Da der Gliadin- bzw. Gluteningehalt in gleichem Umfang zunahm oder abnahm, wiesen die bei 40 °C getrockneten Proben mit den unterschiedlichen PS 20-Dosierungen ein identisches Gliadin- und Gluteninverhältnis von 1,37 auf. Die Summe an extrahierbaren Proteinen beider Proben war ebenfalls sehr ähnlich. Der gleiche Fall trat bei den bei 80 °C getrockneten Proben mit einem Gliadin/Glutenin-Verhältnis von 1,15 bzw. 1,16 auf. Bei 80 °C war das Gliadin/Glutenin-Verhältnis signifikant höher als das der Kontrolle (+8,5 % und +9,4 %). Die Gliadin- und Gluteningehalte unterschieden sich zwischen den Konzentrationen bei der gleichen Trocknungstemperatur zwar nicht signifikant. Dennoch war der gleiche Trend für die jeweilige Emulgatorkonzentration bei beiden Trocknungstemperaturen zu beobachten.

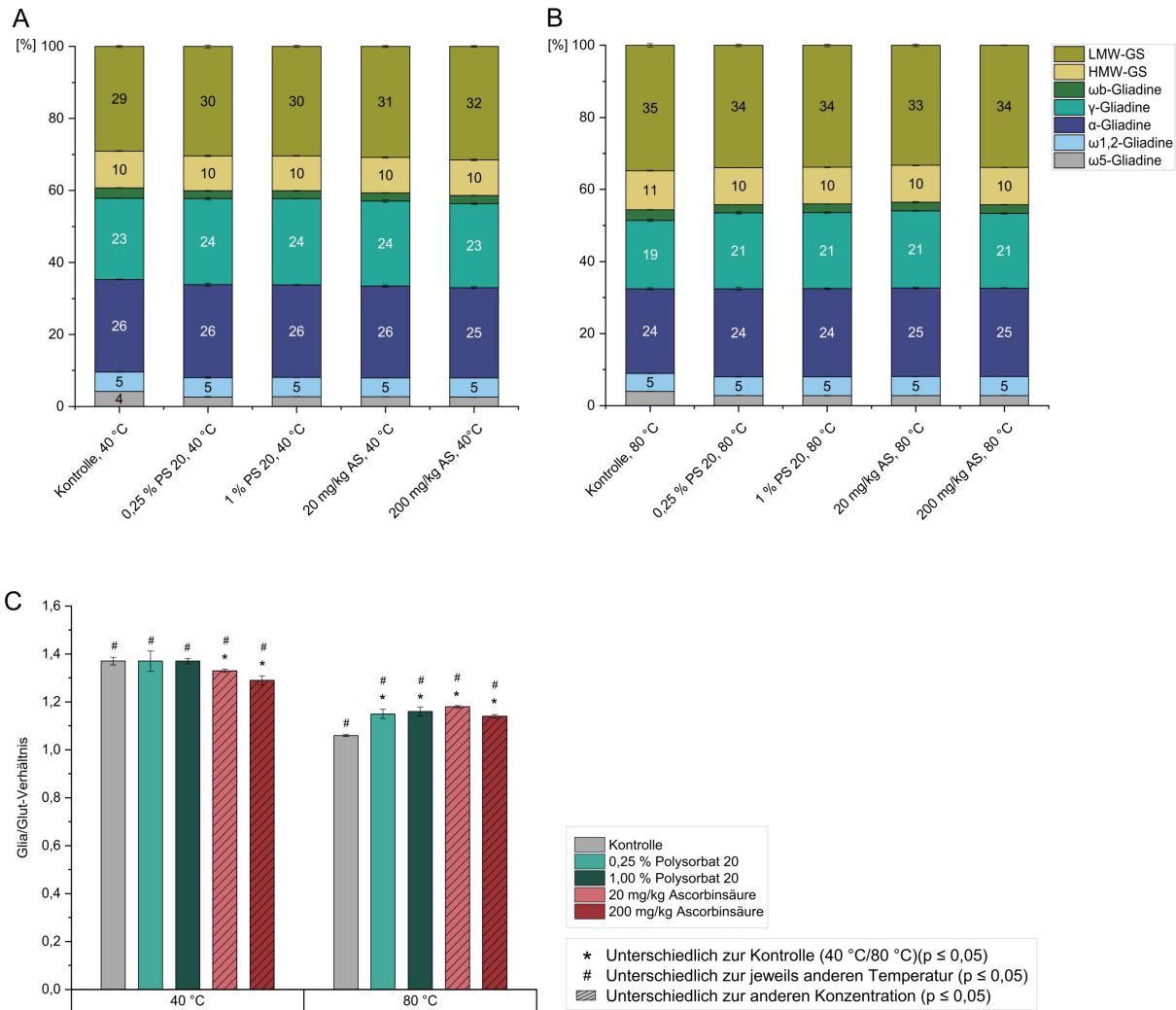


Abbildung 16: Anteile der *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS) und der Glutenproteintypen α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine bei 40 °C (A) und 80 °C (B) Trocknungstemperatur und das Verhältnis von Gliadin zu Glutenin (Gliadin:Glutenin) (C) in Proben mit Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) und Kontrollproben ohne Zusatz. Werte unter 4 % sind nicht dargestellt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n = 3$). In Teil (C) zeigen die Sternchen einen signifikanten Unterschied zu der jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). Das Doppelkreuz zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Trocknungstemperaturen 40 °C und 80 °C für die gleiche Probe (ANOVA mit Tukey's Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). Schraffierte Balken zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen verschiedenen Konzentrationen des gleichen Zusatzes bei derselben Trocknungstemperatur (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). PS 20 und AS wurden separat statistisch ausgewertet.

Der Gehalt an Gluteninen war bei PS 20 weniger stark im Vergleich zur Kontrolle verringert als bei den Salzen oder sogar erhöht (siehe Abbildung 16, Tabelle 26 und 32). Die Zunahme der Gliadinextrahierbarkeit durch PS 20 lag im Rahmen der auch für die Salze gemessenen Werte. Im Gegensatz zu den Salzen nahm die Extrahierbarkeit der ω 5-Gliadine jedoch signifikant gegenüber der Kontrolle ab. Obwohl ω 5- und ω 1,2-Gliadine strukturell sehr ähnlich sind (siehe 1.2.1 und Tabelle 1), nahm der Gehalt an ω 1,2-Gliadinen durch den Zusatz an PS 20 nicht ab. Unterschiede zwischen ω 5- und ω 1,2-Gliadinen liegen in dem etwas höheren Molekulargewicht

der ω 5-Gliadine. Da die Extrahierbarkeit der deutlich höhermolekularen HMW-GS durch PS 20 sogar gefördert wird, kann ein Extraktionsverlust aufgrund sterischer Effekte ausgeschlossen werden. In der Aminosäurezusammensetzung unterscheiden sich ω 5- und ω 1,2-Gliadine vor allem im Gehalt der polaren bzw. sauren Aminosäuren Glutamin und Glutaminsäure. Unter allen Glutenproteintypen weisen ω 5-Gliadine mit 56 mol-% den höchsten Gehalt dieser Aminosäuren auf (Belitz et al., 2007). Daher kann eine Interaktion mit dem polaren Teil des Emulgators PS 20 und speziell diesem Glutenproteintyp vermutet werden, die zu einer geringeren Extrahierbarkeit führt.

In allen Proben konnten großteils signifikant mehr LMW-GS und α -, ω 1,2- und γ -Gliadinen als in der jeweiligen Kontrollprobe extrahiert werden. Gómez et al. (2012) beobachteten mit SSL bzw. DATEM ebenfalls eine erhöhte Extrahierbarkeit dieser Glutenproteintypen und führten dies auf die Wechselwirkung zwischen Emulgator und Protein zurück, die die Extrahierbarkeit von hydrophoben Glutenproteinen begünstigt. Gómez et al. (2012) untersuchten den anionischen Emulgator SSL mit einem hohen HLB-Wert von 21 im Vergleich zu PS 20 mit einem HLB-Wert von 16,7 (Armero & Collar, 1996). SSL interagiert mit HMW-GS vor allem über ionische Wechselwirkungen, welche somit für die Interaktion mit LMW-GS und Gliadinen nicht zur Verfügung stehen und so deren Löslichkeit erhöhen. Der nicht-ionische Emulgator PS 20 kann dagegen nur hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Naheliegender wäre daher, dass PS 20 mit HMW-GS Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet und die Löslichkeit von LMW-GS und Gliadinen auf diese Weise erhöht. Allerdings war auch die HMW-GS-Extrahierbarkeit bei 40 °C Trocknungstemperatur erhöht.

Neben SSL untersuchten Gómez et al. (2012) ebenfalls den anionischen Emulgator DATEM, der mit 9,2 einen geringeren HLB-Wert als PS 20 aufweist (Armero & Collar, 1996). Ionische Wechselwirkungen spielen bei DATEM nur begrenzt eine Rolle. Es treten vermehrt hydrophobe Interaktionen auf, die zu einem geringeren Aggregationsgrad der Glutenproteine als beim Einsatz von SSL führen. Durch DATEM entsteht daher ein strukturiertes Glutennetzwerk (Gómez et al., 2012). Es ist daher davon auszugehen, dass der nachträgliche Einsatz von PS 20 in Feuchtkleber zu einer verbesserten Proteinextrahierbarkeit durch verminderte Proteinaggregation führt, da in den behandelten Proben mehr Protein extrahiert werden konnte als in den entsprechenden Kontrollproben. Zudem waren die beschriebenen Beobachtungen in den Proben mit 40 °C Trocknungstemperatur ausgeprägter, was dafür spricht, dass die Temperatur einen größeren Effekt auf die Interaktion der Glutenproteine nimmt als die Konzentration des Zusatzes PS 20.

3.4.2.3. Ascorbinsäure

Der Gliadinegehalt der mit AS behandelten Proben lag zwischen 462,0 mg/g und 483,5 mg/g und war für die bei 40 °C getrockneten Proben höher (siehe Abbildung 16 und Tabelle 26). Alle Proben wiesen einen signifikant höheren Gliadinegehalt im Vergleich zur Kontrolle auf (+7,7 % bis +10,3 %, siehe Tabelle 33), der vor allem durch die höhere Extrahierbarkeit der γ -Gliadine zustande kam; aber auch der Gehalt an α - und ω 1,2-Gliadinen war gegenüber den Kontrollen erhöht. Der Gehalt an Gluteninen betrug zwischen 363,4 mg/g und 403,9 mg/g, war für die bei 80 °C getrockneten Proben höher und für die Proben bei 40 °C Trocknungstemperatur im Ver-

gleich zur Kontrolle erhöht (+13,8 % bzw. +14,7 %). Dies konnte in erster Linie auf eine verbesserte Extrahierbarkeit der LMW-GS zurückgeführt werden. Die Erhöhung war für die bei 40 °C getrockneten Proben signifikant. Das Gliadin/Glutenin-Verhältnis war für die bei 40 °C getrockneten Proben signifikant erniedrigt (1,33 und 1,29) gegenüber der Kontrolle (-5,8 % bzw. -2,9 %, siehe Tabelle 32) und bei 80 °C Trocknungstemperatur signifikant erhöht (1,18 und 1,14, +7,5 % bzw. +11,3 %, siehe Tabelle 32). Die Proteinsumme aus extrahierbaren Gliadinen und Gluteninen war für alle Proben signifikant höher als für die jeweiligen Kontrollproben (+6,1 % bis 11,7 %, siehe Tabelle 32). Zwischen der niedrigen und hohen Konzentration AS wurde lediglich in der α -Gliadinfraktion bei 40 °C, bei den LMW-GS und im Gesamtgehalt der Glutenine bei 80 °C sowie im Gliadin/Glutenin-Verhältnis beider Temperaturen ein signifikanter Unterschied festgestellt. AS nimmt also einen Einfluss auf die Gliadine und Glutenine, die Konzentration an AS ist dabei aber von geringer Bedeutung.

Im Gegensatz zu den Salzen war wie bei PS 20 auch für den Zusatz AS die Gluteninextrahierbarkeit erhöht, der Gehalt an ω 5-Gliadinen aber im gleichen Umfang wie für PS 20 herabgesetzt. Daher kann auch für AS eine spezifische Interaktion mit diesem Glutenproteintyp aufgrund des hohen Gehalts an Glutamin und Glutaminsäure vermutet werden (Belitz et al., 2007).

Die erhöhte Extrahierbarkeit durch AS kommt vermutlich durch deren reduzierende Wirkung wegen des fehlenden Mechanismus zur Umwandlung in die oxidierend wirkende DH-AS zustande. Zu einem geringeren Teil könnte die Zunahme der Extrahierbarkeit auch in der in anderen Studien festgestellten Abnahme von Dityrosinverbindungen begründet sein (Hanft & Köhler, 2005; Hanft & Köhler, 2006). Obwohl Dityrosinbindungen im Glutennetzwerk lediglich zu einem sehr geringen Anteil vertreten sind (etwa 0,1 %) und daher im Vergleich zu anderen Bindungsarten einen marginalen Einfluss auf die Vernetzung von Glutenproteinen nehmen dürften, könnte dieser Bindungstyp mikrostrukturelle Änderungen verursachen, die zur Auflösung größerer Proteinaggregate und Bildung kleinerer, extrahierbarer Proteine führen. Hanft und Köhler führten die Abnahme an Dityrosinbindungen auf die Wirkung von AS als Antioxidans bzw. Radikalfänger zurück (Hanft & Köhler, 2005).

3.4.3. Gehalt an Natriumdodecylsulfat-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer

3.4.3.1. Salze

Der SDSL-Gehalt lag zwischen 519,6 mg/g und 645,9 mg/g und der GMP-Gehalt zwischen 105,9 mg/g und 320,4 mg/g (siehe Abbildung 17 und Tabelle 27). Der GMP-Gehalt variierte damit stärker zwischen den Proben als der SDSL-Gehalt. Die meisten bei 40 °C getrockneten, salzbehandelten Proben enthielten signifikant weniger SDSL als die Kontrolle (-17,3 % bis -1,2 %, siehe Tabelle 33). Die bei 80 °C getrockneten Proben wiesen insgesamt einen niedrigeren SDSL-Gehalt als die bei 40 °C getrockneten Proben auf und unterschieden sich weniger stark von der Kontrolle (-3,8 % bis +4,1 %). Der GMP-Gehalt sank tendenziell mit dem Zusatz von Salzen und war für alle bei 80 °C getrockneten Proben signifikant niedriger als für die Kontrolle (-25,0 % bis -7,7 %, siehe Tabelle 33). Für alle bei 40 °C getrockneten Proben lag der GMP-Gehalt wiederum insgesamt niedriger als bei den bei hoher Temperatur getrockneten Proben. Für 2,85 % CaCl_2 war der LMW-GMP, HMW-GMP sowie der Gesamt-GMP-Gehalt bei 40 °C Trocknungstemperatur signifikant niedriger gegenüber der Kontrolle. Der Gesamt-

GMP-Gehalt nahm bei dieser Probe mit -50,9 % am stärksten von allen Proben gegenüber der Kontrolle ab. Nur zwei bei 40 °C getrocknete Proben (0,64 % KCl, 3,00 % NaCl) führten zu einer Zunahme an GMP, die lediglich für die Probe mit 3,00 % NaCl und HMW-GMP signifikant ausfiel. Den höchsten GMP-Gehalt enthielt die 80 °C-Kontrollprobe. Alle Salze bewirkten durch die Abnahme des SDSL- und GMP-Gehalts eine verminderte Proteinextrahierbarkeit gegenüber den Kontrollen (-97,5 % bis -0,4 %, siehe Tabelle 33), die bei der hohen Konzentration signifikant ausfiel.

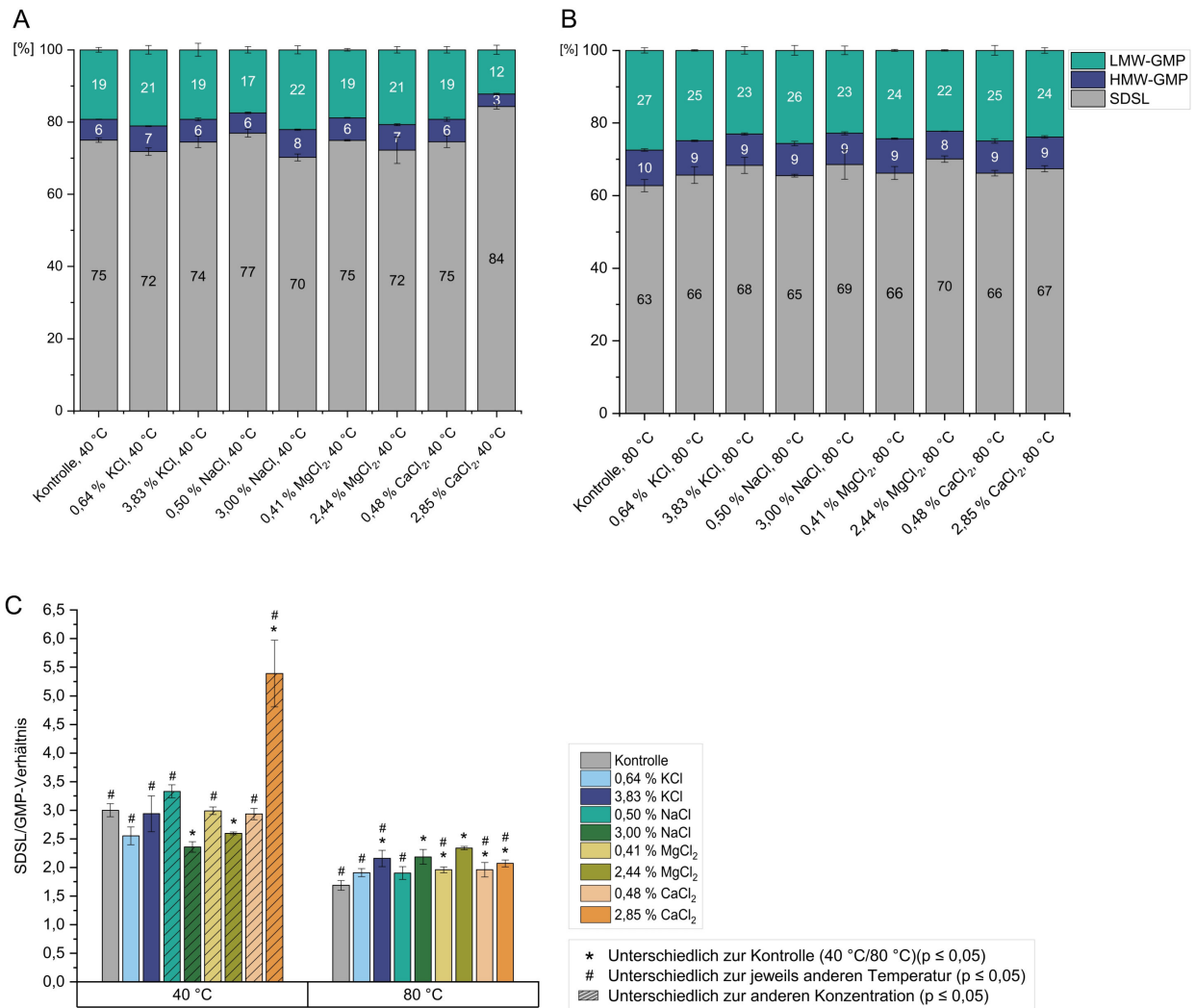


Abbildung 17: Anteile von *Low-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (LMW-GMP), *High-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (HMW-GMP) und SDS-löslichen Proteinen (A,B) und Verhältnis aus SDS-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer (SDSL/GMP) (C) in salzbehandelten Proben und Kontrollproben ohne Salz bei den Trocknungstemperaturen 40 °C (A) und 80 °C (B). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n = 3$). In Teil (C) zeigen die Sternchen einen signifikanten Unterschied zu der jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). Das Doppelkreuz zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Trocknungstemperaturen 40 °C und 80 °C für die gleiche Probe (ANOVA mit Tukey's Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). Schraffierte Balken zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen verschiedenen Konzentrationen des gleichen Salzes bei derselben Trocknungstemperatur (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). Abbildung modifiziert nach Höller & Scherf (2024).

Der individuelle Effekt der Salzbehandlung und der Trocknungstemperatur wird bei Betrachtung des Verhältnisses von SDSL und GMP deutlicher und leichter vergleichbar. Das SDSL/GMP-Verhältnis lag zwischen 2,36 und 5,39 für das 40 °C-Probenset und zwischen 1,69 und 2,34 für die bei 80 °C getrockneten Proben. Bis auf zwei Proben wiesen die bei 40 °C getrockneten Proben ein verringertes SDSL/GMP-Verhältnis im Vergleich zur Kontrolle auf (-21,4 % bis -0,3 %, siehe Tabelle 33). Die Abnahme war aber nur für die hohe Konzentration der Salze NaCl und MgCl₂ signifikant. Der Zusatz von 2,85 % CaCl₂ bewirkte ein deutlich erhöhtes SDSL/GMP-Verhältnis (+79,7 %). Bei den 80 °C-Proben erhöhte sich das SDSL/GMP-Verhältnis bis auf eine Ausnahme ohne Veränderung gegenüber der Kontrolle (+12,8 % bis +38,8 %, siehe Tabelle 33) und war für die hohe Konzentration der monovalenten Salze sowie für alle Proben mit divalenten Salzen signifikant. Die Spanne der SDSL/GMP-Verhältnisse war größer als die der Gliadin/Glutenin-Verhältnisse, zeigt aber auch bei industriell hergestelltem Vitalkleber eine deutliche Variation (4,8 bis 21,6) (Schopf et al., 2021).

Rombouts et al. (2012) untersuchten die Extrahierbarkeit von SDS-löslichen und unter reduzierenden Bedingungen löslichen Proteinen in hydratisiertem Vitalkleber, der bei unterschiedlichen Temperaturen und Zeitspannen bei leicht alkalischen Bedingungen erhitzt wurde. Sie stellten bei Erhitzung von Vitalkleber bei 50 °C für 120 min keine Veränderungen bezüglich der Extrahierbarkeit der SDS-löslichen Proteine fest, bei 70 °C nahm die Extrahierbarkeit innerhalb dieser Zeitspanne leicht ab und bei 90 °C verminderte sie sich exponentiell um mehr als die Hälfte, bevor sie auf einem Niveau konstant blieb. Die Glutenpolymerisation begann bei 90 °C bereits nach 15 min und der Großteil der cysteinhaltigen Gliadine wurde bei höheren Temperaturen oder längeren Erhitzungszeiten in das Glutennetzwerk eingebaut. Bei 70 °C und 90 °C fiel die Extrahierbarkeit nach 30 bis 45 min am stärksten ab und sank danach nur noch langsam. Unter reduzierenden Bedingungen wurde die Extrahierbarkeit bis 110 °C nicht beeinflusst. Rombouts et al. (2012) gingen daher davon aus, dass sämtliche Änderungen des Proteinnetzwerks bis 110 °C auf unter reduzierenden Bedingungen reversiblen Disulfidbindungen beruhen, die Erhitzung von Gluten bei höheren Temperaturen jedoch zur Bildung nicht reversibler Nicht-SS-Vernetzungen führt.

Für die Ergebnisse der vorliegenden Studie bedeutet dies, dass Salze auch bei geringen Temperaturen zur Bildung kovalenter, unter nicht-reduzierenden Bedingungen unlöslichen Bindungen führen, da die SDSL-Extrahierbarkeit bei 40 °C Trocknungstemperatur im Vergleich zur Kontrolle reduziert war, die SDSL-Extrahierbarkeit unter 50 °C laut Rombouts et al. (2012) aber nicht beeinträchtigt wird. Der Rückgang der Extrahierbarkeit der SDS-löslichen Proteine bei gleichzeitiger Zunahme des GMP-Gehaltes bei den salzbehandelten Proben kann durch SH-SS-Austauschreaktionen oder die Oxidation freier Thiole erklärt werden, durch die reversible SS-Bindungen entstehen. Beide Vorgänge werden durch Temperatureinwirkung begünstigt und begründen daher auch die geringeren SDSL-Gehalte und höheren GMP-Gehalte bei den bei 80 °C getrockneten Proben. Der Verlust an GMP in den salzbehandelten Proben gegenüber der Kontrolle, vornehmlich bei der hohen Trocknungstemperatur, legt allerdings die Bildung von salzinduzierten Nicht-SS-Quervernetzungen nahe, da die GMP-Extrahierbarkeit in Gluten bis 110 °C Erhitzung nach Rombouts et al. (2012) nicht rückläufig ist.

Neben SH-SS-Austauschreaktionen gibt es weitere mögliche Reaktionen, die den Verlust der GMP-Extrahierbarkeit erklären (siehe 1.2.2 und Abbildung 3). Die ϵ -Aminogruppe der Ami-

nosäure Lysin kann mit den Aminosäuren Glutamin und Asparagin Isopeptidbindungen bilden. Dadurch verringert sich der Gehalt freier Aminosäuren und es entstehen die nicht reduzierbaren Verbindungen ϵ -(γ -Glutamyl)lysin oder ϵ -(β -Aspartyl)lysin, die zu einer Abnahme der Proteinextrahierbarkeit auch unter reduzierenden Bedingungen führen (Asquith et al., 1974; Rombouts et al., 2011). Die Reaktion läuft auch bei neutralem pH-Wert, bei geringer Feuchtigkeit und hohen Temperaturen ab. Rombouts et al. (2011) wies in erhitztem Gluten (24 h, 130 °C) Isopeptidbindungen nach, die vor allem freie ϵ -Aminogruppen von Lysin involvierten. Bei längerer Temperatureinwirkung bildeten sich mehr Isopeptide, es konnten aber auch nach bereits 1 h bei 130 °C Isopeptide festgestellt werden. Die festgestellten niedrigeren Gehalte an freien Aminosäuren können daneben zu einem gewissen Teil auch durch die Bildung von Maillard-Produkten oder durch andere hitzeinduzierte Reaktionen zustande kommen (Rombouts et al., 2011).

Ab einer Erhitzungstemperatur von 130 °C kommt es in Gluten außerdem zur Bildung weiterer kovalenter Quervernetzungen, die keine Disulfidbindungen sind (Rombouts et al., 2012). Über eine β -Eliminierung von Cystin können sich Dehydroalanin (DHA) und freie Thiole bilden, die zu neuen kovalenten Quervernetzungen wie Lanthionin (LAN) und Lysinoalanin (LAL) führen können. Beide Produkte sind unter reduzierenden Bedingungen nicht reversibel (Rombouts et al., 2010). In zwei Studien von Rombouts et al. (2010, 2012) wurde bei einem pH-Wert von 8 bei 130 °C mit zunehmender Zeit mehr DHA und LAN gebildet, bei einer gleichzeitigen Abnahme des Cysteingehaltes. LAL konnte in dem erhitzten Vitalkleber jedoch nicht festgestellt werden.

Die β -Eliminierung läuft bevorzugt bei alkalischen Bedingungen, unter erhöhten Temperaturen und bei langer Behandlungsdauer ab (Friedman, 1999). Der Feuchtkleber in dieser Arbeit wies einen leicht sauren pH-Wert von etwa 5,5 auf und die Temperaturen während des Herstellungsprozesses überstiegen 80 °C nicht. Lagrain et al. (2010a) zeigten, dass das kinetische Modell, welches zur Beschreibung der Cystin-, DHA- und LAN-Konzentrationen während Temperatureinwirkung in einem Gliadinmodellsystem aufgestellt wurde, auch für den pH-Wert 6 zutrifft. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist bei pH 6 lediglich herabgesetzt, jedoch wiederum erhöht für Proteine, die eine höhere Löslichkeit aufweisen als Gliadin (Lagrain et al., 2010a; Volkin & Klibanov, 1987). Fu et al. (1996) wiesen nach, dass die Löslichkeit von Glutenproteinen bei einer höheren Konzentration von NaCl ansteigt. Sie erklärten diese Beobachtung durch salzinduzierte Konformationsänderungen der Proteine, wodurch Wasser zu einem effektiveren Lösungsmittel wird. Diese Umstände könnten eine Erklärung dafür sein, dass sich trotz leicht sauren pH-Wertes und eher geringen Temperaturen, zumindest zu einem kleinen Teil, Nicht-SS-Quervernetzungen in salzbehandelten Glutenproben bilden.

Eine weitere mögliche Reaktion, die zwischen Glutenproteinen ablaufen kann, ist die Bildung von (Iso)-Dityrosin (Tilley et al., 2001). Es wird allerdings davon ausgegangen, dass das Vorkommen dieser Verbindung in Gluten zu begrenzt ist, um maßgeblich zur Bildung des Glutennetzwerks beizutragen (Hanft & Köhler, 2005; Peña et al., 2006; Rodriguez-Mateos et al., 2006).

Insgesamt ist also die Entstehung von Isopeptiden und LAN die wahrscheinlichste Erklärung für die herabgesetzte Extrahierbarkeit der GMP-Fraktion. Die Bildung von LAN ist jedoch vernachlässigbar gering gegenüber dem Anteil an stattfindenden SH-SS-Austauschreaktionen, welche zudem mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit ablaufen (Lagrain et al., 2011; Volkin & Klibanov, 1987). Da die Extrahierbarkeit der GMP-Fraktion in salzbehandelten Proben herabgesetzt war

im Vergleich zur Kontrolle, wäre eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung eine durch Salze bedingte Konformationsänderung der Glutenproteine, die unter anderem die Zugänglichkeit und Reaktion von Lysin mit Glutamin und Asparagin und damit die Bildung von Isopeptidbindungen erleichtert.

3.4.3.2. Polysorbat 20

Der Gehalt an SDSL lag für die mit PS 20 behandelten Proben zwischen 59,6 mg/g und 69,3 mg/g (siehe Abbildung 18 und Tabelle 28). Der niedrigste bzw. höchste Gehalt konnte jeweils der niedrigen und hohen Dosierung PS 20 bei 40 °C Trocknungstemperatur zugeordnet werden. Im Vergleich zu den Kontrollen und im Gegensatz zu den meisten Salzen war die SDSL-Extrahierbarkeit bis auf die Probe VK (0,25 % PS 20, 40 °C) erhöht (+7,2 % bis +18,6 %, siehe Tabelle 33). Die Extrahierbarkeit von GMP war in allen Proben gegenüber der korrespondierenden Kontrolle herabgesetzt (-11,4 % bis -7,4 %, siehe Tabelle 33). Das SDSL/GMP-Verhältnis war für alle PS 20-Konzentrationen und beide Trocknungstemperaturen bis auf die Probe VK (0,25 % PS 20, 40 °C) signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht (siehe Abbildung 18 und Tabelle 28).

Ähnlich wie bei der Bestimmung der Glutenproteintypen per Osborne-Fraktionierung (siehe 3.4.2.2) könnte für die erhöhte Extrahierbarkeit der SDSL-Fraktion die Wechselwirkung zwischen Emulgator und Proteinen aus der GMP-Fraktion verantwortlich sein, die eine Assoziation der SDSL-Proteine mit den höhermolekularen Proteinen verhindert. Da aber gleichzeitig, wenn auch nicht signifikant, die Extrahierbarkeit von HMW-GMP und LMW-GMP sank, könnten zudem ähnliche Prozesse, die für die salzbehandelten Proben vermutet wurden, wie die Entstehung von Isopeptidbindungen oder LAN, vonstatten gehen (siehe 1.2.2, Abbildung 3 und 3.4.3.1). Eine durch den Zusatz hervorgerufene Konformationsänderung, die die Bildung von Isopeptiden erleichtert, ist demnach auch durch die Einwirkung von PS 20 auf Glutenproteine denkbar.

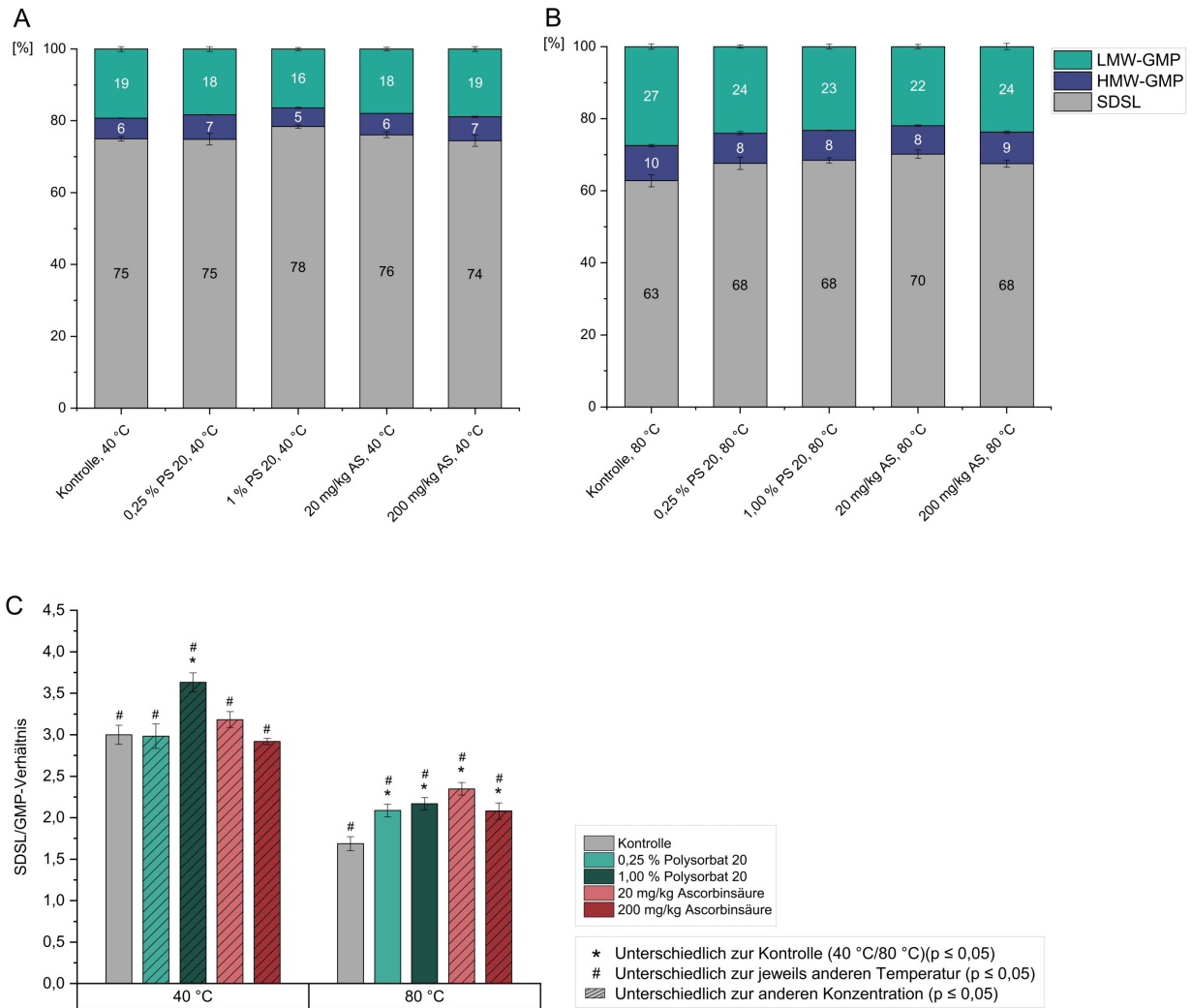


Abbildung 18: Anteile von *Low-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (LMW-GMP), *High-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (HMW-GMP) und SDSL-löslichen Proteinen (A,B) und Verhältnis aus SDSL-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer (SDSL/GMP) (C) in Proben mit Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) und Kontrollproben ohne Zusatz bei den Trocknungstemperaturen 40 °C (A) und 80 °C (B). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n = 3$). In Teil (C) zeigen die Sternchen einen signifikanten Unterschied zu der jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). Das Doppelkreuz zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Trocknungstemperaturen 40 °C und 80 °C für die gleiche Probe (ANOVA mit Tukey's Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). Schraffierte Balken zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen verschiedenen Konzentrationen des gleichen Zusatzes bei derselben Trocknungstemperatur (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). PS 20 und AS wurden separat statistisch ausgewertet.

3.4.3.3. Ascorbinsäure

Der Gehalt an SDSL reichte in den AS behandelten Proben von 63,6 mg/g bis 68,8 mg/g und lag damit bei allen Proben höher als bei den Kontrollproben (+2,8 % bis +19,7 %, siehe Tabelle 33) und als bei den meisten salzbehandelten Proben (siehe Abbildung 17, Tabelle 28 und 33). Bei 80 °C Trocknungstemperatur fiel diese Erhöhung signifikant aus. Der GMP-Gehalt lag

zwischen 21,6 mg/g und 20,6 mg/g, das SDSL/GMP-Verhältnis betrug 2,08 bis 3,18. Die Summe aus SDSL und GMP war bei 80 °C Trocknungstemperatur signifikant höher gegenüber der Kontrolle (+7,2 % und +9,4 %), ebenso wie das SDSL/GMP-Verhältnis (+23,3 % und +39,2 %). Zwischen den Konzentrationen konnte bei den bei 40 °C getrockneten Proben lediglich ein signifikanter Unterschied im SDSL/GMP-Verhältnis festgestellt werden. Bei den 80 °C-Proben waren dagegen der GMP-Gehalt, HMW-GMP, LMW-GMP und das SDSL/GMP-Verhältnis signifikant unterschiedlich. Anders als auf die höhermolekularen Glutenproteintypen der Osborne-Fraktionierung scheint AS in unterschiedlicher Dosierung und insbesondere bei der Trocknung bei 80 °C einen Einfluss auf die Proteine der GMP-Fraktion zu nehmen.

Eine erhöhte Extrahierbarkeit von unlöslichen Proteinen konnte sowohl in Teigen, die mit oxidierenden Zusätzen wie Kaliumiodat als auch mit reduzierenden Zusätzen wie Cystein behandelt wurden, festgestellt werden, obwohl eine durch Oxidationsmittel initiierte stärkere Vernetzung der Glutenproteine und damit eine herabgesetzte Extrahierbarkeit löslicher Proteine zu erwarten wäre (Sievert et al., 1991; Veraverbeke et al., 1999). Als Erklärung für diese Beobachtung wurden Konformationsänderungen vorgeschlagen, die zu einer erweiterten Glutenstruktur führen, welche mit einer erhöhten Extrahierbarkeit einhergeht oder die Inhibierung von SH-SS-Austauschreaktionen durch die Oxidationsmittel (Eckert et al., 1993; Hayta & Schofield, 2004; Lucas et al., 2018; Sievert et al., 1991; Veraverbeke et al., 1999). Ein erneutes Brechen der durch Oxidationsmittel neu gebildeten Disulfidbrücken durch Scherkräfte während des Knetvorgangs wurde ebenfalls angeführt (MacRitchie, 1975). Für eine erhöhte Extrahierbarkeit bei Temperaturen ab 70 °C wurde außerdem eine strukturelle Veränderung der Proteine durch AS vermutet, die zu einer Modifikation der Disulfidbindungen führt und die Extrahierbarkeit erhöht (Hayta & Schofield, 2004). In der vorliegenden Studie kann die Erhöhung der Extrahierbarkeit vermutlich auf die reduzierende Wirkung der AS zurückgeführt werden.

3.4.4. Gehalt an freien und gebundenen Thiolen

3.4.4.1. Salze

Die unterschiedlichen Behandlungen von Feuchtkleber hatten individuelle Auswirkungen auf den Gehalt der freien Thiole in Vitalkleber, der zwischen 0,57 µmol SH/g Protein und 1,63 µmol SH/g Protein lag (siehe Abbildung 19 und Tabelle 29). Der Gehalt der gebundenen Thiole lag zwischen 17,88 µmol SS/g Protein und 30,63 µmol SS/g Protein. Die höhere Trocknungstemperatur verringerte den SH-Gehalt insgesamt stärker als die Trocknung bei 40 °C. Alle Salze führten zu einem signifikant niedrigeren SH-Gehalt gegenüber der Kontrolle (-54,2 % bis -14,4 %, siehe Tabelle 34) unabhängig von der Salzkonzentration, wobei die höhere Salzkonzentration den Gehalt an SH stärker herabsetzte. Monovalente Salze führten zu einer weniger ausgeprägten Verringerung des SH-Gehaltes im Vergleich zur Kontrolle als CaCl₂ und MgCl₂.

Der Gehalt der gebundenen Thiole wurde durch keines der zugegebenen Salze signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht, sondern im Gegenteil eher herabgesetzt (-35,4 % bis +2,0 %, siehe Tabelle 34). Tendenziell konnten mehr SS-Bindungen in Vitalklebern festgestellt werden, die bei 80 °C getrocknet wurden. Die unterschiedlichen Salzkonzentrationen führten bei weniger Salzen zu einem signifikanten Unterschied im SS-Gehalt als im SH-Gehalt.

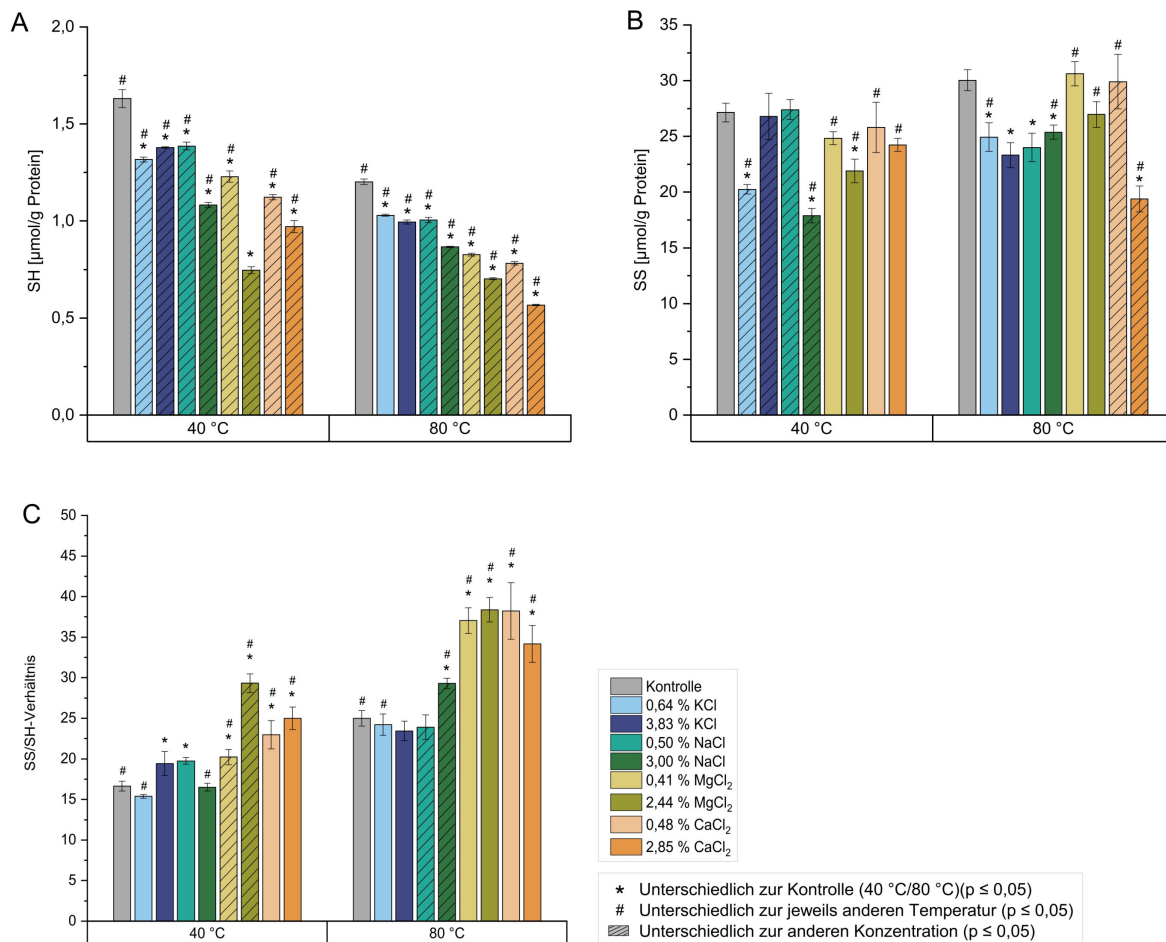


Abbildung 19: Gehalt an freien (SH) (A) und gebundenen (SS) (B) Thiolen und Verhältnis aus gebundenen und freien Thiolen (SS/SH) (C) in salzbehandelten Proben und Kontrollproben ohne Salz bei den Trocknungstemperaturen 40 °C (A) und 80 °C (B). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n = 3$). In Teil (C) zeigen die Sternchen einen signifikanten Unterschied zu der jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). Das Doppelkreuz zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Trocknungstemperaturen 40 °C und 80 °C für die gleiche Probe (ANOVA mit Tukey's Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). Schraffierte Balken zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen verschiedenen Konzentrationen des gleichen Zusatzes bei derselben Trocknungstemperatur (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). Abbildung modifiziert nach Höller & Scherf (2024).

Das Verhältnis von SS und SH liefert detaillierte Informationen über die Vernetzung der Glutenproteine, da der absolute Gehalt an SS und SH nicht die proportionale Verknüpfung von Disulfiden innerhalb des Glutennetzwerks widerspiegelt. Ein hohes SS/SH-Verhältnis deutet darauf hin, dass die Probe relativ mehr SS als SH enthält, was ein stärker vernetztes Glutennetzwerk impliziert. Das SS/SH-Verhältnis variierte zwischen 15,38 und 38,38 für alle Proben und war für die meisten Proben höher im Vergleich zur Kontrolle (-7,6 % bis 76,2 %, siehe Tabelle 34). Die höhere Trocknungstemperatur bedingte ein höheres SS/SH-Verhältnis. Die Zugabe divalenter Salze führte ebenfalls zu einem erhöhten SS/SH-Verhältnis, da bei diesen Proben die Abnahme des SH-Gehaltes besonders ausgeprägt war, der SS-Gehalt gleichzeitig jedoch deutlich weniger abnahm. Einen signifikanten Unterschied zwischen den Konzentrationen löste lediglich der Zusatz von MgCl₂ und NaCl bei 40 °C bzw. 80 °C aus. Der Gesamtthiolgehalt wurde für alle

Proben gegenüber der Kontrolle teilweise signifikant reduziert oder blieb unverändert (0,0 % bis -36,1 %, siehe Tabelle 34). Insgesamt konnte kein Trend zwischen dem Gehalt der freien Thiole oder Disulfide bzw. aus deren Verhältnis, der Salzart und der Trocknungstemperatur festgestellt werden.

Die Verringerung der freien Thiole, ohne eine entsprechende Erhöhung des Disulfidgehalts durch die Zugabe von Salzen, stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen überein. Chen et al. (2018) kamen zu dem gleichen Resultat in Gluten aus Teig, der mit NaCl versetzt wurde. Tuhumury et al. (2014) stellten ebenso keine bzw. lediglich eine geringe Erhöhung des SS-Gehaltes in Gluten aus NaCl-behandeltem Teig gegenüber Gluten ohne Salz bei zwei verschiedenen Mehlsorten fest.

Die Ergebnisse des Ellman-Assays können in Kontext mit den Erkenntnissen der rheologischen Versuche gesetzt werden, um ein detaillierteres Bild über die Vorgänge auf molekularer Ebene in mit Salz behandeltem Gluten zu erhalten. Tan δ nimmt im Verlauf des Temperatursweeps ab, was auf eine Zunahme des elastischen Moduls bei steigender Temperatur hinweist. Dieses Verhalten kann durch die Entfaltung von Proteinen und anschließende Polymerisierung der cysteinhaltigen α - und γ -Gliadine erklärt werden, die für das viskose Verhalten von Gluten verantwortlich sind und ab etwa 75 °C durch SH-SS-Austauschreaktionen untereinander aggregieren oder in die polymere Struktur der Glutenine eingebaut werden (Lagrain et al., 2008; Schofield et al., 1983; Singh & Singh, 2013). LMW-GS und HMW-GS sind durch die enthaltenen Cysteinreste ebenfalls anfällig für die Einbettung in Aggregate durch intra- und intermolekulare Disulfidbrücken (Lagrain et al., 2008; Weegels et al., 1994).

Als Ergebnis der beschriebenen molekularen Prozesse nimmt der Gehalt an freien Thiolen auf der Glutenoberfläche ab (Weegels et al., 1994). Durch SH-SS-Austauschreaktionen verändert sich das SS/SH-Verhältnis nicht. Durch die Oxidation von Thiolen verringert sich dagegen der Gehalt an SH und der SS-Gehalt steigt, wodurch auch das SS/SH-Verhältnis größer wird. In der vorliegenden Studie wird der Ablauf dieser Prozesse durch die geringen Gehalte an freien Thiolen und die vermehrten Disulfidbindungen in Glutenproben, die bei 80 °C getrocknet wurden, bestätigt.

Diese Begründung liefert allerdings keine Erklärung dafür, welche Veränderungen genau die zugesetzten Salze auf molekularer Ebene auslösen. Der verringerte SH-Gehalt in Proben mit Salzen und der gleichzeitig nicht erhöhte SS-Gehalt gegenüber der Kontrolle zeigt, dass lediglich die Temperatur einen Effekt auf die Neubildung von Disulfidbrücken hat, dieser durch Salze jedoch nicht verstärkt wird. Die ausbleibende Zunahme an Disulfidbindungen kann auch der Grund dafür sein, dass keines der Salze den Dehnwiderstand im Mikrozugversuch signifikant erhöhte (siehe 3.3.1 und Abbildung 10). Es wurde bereits gezeigt, dass sich die Reduzierung an Disulfidbindungen in Gluten in einem geschwächten Glutennetzwerk äußert, wodurch zwar die Dehnbarkeit steigt, der Dehnwiderstand jedoch herabgesetzt wurde (Belton, 1999; Jones et al., 1974; Nawrocka et al., 2016a).

Erkenntnisse aus der Literatur legen nahe, dass SH-SS-Austauschreaktionen bei der Umstrukturierung von Glutenproteinen vorherrschend sind gegenüber der Bildung von LAN (Volkin & Klibanov, 1987). Die Ergebnisse des Ellman-Assays sind allerdings ein weiteres Indiz dafür, dass die Salze molekulare Veränderungen bewirken, die nicht allein durch SH-SS-Austauschreaktionen

zwischen cysteinhaltigen Proteinen erklärt werden können. Da keine neuen Disulfidbrücken gebildet wurden, müssen andere Wechselwirkungen als kovalente SS-Bindungen für die bei rheologischen Messungen und der Untersuchung der Glutenproteinzusammensetzung beobachteten Unterschiede verantwortlich sein.

Dass in den salzbehandelten Proben der Gesamtthiolgehalt gegenüber den Kontrollproben reduziert wurde, zeigt weiterhin, dass nicht alle Thiolverbindungen in einer für den Ellman-Assay zugänglichen oder reduzierbaren Form vorlagen. Diese Beobachtung ist ein weiteres Indiz für die Bildung von LAN, da hierbei nicht reduzierbare, kovalente Thioetherverbindungen entstehen. Chen et al. (2018) vermuten ebenfalls die Bildung von Nicht-SS-Verbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen als Erklärung für die Abnahme der freien Thiole ohne die gleichzeitige Entstehung von neuen Disulfidbindungen.

3.4.4.2. Polysorbat 20

Der Gehalt an freien Thiolen betrug für die mit PS 20 behandelten Proben zwischen 1,00 $\mu\text{mol SH/g Protein}$ und 1,31 $\mu\text{mol SH/g Protein}$ und war für die bei 40 °C getrockneten Proben höher als für die bei 80 °C getrockneten Proben, für alle Proben jedoch herabgesetzt gegenüber der Kontrolle (-20,1 % bis -12,8 %, siehe Abbildung 20, Tabelle 30 und 34). Der Gehalt der gebundenen Thiole lag zwischen 25,71 $\mu\text{mol SH/g Protein}$ und 26,98 $\mu\text{mol SH/g Protein}$ und war in den bei hoher Temperatur getrockneten Proben höher, für alle Proben jedoch gegenüber der Kontrolle herabgesetzt (-10,4 % bis -1,5 %, siehe Tabelle 34). Der SS-Gehalt konnte wie auch bei den Salzen durch den Zusatz von PS 20 im Vergleich zur Kontrolle nicht gesteigert werden (-10,4 % bis -1,5 %, siehe Tabelle 34). Die Menge an freien und gebundenen Thiolen unterschied sich zwischen den PS 20-Konzentrationen weniger stark als bei den salzbehandelten Proben, sodass das SS/SH-Verhältnis mit 19,76–26,97 geringeren Abweichungen zwischen den Proben unterlag (+2,7 % bis +22,3 % gegenüber der Kontrolle, siehe Tabelle 34). Der Gesamtthiolgehalt wurde für alle mit PS 20 versetzten Proben im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant reduziert (-10,5 % bis -2,5 %, siehe Tabelle 34).

In einer Studie von Gómez et al. (2013b) wurde der Gehalt der freien Thiole durch den Zusatz von SSL, DATEM und einer Kombination beider Emulgatoren signifikant reduziert. Sie führten dies auf die Bildung von Disulfidbrücken zurück, belegten ihre Vermutung jedoch nicht durch die Bestimmung der gebundenen Thiole in einem analytischen Test. In der vorliegenden Studie kann die Abnahme des Gehalts der freien Thiole zu Gunsten einer Neubildung von Disulfidbrücken durch die Bestimmung des SS-Gehalts ausgeschlossen werden. In Zusammenhang mit diesen Ergebnissen kann durch die Abnahme der Disulfidbindungen analog zu den salzbehandelten Proben die Bildung von Isopeptiden oder LAN vermutet werden.

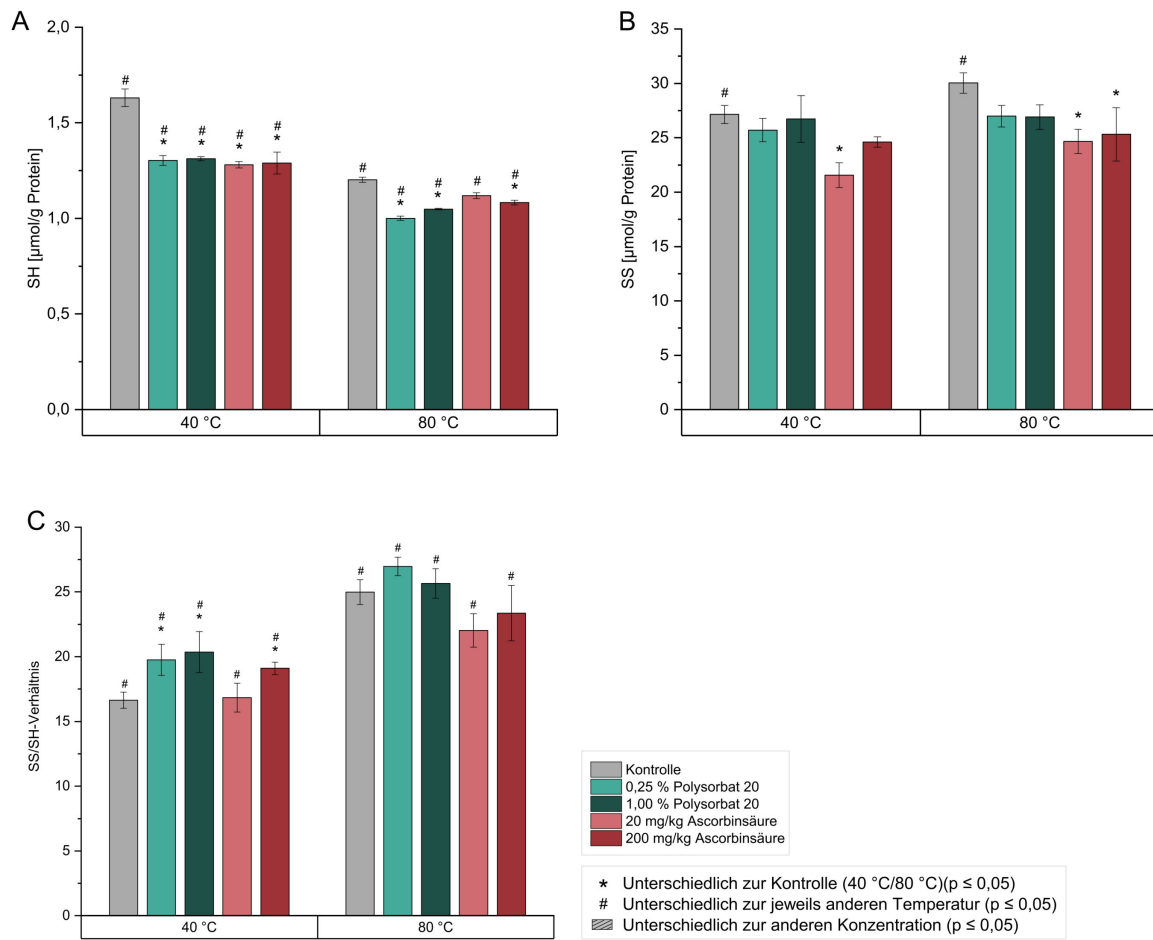


Abbildung 20: Gehalt an freien Thiolen (SH) (A) und gebundenen Thiolen (SS) (B) und Verhältnis aus gebundenen und freien Thiolen (SS/SH) (C) in Proben mit Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) und Kontrollproben ohne Zusatz bei den Trocknungstemperaturen 40 °C (A) und 80 °C (B). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n = 3$). In Teil (C) zeigen die Sternchen einen signifikanten Unterschied zu der jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). Das Doppelkreuz zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Trocknungstemperaturen 40 °C und 80 °C für die gleiche Probe (ANOVA mit Tukey's Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). Schraffierte Balken zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen verschiedenen Konzentrationen des gleichen Zusatzes bei derselben Trocknungstemperatur (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$). PS 20 und AS wurden separat statistisch ausgewertet.

3.4.4.3. Ascorbinsäure

Der Gehalt der freien Thiole betrug für die Proben mit AS zwischen 1,08 $\mu\text{mol/g}$ Protein und 1,29 $\mu\text{mol/g}$ Protein bzw. 21,55–25,31 $\mu\text{mol/g}$ Protein für die gebundenen Thiole (siehe Abbildung 20 und Tabelle 30). Der SH- und SS-Gehalt war damit signifikant herabgesetzt gegenüber den jeweiligen Kontrollen (-21,5 % bis -6,9 % bzw. -20,6 % bis -9,3 %, siehe Tabelle 34). Das SS/SH-Verhältnis lag bei 16,85–23,36 und war für die bei 40 °C getrockneten Proben leicht erhöht (1,2 % bzw. 14,8 %) sowie für die bei 80 °C behandelten Proben leicht herabgesetzt (-11,8 % bzw. -6,5 %). Ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ergab sich nur bei VK (200 mg/kg AS, 40 °C). Der Gesamtthiolgehalt war für fast alle Proben signifikant niedriger als der der Kontrolle (-25,0 % bis 0,7 %, siehe Tabelle 34).

AS wirkte nicht stärker reduzierend als die anderen Zusätze, da der SH-Gehalt im Rahmen der für die anderen Zusätze bestimmten Werte lag (siehe Abbildung 19 und 20 und Tabelle 29 und 30). Bei 80 °C Trocknungstemperatur zeigten die mit AS behandelten Proben sogar die geringste Abweichung des SH-Gehalts gegenüber der Kontrolle (siehe Tabelle 34). Die verschiedenen AS-Konzentrationen unterschieden sich kaum im SH-Gehalt. Somit ist eine Reduzierung von DTNB durch AS während des Ellman-Assays und damit eine nicht durch freie Thiole des Proteins hervorgerufene Überschätzung des SH-Gehalts unwahrscheinlich.

Die Teig-stärkende Wirkung von AS wird auf den Entzug von GSH zurückgeführt, wodurch eine Depolymerisation der Glutenproteine verhindert wird und eine indirekt vermittelte Bildung von Disulfidbindungen initiiert wird (siehe 1.3.3 und Abbildung 5) (Grosch & Wieser, 1999). Der SH-Gehalt nimmt somit zugunsten der Entstehung von Disulfidbrücken ab (Hayta & Schofield, 2004; Yeh & Shiau, 1999). Gleichzeitig existieren aber Studien, die ein vermehrtes Auftreten freier Thiole in Teigen mit AS-Zusatz feststellten, für dieses Phänomen aber keine Erklärung fanden (Hanft & Köhler, 2006; Köhler, 2003a). Der gleichzeitige Rückgang von Thiolen und Disulfiden in der vorliegenden Studie deutet zum einen auf eine Reduktion von Disulfidbindungen hin, zum anderen bedeutet diese Beobachtung, dass freie Thiole in der Anwesenheit von AS nicht reduzierbare Bindungen eingehen.

3.4.5. Massenspektrometrische Bestimmung von Glutenproteintypen

Für eine detaillierte Analyse der Wirkung von Salzen auf die Glutenproteinzusammensetzung von nachbehandeltem Gluten wurden mit einer Auswahl von Proben nicht-zielgerichtete massenspektrometrische Analysen (*untargeted* LC-MS/MS) durchgeführt. Die Wahl von Proben mit 3,00 % NaCl erfolgte, da dieses Salz standardmäßig in den meisten Backwaren verwendet wird. Daneben wurden Proben mit CaCl₂ analysiert, weil das Salz in beiden getesteten Konzentrationen im Vergleich zu den anderen Salzen eine starke Zunahme des Gliadin/Glutenin-, des SDSL/GMP- und des SS/SH-Verhältnisses bewirkte. Die hohe Dosierung von 2,85 % CaCl₂ wurde ausgewählt, damit in allen Proben die gleiche Anzahl positiver und negativer Ladungen vorliegt, die mit den Glutenproteinen wechselwirken können. Somit können die individuellen Auswirkungen der Salze auf das Proteom der Proben besser verglichen werden. Es wurden Proben beider Salze, die bei Trocknungstemperaturen von 40 °C und 80 °C getrocknet wurden, sowie entsprechende Kontrollproben ohne Salzzusatz analysiert. Proben mit PS 20 und AS wurden aufgrund des geringeren messbaren Effekts auf die Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität nicht untersucht.

Die Anzahl der massenspektrometrisch identifizierten Peptide lag zwischen 905 und 1392, die zwischen 333 und 459 Proteingruppen zugeordnet werden konnten (siehe Abbildung 21). Aufgrund der Strukturähnlichkeit der Glutenproteine (siehe 1.2.1, Abbildung 2) konnten viele Peptide mehreren Proteinen zugeordnet werden (siehe Tabelle 36). Alle Proteine, die die gleiche Aminosäuresequenz eines identifizierten Peptids enthalten, werden daher in Proteingruppen zusammengefasst. Ein detaillierter Vergleich zwischen einzelnen Proteinen, die in den Proben jeweils identifiziert wurden, ist daher erschwert. Die Proteine bzw. Proteingruppen können jedoch den verschiedenen Glutenproteintypen zugeordnet werden und so gesammelt verglichen werden.

Unter allen Proteingruppen konnten 50–72 Proteingruppen verschiedenen Glutenproteintypen zugeordnet werden (siehe Tabelle 35). Die restlichen Proteingruppen konnten zu einem großen Teil als Proteine der Albumin- und Globulin-Fraktion (z.B. Amylase/Trypsin-Inhibitoren) identifiziert werden. Beide mit NaCl behandelten Proben wiesen jeweils mehr übereinstimmende Proteingruppen mit den Kontrollproben auf (69,0 % bzw. 57,5 %) als die mit CaCl_2 behandelten Proben (42,7 % bzw. 42,6 %). Die größeren Abweichungen der CaCl_2 -Proben von der Kontrolle deuten darauf hin, dass CaCl_2 einen stärkeren Einfluss auf die Glutenproteine ausübt als NaCl. Die Glutenproteinzusammensetzung der Probe VK (3,00 % NaCl, 80 °C) zeigte darüber hinaus deutlich weniger Unterschied zur Kontrollprobe, die bei 40 °C getrocknet wurde, als zur Kontrollprobe bei 80 °C Trocknungstemperatur.

VK (3,00 % NaCl, 40 °C) und VK (3,00 % NaCl, 80 °C) enthielten mindestens 59,3 % gemeinsame Proteingruppen. Die Kontrollproben bei unterschiedlichen Trocknungstemperaturen hatten mindestens 65,0 % der Proteingruppen gemeinsam. Die mit CaCl_2 behandelten Proben enthielten dagegen nur mindestens 42,0 % gemeinsame Proteingruppen. Die geringe Übereinstimmung der beiden Proben mit CaCl_2 kann zum einen durch die geringere Anzahl an identifizierten Proteingruppen besonders in der Probe VK (2,85 % , 80 °C) bedingt sein. Diese Feststellungen deuten aber auch darauf hin, dass sich die mit CaCl_2 behandelten Proben stärker von der Kontrolle unterscheiden und die Temperaturbehandlung dieser Proben einen größeren synergistischen Effekt auf die Glutenproteinzusammensetzung nahm als dies bei NaCl oder im Vergleich zur Kontrolle der Fall war.

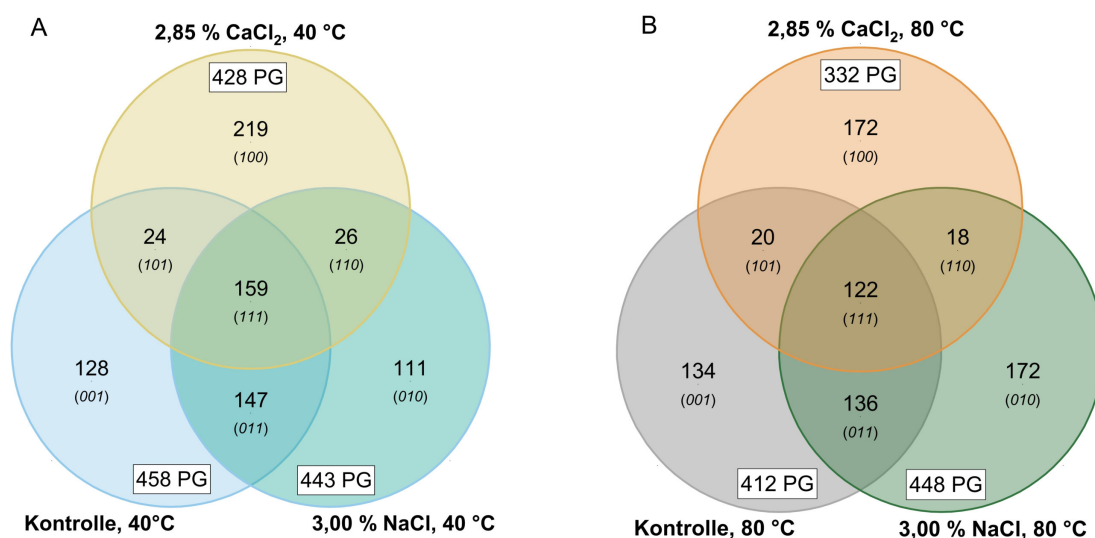


Abbildung 21: Gesamtzahl identifizierter Proteingruppen (PG) und Übereinstimmung von Proteingruppen zwischen salzbehandelten Proben und Kontrollproben bei 40 °C (A) und 80 °C (B) Trocknungstemperatur.

Die Aufsummierung der Intensitäten der markierungsfreien massenspektrometrischen Quantifizierung (*Label-free Quantification*, Lfq) der jeweiligen Glutenproteintypen ermöglicht einen Vergleich der relativen Verteilung der Glutenproteintypen zwischen den Proben (siehe Abbildung 22). Die relativen Anteile der einzelnen Glutenproteintypen unterschieden sich vor allem in den Proben VK (3,00 % NaCl, 80 °C), VK (2,85 % CaCl_2 , 40 °C) und VK (2,85 % CaCl_2 , 80 °C) gegenüber der jeweiligen Kontrolle. Bei Vergleich der 10 Proteingruppen mit den höchsten Lfq-

Intensitäten, fiel auf, dass VK (2,85 % CaCl_2 , 40 °C) deutlich mehr HMW-GS-Proteingruppen enthielt als die Kontrolle, VK (2,85 % CaCl_2 , 80 °C) im Gegensatz zur niedrigeren Trocknungstemperatur allerdings mehr LMW-GS und γ -Gliadine aufwies (siehe Tabelle 36). VK (3,00 % NaCl, 80 °C) beinhaltete im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle mehr γ -Gliadine und HMW-GS und weniger LMW-GS. Dass die Anzahl der intensitätsstärksten Glutenproteintypen in den Kontrollproben bei beiden Trocknungstemperaturen jeweils identisch war und der Großteil der Proteingruppen übereinstimmte, ist ein Hinweis, dass die Salze einen Effekt auf die Glutenproteinzusammensetzung ausgeübt haben. Das Protein B2BZC7, das den LMW-GS zugeordnet werden konnte, wurde in allen Proben mit der höchsten LFQ-Intensität identifiziert. Fast alle in dieser Studie identifizierten HMW-GS wurden ebenfalls im Aleuron, Sub-Aleuron und Endosperm in einer Studie von Hermans et al. (2024) gefunden.

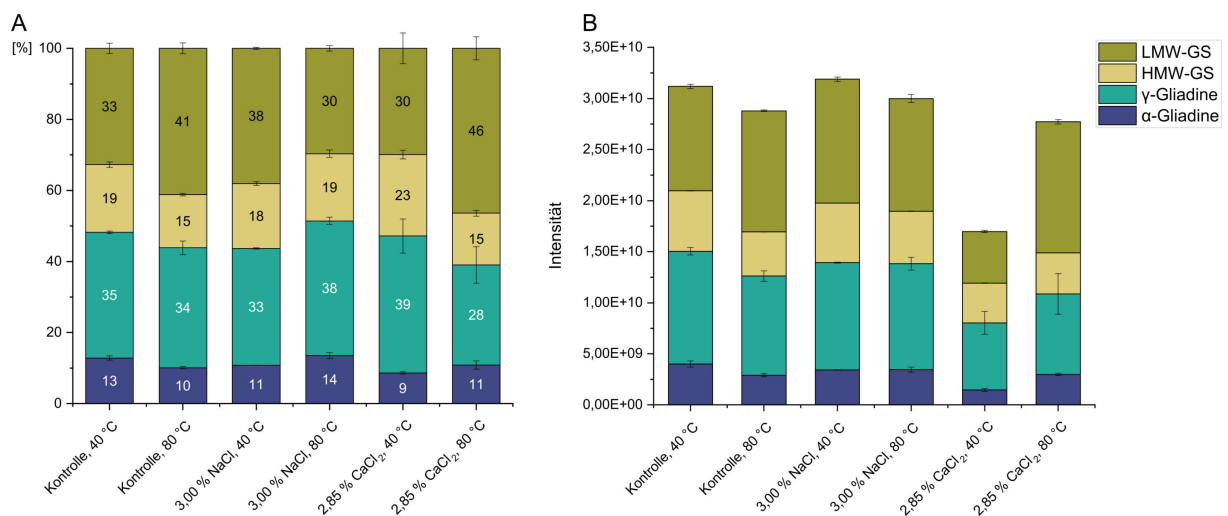


Abbildung 22: Relative Anteile der *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS) und der Glutenproteintypen α - und γ -Gliadine bei 40 °C und 80 °C Trocknungstemperatur (A) und aufsummierte Intensitäten der Glutenproteintypen der markierungsfreien massenspektrometrischen Quantifizierung (*Label-free Quantification*, LFQ) (B).

Bei allen Proben konnten keine ω -Gliadine festgestellt werden. Dieses Phänomen beobachteten beispielsweise auch Martínez-Esteso et al. (2016) und Fallahbagheri et al. (2017). Dies liegt daran, dass die Endopeptidase Trypsin spezifisch die Hydrolyse von Peptidbindungen C-terminal von Lysin und Arginin katalysiert. Die ω -Gliadine bestehen jedoch aus relativ kurzen N- und C-terminalen Domänen und die repetitive Sequenz setzt sich in erster Linie aus Prolin (P), Glutamin (Q) und Phenylalanin (F) (PQQQF-Peptideinheiten) zusammen. Zudem enthalten die ω -Gliadine deutlich weniger Arginin (0,5–1,4 mol-%) als die restlichen Glutenproteintypen (1,2–2,9 mol-%) (Belitz et al., 2007; Wieser et al., 2023).

Mit Chymotrypsin ist ein Verdau der ω -Gliadine möglich, da das Enzym bei Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin spaltet (Kellermann, 2022; Martínez-Esteso et al., 2016). Es kann mit geringerer Hydrolyserate aber auch Peptidbindungen C-terminal von Leucin, Methionin, Alanin und Asparaginsäure spalten. Im Vergleich zu Trypsin unterliegt Chymotrypsin jedoch anderen Einschränkungen. Aufgrund der weniger ausgeprägten Spezifität und der größeren Anzahl an möglichen Spaltungsstellen, entstehen durch den Verdau mit Chymotrypsin mehr Peptide mit

einer niedrigeren durchschnittlichen Fragmentlänge (Colgrave et al., 2017; Kellermann, 2022). Kurze Peptidsequenzen können die Identifizierung von Proteinen erschweren (Swaney et al., 2010; Tsiatsiani & Heck, 2015). Chymotrypsin weist zudem eine geringere Effizienz beim Verdau und eine weniger reproduzierbare Bildung von Peptiden mit unspezifischen Spaltungen auf. Die weniger starke Affinität für die Spaltung bei Leucin, Methionin, Alanin und Asparaginsäure führt zudem zu mehr verpassten Spaltungsstellen in Peptiden (*missed cleavages*) (Colgrave et al., 2017).

Trypsin ist durch seine Effizienz, Effektivität und geringen Kosten eines der für *Bottom-up-Proteomics* am häufigsten verwendeten Enzyme (Colgrave et al., 2017; Kellermann, 2022). Die durch Trypsin entstehenden Peptide haben günstige Eigenschaften für die chromatographische und massenspektrometrische Analyse (Ionisierung, Fragmentierung). Zudem fällt die Zahl an identifizierbaren Proteinen mit Trypsin teils höher aus als mit Chymotrypsin (Colgrave et al., 2017; Fallahbaghery et al., 2017). Jedoch können durch den Trypsinverdau Peptide von einer Länge von weniger als 6 Aminosäuren entstehen, die schlecht identifizierbar sind (Swaney et al., 2010; Tsiatsiani & Heck, 2015). Die tatsächliche Länge der Peptide und damit die Anzahl an identifizierbaren Proteinen hängt allerdings neben dem verwendeten Enzym maßgeblich von der Struktur der Proteine und der Häufigkeit potentieller Spaltstellen ab.

In einem direkten Vergleich eignet sich Trypsin besser für die Analyse von LMW-GS, HMW-GS, α - und γ -Gliadinen. Chymotrypsin ist dagegen in der Lage ω -Gliadine zu spalten (Colgrave et al., 2017). Für eine vollständige Identifizierung aller Glutenproteintypen müssen daher die wichtigsten Zielparameter abgewogen oder alternative Enzyme bzw. Enzymkombinationen getestet werden. Da ω -Gliadine nur einen Anteil von circa 10 % der Glutenproteine ausmachen (siehe Tabelle 1 und Abbildung 14), kann davon ausgegangen werden, dass der Einfluss der Salze auf diesen Glutenproteintyp gering ist und eine Modifikation der Proteine einen geringen Effekt auf die Zusammensetzung und Funktionalität der restlichen Glutenproteine ausübt.

Eine unzureichende Spaltung mancher Proteine oder zu kurze Peptidsequenzen erschweren die Identifikation der zugehörigen Proteine. Durch die Ähnlichkeit der Glutenproteine kann zudem eine falsche Zuordnung von Peptiden zu Proteingruppen nicht ausgeschlossen werden. Dies kann der Grund dafür sein, dass die massenspektrometrisch bestimmte Verteilung der Glutenproteintypen Abweichungen von der Glutenproteinzusammensetzung zeigt, die per RP-HPLC bestimmt wurde (siehe Abbildung 14). Zudem kommt als Ursache für die Abweichungen zwischen RP-HPLC- und LC-MS/MS-Ergebnissen die unterschiedliche Extraktion der Proben in Frage, die bei der LC-MS/MS-Analyse auf einer einstufigen statt einer dreistufigen Extraktion wie bei der Osborne-Fraktionierung beruht. Die LC-MS/MS-Analyse schließt zudem Ultraschallbehandlung ein und basiert auf einer anderen Identifizierungsmethode der Glutenproteintypen. Darüber hinaus konnte durch LC-MS/MS-Experimente festgestellt werden, dass in den einzelnen Osborne-Fractionen jeweils 13–42 % Nicht-Glutenproteine sowie ein großer Anteil anderer Glutenproteintypen mitextrahiert werden (Fallahbaghery et al., 2017; Lexhaller et al., 2019). Sowohl die durch RP-HPLC als auch durch LC-MS/MS bestimmte Verteilung der Glutenproteintypen spiegelt daher möglicherweise nicht exakt deren tatsächliches Vorkommen in den Glutenproben wider.

Die Unterschiede der Glutenproteinzusammensetzung zwischen den Proben mit verschiede-

ner Behandlung kann nicht allein auf die Bildung von Disulfidbindungen zurückgeführt werden, da diese reversiblen Bindungen während der Reduzierung der Proben in der LC-MS/MS-Aufarbeitung gespalten werden. Zudem erklären sich dadurch nicht die Abweichungen der aufsummierten LFQ-Intensitäten der Glutenproteintypen zwischen den verschiedenen Proben (siehe Abbildung 22). Proben, die bei 80 °C getrocknet wurden, und insbesondere die Probe VK (2,85 % CaCl_2 , 40 °C), wiesen eine geringere LFQ-Intensität auf als die 40 °C Kontrollprobe (siehe Abbildung 22). Dieser Umstand deutet auf eine verminderte Proteinextrahierbarkeit durch nicht-reduzierbare Verbindungen hin. Daher kann für die Abweichungen die bereits in 3.4.3.1 vermutete Bildung von Isopeptiden oder LAN vermutet werden, die auch bei der Osborne-Fraktionierung und insbesondere bei der SDLS/GMP-Fraktionierung zu einer Abnahme der Extrahierbarkeit führte.

In der Proteindatenbank UniProtKB existieren 36 Einträge für das Enzym Ascorbat-Oxidase. In keiner der Proben konnten Proteine gefunden werden, die diesem Enzym zugeordnet werden konnten. Dies bestätigt die in 3.3.1.3 geäußerte Vermutung, dass AO während des Waschschritts der Glutenisolation entfernt wurde und nicht mehr oder nur noch in sehr geringen Mengen in Gluten vorhanden ist.

3.5. Einfluss von Zusätzen auf die Sekundärstruktur von Gluten

Um die Veränderung der Sekundärstruktur der Glutenproteine durch den Einfluss der Zusätze bewerten zu können, wurden Raman-Messungen der Vitalkleberproben durchgeführt. Die Ergebnisse können gemeinsam mit den bisherigen chemisch-analytischen und rheologischen Resultaten weiteren Aufschluss über die Wechselwirkung von Proteinen mit den Zusätzen auf molekularer Ebene geben.

Für die Raman-Messungen wurden Zusätze ausgewählt, die im Mikrozugversuch die größten Änderungen bewirkten (3,83 % KCl, 3,00 % NaCl, 2,44 % MgCl_2 , 0,48 % CaCl_2 , 200 mg/kg AS, 1 % PS 20). Dieser Versuch wurde als maßgeblich angesehen, da die Dehnbarkeit und der Dehnwiderstand wichtige Größen zur Beschreibung der Glutenfunktionalität darstellen und beide Messgrößen mit der Zusammensetzung der Glutenproteine verknüpft sind. Die Proben wurden bei 40 °C getrocknet und unter standardisierten Bedingungen nach 5.2 vermahlen.

Die Ramanspektren wurden herangezogen, um die Amid I-Bande und damit die Zusammensetzung der Sekundärstruktur zu bestimmen und auf die Konformation der Disulfidbindungen zu schließen. Aus der Literatur bekannte Raman Verschiebungen der Amid I-Bande und Disulfidbindungsschwingungen von Proteinen wurden Sekundärstrukturelemente und Disulfidbindungskonformationen zugeordnet. Die Zuordnung der Peaks wurde entsprechend 5.4.6 durchgeführt.

Darüber hinaus deutet der Tyrosin-Doppelpeak auf die Stärke von Wasserstoffbrückenbindungen hin und der Tryptophan-Peak kann Aufschluss über die Hydrophobizität der Tryptophan-Umgebung geben (Honzatko & Williams, 1982; Li-Chan, 1996; Nonaka et al., 1993).

3.5.1. Salze

Die Sekundärstrukturelemente der Kontrolle setzten sich aus 57,8 % α -Helices, 24,8 % β -Schleifen, 13,4 % parallelen β -Faltblatt-Strukturen und 4,0 % antiparallelen β -Faltblatt-Strukturen zusammen (siehe Abbildung 23). Den größten Teil der Sekundärstruktur der salzbehandelten Proben machten ebenfalls α -Helices aus, die zu 35,9–48,0 % in den Proben vertreten waren und durch den Zusatz der Salze, vor allem der monovalenten Salze, gegenüber der Kontrolle abnahmen. Parallele β -Faltblatt-Strukturen waren zu 13,4–30,0 % in den Proben vertreten und waren bei den monovalenten Salzen gegenüber der Kontrolle mehr als verdoppelt. Mit 28,7–34,6 % variierte der Anteil der β -Schleifen zwischen den Proben eher wenig, war aber in den salzbehandelten Proben, vor allem durch die divalenten Salze, tendenziell erhöht. Antiparallele β -Faltblatt-Strukturen machten mit 3,7–7,3 % den geringsten Anteil an Sekundärstrukturelementen aus und unterschieden sich wenig zwischen den Proben. Bei keiner Probe wurde eine Struktur festgestellt, die *Random Coils* zugeordnet werden konnte. In einer Raman-Studie mit getrocknetem, unbehandeltem Vitalkleber machten mit 60 % ebenfalls α -Helices den Großteil der Sekundärstruktur aus, gefolgt von 11 % β -Faltblatt-Strukturen, 8 % antiparallelen β -Faltblatt-Strukturen und 13 % β -Schleifen (Nawrocka et al., 2016a).

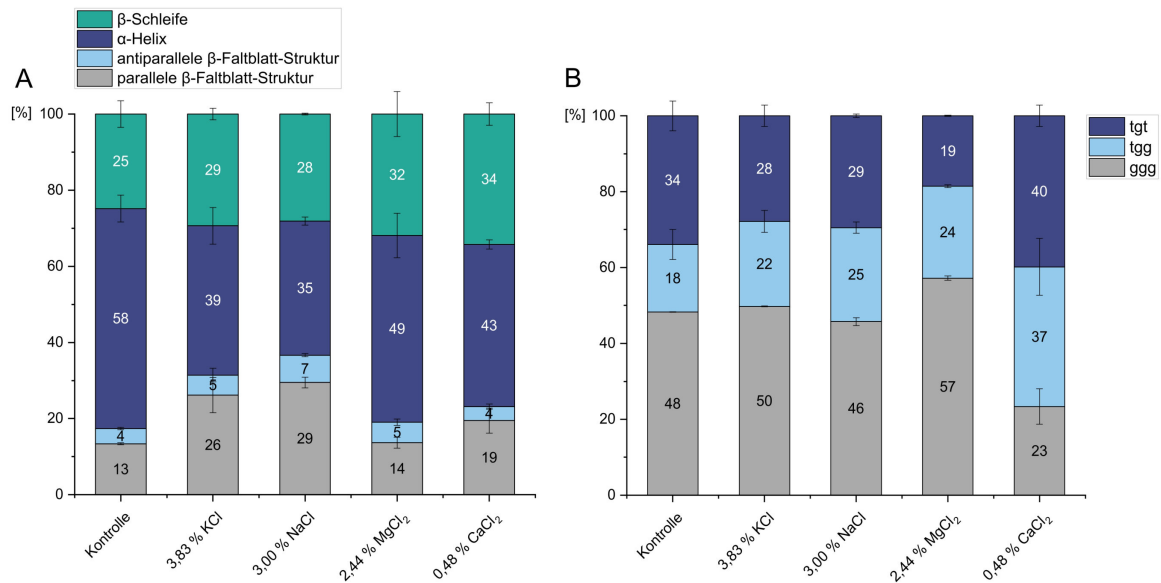


Abbildung 23: Anteil der Sekundärstrukturelemente (A) und Anteil an Disulfidbindungskonformationen (B) in mit Salz behandelten Proben und der Kontrollprobe ohne Salz. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm halbe Differenz der Mittelwerte angegeben ($n = 2$), ggg: *gauche-gauche-gauche*-Konformation der Disulfidbindung, tgg: *trans-gauche-gauche*-Konformation der Disulfidbindung, tgt: *trans-gauche-trans*-Konformation der Disulfidbindung.

Die β -Faltblatt-Struktur ist mit der Bildung inter- oder intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen HMW-GS und einer damit einhergehenden geordneten Struktur assoziiert. Sie tritt vorrangig in gefalteten oder aggregierten Proteinstrukturen auf (Belton, 1999; Belton et al., 1995; Li et al., 2019). Die Strukturen befinden sich daher üblicherweise im Inneren von Proteinkomplexen. Diese Konformation ermöglicht die Einbettung von hydrophoben Aminosäuren im Inneren der Proteine (Wang et al., 2014).

Der Anteil der β -Faltblatt-Strukturen war bei Proben mit monovalenten Salzen im Vergleich zur Kontrolle verdoppelt, bei den divalenten Salzen war eine leichte Zunahme feststellbar. Diese Beobachtung spricht für eine zunehmende Proteinaggregation durch den Zusatz der Salze. Der Anteil der geordneten β -Faltblatt-Strukturen hat sich bei Zusatz der monovalenten Salzen stärker erhöht als durch den Zusatz der divalenten Salze. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit der beobachteten fibrillären Glutenstruktur bei Zusatz monovalenter Salze zu Teig (Tuhumury et al., 2016b). Der Anteil antiparalleler β -Faltblatt-Strukturen nahm durch den Zusatz an KCl, NaCl und MgCl₂ leicht zu. Aufgrund der günstigeren linearen Ausrichtung sind die Wasserstoffbrückenbindungen in antiparallelen β -Faltblatt-Strukturen etwas stabiler als in parallelen β -Faltblatt-Strukturen (Sadat et al., 2022).

Da β -Faltblatt-Strukturen mit Bahnen aus Beltons „Train and Loop“-Modell assoziiert sind und die Deformation von Bahnen mehr Energie benötigt, wird eine Zunahme an β -Faltblatt-Strukturen mit einer Zunahme des Dehnwiderstandes im Mikrozugversuch verknüpft (Belton, 1999). Vitalkleber mit 3,83 % KCl und 3,00 % NaCl wiesen im Mikrozugversuch (siehe 3.3.1) den höchsten Dehnwiderstand auf sowie den größten Anteil an β -Faltblatt-Strukturen. Daher kann dieser Zusammenhang für die Proben bestätigt werden. Allerdings zeigte die Kontrollprobe

einen höheren Dehnwiderstand als die Proben mit divalenten Salze, trotz des geringeren Anteils an β -Faltblatt-Strukturen. Die Proben mit divalenten Salze wiesen gegenüber der Kontrolle einen geringeren Dehnwiderstand im Mikrozugversuch auf, enthielten aber einen leicht erhöhten Anteil an β -Faltblatt-Strukturen im Vergleich zur Kontrolle. Es ist daher davon auszugehen, dass der Dehnwiderstand auch durch andere Wechselwirkungen beeinflusst wird als durch Wasserstoffbrückenbindungen in β -Faltblatt-Strukturen.

Tuhumury et al. (2014) stellten in mit NaCl behandeltem Gluten einen Anstieg an β -Faltblatt-Strukturen fest und vermuteten daher verstärkte Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Glutininmolekülen und hydrophobe Interaktionen durch Salzzusatz. Sie brachten die faserige, geordnete Struktur und die Abnahme des SH-Gehaltes sowie Veränderungen des Gliadin/Glutenin-Verhältnisses mit Konformationsänderungen innerhalb der Glutenstruktur in Verbindung. Sie vermuteten außerdem einen stärkeren Rückgang an Elastizität durch β -Faltblatt-Strukturen als durch β -Schleifen (Tuhumury et al., 2014). In der vorliegenden Studie bewahrheitete sich eine Abnahme des Speichermoduls in den Proben mit KCl und NaCl, die den größten Anteil an β -Faltblatt-Strukturen aufwiesen, nicht. Allerdings konnte eine Zunahme des Fließverhaltens G'' festgestellt werden. Die Vermutung von Tuhumury et al. (2014) steht allerdings im Kontrast zum bewährten „*Train and Loop*“-Modell von Belton.

Während α - und γ -Gliadine überwiegend aus α -Helices und β -Faltblatt-Strukturen bestehen, enthalten HMW-GS und ω -Gliadine auch β -Schleifen (Shewry et al., 1992; Tatham & Shewry, 1985). Bei der Bildung von Glutenaggregaten wurde in der Literatur von einer Abnahme an β -Schleifen zugunsten von β -Faltblatt-Strukturen berichtet (Li et al., 2019; Nawrocka et al., 2016b). Da sich in der vorliegenden Studie zwar der Anteil an β -Faltblatt-Strukturen in den Salzproben erhöhte, β -Schleifen aber gleichzeitig zunahmen, ist eine Konformationsänderung von β -Strukturen untereinander ausgeschlossen.

α -Helices sind stabile, aber starre und hydrophobe und daher für Wasser schlecht zugängliche Strukturen, die eine geordnete, kompakte Form ausbilden (Correa et al., 2014; Ferrer et al., 2011; Mejri et al., 2005; Tatham & Shewry, 1985). Ein geringer Anteil an α -Helices verbessert daher die Löslichkeit von Proteinen durch eine verringerte Protein-Protein-Interaktion und eine vermehrte Protein-Lösungsmittel-Interaktion (Mejri et al., 2005). In dieser Arbeit ist durch die beobachtete Verringerung der α -Helix-Strukturen durch alle Salze im Vergleich zur Kontrolle demnach von einer verbesserten Löslichkeit der Glutenproteine auszugehen. Mejri et al. (2005) stellten in teilweise hydrolysiertem Gluten, das in KCl- und NaCl-Salzlösungen hydratisiert wurde, eine verbesserte Löslichkeit durch weniger α -Helices und eine Erhöhung des Anteils an β -Schleifen fest. Wahrscheinlich ist daher, dass die auch in der vorliegenden Arbeit beobachtete Zunahme an β -Schleifen zu Lasten einer Reduktion von α -Helix-Strukturen vonstatten ging.

Random Coil-Strukturen bilden bei Hydratation Wasserstoffbrückenbindungen aus, die bei Dehydratisierung nicht länger existieren. Stattdessen formen sich in dehydratisierten Proteinen intermolekulare β -Faltblatt-Strukturen (Prestrelski et al., 1993). Diese Erklärungen sind ursächlich für die Abwesenheit von *Random Coil*-Strukturen in den gemessenen Vitalkleberproben. Nawrocka et al. (2016a) konnte in trockenen Vitalkleberproben ebenfalls keine *Random Coil*-Struktur beobachten.

Da α -Helices und β -Faltblatt-Strukturen die Eigenschaften von Gluten maßgeblich beeinflus-

sen, kann das Verhältnis der beiden Sekundärstrukturelemente gebildet werden, um einen Eindruck über den Grad der Veränderung der Sekundärstruktur zu erhalten (Mejri et al., 2005). Das Verhältnis betrug 3,32 für die Kontrolle und 0,96–2,58 für die salzbehandelten Proben. Es war für die monovalenten Salze deutlicher herabgesetzt als für die divalenten Salze. Die Abnahme ist bei allen Salzen begründet durch eine Zunahme an β -Faltblatt-Strukturen bei einer gleichzeitigen Abnahme an α -Helices, welche bei den monovalenten Salzen stärker ausgeprägt war. Alle salzbehandelten Proben führten somit zu einer stärker aggregierten Proteinstruktur.

Aufgrund der schwankenden Ergebnisse der Doppelbestimmungen der einzelnen Messgrößen, konnte für das Probenset keine Varianzhomogenität festgestellt werden. Der daher verwendete nicht-parametrische Dunnett-T3-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben. Daher kann bei der Bewertung der Ramanspektren trotz teils erheblicher Abweichungen der relativen Werte der Messgrößen, nur von Tendenzen, nicht aber von statistisch belegbaren Unterschieden ausgegangen werden. Allerdings werden in der Literatur Ramanspektren meist ohnehin rein qualitativ bzw. semi-quantitativ ausgewertet (Ferrer et al., 2011; Mejri et al., 2005; Nawrocka et al., 2015).

Disulfidbrücken erhalten durch inter- und intramolekularer Bindungen die Tertiärstruktur von Proteinen (Li et al., 2019). Unter den drei möglichen Konformationen, die die Disulfidbindung einnehmen kann, ist die *ggg*-Konformation die stabilste (Nawrocka et al., 2016a). Intermolekulare Disulfidbindungen liegen bevorzugt in der *ggg*-Konformation vor, intramolekulare Disulfidbindungen in der *tgg*-Konformation. Das Auftreten dieser Bindungskonformationen wird daher mit Proteinfaltung in Verbindung gebracht (Nawrocka et al., 2016a).

Um die Konformation der Disulfidbindungen zu bestimmen, wurde der Anteil der *ggg*-, *tgg*- und *tgt*-Konformation ausgewertet. Die *ggg*-Konformation machte mit 23,4–57,2 % den größten Anteil bei den meisten Proben mit Salzzusatz aus und war für Proben mit 3,83 % KCl und 2,44 % MgCl_2 erhöht, für 3,00 % NaCl leicht und für 0,48 % CaCl_2 deutlich gegenüber der Kontrolle herabgesetzt (siehe Abbildung 23). Die *tgg*-Konformation nahm Werte von 17,8–36,8 % an und erhöhte sich leicht für alle Proben mit Salzen im Vergleich zur Kontrolle. Für den Zusatz von 0,48 % CaCl_2 war der Anteil an *tgg* mit 36,8 % deutlich erhöht gegenüber der Kontrolle (+17,8 %). Die *tgt*-Konformation variierte zwischen 18,5–39,8 %, war für die Proben mit monovalenten Salzen gegenüber der Kontrolle leicht und für 2,44 % MgCl_2 stark verringert. Für den Zusatz von 0,48 % CaCl_2 erhöhte sich der Anteil auf knapp 40 %. In anderen Studien, die Gluten spektroskopisch untersuchten, stellte die *ggg*-Konformation ebenfalls die dominante SS-Bindungskonformation dar (Gómez et al., 2013b; Nawrocka et al., 2015; Nawrocka et al., 2016a).

Bei den Proben mit 3,83 % KCl und 2,44 % MgCl_2 stieg der Anteil der *ggg*-Konformation und die Salze führten somit zu einer stabileren Disulfidbindungskonformation und anteilig mehr intermolekularen Disulfidbindungen. Bei allen salzbehandelten Proben nahm außerdem der Anteil der *tgg*-Konformation zu, wodurch diese Proben prozentual mehr intramolekulare Disulfidbrücken enthielten (Li et al., 2019; Nawrocka et al., 2016a). Die Reduzierung des Anteils der *ggg*-Konformation gegenüber der Kontrolle in der mit NaCl und CaCl_2 behandelten Proben könnte auf eine allgemeine Reduzierung der SS-Bindungen zurückzuführen sein (Nawrocka et al., 2015). Eine signifikante Reduzierung des SS-Gehaltes im Vergleich zur Kontrolle konnte für diese Probe im Ellman-Assay jedoch nicht festgestellt werden (siehe Abbildung 19 und Tabel-

le 29). Kommt es zu einer Reduzierung von Disulfidbrücken, wie sie in den Proben mit 3,00 % NaCl und 2,44 % MgCl_2 festgestellt werden konnte, etwa durch Spaltung der Bindung, wird das betreffende Molekül in die grundlegenden Polypeptidketten umgewandelt, die in die Struktur des *Random Coils* zurückkehren (Wall, 1971). Da allerdings in keiner der Proben eine *Random Coil*-Struktur festgestellt werden konnte, kann stattdessen von einer Proteinfaltung oder -aggregation ausgegangen werden (Nawrocka et al., 2015). Diese Vermutung stimmt mit dem erhöhten Anteil an β -Faltblatt-Strukturen in allen salzbehandelten Proben überein, der ein Indiz für Proteinfaltung und -aggregation darstellt (Wall, 1971).

Das vermehrte Auftreten der *tgg*- und *tgt*-Konformation kann ein Hinweis auf die Verschiebung von Polypeptidketten und einer daraus folgenden abnormalen Proteinfaltung und Aggregation von Proteinuntereinheiten sein, die folglich zu einer instabileren Glutenstruktur beiträgt (Zhou et al., 2014). Wang et al. (2020) postulierten außerdem, dass wasserlösliches Arabinoxylan die Polymerisierung zwischen Gluteninen untereinander und zwischen Gluteninen und Gliadinen beeinflusst, dieser Mechanismus zu einer SS-Konformationsänderung führt und es so zu irregulärer Proteinfaltung und -aggregation kommt. Es ist denkbar, dass insbesondere das Salz CaCl_2 eine ähnliche Wirkung auf die Polymerisierungsvorgänge der Glutenproteine hat.

Der Tyrosin-Doppelpeak gibt Auskunft über die Mikroumgebung der Tyrosinreste und stammt von der Tyrosin-Ring-Vibration. Der Peak bei 850 cm^{-1} steht dabei für die freiliegenden Tyrosinreste, der Peak bei 830 cm^{-1} rührt von den in der Proteinstruktur verborgenen Tyrosinresten. Das Verhältnis beider Intensitäten liefert Informationen über die Kapazität der Phenol-Hydroxyl-Gruppe inter- oder intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Übersteigt das Verhältnis 1, so befinden sich die meisten Tyrosinreste an der Oberfläche des Proteins und die OH-Gruppe am Phenolring ist gleichzeitig Donor und Akzeptor in schwachen bis moderat starken Wasserstoffbrückenbindungen. Nimmt das Verhältnis Werte unter 1 an, ist dies ein Hinweis darauf, dass Tyrosinreste teilweise oder ganz in der Proteinstruktur verborgen liegen und die OH-Gruppe des Phenolrings ein Protonendonator in einer starken Wasserstoffbrückenbindung ist (Honzatko & Williams, 1982; Li-Chan, 1996; Nonaka et al., 1993).

Das Verhältnis der Intensitäten des I_{850} und I_{830} Tyrosin-Doppelpeaks war bei allen Proben > 1 und variierte nur geringfügig zwischen den Proben (1,21–1,25). Es war bei allen Proben mit Salz geringfügig erhöht im Vergleich zur Kontrolle, mit Ausnahme von 2,44 % MgCl_2 . Für diese Probe war das Verhältnis minimal herabgesetzt. Somit befinden sich in allen Vitalkleberproben die Tyrosinreste an der Oberfläche der Proteinstruktur und die Hydroxylgruppe ist an schwachen bis moderaten Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt (Honzatko & Williams, 1982; Li-Chan, 1996; Nonaka et al., 1993). Die Werte, die I_{850}/I_{830} annahm, lagen in einem etwas niedrigeren Rahmen als bei unbehandeltem, pulverisiertem Vitalkleber beobachteten Werten in der Literatur (1,42–1,56) (Ferrer et al., 2011; Nawrocka et al., 2015; Nawrocka et al., 2016b). Die fast identischen Werte für das I_{850}/I_{830} -Verhältnis der verschiedenen Proben in der vorliegenden Studie zeigen, dass die Tyrosin-Hydroxylgruppe in allen Proben an ähnlich schwachen Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt war und die Salze sowohl auf die Bindung, als auch die Lokalisation der Tyrosinreste keinen Einfluss nahmen. Daher ist naheliegend, dass sich diese Formation während der Teigherstellung durch Faltung und Aggregation der Polypeptidketten ausbildete und die Salze auf diese Bindungen in der Nachbehandlung keinen Einfluss nehmen konnten (Lancelot et al., 2021; Nawrocka et al., 2015).

Der Tryptophan-Peak kann als Indikator der Hydrophobizität des Indolrings interpretiert werden und gibt genau wie bei Tyrosin Aufschluss über die Mikroumgebung des Tryptophanrestes. Kommt es zu einer Exposition des Tryptophanrestes gegenüber polaren Lösungsmitteln, zeigt eine Reduzierung der Intensität des Tryptophan-Peaks an, dass die Tryptophanreste in einer verborgenen, hydrophoben Umgebung einer ungeordneten Proteinstruktur lokalisiert sind (Li-Chan, 1996; Nawrocka et al., 2015; Nonaka et al., 1993). Die Intensität des Tryptophan-Peaks variierte zwischen den Proben sehr wenig und betrug 0,12–0,16. Damit nahm die Tryptophanintensität für unbehandelte Glutenproben übliche Werte an und die Salze konnten demzufolge die Hydrophobizität der Tryptophanumgebung nicht beeinflussen (Nawrocka et al., 2016a, 2016b). Zhou et al. (2014) brachte die Überlegung auf, dass die geordnete, kompakte Struktur, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den langen Ketten der HMW-GS entsteht, die Interaktion mit der Mikroumgebung behindert. Da sich der Anteil der β -Faltblatt-Strukturen in den Salzproben tatsächlich erhöhte, wäre dies ein möglicher Erklärungsansatz für die unveränderten Tyrosin- und Tryptophan-Intensitäten.

Insgesamt lässt sich aus den Ramanexperimenten ableiten, dass alle Salze zu einer post-translationalen Änderung der Sekundärstruktur führten. Damit bestätigen die Ramanergebnisse, dass die beobachteten rheologischen Veränderungen und die Änderung der Glutenproteinzusammensetzung unter anderem auf eine nachträgliche Modifikation der Sekundärstruktur der Glutenproteine durch die Salze zurückzuführen sind. Durch die Zunahme an β -Faltblatt-Strukturen ist von einer verstärkten Aggregation der Glutenproteine auszugehen, die durch die Salze gefördert wurde. Die Glutenstruktur ist durch die Salze 3,83 % KCl und 2,44 % MgCl_2 besonders stabilisiert, da sich mehr Disulfidbindungen im Vergleich zur Kontrolle in der stabilen *ggg*-Konformation befanden. Der gegenteilige Trend zeichnete sich bei 0,48 % CaCl_2 ab, da diese Probe durch einen besonders verringerten Anteil der *ggg*-Konformation auffiel.

Keines der Salze führte zu einer Veränderung der Tyrosin- oder des Tryptophan-Peaks und somit zu keiner Abweichung der Wasserstoffbrückenbindungskapazität oder Hydrophobizität der Mikroumgebung der Aminosäuren im Vergleich zur Kontrolle. Da jedoch bei allen Salzen der Anteil der β -Faltblatt-Strukturen zunahm, die mit der Bildung von Wasserstoffbrücken assoziiert sind, ist davon auszugehen, dass sich neue, salzinduzierte Wasserstoffbrückenbindungen, beispielsweise zwischen HMW-GS, bildeten.

3.5.2. Polysorbat 20

Die mit 1 % PS 20 behandelte Probe enthielt 57,5 % α -Helices, 26,3 % β -Schleifen, 12,0 % parallele β -Faltblatt-Strukturen, 4,1 % antiparallele β -Faltblatt-Strukturen und keine mit *Random Coils* assoziierten Strukturen (siehe Abbildung 24). Die Anteile der Sekundärstrukturelemente unterschieden sich daher kaum von denen der Probe ohne Zusatz. In beiden Proben dominierten geordnete, kompakte α -Helix- und β -Faltblatt-Strukturen neben Proteinbereichen mit ungeordneten β -Schleifen. Das Verhältnis aus α -Helices und β -Faltblatt-Strukturen betrug für PS 20 3,56 und unterschied sich aufgrund der sehr ähnlichen Verteilung der Sekundärstrukturelemente damit wenig von dem Wert der Kontrolle (3,32). Es ist daher davon auszugehen, dass der Zusatz an PS 20 wenig Einfluss auf die Aggregation der Glutenproteine nahm.

Der Anteil der *ggg*-Konformation lag bei 46,4 %, bei 32,1 % für die *tgg*- und bei 21,5 % für die *tgt*-

Konformation (siehe Abbildung 24). Damit war der Anteil der stabilen *ggg*-Konformation fast identisch mit der Kontrolle und der Zusatz an PS 20 führte somit nicht zu einem Verlust der stabilsten SS-Konformation. Offenbar konnten durch PS 20 zudem mehr intramolekulare Disulfidbindungen gebildet werden, zulasten der *tgt*-Konformation. Die Intensität des Tryptophan-Peaks und das Verhältnis des Tyrosin-Doppelpeaks war mit 0,16 bzw. 1,22 identisch zur Kontrolle.

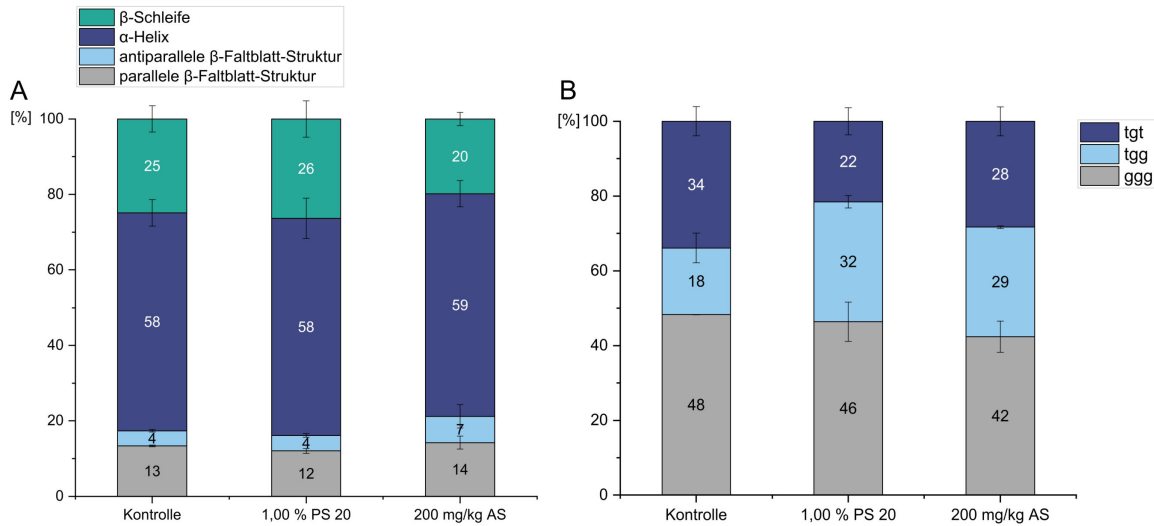


Abbildung 24: Anteil der Sekundärstrukturelemente (A) und Anteil an Disulfidbindungskonformationen (B) in Proben mit Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) und der Kontrollprobe ohne Zusatz. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm halbe Differenz der Mittelwerte angegeben ($n = 2$), *ggg*: *gauche-gauche-gauche*-Konformation der Disulfidbindung, *tgg*: *trans-gauche-gauche*-Konformation der Disulfidbindung, *tgt*: *trans-gauche-trans*-Konformation der Disulfidbindung.

Gómez et al. (2013b) versetzten Mehl einzeln und in Kombination mit den Emulgatoren SSL und DATEM und isolierten daraus Gluten. Die Emulgatoren wurden in Konzentrationen von 0,25 %, 0,5 % und 1 % zugegeben. Dosierungen von mehr als 1 % verhinderten die Teigbildung. Die Sekundärstruktur des resultierenden Vitalklebers wurde per Raman-Spektroskopie untersucht. Gluten mit SSL und DATEM zeigte jeweils eine Zunahme von α -Helices und antiparallelen β -Faltblatt-Strukturen sowie eine Abnahme an β -Faltblatt-Strukturen und β -Schleifen. *Random Coil*-Strukturen konnten nur in der Probe ohne Emulgator identifiziert werden. Die höhere Intensität der Amid I-Bande durch eine SSL-Dosierung von 0,25 % und eine DATEM-Konzentration von 0,5 % führten Gómez et al. (2013b) auf das Vorliegen von vermehrter Proteinfaltung zurück. Bei Kombination beider Emulgatoren nahm die Intensität im Vergleich zur Kontrolle weniger stark zu. Gómez et al. (2013b) assoziierten die zugrundeliegende ungeordnetere Glutenstruktur mit reduzierten Interaktionen zwischen Emulgator und Glutenproteinen, die durch die unterschiedlichen chemischen Strukturen der Emulgatoren und die daraus resultierende sterische Hinderung entstand. Wenige Tyrosinreste waren bei den geringen SSL-Dosierungen freigelegt, da die Intensität der Tyrosin-Peaks im Vergleich zur Kontrolle abnahm. Bei 1 % SSL-Zusatz nahm die Tyrosin-Intensität jedoch zu. Gómez et al. (2013b) schrieben die Zunahme vermehrten Emulgator-Protein-Interaktionen zu, bei denen die Tyrosinreste als Protonenakzeptor für die COO^- -Gruppe des anionischen Tensids SSL fungierte. Die negativ geladene funktionelle Gruppe des Emulgators begünstigte außerdem die Ladungsabstoßung zwischen den Glutenprotei-

nen, wodurch eine ungeordnete Struktur und Proteinentfaltung gefördert wird. DATEM reduzierte die Tyrosin-Intensität im Vergleich zur Kontrolle. Die Proteine lagen folglich gefaltet vor, wodurch die Tyrosinreste in der Proteinstruktur verborgen lagen.

Die Intensität des Tryptophan-Bandes nahm für fast alle Emulgator-Dosierungen ab und wies somit auf verborgen liegende Tryptophanreste in einer hydrophoben Mikroumgebung hin.

Gómez et al. (2013b) schrieben die unterschiedlichen Eigenschaften der Emulgatoren auf die Sekundärstruktur deren HLB-Wert zu, der unter anderem Eigenschaften wie die ionische und hydrophobe Interaktion und Ladungsabstoßung gegenüber Proteinen bestimmt. SSL besitzt einen HLB-Wert von 21, DATEM einen Wert von 9,2 (Armero & Collar, 1996). PS 20 liegt mit einem HLB-Wert von 16,7 also zwischen den beiden Emulgatoren. Die unterschiedliche chemische Struktur von SSL und DATEM bedingt besonders durch den ungleichen räumlichen Aufbau des hydrophilen Teils der Moleküle andersartige Wechselwirkungen der Emulgatoren mit den Glutenproteinen. Der polare, hydrophile Molekülteil von SSL kann mit positiv geladenen Aminosäureseitenketten der Glutenproteine ionische Wechselwirkungen eingehen und so die Glutenaggregation fördern (Gómez et al., 2012, 2013b). DATEM interagiert dagegen vorrangig über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen des hydrophoben Molekülteils mit den Proteinen (Gómez et al., 2012, 2013b; Hähnel et al., 1995).

Im Gegensatz zu SSL und DATEM ist PS 20 ein nicht-ionisches Tensid, welches daher gegenüber Tyrosin weder einen starken Protonenakzeptor noch -donor darstellen kann. Zudem ist der hydrophile Teil des Moleküls durch seine Polyoxyethyleinheiten deutlich sperriger und Bindungsstellen der Glutenproteine vermutlich schwerer zugänglich als bei SSL und DATEM. Nicht-ionische Tenside können zwar die Kapazität für intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen erhöhen und dadurch Konformationsänderungen initiieren. Allerdings fördern sie dadurch nicht die Aggregation von Proteinen (Armero & Collar, 1996).

Die beobachteten Veränderungen in der Proteinextrahierbarkeit der Osborne- und SDSL/GMP-Fraktionierung und bei den rheologischen Messungen durch den Zusatz PS 20 können durch die ausbleibende Änderung der Sekundärstruktur nicht auf eine Konformationsänderung zurückgeführt werden. Durch die geringen Abweichungen von der Kontrolle ist davon auszugehen, dass der Emulgator PS 20 in einem fertig ausgebildeten Glutennetzwerk lediglich geringfügige Auswirkungen auf die Glutenproteinzusammensetzung und funktionellen Eigenschaften nimmt. Wesentliche Veränderungen der Sekundärstruktur bleiben jedoch aus.

3.5.3. Ascorbinsäure

Der Gehalt an α -Helices in der mit 200 mg/kg AS behandelten Probe lag bei 59,1 %, β -Schleifen waren zu 19,9 % vertreten, parallele β -Faltblatt-Strukturen zu 14,3 % und antiparallele β -Faltblatt-Strukturen zu 7,0 % (siehe Abbildung 24). *Random Coil*-Strukturen konnten nicht zugeordnet werden. Die Probe wies unter allen anderen Proben mit etwa 20 % den geringsten Anteil an β -Schleifen auf, ansonsten unterschied sich der Gehalt der Sekundärstrukturelemente allerdings kaum von der Probe ohne Zusatz. Das Verhältnis aus α -Helices und β -Faltblatt-Strukturen hob sich mit einem Wert von 2,78 daher weniger deutlich von der Kontrolle (3,32) ab als das der meisten Salze (siehe 3.5.1).

Das Verhältnis der Tyrosin-Peaks nahm einen Wert von 1,23 an, der Tryptophan-Peak zeigte eine Intensität von 0,15. Die Intensitäten beider Peaks entsprachen damit den bei der Kontrollprobe festgestellten Werten. Die Verteilung der Disulfidkonformation zeichnete sich mit 42,4 % *ggg*-, 29,3 % *tgg*- und 28,3 % *tgt*-Konformation durch eine leichte Reduzierung der stabilen *ggg*-Konformation und eine Zunahme der *tgg*-Konformation aus, die die vermehrte Bildung intramolekularer SS-Bindungen kennzeichnet (siehe Abbildung 24).

Die spektroskopischen Ergebnisse deuten darauf hin, dass AS in der Nachbehandlung von Feuchtkleber nur bedingt Auswirkungen auf die Sekundärstruktur hat. Damit bestätigen die Ramanergebnisse die rheologischen Messungen und die Bestimmung der Glutenproteinzusammensetzung, auf die AS für die meisten bestimmten Parameter weniger Einfluss nahm als die Salze. Chompoorat et al. (2022) zeigten ebenfalls, dass in Gluten aus Teig mit 100 mg/kg AS nur geringe Veränderungen der Sekundärstruktur feststellbar sind, welche sich allerdings bei Einwirkung von Temperatur erhöhen. In der vorliegenden Arbeit konnte für AS ebenfalls ein stärkerer Effekt der Temperatur auf die Eigenschaften der Glutenproben festgestellt werden als bei den Salzen. Ein geringerer Anteil der Disulfidbrücken in Proben mit AS gegenüber der Kontrolle nahm die stabile *ggg*-Konformation an, wodurch die Probe weniger intermolekulare Disulfidbindungen aufwies. Dieser Umstand bedingt eine verringerte Netzwerkkonnektivität, kleinere Proteinaggregate und damit vermutlich eine erhöhte Proteinextrahierbarkeit, die bei der Osborne- und SDSL/GMP-Fraktionierung festgestellt werden konnte. Durch die kaum veränderte Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente kann eine Konformationsänderung als Grund für die Erhöhung der Proteinextrahierbarkeit weitgehend ausgeschlossen werden. Die in 3.4.2.3 diskutierte Abnahme an Dityrosinbindungen kann durch die spektroskopisch unveränderte Mikroumgebung der Tyrosinreste als Grund für eine veränderte Proteinextrahierbarkeit gegenüber der Kontrolle ebenfalls nicht geltend gemacht werden.

3.6. Synergistischer Effekt aus Milieu- und Prozessbedingungen

Die Inhalte aus 3.6 sind als Publikation in Vorbereitung.

Im Rahmen einer Projektarbeit (FEI Projekt 21289 N) in Kooperation mit TUM-BGT wurde neben der Nachbehandlung auch der Einfluss von Milieubedingungen, d.h. von Bedingungen vor und während des Auswaschens von Gluten, auf Vitalklebereigenschaften betrachtet. Hierbei wurden unter anderem verschiedene Salzlösungen und Waschwassertemperaturen während der Feuchtkleberisolation getestet, welche ebenfalls einen Effekt auf die Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität hatten (Daten werden nicht gezeigt). Die dabei als einflussreichste Parameter herausgearbeiteten Milieubedingungen wurden mit den effektstärksten Bedingungen der Nachbehandlung kombiniert.

Tabelle 7: Probenübersicht der Vitalkleberproben zur Beurteilung des synergistischen Effekts aus Milieu- und Prozessbedingungen. Durch den Vergleich verschiedener Proben kann der Effekt verschiedener Einflüsse beurteilt werden (in der linken und rechten Spalte dargestellt).

Milieubedingungen			Prozessbedingungen	
	Temperatur Waschwasser	Zusatz Waschwasser	Nachbehand- lungsparameter	Trocknungs- parameter
Einfluss der Waschwassertemperatur	20 °C			GT
	50 °C			GT
Einfluss von Salz in der Nachbehandlung	20 °C		3 % (w/w) NaCl	40 °C
	50 °C		3 % (w/w) NaCl	40 °C
	20 °C		3 % (w/w) NaCl	GT
	50 °C		3 % (w/w) NaCl	GT
	20 °C		0,48 % (w/w) CaCl ₂	GT
	50 °C		0,48 % (w/w) CaCl ₂	GT
Einfluss von NaCl im Waschwasser	20 °C	0,58 % NaCl		GT
	50 °C	0,58 % NaCl		GT
	20 °C	0,58 % NaCl	3 % (w/w) NaCl	GT
	50 °C	0,58 % NaCl	3 % (w/w) NaCl	GT

Auf Seite der Milieubedingungen wurden eine Waschwassertemperatur von 20 °C und 50 °C und der Zusatz von 0,58 % NaCl in der Waschlösung als einflussreichste Parameter festgestellt, welche in der darauffolgenden Nachbehandlung des Feuchtklebers mit dem Zusatz von 3 % NaCl oder 0,48 % CaCl₂ und Trocknungsbedingungen von 40 °C oder Gefriertrocknung (GT) kombiniert wurden (siehe Tabelle 7). Alle Proben dieses Probensatzes wurden gemäß des etablierten Workflows (siehe 5.2) von den Projektpartnern hergestellt, der allerdings auf einen größeren Maßstab (ausgehend von 1 kg Mehl pro Probe) übertragen wurde, um eine ausreichende Menge an Vitalkleber zu generieren. Die Analyse der Proben ermöglichte die Evaluierung des synergistischen Effekts verschiedener Behandlungsbedingungen von Gluten während des Auswaschens und in einem Nachbehandlungsschritt.

Die Vitalkleber wurden auf ihren Rohproteingehalt per Dumas und ihre Glutenproteinzusam-

mensetzung per Osborne- und SDSL/GMP-Fraktionierung, sowie den Gehalt an freien und gebundenen Thiolen per Ellman-Assay untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) unterworfen.

Der Rohproteingehalt betrug zwischen 77,9 % und 90,6 % und war am niedrigsten für die bei 50 °C getrocknete Kontrollprobe (siehe Tabelle 37). Den höchsten Wert nahm VK (50 °C, 0,58 %, GT) an.

Der per Osborne-Fraktionierung bestimmte Gliadiningehalt lag bei 384,4 mg/g bis 491,7 mg/g, der Gluteningehalt bei 263,0 mg/g bis 357,2 mg/g (siehe Abbildung 25 und Tabelle 38). Bei 50 °C Waschwassertemperatur konnten bei den Kontrollproben und den mit NaCl nachbehandelten Proben relativ mehr Glutenine, aber weniger Gliadine extrahiert werden, bei 20 °C konnte die entsprechend entgegengesetzte Feststellung gemacht werden. Dies kann auf die Vernetzung von Glutenproteinen bei steigender Temperatur zurückgeführt werden (Vogel et al., 2018; Weegels et al., 1994). Da die meisten Salze die Proteinextrahierbarkeit im Allgemeinen herabsetzten, wird dieser Umstand bei Betrachtung der Absolutwerte deutlicher (siehe Tabelle 38).

Dieser für NaCl beobachtete Effekt kehrte sich bei der Nachbehandlung mit 0,48 % CaCl_2 jedoch um. Aus diesen Proben konnten bei 50 °C Waschwassertemperatur mehr Gliadine und weniger Glutenine extrahiert werden als bei 20 °C. Zwischen den korrespondierenden Proben war der Unterschied in der Gliadinextrahierbarkeit für alle Proben außer bei Proben mit NaCl im Waschwasser signifikant, die Gluteninextrahierbarkeit unterschied sich bei allen Proben nicht signifikant. Die Gliadinextrahierbarkeit stieg durch die Salzbehandlung der Proben im Vergleich zur Kontrolle bei fast allen Proben signifikant, insbesondere bei 50 °C Waschwassertemperatur. Die Gluteninextrahierbarkeit sank bei fast allen Proben signifikant im Vergleich zur Probe ohne Salzzusatz. Dies zeigt, dass die Gliadinextrahierbarkeit durch die hohe Waschwassertemperatur zwar verringert wurde, durch die Salzbehandlung aber wiederum gesteigert werden konnte. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt in den Proben VK (50 °C, 0,48 % CaCl_2 , GT), VK (50 °C, 0,58 % NaCl, GT) und VK (50 °C, 0,58 % NaCl, 3 % NaCl, GT), die bei 50 °C Waschwassertemperatur isoliert wurden, aber mehr Gliadin enthielten als die 20 °C-Kontrollprobe ohne Salz.

Aufgrund der unterschiedlichen Extrahierbarkeiten der Gliadine und Glutenine je nach Behandlung der Feuchtkleber, ist die Betrachtung des Verhältnisses aus Gliadinen und Gluteninen sinnvoll. Das Gliadin/Glutenin-Verhältnis nahm Werte zwischen 1,12 und 1,78 an. Es lag bei den bei 50 °C ausgewaschenen Proben niedriger als bei den Proben mit 20 °C Waschwassertemperatur. Die einzige Ausnahme bildeten hierbei wiederum die Proben mit CaCl_2 . Bei den Kontrollproben und den mit 3 % NaCl nachbehandelten Proben fielen die Unterschiede im Gliadin/Glutenin-Verhältnis zwischen den Waschwassertemperaturen signifikant aus, bei allen anderen Proben nicht. Das Gliadin/Glutenin-Verhältnis lag bei den salzbehandelten Proben höher als bei den Kontrollproben und nahm die höchsten Werte für die Proben mit NaCl im Waschwasser und in der Nachbehandlung an. Der kombinierte Effekt von NaCl trug besonders zu einer Erhöhung der Gliadinextrahierbarkeit bei und reduzierte gleichzeitig den Gluteningehalt.

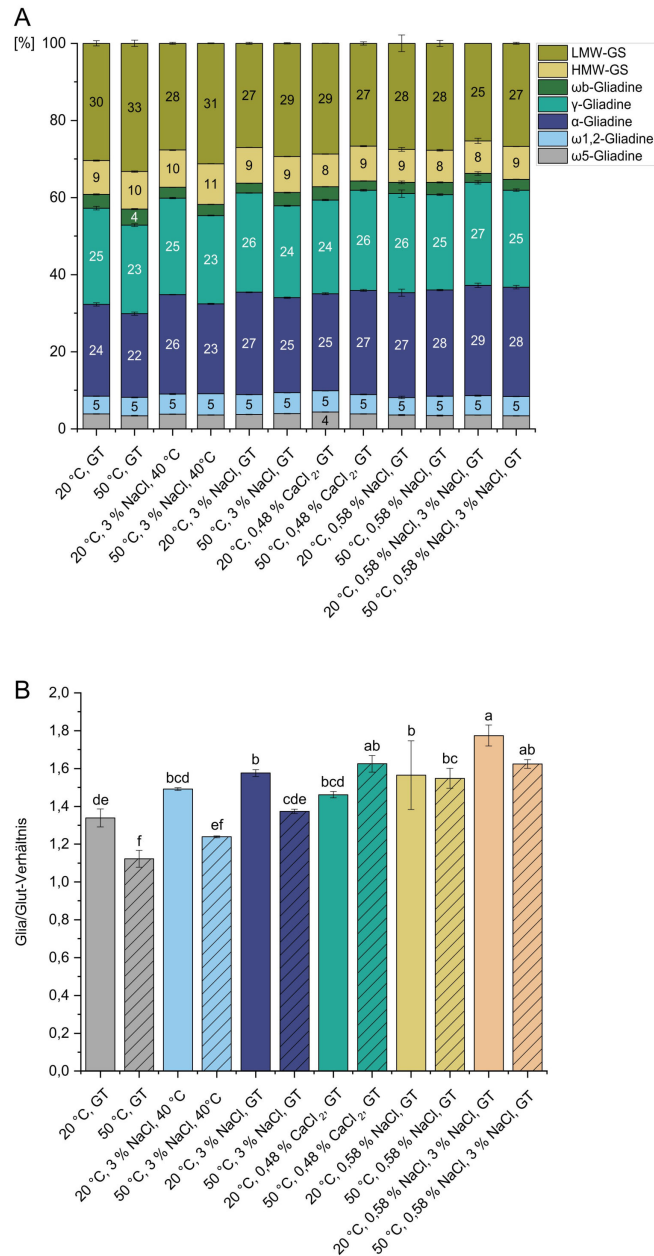


Abbildung 25: Anteile der *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS) und der Glutenproteintypen α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine (A) und Verhältnis von Gliadin zu Glutenin (Glia/Glut) (B) in salzbehandelten Vitalkleberproben und Kontrollproben ohne Salz, getrocknet bei 40 °C oder gefriergetrocknet (GT). Werte unter 4 % sind nicht dargestellt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$) angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Vitalkleberproben sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet (ANOVA, Tukey's-Test, $p \leq 0,05$).

Aufgrund der bisher gewonnenen Erkenntnisse über das Zusammenspiel von Salzen und Proteinen kann die verbesserte Gliadinextrahierbarkeit in salzbehandelten Proben mit einer verbesserten Löslichkeit bedingt durch salzinduzierte Konformationsänderungen erklärt werden. Die Auswertung der Raman-Spektren ergab einen verringerten Anteil an schlecht für Lösungsmittel zugängliche α -Helices für alle mit Salz versetzten Proben (siehe 3.5). Die in 3.4.3 dargelegte mögliche Bildung von nicht-kovalenten Isopeptidbindungen und LAN könnte zudem eine Erklärung für den verringerten Gehalt an Gluteninen in den Salzproben sein (Fu et al., 1996; Lagrain et al., 2010a; Volkin & Klibanov, 1987).

Der SDSL-Gehalt betrug für alle Proben zwischen 363,3 mg/g und 597,9 mg/g (siehe Abbildung 26 und Tabelle 39). Der GMP-Gehalt lag bei 45,5 mg/g bis 264,5 mg/g. Relativ gesehen war der SDSL-Gehalt für Proben, die bei 20 °C gewaschen wurden, höher als für Proben, die bei 50 °C gewaschen wurden, während der GMP-Gehalt niedriger ausfiel. Die absoluten Gehalte der SDSL- und GMP-Fractionen nahmen allerdings jeweils für die bei 20 °C behandelten Proben niedrigere Werte an. Auffällig für besonders dieses Probenstet war, dass sich die Summe der SDSL- und GMP-Fraktion und damit die Proteinextrahierbarkeit zwischen den Proben extrem stark unterschieden (siehe Abbildung 26). Die Differenz der Probe mit der höchsten Summe an SDSL und GMP zur Probe mit der niedrigsten Summe des Gesamtgehaltes betrug knapp 50 %. Eine derart große Spanne ist weder bei der Osborne-Fraktionierung der gleichen Proben, noch bei der Bestimmung der Glutenproteinzusammensetzung aller anderen salzbehandelten Proben, auch bei höherer Temperatureinwirkung, aufgefallen (siehe Tabelle 25 und 27). Zudem unterschieden sich fast alle Proben signifikant von der jeweiligen Kontrollprobe ohne Salz. Daher ist von einem starken synergistischen Effekt von Auswaschtemperatur, NaCl im Waschwasser, NaCl und CaCl₂ in der Nachbehandlung und den Trocknungsbedingungen auf den SDSL- und GMP-Gehalt auszugehen.

Die SDSL/GMP-Extrahierbarkeit lag für die bei 20 °C ausgewaschenen und gefriergetrockneten Proben, außer bei CaCl₂, niedriger als für die bei höherer Temperatur behandelten Proben. Dies ist insofern verwunderlich, als dass die Proteinextrahierbarkeit tendenziell mit steigenden Temperaturen abnimmt, da während der Temperaturerhöhung Querverbindungen zwischen den Proteinen oder nicht-kovalente Bindungen entstehen (Lagrain et al., 2008; Rombouts et al., 2010, 2012). Die Bildung von Disulfidbindungen kann die reduzierte Extrahierbarkeit nicht erklären, da die Bindungen unter reduzierenden Bedingungen reversibel sind (Rombouts et al., 2012).

Um im Falle von starken Abweichungen in der Proteinextrahierbarkeit die Proben untereinander dennoch vergleichen zu können, kann wiederum das SDSL/GMP-Verhältnis herangezogen werden. Dieses betrug zwischen 2,14 und 7,99 und lag bei den bei 50 °C gewaschenen Proben grundsätzlich niedriger mit Ausnahme der mit CaCl₂ behandelten Proben. Das Verhältnis war bei 20 °C für den kombinierten Effekt aus NaCl im Milieu und in der Nachbehandlung nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrollprobe. Die einzelnen Behandlungen zeigten dagegen jeweils eine signifikante Abweichung von der Kontrolle. Die Verhältnisse der separaten Behandlungen bei 20 °C Waschwassertemperatur waren wiederum nicht signifikant unterschiedlich oder deutlich erhöht im Vergleich zum kombinierten Effekt (siehe Abbildung 26). Somit bewirkte die Kombination aus Milieu- und Prozessbedingungen einen synergistischen Effekt.

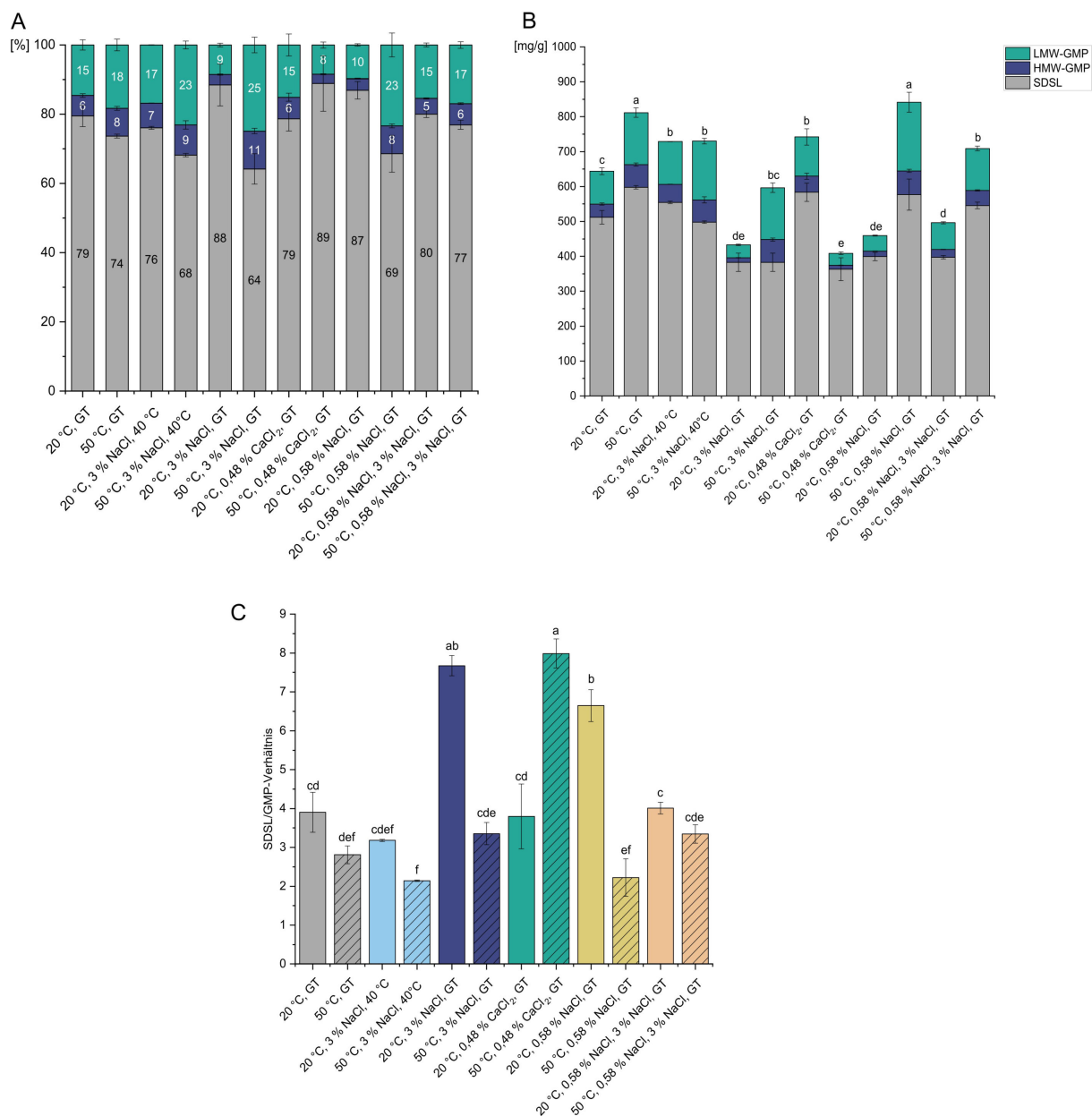


Abbildung 26: Relativer (A) und absoluter (B) Gehalt an *Low-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (LMW-GMP), *High-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (HMW-GMP) und Verhältnis aus SDS-löslichen Proteinen (SDSL) und Gluteninmakropolymer (SDSL/GMP) (C) in salzbehandelten Vitalkleberproben und Kontrollproben ohne Salz, getrocknet bei 40 °C oder gefriergetrocknet (GT). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$) angegeben. Werte unter 4 % sind nicht dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Vitalkleberproben sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet (ANOVA, Tukey's-Test, $p \leq 0,05$). Signifikante Unterschiede in (B) beziehen sich auf die Gesamtmenge an Protein.

Der Gehalt der freien Thiole bewegte sich für das Probenaset zwischen 1,04 $\mu\text{mol/g}$ Protein und 1,91 $\mu\text{mol/g}$ Protein (siehe Abbildung 27 und Tabelle 40). Der SH-Gehalt lag für salzbehandelte Proben bei 20 °C Waschwassertemperatur niedriger als für die Kontrollprobe. Bei 50 °C Waschwassertemperatur hatten die Salze keinen Effekt. Eine Ausnahme bildeten auch hier die mit CaCl_2 behandelten Proben, bei denen die bei 50 °C ausgewaschene Probe signifikant mehr freie Thiole aufzeigte als die Kontrollprobe. Alle korrespondierenden, bei unterschiedlichen Tem-

peraturen ausgewaschenen Proben unterschieden sich signifikant bis auf die Proben, die bei 40 °C getrocknet wurden. Dies zeigt, dass hier die Temperatur der dominierende Einflussfaktor auf den Gehalt der freien Thiole war.

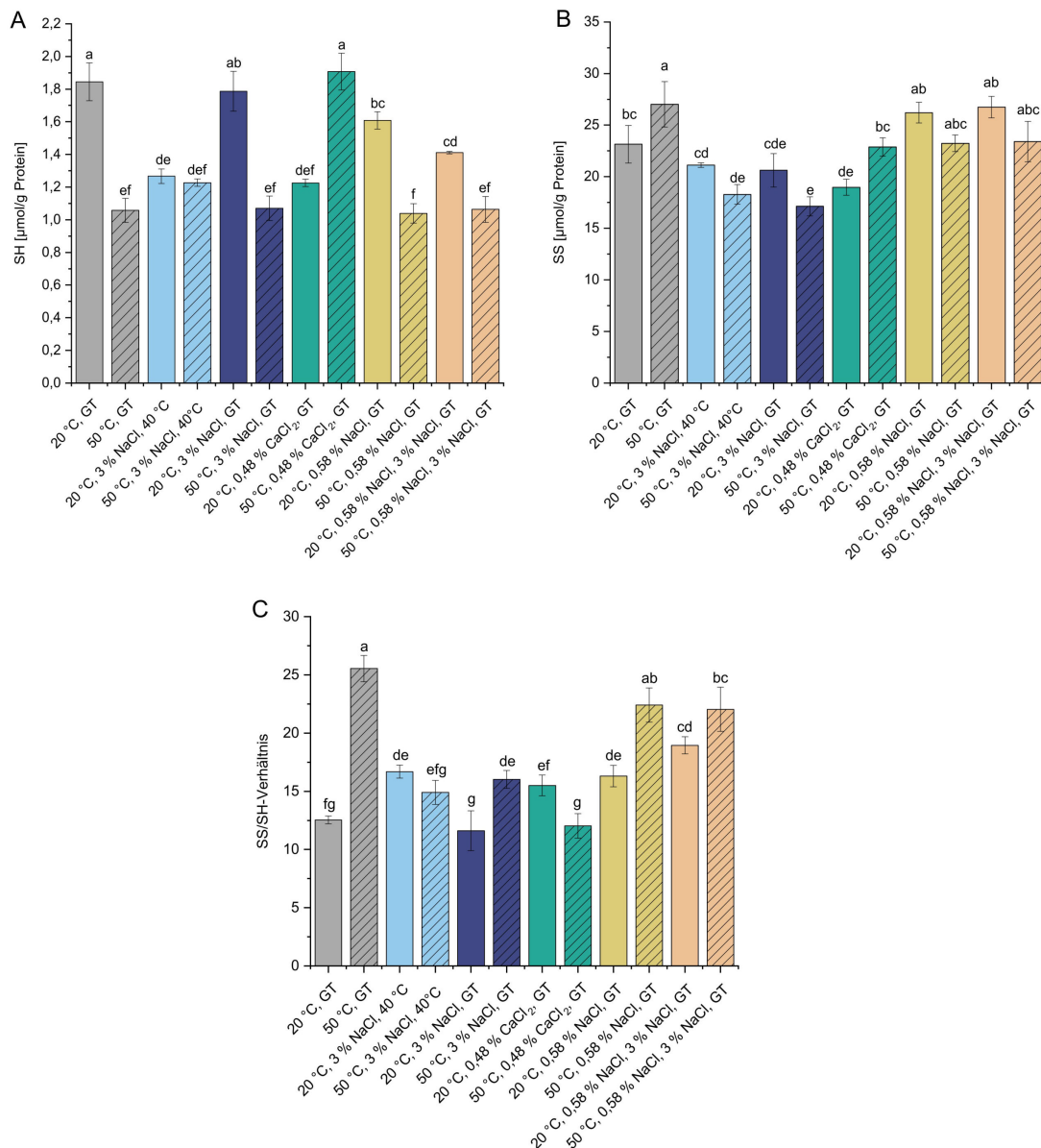


Abbildung 27: Gehalt an freien (SH) (A) und gebundenen (SS) (B) Thiolen und Verhältnis aus gebundenen und freien Thiolen (SS/SH) (C) in salzbehandelten Vitalkleberproben und Kontrollproben ohne Salz, getrocknet bei 40 °C oder gefriergetrocknet (GT). Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$) angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen den Vitalkleberproben sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet (ANOVA, Tukey's-Test, $p \leq 0,05$).

Der Gehalt der gebundenen Thiole betrug zwischen 17,13 $\mu\text{mol/g}$ Protein und 27,02 $\mu\text{mol/g}$ Protein und wurde neben der hohen Auswaschtemperatur auch durch die Salzzusätze erniedrigt. Keine der Behandlungen führte zu einer Zunahme an Disulfidbindungen. Die 50 °C-Kontrollprobe hatte einen signifikant höheren SS-Gehalt als die bei 20 °C gewaschene Kontrollprobe. Alle salzbehandelten, bei 50 °C gewaschenen Proben wiesen jedoch einen

niedrigeren SS-Gehalt als die entsprechende bei 20 °C ausgewaschene Probe auf. Daher ist von einem kombinierten Effekt aus Salzzusatz und Temperatur auszugehen. Während sich bei 20 °C Waschwassertemperatur nur die mit CaCl_2 versetzte Probe signifikant von der Kontrolle unterschied, nahmen bei 50 °C alle Proben signifikant niedrigere Werte an als die Kontrollprobe. Eine Ausnahme bildeten hier die Proben, bei denen NaCl im Waschwasser zudosiert wurde und sich nicht signifikant von der 50 °C-Kontrolle unterschieden.

Das Verhältnis aus freien und gebundenen Thiolen lag zwischen 11,62 und 25,54. Ein hohes SS/SH-Verhältnis weist auf einen hohen relativen Gehalt an gebundenen Thiolen in der Probe und damit auf ein stärker vernetztes Proteinnetzwerk hin. Bei keiner der korrespondierenden Proben war der Unterschied des Verhältnisses so stark ausgeprägt wie bei den Kontrollproben. Die Salzbehandlung schien daher eine Milderung des Temperatureffekts zu bewirken. Zwischen VK (50 °C, 3 % NaCl, 40 °C) und VK (50 °C, 3 % NaCl, GT) war ebenso wie im Gehalt der freien und gebundenen Thiole kein signifikanter Unterschied festzustellen. Es kann also angenommen werden, dass die Häufigkeit der Hitzebehandlung keine Rolle spielt, sobald sich die Glutenstruktur durch das erstmalige Einwirken von Hitze bereits nachhaltig verändert hat. Der Zeitpunkt der Hitzeeinwirkung scheint dabei unerheblich zu sein.

Um herauszuarbeiten, wie sich die unterschiedlichen Parameter der Milieu- und Nachbehandlung auf die Eigenschaften der Vitalkleber auswirkten, wurde eine PCA auf der Grundlage des rheologischen Verhaltens der Proben und ihrer Glutenproteinzusammensetzung durchgeführt. Die rheologischen Daten wurden von den an dieser Projektarbeit beteiligten Projektpartnern erhoben und werden im Folgenden nicht näher besprochen (Publikation in Vorbereitung, Rohdaten siehe Tabelle 41).

Die PCA setzte sich aus drei Hauptkomponenten zusammen, die insgesamt 81,4% der Datenvariation erklärten (siehe Abbildung 28). PC 1 machte dabei einen Anteil von 45,9% aus, PC 2 von 20,1 % und PC 3 erfasste 15,4% der Variation. PC 1 war unter anderem negativ mit den chemisch-analytischen Parametern des SDSL/GMP-Verhältnisses, dem Gehalt an α - und γ -Gliadinen sowie dem Gesamtgliadinegehalt assoziiert. Eine positive Assoziation erfolgte durch die Größen HMW-GS, HMW-GMP, den Gesamt-GMP-Gehalt und die Summe aus SDSL und GMP. PC 2 wurde im positiven Bereich in erster Linie durch den Rohproteingehalt und die Summe aus Gliadinen und Gluteninen dominiert. Der Parameter Feuchtigkeit wies eine geringe Ladung für PC 1, jedoch eine große negative Ladung für PC 2 auf. Im Score-Diagramm von PC 1 und PC 2 clusterten sich in der rechten unteren Ecke Proben, die mit NaCl nachbehandelt wurden und auf die eine Hitzeeinwirkung stattfand. Im Ladungsdiagramm wurde ersichtlich, dass sich diese Proben durch einen ähnlichen Feuchtigkeitsgehalt auszeichnen. Entlang PC 1 des Score-Diagramms waren die meisten Proben, die mit Hitze behandelt wurden näher an der 20 °C-Kontrollprobe, oder zumindest in Richtung der Position dieser Probe verschoben, als an der 50 °C-Kontrollprobe. VK (50 °C, 0,58 % NaCl, GT) befand sich besonders nah zur 20 °C-Kontrollprobe. Diese Beobachtung visualisiert den Eindruck der chemisch-analytischen Ergebnisse, der vermuten ließ, dass sich Hitzeeffekte in Vitalkleber zu einem gewissen Grad durch die Zugabe von Salzen ausgleichen lassen. Dabei zeigen die Proben VK (20 °C, 0,58 % NaCl, GT) und VK (20 °C, 3 % NaCl, GT) sowie VK (50 °C, 0,58 % NaCl, GT) und VK (50 °C, 3 % NaCl, GT) durch ihre jeweilige Aufspaltung entlang PC 2, dass der Zeitpunkt des Salzzusatzes Auswirkungen auf die Eigenschaften der Vitalkleber hat.

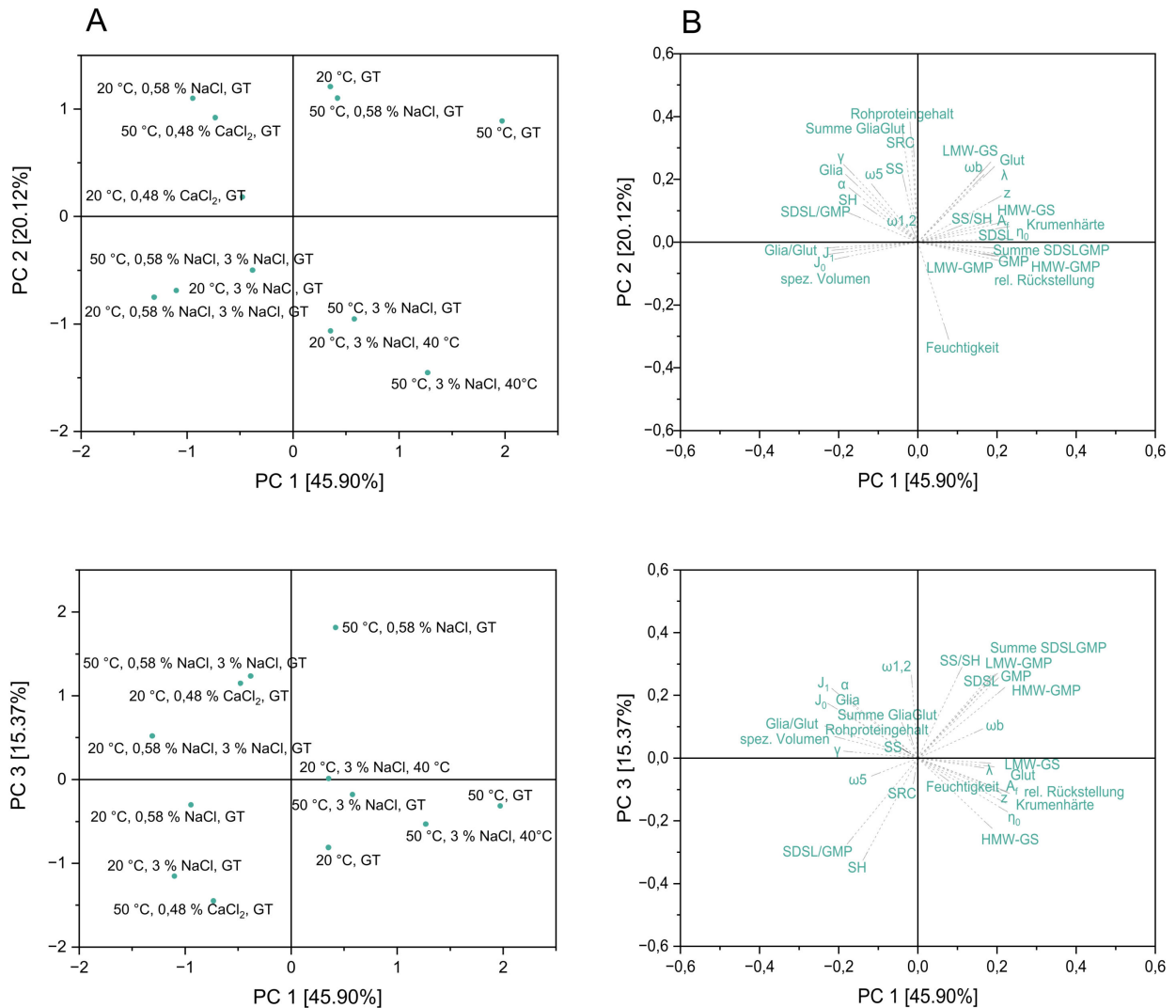


Abbildung 28: Score-Diagramm (A) und Ladungsdiagramm (B) der Hauptkomponentenanalyse (PCA) mit analytischen und rheologischen Parametern von salzbehandelten Vitalkleberproben und Kontrollproben ohne Salz, getrocknet bei 40 °C oder gefriergetrocknet (GT). Gehalt an freien (SH) und gebundenen (SS) Thiolen, Verhältnis aus gebundenen und freien Thiolen (SS/SH), Gehalt an Gliadinen (Glia) und Glutenproteintypen $\omega 5$ -, ωb -, $\omega 1,2$ -, α - und γ -Gliadine, Gehalt an Gluteninen (Glut), *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS) und *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS), Summe der Gliadine und Glutenine (Summe GliaGlut), Verhältnis aus Gliadinen und Gluteninen (Glia/Glut), Gehalt an SDS-löslichen Proteinen (SDSL), Gehalt an Gluteninmakropolymer (GMP), *Low-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (LMW-GMP) und *High-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (HMW-GMP), Summe der SDS-löslichen Proteine und des Gluteninmakropolymers (Summe SDSLGMP), Verhältnis der SDS-löslichen Proteine und des Gluteninmakropolymers (SDSL/GMP), Feuchtigkeit, Wasserbindungskapazität (SRC), Krumenhärte, Spezifisches Volumen (spez. Volumen) und rheologische Messwerte *Power law*-Parameter (A_f und z), elastische und viskoelastische Nachgiebigkeit (J_0 und J_1), Nullviskosität η_0 , Retardationszeit λ und relative Rückstellung (rel. Rückstellung) im Kriech-Erholungsversuch.

PC 3 war positiv bzw. negativ mit dem Gehalt an freien Thiolen, dem SS/SH-Verhältnis, dem Gehalt an SDSL und GMP und dem Verhältnis daraus assoziiert. Im Score-Diagramm von PC 1 und PC 3 war keine Clusterbildung von Proben zu erkennen. Proben, die im Score-Diagramm von PC 1 und PC 2 näher zusammen lagen, waren entlang PC 3 mehr aufgespalten. So waren beispielsweise die Proben VK (20 °C, 0,48 % CaCl_2 , GT) und VK (50 °C, 0,48 % CaCl_2 , GT) entlang PC 3 in größerer Distanz voneinander positioniert als entlang PC 2. In diesem Fall kann daraus abgeleitet werden, dass die Waschwassertemperatur Einfluss auf die Vitalklebereigenschaften nahm und sich in erster Linie auf den Gehalt der freien Thiole, das SDSL/GMP-Verhältnis, den Gliadin-gehalt, das Gliadin/Glutenin-Verhältnis und die rheologischen Parameter spezifisches Volumen und elastische und viskoelastische Nachgiebigkeit J_0 und J_1 auswirkte (rheologische Daten siehe Tabelle 41).

Die mit CaCl_2 behandelten Proben waren sowohl im Score-Diagramm von PC 1 und PC 2 als auch von PC 1 und PC 3 nicht nahe der mit NaCl versetzten Proben, die ansonsten die gleiche Behandlung erfahren hatten. Die Untersuchung der Glutenproteinzusammensetzung der Proben zeigte bereits, dass die Proben mit CaCl_2 häufig ein gegensätzliches oder abweichendes Verhalten im Vergleich zu den korrespondierenden NaCl-Proben aufwiesen. Trotz der unterschiedlichen Salzdosierung der beiden Salze, die einen Einfluss auf die Eigenschaften der Vitalkleber nehmen kann, ist diese Beobachtung auch ein Hinweis darauf, dass die Salze in unterschiedlicher Weise mit den Glutenproteinen interagieren, beispielsweise über die geladenen Aminosäureseitenketten der Proteine, mit dem Aminosäurerückgrat des Proteins und dessen Hydratationsschicht (Lo Nostro & Ninham, 2012; Okur et al., 2017; Xie & Gao, 2013). Allerdings umfasste das Probenset eine zu geringe Anzahl an Probenvariationen, um eine Aussage über einen systematischen Effekt der Salze treffen und die Veränderung der Eigenschaften der Vitalkleber auf die Wertigkeit der Salze oder deren chaotropen oder kosmotropen Charakter zurückführen zu können. Der erste Teil dieser Arbeit zeigte jedoch bereits, dass die Salze KCl, NaCl, MgCl_2 und CaCl_2 in niedriger und hoher Dosierung die Eigenschaften von nachbehandeltem Gluten nicht entsprechend einer Systematik, die der Hofmeisterreihe folgt, verändern.

3.7. Einfluss von Zusätzen auf die Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität verschiedener Mehlqualitäten und -sorten

Um den Einfluss der Mehlsorte und den kombinierten Effekt von Mehlsorte und Nachbehandlung auf Gluteneigenschaften einordnen zu können, wurden neben der industrieüblichen Sortenmischung (Standard) die sortenreinen Mehle Asory und RGT Reform mit der Weizenmehlqualität „A“ untersucht. Für die Backwarenherstellung wird in der Regel Brotweizen verwendet (B-Qualität), welcher etwas schlechtere Qualitätseigenschaften und einen in der Regel niedrigeren Proteingehalt aufweist (Bundessortenamt, 2022). In der industriellen Herstellung von Gluten werden üblicherweise keine sortenreinen Mehle verwendet, weshalb die vorangegangenen Versuche mit der industrieüblichen Sortenmischung durchgeführt wurden.

Diejenigen Zusätze, die bei Zugabe zu der industrieüblichen Weizenmehlmischung die größten Effekte zeigten, wurden in der jeweiligen Konzentration auch in den sortenreinen A-Mehlqualitäten Asory und RGT Reform getestet. Hierfür wurden 3,83 % KCl, 3,00 % NaCl, 2,44 % MgCl_2 , 0,48 % CaCl_2 , 1 % PS 20 und 200 mg/kg AS ausgewählt. Die jeweiligen Zusätze wurden in die Feuchtkleber der jeweiligen Mehle eingearbeitet und im Mikrozugversuch getestet (siehe Tabelle 42) oder bei 40 °C für 4 h getrocknet und anschließend bei 200 μm und 18 930 \times g zu Vitalkleber vermahlen. Die Vitalkleber wurden per Osborne-Fraktionierung, SDSL/GMP-Fraktionierung und mit dem Ellman-Assay auf deren Proteinzusammensetzung analysiert (siehe Tabellen 43 bis 49).

Der Vergleich der absoluten Werte über die verschiedenen Mehlsorten hinweg war nicht aussagekräftig, da sich die Kontrollproben ohne Zusatz zwischen den Mehlen bereits unterscheiden. Um eine Aussage über den Einfluss der Zusätze auf die Eigenschaften des Feucht- und Vitalklebers treffen zu können, wurde daher für alle gemessenen Parameter die prozentuale Abweichung von der jeweiligen Kontrolle berechnet. Auf diese Weise wurden die prozentualen Veränderungen auf die jeweilige Kontrolle normiert und der tatsächliche Effekt des Zusatzes bestimmt.

Für einige Zusätze konnte bei allen Mehlsorten ein ähnlicher Effekt beobachtet werden. Der Zusatz von 0,48 % CaCl_2 bewirkte für alle getesteten Mehle eine Zunahme des SS/SH- und des Gliadin/Glutenin-Verhältnisses sowie des $E_{\text{max}}/R_{\text{max}}$ -Verhältnisses durch einen verringerten Dehnwiderstand im Feuchtkleber. Daraus kann abgeleitet werden, dass 0,48 % CaCl_2 in allen Mehlen ein weiches, viskoseres Netzwerk verursachte. Die Erhöhung des SS/SH-Verhältnisses und die damit einhergehende stärkere Vernetzung der Proteine mag dieser Feststellung entgegenstehen. Die Zunahme des Gliadin/Glutenin-Verhältnisses und damit die relative Abnahme an Proteinen, die in der Lage sind intermolekulare Bindungen auszubilden, steht wiederum im Widerspruch zu diesem Ergebnis. Allerdings ergab die Korrelationsanalyse nur eine schwache, nicht signifikante Korrelation der Größen SS/SH-Verhältnis und Gliadin/Glutenin-Verhältnis (Spearman-Korrelation, $r_s = 0,41$, $p = 0,065$). Bei den Mehlen RGT Reform und Asory bewirkte der Zusatz von 0,48 % CaCl_2 eine Zunahme der Disulfidbrücken um mindestens 20 % im Vergleich zur Kontrolle, bei Asory betrug die Zunahme sogar 134 %. Die Zusätze 3,83 % KCl und 3,00 % NaCl konnten in den Mehlen RGT Reform bzw. Asory ebenfalls eine deutliche Erhöhung des SS-Gehaltes hervorrufen. Diese Beobachtung ist bemerkenswert, da im Standardmehl keiner der getesteten Zusätze in der Lage war, den Gehalt

an Disulfidbindungen zu erhöhen.

2,44 % MgCl_2 senkte in mindestens zwei Mehlen den Gehalt an freien Thiolen, steigerte die Dehnbarkeit im Mikrozugversuch und das Gliadin/Glutenin-Verhältnis. Der Zusatz von 1 % PS 20 zeigte im Mikrozugversuch die deutlichsten Effekte. Die Dehnbarkeit wurde bei allen drei Mehlen deutlich erhöht, während der Dehnwiderstand herabgesetzt wurde. Das E_{\max}/R_{\max} -Verhältnis stieg somit für alle Mehle um mindestens 68 % im Vergleich zur Kontrolle. 3,00 % NaCl und 200 mg/kg AS bewirkten vereinzelt für bestimmte Messgrößen und Mehle einen großen Effekt. So trug NaCl bzw. AS jeweils zur größten Zunahme an HMW-GMP im Standardmehl bzw. in Asory bei.

Die Zusätze bedingten zwar teilweise eine einheitliche Zu- oder Abnahme eines Messparameters bei allen Mehlen, jedoch meist in unterschiedlichen Ausprägungen. Für andere Messparameter und Zusätze konnte dagegen ein sehr individueller Effekt auf die einzelnen Vitalkleber festgestellt werden. Daher wurden die prozentualen Abweichungen von der Kontrolle im Weiteren für die Durchführung einer PCA genutzt. Dadurch wird der Einfluss der Behandlung der Proben und der Mehlsorte deutlicher und es können systematische Einflüsse der Zusätze und der Mehlsorte beurteilt werden, die durch einen bloßen Vergleich der einzelnen Messwerte nicht ersichtlich werden (siehe Abbildung 29).

In der PCA wurden alle Ergebnisse der chemisch-analytischen Untersuchungen der Vitalkleberproben berücksichtigt, das heißt alle Parameter, die im Rahmen der Rohproteinbestimmung, der Osborne-Fraktionierung, der SDSL/GMP-Fraktionierung und der Bestimmung der freien und gebundenen Thiole erhoben wurden, ebenso wie die Ergebnisse des Mikrozugversuchs mit Feuchtkleber.

72,6 % der Datenvarianz konnte durch drei Hauptkomponenten erklärt werden. PC 1 floss mit 34,6 % in die PCA ein, PC 2 mit knapp unter 20 %. Die Summe aus SDSL und GMP, die Summe der Glutenine mit den Unterfraktionen und die Summe aus Gliadinen und Gluteninen wiesen eine große positive Ladung für PC 1 auf. Das Verhältnis aus Gliadinen und Gluteninen sowie der Dehnwiderstand zeigten eine negative Ladung für PC 1. PC 2 war mit LMW-GMP, HMW-GMP und deren Summe positiv sowie mit dem Verhältnis aus diesen Parametern negativ assoziiert.

Eine Clusterung nach Mehlsorte ließ sich im Score-Diagramm vereinzelt erkennen. Die Proben der verschiedenen Mehle spalteten sich sowohl entlang PC 1 als auch PC 2 auf. Die Proben, die mit 1 % PS 20 und 200 mg/kg AS behandelt wurden, sammelten sich in der rechten unteren Ecke des Score-Diagramms. Beide Zusätze schienen demzufolge ähnliche, vom Ausgangsmaterial unabhängige Effekte zu verursachen. Das Score-Diagramm visualisierte den Eindruck, der bei Vergleich der prozentualen Abweichungen der Messparameter im Vergleich zur Kontrolle entstand und darin bestand, dass das Standardmehl und RGT Reform häufig ähnliche Änderungen des Messparameter aufwiesen. Die meisten Proben des Standardmehls und RGT Reform befanden sich im Score-Diagramm nah beieinander, wohingegen Asory-Proben etwas distanzierter davon positioniert waren.

PC 3 ging mit 18,0 % jeweils zu fast gleichen Anteilen in die PCA ein wie PC 2. Eine Clusterbildung von AS- und PS 20-behandelten Proben konnte auch in diesem Score-Diagramm im rechten unteren Bereich festgestellt werden. Viele der RGT Reform- und Standardmehlproben lagen vor allem entlang PC 1 nah beisammen. Jedoch waren diese Proben insgesamt etwas

weiter gestreut, sodass die Asory-Proben weniger Abstand zu den anderen beiden Mehlen aufwiesen.

Die Gruppe der Salze sowie AS und PS 20 bewirkten bei allen drei Mehlen deutliche Effekte, da Proben mit diesen Zusätzen entlang PC 1 jeweils am weitesten entfernt voneinander lagen. 3,00 % NaCl bzw. 2,44 % MgCl_2 und PS 20 trugen zur größten Aufspaltung entlang PC 2 und PC 3 bei.

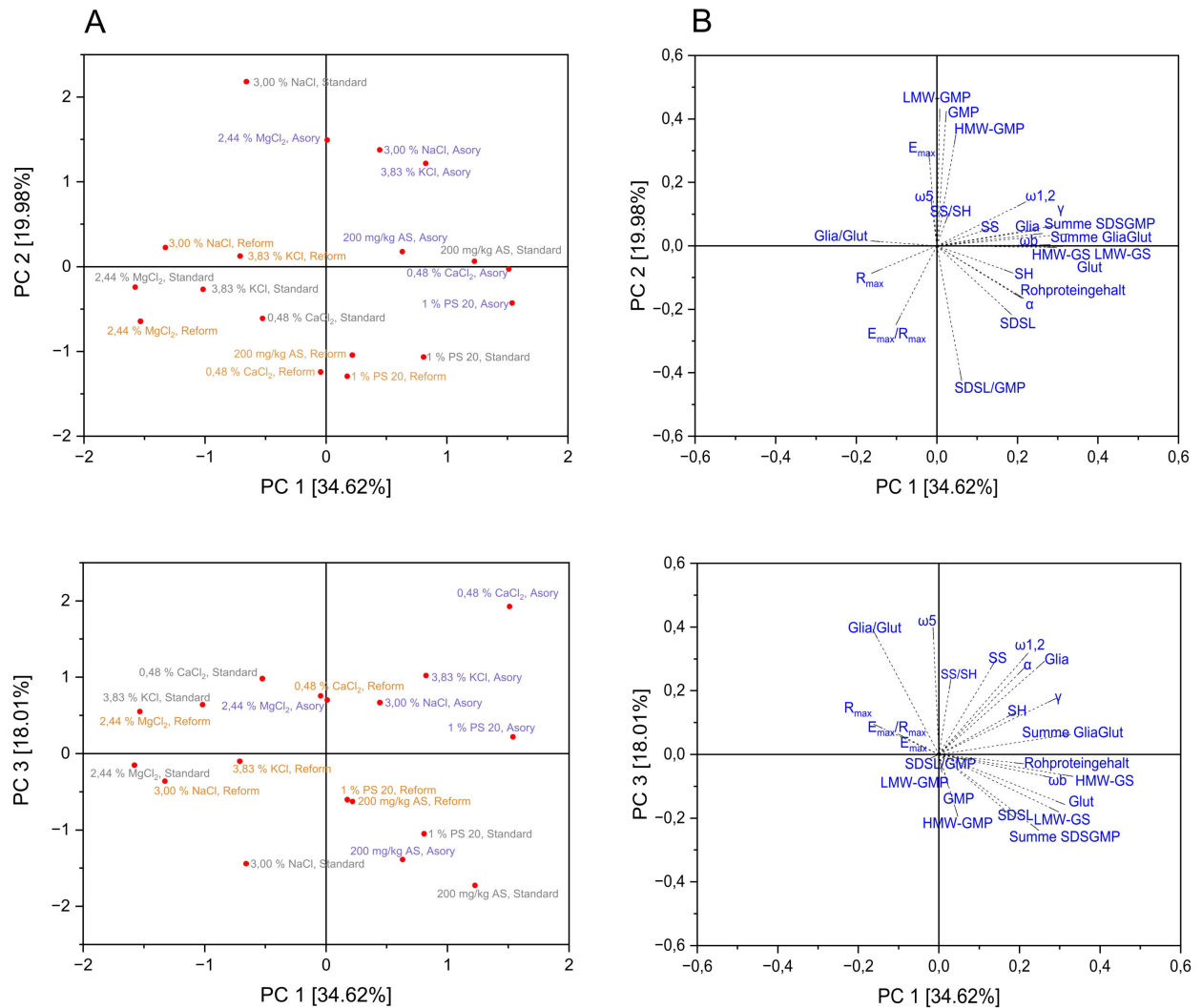


Abbildung 29: Score-Diagramm (A) und Ladungsdiagramm (B) der Hauptkomponentenanalyse (PCA) mit analytischen und rheologischen Parametern von salzbehandelten Vitalkleberproben und Kontrollprobe ohne Salz aus verschiedenen Mehlsqualitäten und -sorten, getrocknet bei 40 °C. Gehalt an freien (SH) und gebundenen (SS) Thiolen, Verhältnis aus gebundenen und freien Thiolen (SS/SH), Gehalt an Gliadinen (Glia) und Glutenproteintypen ω 5-, ω b-, ω 1,2-, α - und γ -Gliadine, Gehalt an Gluteninen (Glut), Low-Molecular-Weight Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS) und High-Molecular-Weight Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS), Summe der Gliadine und Glutenine (Summe GliaGlut), Verhältnis aus Gliadinen und Gluteninen (Glia/Glut), Gehalt an SDS-löslichen Proteinen (SDSL), Gehalt an Gluteninmakropolymer (GMP), Low-Molecular-Weight Gluteninmakropolymer (LMW-GMP) und High-Molecular-Weight Gluteninmakropolymer (HMW-GMP), Summe der SDS-löslichen Proteine und des Gluteninmakropolymers (Summe SDSL/GMP).

Das Ladungsdiagramm der beiden PCAs zeigte, dass der Zusatz an PS 20 und AS vor allem Einfluss auf die Glutenine nahm, mitsamt den inbegriffenen Unterfraktionen, die Summe aus Gliadinen und Gluteninen sowie die Summe und das Verhältnis aus SDSL und GMP. Die Salze dagegen bewirkten in erster Linie Veränderungen im Gehalt von LMW-GMP und HMW-GMP und der Summe aus beiden, im Verhältnis von Gliadinen und Gluteninen, sowie in der Dehnbarkeit, dem Dehnwiderstand und dem entsprechenden Verhältnis. Das Ladungsdiagramm von PC 1 und PC 3 zeigte außerdem, dass sich die salzbehandelten Asoryproben durch ihren Gehalt an freien und gebundenen Thiolen von den anderen Proben abhoben.

Der Vergleich beider Score-Diagramme mit insgesamt 3 Hauptkomponenten zeigte, dass KCl und NaCl im Gluten der Mehle RGT Reform und Asory jeweils ähnliche Eigenschaften hervorriefen. Im Standardmehl erzeugte der Zusatz von NaCl und KCl dagegen unterschiedliche Gluteneigenschaften, was durch eine deutlichere Streuung der Proben in den PCAs erkennbar war.

Um eine Aussage treffen zu können, welcher Zusatz allgemein die größten Effekte hervorrief, ob positiv oder negativ, wurde zusätzlich eine Übersicht erstellt, die die Anzahl der durch den Zusatz verursachten Effekte zusammenstellt (siehe Tabelle 8 und Tabelle 50). Als Effekt wurden hierbei alle Änderungen im Vergleich zur Kontrolle berücksichtigt, die $\pm 20\%$ betrugen. Für jedes Mehl konnte so eine Reihenfolge der Zusätze aufgestellt werden, die die Eigenschaften der Vital- und Feuchtkleber am meisten beeinflussten. Für RGT Reform und das Standardmehl war diese Anordnung bis auf den Zusatz NaCl und CaCl_2 gleich, die Anordnung für Asory entsprach bis auf die Einordnung von AS genau der entgegengesetzten Reihenfolge des Standardmehls. Werden alle Effekte der Mehle zusammengenommen, lautet die Anordnung wie folgt: $0,48\% \text{CaCl}_2 > 2,44\% \text{MgCl}_2 > 3,83\% \text{KCl} = 1\% \text{PS 20} > 3,00\% \text{NaCl} > 200 \text{ mg/kg AS}$. Die divalenten Salze verursachten demnach in den Mehlen am häufigsten Änderungen von Eigenschaften gegenüber der Kontrolle, die 20% überschritten. Die standardmäßig in der Backwarenindustrie eingesetzten Zusätze NaCl und AS zeigten dagegen seltener deutliche Abweichungen von der Kontrollprobe ohne Zusatz.

Tabelle 8: Anzahl der durch verschiedene Zusätze erzielten Effekte ($\pm 20\%$) für verschiedene chemisch-analytische und rheologische Messparameter in der industrieüblichen Mehlmischung Standard und den sortenreinen Mehlen RGT Reform und Asory und Aufreihung der Zusätze entsprechend der Anzahl der verursachten Effekte.

Mehl \ Zusatz	3,83 % KCl	3,00 % NaCl	2,44 % MgCl_2	0,48 % CaCl_2	1,00 % PS 20	200 mg/kg AS
Standard	5	7	7	6	7	4
	1 % PS 20 = 3,00 % NaCl = 2,44 % $\text{MgCl}_2 > 0,48\% \text{CaCl}_2 > 3,83\% \text{KCl} > 200 \text{ mg/kg AS}$					
RGT Reform	5	4	7	8	7	4
	$0,48\% \text{CaCl}_2 > 1\% \text{PS 20} = 2,44\% \text{MgCl}_2 > 3,83\% \text{KCl} > 3,00\% \text{NaCl} = 200 \text{ mg/kg AS}$					
Asory	11	7	8	10	5	1
	$3,83\% \text{KCl} > 0,48\% \text{CaCl}_2 > 2,44\% \text{MgCl}_2 > 3,00\% \text{NaCl} > 1\% \text{PS 20} > 200 \text{ mg/kg AS}$					
Gesamtzahl Effekte	21	18	22	24	19	9

Es lässt sich also festhalten, dass je nach Betrachtung der Messgröße ein deutlicher Einfluss des Rohstoffs, aber auch der Zusätze unabhängig von der Mehlsorte festgestellt werden kann. Die Salze verursachten häufig ähnliche Effekte in unterschiedlichen Ausprägungen, eine Einordnung entsprechend der Hofmeisterreihe war jedoch nicht möglich. Auf die Mehlsorte Asory nahmen die meisten Zusätze den deutlichsten Einfluss und bewirkten teils auch gegenteilige Effekte im Vergleich zu den anderen Mehlsorten. Wie die Zusätze in den Glutenproben die Endprodukteigenschaften im Anwendungsfall verändern würden, kann über die angestellten Datenauswertungen dennoch nicht sicher eingeschätzt werden, denn einige Messgrößen könnten sich gegenseitig aufheben oder verstärken. Eine sichere Einordnung der Eigenschaften kann daher nur durch Anwendungstests wie z.B. Backversuche vorgenommen werden. Im Rahmen einer Masterarbeit wurde Gluten des Standardmehls, das mit den Zusätzen KCl, NaCl, MgCl_2 und PS 20 nachbehandelt wurde, in Mikrobackversuchen mit verschiedenen Rezepten getestet. Die Backversuche bestätigten, dass KCl und NaCl ähnliche Backeigenschaften hervorrufen und sich die Zusätze MgCl_2 und PS 20 stärker voneinander unterscheiden. PS 20 erhöhte das spezifische Volumen von Broten und verringerte die Krumenhärte, während MgCl_2 den gegenteiligen Effekt bewirkte (Geist, 2023).

Für das abweichende Verhalten der Mehlsorte Asory gegenüber RGT Reform und dem Standardmehl können unterschiedliche Erklärungen angeführt werden.

Um die drei verwendeten Mehle bezüglich ihrer grundlegenden Eigenschaften besser einschätzen und die Mehlmischung unbekannter Sorten einordnen zu können, kann die beschreibende Sortenliste des Bundessortenamtes herangezogen werden. Die Sortenliste wird jährlich herausgegeben und liefert eine objektive Beschreibung der zugelassenen und auf dem Markt verfügbaren Getreidesorten hinsichtlich ihrer Anbau-, Resistenz-, Qualitäts- und Ertrageigenschaften. Die Kommission „Backqualität“ ist beauftragt deutsche Weizensorten bezüglich ihrer Mahl- und Backeigenschaften zu charakterisieren. Die Sorten werden anhand der Eigenschaften bestimmter Bezugssorten eingeordnet. Die Bewertung erfolgt daher nicht durch absolute Werte, sondern durch Einordnung auf einer Skala von 1 bis 9. Asory und RGT Reform sind Weizensorten der A-Qualität und waren im Erntejahr 2021 der in der Studie verwendeten Mehle mit 3455 ha und 3433 ha die zwei meist angebauten Weichweizensorten in Deutschland. Qualitätsweizen muss bestimmte Mindestanforderungen erfüllen, darunter eine hohe Wasseraufnahmefähigkeit, eine gute Elastizität des Teigs und eine hohe Volumenausbeute (Bundessortenamt, 2022). Die in dieser Studie bestimmte Wasseraufnahmefähigkeit von Asory hob sich mit 65,8 % deutlich von der der anderen Mehle mit 61,6 % (RGT Reform) bzw. 59,9 % (Standard) ab (siehe Tabelle 10). Damit stimmen die Werte mit der Einordnung der beschreibenden Sortenliste überein, die die Wasseraufnahmefähigkeit für Asory als 6 und die von RGT Reform als 3 einordnete (Bundessortenamt, 2022). Meistens zeichnet sich Qualitätsweizen auch durch einen hohen Proteingehalt aus. Der in der vorliegenden Studie per Dumas gemessene Proteingehalt von Asory betrug 9,5 %, 10,3 % bei RGT Reform und der Proteingehalt des Standardmehls lag bei 10,8 % und war demnach am höchsten. Mit einer Bewertung von „4“ durch die beschreibende Sortenliste wiesen Asory und RGT Reform einen mittleren Proteingehalt auf (Bundessortenamt, 2022).

Der Proteingehalt der Mehle sollte nach Isolation des Feuchtklebers allerdings nur noch eine geringe Rolle spielen, da alle Vitalkleber-Proben ähnliche Proteingehalte aufwiesen (siehe Tabelle 43). Je nach Proteinzusammensetzung wäre es allerdings möglich, dass unterschiedli-

che Zusätze auf bestimmte Proteinfractionen verschieden starke Auswirkungen haben. Die per Osborne- und SDSL/GMP-Fraktionierung bestimmten Glutenproteintypen der Mehle unterschieden sich aber kaum (siehe Tabelle 51). Jedoch zeigten die Feucht- und Vitalkleberproben der Mehle ohne Zusatz Unterschiede in ihren rheologischen Eigenschaften und der Glutenprotein-zusammensetzung (siehe Tabellen 42, 43, 44, 46 und 48). Allerdings wiesen das Standardmehl und Asory eine ähnlichere Glutenproteinzusammensetzung auf als RGT Reform, obwohl die PCA eine größere Ähnlichkeit der mit Zusatz behandelten Proben zwischen dem Standardmehl und RGT Reform zeigte. Es ist daher denkbar, dass neben der Proteinzusammensetzung der Mehle und dem daraus gewonnenen Gluten der Anteil der Nebenbestandteile wie Stärke oder Lipide einen Unterschied in der Zusammensetzung der Feucht- und Vitalkleberproben und der Wirkung der Zusätze verursacht (Chen et al., 2018).

3.8. Herausforderungen und Perspektiven bei der funktionellen und chemisch-analytischen Charakterisierung von Gluten

Die Untersuchungen der vorliegenden Studie zeigen, dass die Salze KCl, NaCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, der Emulgator PS 20 und AS die Eigenschaften eines bereits ausgebildeten Glutennetzwerks auf vielfältige Weise und in unterschiedlichen Ausprägungen beeinflussen können. Allerdings sind Aussagen über systematische Einflüsse der Zusätze auf die Glutenproteine erschwert. Dies hat mehrere Gründe.

Die Gültigkeit der Hofmeisterreihe wurde in salzbehandeltem Teig bereits in mehreren Studien untersucht und bestätigt (Kinsella & Hale, 1984; Melnyk et al., 2011; Tuhumury et al., 2016a; Tuhumury et al., 2016b; Wellner et al., 2003). In der Nachbehandlung von Gluten konnte für die meisten Messparameter, die die Glutenproteinzusammensetzung oder -funktionalität sowie Sekundärstruktur maßgeblich beeinflussen, wie der Gliadin- und Gluteningehalt, der HMW-GMP-Gehalt oder der Gehalt an Disulfidbindungen, die Systematik der Hofmeisterreihe jedoch nicht nachvollzogen werden. Einzelne Messergebnisse folgten zwar der Logik der Hofmeisterreihe, eine Korrelation zu weiteren, verwandten Messgrößen und damit die Ableitung eines systematischen Einflusses blieben allerdings aus. Häufiger konnten ähnliche Eigenschaften der Feucht- oder Vitalkleberproben dagegen der Wertigkeit der Salze bzw. deren kosmotropem oder chaotropem Charakter zugeordnet werden. Ob die beobachteten vergleichbaren Eigenschaften der Wertigkeit der Salze oder dem chaotropen bzw. kosmotropen Verhalten der Salze zuzuschreiben sind, und ob diese Definitionen überhaupt getrennt werden können, konnte allerdings nicht festgestellt werden, da die Einordnung der Salze entsprechend der Hofmeisterreihe mit der Wertigkeit der Salze zusammenfällt.

Für eine systematische Aufklärung der Anionenreihe der Hofmeisterreihe, wurde im Rahmen einer Masterarbeit eine größere Anzahl von Natriumsalzen mit verschiedenen Wertigkeiten und Positionierungen in der Hofmeisterreihe in der Nachbehandlung von Feuchtkleber getestet. Diese Untersuchung ergab, dass eine Unterteilung der Salze in kosmotrope und chaotrope Anionen möglich ist. Die Anionen innerhalb dieser Gruppen folgten jedoch ebenfalls keiner festen Systematik bezüglich rheologischer Eigenschaften und der Glutenproteinzusammensetzung (Bahlo, 2023).

Dazu muss bedacht werden, dass die Hofmeisterreihe ursprünglich für die Wirkung von Salzen auf ein Gemisch aus Eiklar und Wasser aufgestellt wurde (Kunz et al., 2004). Da Gluten aus nicht-wasserlöslichen Proteinen besteht, kann grundsätzlich hinterfragt werden, ob die Hofmeisterreihe in ihrer herkömmlichen Form auf die Glutenmatrix übertragbar ist. Dazu kommt, dass die Anordnung von Salzen in der Hofmeisterreihe auf der synergistischen Wirkung von Salzen beruht und nicht auf dem individuellen Effekt von Ionen. Da das Anion und Kation eines Salzes jeweils separat mit verschiedenen Aminosäuren eines Makromoleküls wechselwirken kann, spielt somit auch das betrachtete biologische System eine entscheidende Rolle. Daher wurden bereits abgewandelte Formen der Hofmeisterreihe in Betracht gezogen, die beispielsweise einer Glockenform gleichen (Kunz, 2010). Durch die Variation des Kations bei gleich bleibendem Anion und der Vereinheitlichung der in der Glutenmatrix präsenten Ladungen in dieser Studie, konnte sowohl der synergistische Effekt beider Ionen als auch der individuelle Effekt des Kations beurteilt werden.

Dass die Matrix einen ausschlaggebenden Effekt auf die Wirkung der Salze hat, zeigte sich in einer an diese Studie angrenzenden Masterarbeit, in der mit KCl, NaCl, $MgCl_2$ und anderen Salzen nachbehandeltes Gluten in Mikrobackversuchen mit unterschiedlichen Rezepten getestet wurde. In dieser Studie folgten die getesteten Salze bezogen auf das spezifische Backvolumen und die Krumenhärte der Einordnung der Hofmeisterreihe. Die behandelten Vitalkleberproben folgten dieser Tendenz auch in Produkten, die auf einem Rezept auf Basis von Stärke, Glucose, Hefe und Wasser basierten, was zeigt, dass Stärke einen großen Effekt auf die Wechselwirkung von Glutenproteinen hat (Geist, 2023).

Neben den im Labormaßstab produzierten, in dieser Studie untersuchten Vitalklebern wurden zusätzlich zwei industriell hergestellte Vitalkleber chemisch-analytisch charakterisiert, die auf Grundlage von Backversuchen als Vitalkleber guter bzw. schlechter Qualität klassifiziert wurden. Die Ergebnisse der analytischen Bestimmung der Vitalkleber ließen nicht auf die Einordnung der Backeigenschaften schließen. So unterschieden sich die Vitalkleber guter und schlechter Qualität nicht im SS/SH-Verhältnis voneinander und das extrem hohe SDSL/GMP-Verhältnis des „guten“ Vitalklebers von 9,15 kam durch einen im Vergleich zu den anderen Proben sehr geringen GMP-Gehalt zustande, der eigentlich für eine schlechte Backeignung spricht (Daten der industriellen Vitalkleber in Tabelle 52).

Untersuchungen einer Vielzahl von auf dem Markt verfügbaren, industriell hergestellten Vitalklebern zeigten, dass oft zur Bewertung der Backqualität genutzte Parameter wie das Gliadin/Glutenin-Verhältnis nicht zur Vorhersage der Vitalklebergüte geeignet sind. So zeigten im Umfang der Studien analysierte Vitalkleber mit einem eher geringen Gliadin/Glutenin-Verhältnis von 1,5 und 1,7 die höchsten spezifischen Volumina im Backversuch (Schopf & Scherf, 2020). Das SDSL/GMP-Verhältnis der Industrie-Vitalkleber verfügte über eine weite Bandbreite von 4,8–21,6 (Schopf et al., 2021). Es konnte im Gegensatz zu der weit verbreiteten Annahme, dass der GMP-Gehalt mit dem Backvolumen korreliert, keine Korrelation ($p = 0,49$) zwischen dem GMP-Gehalt der Vitalkleber und dem spezifischen Volumen festgestellt werden (Schopf & Scherf, 2020; Schopf et al., 2021). Zwischen dem Gehalt an freien und gebundenen Thiolen und dem spezifischen Brotvolumen konnte ebenfalls keine Korrelation beobachtet werden (Schopf & Scherf, 2021). Dies wirft die weitergehende Frage auf, welche Größenordnung bestimmter Parameter eine gute oder schlechte Glutenqualität auszeichnen.

Eine weitere Schwierigkeit in der Bewertung der Vitalkleberproben besteht somit in der Schlussfolgerung von einzelnen analytischen Ergebnissen auf eine pauschale Aussage zur Glutenproteinzusammensetzung oder -funktionalität. Bei den in dieser Studie untersuchten Proben konnte ebenso keine oder nur eine schwache Korrelationen zwischen Messgrößen festgestellt werden, die theoretisch miteinander korrelieren sollten, wie der SS- und GMP-Gehalt.

Diese Tatsachen erschweren die durch Zusätze hervorgerufenen Veränderungen der Gluteneigenschaften als positiv oder negativ zu bewerten. Um die in der vorliegenden Studie analysierten Vitalkleber beispielsweise hinsichtlich ihrer Endproduktqualität wie Backeigenschaften bewerten zu können, muss daher auf die Durchführung von Backversuchen zurückgegriffen werden oder ein für Vitalkleber etabliertes Scoring-System genutzt werden, das lediglich die Ausführung des weniger zeitaufwändigen Glutenaggregationstests und Mikrozugversuchs erfordert (Schopf & Scherf, 2020). Die Anzahl der Publikationen, die sich ausschließlich auf die Glutenstruktur- und

-funktionalität beziehen, ist im Gegensatz zu Veröffentlichungen, die Teigeigenschaften untersuchen, gering. Die vorliegende Studie ist die erste, die sich systematisch mit der Nachbehandlung von Gluten befasste und in einer weiterführenden Studie die Endprodukteigenschaften der nachbehandelten Glutenproben untersuchte (Geist, 2023). Bei Fortführung der Forschung auf diesem Gebiet ist davon auszugehen, dass sich Methoden zur schnellen, einfachen Bewertung der Glutenfunktionalität etablieren und weiterentwickeln.

Die Schwierigkeit eine absolute Aussage über die Beeinflussung der Gluteneigenschaften durch die zugesetzten Zusätze zu treffen liegt nicht zuletzt in der Natur der Glutenproteine selbst begründet. Die Struktur und Interaktionen von Glutenproteinen basieren auf einem Gleichgewicht aus kovalenten, hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen. Die Protein-Protein-Interaktionen sind dynamisch und daher bei Beanspruchung permanenten Veränderungen unterlegen. Zusätzlich unterscheidet sich die Ausprägung der Interaktionen zwischen den Glutenproteintypen (Shewry & Belton, 2024). Die Protein-Protein- und Protein-Zusatz-Interaktionen werden weiter beeinflusst durch Restbestandteile des Rohstoffs Mehl wie Lipide, Stärke und Nicht-Stärke-Polysaccharide (Schofield et al., 1983). Das grundsätzliche Verständnis und die Aufklärung der Vorgänge zwischen Glutenproteinen und Zusätzen auf molekularer Ebene stellt daher eine komplexe Herausforderung dar, derer sich durch die in dieser Studie durchgeführte, chemisch-analytische Herangehensweise in Kombination mit rheologischen Versuchen in Reinform angenähert werden konnte.

4. Fazit und Ausblick

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Studie war, ob ein in Teig vollständig ausgebildetes, bereits isoliertes Glutennetzwerk durch Zusätze nachträglich verändert werden kann. Zu diesem Zweck wurde ein Workflow für die Herstellung von Feucht- und Vitalkleberproben etabliert, der die Steuerung der Nachbehandlungs-, Trocknungs- und Vermahlungsbedingungen erlaubte.

Die durch die Zusätze hervorgerufenen Veränderungen der Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität sowie Sekundärstruktur wurden durch rheologische und chemisch-analytische Versuche beurteilt. Durch oszillationsrheologische Messungen und die Durchführung des Mikrozugversuchs konnte die Veränderung der Glutenfunktionalität durch Zusätze bestätigt werden. Die Quantifizierung der Glutenproteintypen per Osborne- und SDSL/GMP-Fraktionierung, die Bestimmung des Gehalts der freien und gebundenen Thiole per Ellman-Assay und die Ermittlung der Sekundärstruktur über Raman-Spektroskopie sowie Proteomics-Untersuchungen per LC-MS/MS zeigten, dass die Zusätze in unterschiedlichem Ausmaß zur Beeinflussung der Glutenproteinzusammensetzung der Vitalkleber beitrugen.

Die verschiedenen Proben und Messparameter konnten hinsichtlich des zugegebenen Zusatzes, dessen Konzentration und der Trocknungstemperatur bewertet und untereinander verglichen werden, wodurch Trends zum Einfluss dieser Parameter herausgearbeitet werden konnten.

Der LVE-Bereich erhöhte sich am stärksten durch die divalenten Salze. Die Summe des Speicher- und Verlustmoduls nahm durch PS 20, AS und die monovalenten Salze am meisten zu, die Summe des Verlustfaktors stieg durch alle Salze, insbesondere der hohen Konzentration am meisten an. Der Dehnwiderstand erhöhte sich durch die monovalenten Salze, insbesondere in hoher Konzentration, stärker als durch andere Zusätze, ebenso wie die Dehnbarkeit. Auf die Dehnbarkeit hatte AS als einziger Zusatz einen stark negativen Effekt.

Die niedrige Salzdosierung und darunter die divalenten Salze trugen am meisten zur Erhöhung der Extrahierbarkeit der Gliadine bei. Die geringe Salzkonzentration senkte die Extrahierbarkeit der Glutenine zudem weniger stark als die hohe Salzkonzentration. Damit trug die niedrige Salzkonzentration zu einem geringen Abfall des Gliadin/Glutenin-Verhältnisses oder einer leichten Erhöhung bei. Die hohe Salzkonzentration führte zu einem geringen Anstieg des Gliadiningehalts und zur deutlichsten Abnahme des Gluteningehalts. Somit führte die hohe Salzdosierung zu einer stärkeren Reduzierung der Gesamtproteinextrahierbarkeit. PS 20 und AS führten zu keiner Abnahme des Gluteningehalts, sondern sogar zu einer Zunahme bei 40 °C Trocknungstemperatur, wodurch das Gliadin/Glutenin-Verhältnis nicht oder leicht negativ beeinflusst wurde. PS 20 und AS erhöhten im Gegensatz zu den Salzen damit die Extrahierbarkeit der Proteine.

Auf den SDSL-Gehalt hatte die höhere Salzkonzentration einen verringernden Effekt, wenn auch der Einfluss der Salzkonzentration nicht so stark abgegrenzt werden konnte wie bei der Osborne-Fraktionierung. Im SDSL-Gehalt machte sich mehr der Temperatureffekt bemerkbar, da der Gehalt durch 40 °C Trocknungstemperatur stärker verringert wurde. Beim GMP-Gehalt wirkte sich die hohe Salzkonzentration unabhängig von der Temperatur am stärksten auf die Reduzierung aus. Alle Salze verringerten demnach die Gesamtproteinextrahierbarkeit in der Osborne- und SDSL/GMP-Fraktionierung und die höhere Dosierung der Salze hatte hierbei jeweils einen stärkeren Effekt.

Die SDSL-Extrahierbarkeit wurde durch PS 20 und AS positiv beeinflusst, insbesondere bei 80 °C Trocknungstemperatur, wodurch die Gesamtextrahierbarkeit der SDSL- und GMP-Fraktion gegenüber der Kontrolle gesteigert wurde. Die Auswirkungen auf das Glutennetzwerk waren je nach Konzentration temperaturabhängig.

Der Gehalt der freien und gebundenen Thiole wurde durch alle Zusätze erniedrigt, am deutlichsten jedoch durch die hohe Salzkonzentration. Im SS/SH-Verhältnis fiel zudem eine stärkere Zunahme durch die divalenten Salze auf. Am geringsten fiel der Verlust an freien Thiolen für PS 20 und AS bei 80 °C Trocknungstemperatur aus. Beim SS-Gehalt konnte kein eindeutiger Trend bezüglich der Zusätze oder Trocknungstemperatur festgestellt werden, was sich im SS/SH-Verhältnis widerspiegelte.

Insgesamt lassen sich durch den Vergleich der prozentualen Abweichungen der Messparameter von der jeweiligen Kontrolle folgende Feststellungen treffen:

1. Die hohe Salzkonzentration bewirkte meist einen stärkeren Effekt auf die Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität als die niedrige Salzdosierung.
2. Die monovalenten, kosmotropen Kationen K^+ und Na^+ sowie die divalenten, chaotropen Kationen Mg^{2+} und Ca^{2+} zeigten jeweils häufig ähnliche Trends. Die durch die Salze beobachteten Veränderungen konnten allerdings nicht der Systematik der Hofmeisterreihe zugeordnet werden.
3. Die beobachteten Trends wurden bei den Salzproben selten durch die Trocknungstemperatur der Proben bestimmt.
4. Die mit PS 20 und AS behandelten Proben zeigten meist ein grundsätzlich anderes Verhalten im Vergleich zu den Salzproben.
5. Die Ähnlichkeiten zwischen Proben mit PS 20 und AS wurden seltener durch die Konzentration der Zusätze, sondern durch die Trocknungstemperatur bestimmt.

Im relativen Vergleich mit der Kontrolle veränderten die Zusätze PS 20 und AS die Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität der Glutenproben zwar, allerdings in einem deutlich geringeren Umfang als die Salze. Die Salze schienen außerdem einen stärkeren individuellen Effekt auf die Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität als PS 20 und AS auszuüben, da bei den salzbehandelten Proben die Temperatur nicht der bestimmende Faktor für die Gluteneigenschaften war.

Die grundsätzlichen Unterschiede der Zusätze Salz, PS 20 und AS lassen sich vermutlich auf grundlegend andere Mechanismen der Wechselwirkungen zwischen Protein und Zusatz zurückführen. Die Ionen der Salze wechselwirken mit verschiedenen Aminosäuren der Glutenproteine, während bei PS 20 eine verminderte Proteinaggregation durch Protein-Emulgator-Interaktionen vermutet werden kann. Der Zusatz von AS in einem Nachbehandlungsschritt lässt mutmaßlich deren reduzierende Wirkung zu Tragen kommen, da der Mechanismus, der Ascorbinsäure in das korrespondierende Oxidans Dehydroascorbinsäure umwandelt, durch die im Waschschrift extrahierte Ascorbat-Oxidase unterbunden wurde.

Die Salze förderten die Gliadinextrahierbarkeit, jedoch beeinflussten sie insbesondere die Glutinin- und GMP-Extrahierbarkeit negativ, wodurch der Gesamtgehalt der extrahierbaren Proteine

herabgesetzt wurde. Deshalb kann die Vermutung angestellt werden, dass durch Salz induzierte kovalente Nicht-SS-Bindungen wie Isopeptidbindungen oder Lanthionin gebildet wurden. Der Verlust der Extrahierbarkeit kann nicht auf die Bildung von Disulfidbrücken zurückgeführt werden, da sich der Gehalt der gebundenen Thiole durch die Salzbehandlung nicht erhöhte und Disulfidbindungen überdies unter reduzierenden Bindungen reversibel sind.

Die massenspektrometrischen Analysen zeigten, dass das divalente Salz CaCl_2 eine größere Abweichung der intensitätsstärksten Proteingruppen von der Kontrollprobe zeigte als NaCl . Dies deutet darauf hin, dass CaCl_2 in der Nachbehandlung einen größeren Einfluss auf die Interaktion der Glutenproteine nimmt als NaCl .

Die Auswertung der Raman-Spektren zeigte für monovalente Salze eine Zunahme an β -Faltblatt-Strukturen und eine Abnahme an α -Helices. Dies deutet auf eine geordnetere, besser lösliche Proteinstruktur durch die Zugabe von KCl und NaCl hin. Dass die Salze dennoch keine Verbesserung der Proteinextrahierbarkeit hervorriefen, ist ein weiteres Indiz, dass es nicht allein zu Konformationsänderungen der Glutenstruktur, sondern auch zur Bildung kovalenter Verknüpfungen durch die Zusätze kam. Insbesondere KCl und MgCl_2 wiesen einen größeren Anteil stabiler intermolekularer Disulfidbindungen auf. Bei CaCl_2 war diese Form der Disulfidkonformation rückgängig, was auf eine irreguläre Faltung bzw. Aggregation der Glutenproteine hindeutet. Die Sekundärstruktur wurde durch PS 20 und AS kaum verändert.

Der Einsatz der Enzyme Transglutaminase, Lipase, Xylanase und Cellulase in der Nachbehandlung von Gluten führte zu keiner Veränderung der Gluteneigenschaften.

Die kombinierte Zugabe von Temperatureinwirkung und Salz während der Glutenisolation und in der Nachbehandlung verursachte einen synergistischen Effekt. Der Einsatz von CaCl_2 zeigte dabei in Kombination mit verschiedenen Waschwassertemperaturen ein grundsätzlich anderes Verhalten als NaCl auf. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass der Einsatz von Salz während des Waschschriffs und in der Nachbehandlung von Gluten die durch eine Temperaturbehandlung entstandenen Effekte teilweise ausgleichen kann.

Ein Vergleich der Nachbehandlung von Gluten unterschiedlicher Mehle machte deutlich, dass das Potential der Zusätze zur Veränderung der Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität maßgeblich durch die Eigenschaften des Rohstoffs bestimmt wird, da die Zusätze von der Mehlsorte abhängige individuelle Effekte verursachten. Für die unterschiedliche Wirkung der Zusätze je nach Mehl wird ein anderer Faktor als der Proteingehalt oder die Proteinzusammensetzung der Mehle und des daraus resultierenden Glutens vermutet. Möglicherweise beeinflusst der Anteil an Nebenbestandteilen wie Stärke oder Lipide die Wirkung der Zusätze.

Die Erkenntnis, dass ein fertig ausgebildetes Glutennetzwerk veränderbar ist, legt den Grundstein für weitere Forschung in diese Richtung. Eine Ausweitung der getesteten Kationen auf weitere Ionen der Hofmeisterreihe, kann eine Aussage über systematische Einflüsse der Wertigkeit der Ionen oder deren chaotropen und kosmotropen Charakter ermöglichen. Die Analyse der Glutenstruktur durch weitere möglichst nicht-invasive Analysemethoden wie CLSM oder Raman-Mikroskopie würde darüber hinaus einen weiteren Einblick in das Zusammenwirken von Glutenproteinen untereinander und die Interaktion mit Zusätzen bieten, ohne die initiale Glutenstruktur zu beeinflussen.

Um die Hypothese der Bildung kovalenter Nicht-SS-Bindungen durch den Zusatz von Salz zu

überprüfen, wäre eine Analyse des Gehalts an Aminosäuren, Isopeptiden, DHA und LAN erforderlich. Die Bestätigung der Theorie würde zur Beschreibung der Wirkungsweise von Proteinen mit Salzen beitragen.

Die Untersuchung der Auswirkung von nachbehandelten Vitalklebern auf Endprodukteigenschaften verschiedener Anwendungsbereiche kann darüber hinaus einen Eindruck über die Bedeutung und Funktion verschiedener Proteinkomponenten zum Aufbau des Glutennetzwerks geben. Darüber hinaus würde dieser Ansatz eine Eingrenzung der bedeutsamsten analytischen Parameter zur Abschätzung der Vitalkleberfunktionalität ermöglichen.

Das Wissen um die Möglichkeit der Beeinflussung der Gluteneigenschaften in einem Nachbehandlungsschritt eröffnet Optionen zur gezielten Modifikation von Gluten ohne in den etablierten, in sich geschlossenen Stärkeextraktionsprozess einzugreifen. Die anwendungsorientierte Produktion von Vitalkleber bietet Perspektiven für die Ausweitung des Einsatzgebiets für Vitalkleber in der Lebensmittel- und Non-Food-Industrie und das Potential zur weiteren Ausschöpfung der einzigartigen Eigenschaften des Proteins.

5. Material und Methoden

5.1. Chemikalien und Materialien

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Acetonitril	≥ 99,9%, HPLC-Qualität	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure	≥ 99,0%	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
L-Ascorbinsäure	≥ 99,0%	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Calciumchlorid	≥ 98,0%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Cellulase Veron® CP	-	AB Enzymes GmbH, Darmstadt, Deutschland
2-Chloracetamid (CAA)	98,0 %	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat- Dihydrat	≥ 99,5%	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	≥ 99,5%	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
5,5´-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB)	99,0 %	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	99,4 %	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Ethanol	≥ 99,8%	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
L(-)-Glutathion, oxidiert	98,0 %	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
L(-)-Glutathion, reduziert	≥ 98,0 %	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Kaliumchlorid	≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99,5 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Lipase Veron® Hyperbake ST	-	AB Enzymes GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	-	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Methanol	≥ 99,8 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Natriumborhydrid	≥ 98,0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	≥ 99,8 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	-	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	99,0 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	≥ 99,50 %	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Polysorbat 20 (Tween 20)	-	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Propan-1-ol	99,5 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
PWG-Standard	93,1 %	Prolamin Working Group
Salzsäure, 32 %	-	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris(2-carboxyethyl)phosphin- Hydrochlorid (TCEP)	≥ 98,0 %	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Transglutaminase Veron® TG	-	AB Enzymes GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trifluoressigsäure	≥ 99,5 %	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Tris-Hydrochlorid	99,0 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	-	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Urea	≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Wasser	HPLC-Qualität LC-MS-Qualität	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Xylanase Veron® 191	-	AB Enzymes GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 10: Verwendete Mehle.

Mehl	Mühle	Type	Zusammensetzung	Rohproteingehalt	Feuchtigkeit	Ideale Wasser- aufnahmemenge
Standardmehl	Bavaria Mühle	550	Mehlmischung, ascorbinsäurefrei	10,83 %	13,27 %	59,9 %
RGT Reform	Altdorfer Mühle GmbH	550	sortenrein, ascorbinsäurefrei	10,27 %	13,66 %	61,6 %
Asory	Altdorfer Mühle GmbH	550	sortenrein, ascorbinsäurefrei	9,52 %	14,34 %	65,8 %

5.2. Workflow für die Herstellung von Feucht- und Vitalkleberproben

Zur Herstellung der Feucht- und Vitalkleberproben wurde zunächst ein Teig aus Mehl und Wasser auf eine einheitliche Konsistenz geknetet. Dazu wurde im Farinographen (50 g-Kneter, Brabender GmbH & Co. KG, Duisburg, Deutschland) gemäß ICC-Standard 115/1 ermittelt, wie viel Wasser zu den jeweiligen Mehlen gegeben werden muss, um eine Teigkonsistenz von 500 Brabender Einheiten zu erreichen. Der dafür benötigte Feuchtigkeitsgehalt der Mehle wurde nach ICC-Standard 110/1 bestimmt. Die ermittelte Wassermenge wurde anschließend auf $20 \pm 0,1$ g Mehl angepasst, und der Teig wurde manuell im Becherglas mit einem Spatel geknetet. Dafür wurde die gleiche Knetzeit verwendet, die der Teig des entsprechenden Mehls im Farinographen benötigte, um 500 Brabender Einheiten zu erreichen (Teigentwicklungszeit).

Anschließend wurde der Teig gleichmäßig auf die beiden Waschkammern des Glutomatic-Geräts verteilt und gemäß ICC-Standard 137/1 unter Verwendung von Polyamidsieben ($0,88 \mu\text{m}$) mit 540 mL vollentsalztem Wasser pro Waschkammer innerhalb von 10 min ausgewaschen. Der Mischschritt von Mehl und Wasser im Glutomatic-Programm wurde bewusst übersprungen, um ein Verstopfen der Siebe zu vermeiden. Der zurückbleibende Feuchtkleber wurde anschließend in die Siebe ($600 \mu\text{m}$) der Glutomatic-Zentrifuge gegeben und bei $2320 \times g$ für 1 min zentrifugiert, um überschüssiges Wasser aus dem Waschvorgang zu entfernen. Für die Zugabe der Zusätze wurde der Feuchtkleber mit der entsprechenden Menge des jeweiligen Zusatzes (Salz in fester Form (siehe Tabelle 20), PS 20 als viskose Flüssigkeit, AS als Lösung) in einer elektrischen Kaffeemühle zusammen gegeben und in drei Intervallen für je 5 s gemixt. Die Kontrollproben ohne Zusatz wurden auf die gleiche Weise bearbeitet und in der Kaffeemühle gemixt.

Der Feuchtkleber wurde anschließend zu Kügelchen von etwa 1 cm Durchmesser geformt und für 4 min zwischen zwei glatten Teflonformen gepresst. Die daraus entstandenen Plättchen wurden auf einem Edelstahlgitter für 4 h bei entweder 40°C oder 80°C getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Glutenproben in einer Ultrazentrifugalmühle (Pulverisette 14 Classic Line, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Deutschland) mit Trapezloch-Siebringen mit einer Siebmaschengröße von $200 \mu\text{m}$ bei $18\,930 \times g$ vermahlen.

5.3. Rheologische Methoden zur Bestimmung funktioneller Eigenschaften

5.3.1. Mikrozugversuch

Für den Mikrozugversuch wurden nach 5.2 hergestellte Feuchtkleberproben verwendet. Die Feuchtkleber wurden jeweils direkt nach der Bearbeitung in der Kaffeemühle in einen zylindrischen, mit Rillen vorgeformten Tefloneinsatz nach Scherf et al. (2016) gegeben und für 10 min bei 22 °C und 3060 × g zentrifugiert (Z366K, Heraeus, Hanau, Deutschland), um überschüssiges Wasser zu entfernen und die Glutenstränge für die anschließende Formung in einer weiteren Teflonform zu standardisieren. Die zweite Teflonform bestand aus einer glatten Seite und einer mit Rillen geformten Seite. Die vorgeformten Feuchtkleberproben wurden jeweils zwischen die leicht mit Paraffinöl geölten Teile der Teflonform gepresst, die überstehenden Enden mit einem Skalpell entfernt und die Schnittstellen eingeölt. Nach 30 min Relaxation in der Teflonform wurden die vereinzelter Glutenstränge mit Hilfe eines geölten Spatels unter möglichst geringer Beanspruchung auf das SMS/Kieffer Dough and Gluten Extensibility Rig eines TA.XT plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd, Godalming, UK) überführt. Die Messung mit den in Tabelle 11 genannten Messparametern wurde direkt im Anschluss durchgeführt. Alle Messungen wurden in Vierfachbestimmung aus drei separaten Glutenisolationen durchgeführt.

Tabelle 11: Messparameter des Texture Analyzers für den Mikrozugversuch.

Testart	Zug
Vorgeschwindigkeit	2,0 mm/s
Testgeschwindigkeit	3,3 mm/s
Rückgeschwindigkeit	20 mm/s
Zielparameter	Weg
Weg	150,0 mm
Auslösewert	Auto (Kraft)
Auslösekraft	0,049 N
Brucherkennung	Bereich
Bruchempfindlichkeit	0,020 N

5.3.2. Oszillationsrheologie

Für die oszillationsrheologischen Messungen wurden Feuchtkleberproben nach 5.2 gewonnen. Für den Amplituden- und Frequenzsweep wurden jeweils direkt nach der Bearbeitung der Proben in der Kaffeemühle von jeder Probe 1,3 g Feuchtkleber abgewogen und für 5 s unter leichtem Druck zwischen zwei glatten Teflonplatten gepresst. Die Probe wurde anschließend auf die untere Platte der Messgeometrie (Platte-Platte, profiliert, Durchmesser 2,5 cm) des Rheometers (MCR-301, Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) überführt und ein Messspalt von 2 mm angefahren. Um die Probe vor Austrocknung zu schützen, wurden die an der Luft exponierten

Ränder der Probe mit Paraffinöl bestrichen. Die Probe wurde für 20 min relaxiert und anschließend ein Amplituden- bzw. Frequenzsweep mit den in Tabelle 12 genannten Messparametern durchgeführt. Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung aus separaten Glutenisolationen.

Für den Temperatursweep wurden 2,0 g frisch hergestellter Feuchtkleber abgewogen und zwischen zwei glatten Teflonplatten mit einem Abstand von 3 mm für 20 min relaxiert. Die Proben wurden anschließend von der Teflonform direkt auf die Messgeometrie des Rheometers (Platte-Platte, profiliert, Durchmesser 2,5 cm) gestürzt, ohne die Glutenprobe erneut auf der Messplatte zu justieren, um eine erneute Beanspruchung der Probe zu verhindern. Ein Messspalt von 2 mm wurde angefahren und die freiliegenden Ränder der Probe mit Paraffinöl bestrichen. Auf die Messgeometrie wurde eine Temperaturhaube (H-PTD200, Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) gesetzt und der Temperatursweep nach den in Tabelle 12 genannten Bedingungen durchgeführt. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung aus drei separaten Glutenisolationen durchgeführt.

Zur Auswertung der funktionellen Änderungen der Glutenproteine während des Temperatursweeps wurden die Wendepunkte des Verlustfaktors $\tan(\delta)$ (G'/G'') in Abhängigkeit von der Temperatur ermittelt. Dazu wurden die Nullpunkte der zweiten Ableitung eines Polynoms zweiten Grades bestimmt, wobei eine Glättung über 20 Punkte angewendet wurde.

Tabelle 12: Messparameter des Rheometers für oszillationsrheologische Messungen.

Amplitudensweep	Deformation	0,01-100 %
	Frequenz	1 Hz
	Temperatur	25 °C
Frequenzsweep	Deformation	0,1 %
	Frequenz	0,1 – 20 Hz
	Temperatur	25 °C
Temperatursweep	Deformation	0,1 %
	Frequenz	1 Hz
	Temperaturrampe	25 – 95 °C, 1 °C/min

5.4. Chemisch-analytische Methoden zur Bestimmung der Glutenproteinzusammensetzung und Sekundärstruktur

5.4.1. Rohproteinbestimmung

Der Rohproteingehalt wurde nach ICC-Standard 167 über die Messung des Stickstoffgehalts nach Dumas bestimmt. Dafür wurden 100 mg Vitalkleber in Dreifachbestimmung in Zinnfolien eingewogen und die Proben in einem Dumas-Gerät (Dumatherm® N Pro, C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland) unter Sauerstoffzufuhr mit einem O₂-Faktor von 1,8 mL/mg und einer O₂-Durchflussrate von 300 mL/min verbrannt. Aus dem so ermittelten Stickstoffgehalt wurde mit Hilfe eines Umrechnungsfaktors von 5,71 der Proteingehalt berechnet.

5.4.2. Osborne-Fraktionierung und Analyse per Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Osborne-Fraktionierung wurde mit Anpassungen nach der modifizierten Osborne-Fraktionierung nach Wieser et al. (1998) durchgeführt.

Extraktion der Gliadine

Zur Extraktion der Gliadine wurden 20 mg Vitalkleber in Dreifachbestimmung mit 1,5 mL 60%igem wässrigem Ethanol (v/v) versetzt und für 2 min mit einem Multi-Tube-Vortexer gemischt. Die Gefäße wurden anschließend für 10 min auf dem Magnetrührer gerührt und daraufhin für 25 min bei 22 °C bei 3550 × g zentrifugiert (Z446K, Heraeus, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde in 5 mL Messkölbchen überführt. Die Gliadinextraktion wurde ein zweites Mal wiederholt und der vereinte Überstand wurde mit Gliadin-Extraktionslösung aufgefüllt. Der Extrakt wurde für die RP-HPLC-Analyse durch einen 0,45 µm Filter membranfiltriert.

Extraktion der Glutenine

Der Rückstand der Gliadinextraktion wurde für die Extraktion der Glutenine mit 1,5 mL 50% (v/v) Propan-1-ol, 0,05 mol/L Tris-HCl (pH 7,5), 2 mol/L (w/v) Harnstoff und 1 % (w/v) Dithiothreitol (DTT) extrahiert und die Gefäße mit Argon gesättigt. Anschließend wurden die Proben für 2 min mit einem Multi-Tube-Vortexer gemischt, dann für 30 min in einem Wasserbad bei 60 °C gerührt und abschließend 25 min lang bei 22 °C und 3550 × g zentrifugiert (Z446K, Heraeus, Hanau, Deutschland). Das Extraktionsverfahren wurde für Glutenine zwei Mal wiederholt. Die Überstände wurden jeweils in ein 5 mL Messkölbchen überführt und mit Extraktionslösung aufgefüllt. Vor der RP-HPLC-Analyse wurden die Extrakte durch einen 0,45 µm-Membranfilter filtriert.

Das Injektionsvolumen betrug 20 µL für Gliadine und 15 µL für Glutenine. Zur Quantifizierung wurde *Prolamin Working Group* (PWG)-Gliadin (c = 2,5 mg/mL) mit einem Proteingehalt von 93,1 % verwendet (Van Eckert et al., 2006). Die Bedingungen der HPLC-Analyse sind in Tabelle 13 dargestellt. Die Integration erfolgte nach Schalk et al. (2017) mit der Software Lab Solutions 5.93.

Tabelle 13: Geräteparameter des RP-HPLC-Systems für die Osborne-Analyse.

System	UFLC-DAD Shimadzu (Prominence)		
Säule	YMC Triart C18, 3 µm, 2,1 × 150 mm		
Temperatur Säulenofen	60		
Flussrate	0,5 ml/min		
Fließmittel	A: 0,1 % TFA in H ₂ O B: 0,1 % TFA in Acetonitril		
Detektor	UV-Absorption bei λ = 210 nm		
Gradient			
Gliadine, Glutenine, PWG	Zeit [min]	A [%]	B [%]
	0	95	5
	0,4	95	5
	0,5	70	30
	16	40	60
	16,1	0	100
	22,1	0	100
	22,2	95	5
	30	95	5
Injektionsvolumen	Gliadine: 20 µL, Glutenine: 15 µL PWG: 5 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL		

5.4.3. Fraktionierung der Natriumdodecylsulfat-löslichen Proteine und des Gluteninmakropolymers per Größenausschlusschromatographie

Zur Bestimmung des Gehalts an SDS-löslichen Proteinen und des Gluteninmakropolymers wurde die Methode von Thanhäuser et al. (2014) mit Modifikationen verwendet (Höller & Scherf, 2024).

Extraktion der SDS-löslichen Proteine (SDSL)

Für die Extraktion der SDS-löslichen Proteine wurden 20 mg Vitalkleber in Dreifachbestimmung mit 1,0 mL 1 % (w/v) SDS und 0,05 mol/L NaH_2PO_4 (pH 6,9) versetzt. Nach Zugabe der Extraktionslösung wurden die Proben für 2 min mit einem Multi-Tube Vortexer gemischt. Danach wurden die Proben für 25 min bei 1500 U/min in einem Thermoschüttler bei 22 °C inkubiert und anschließend 30 min bei 22 °C und 21 300 \times g zentrifugiert (Z216MK, Heraeus, Hanau, Deutschland). Die SDSL-Extraktion wurde nach dieser Vorschrift ein weiteres Mal durchgeführt. Die Überstände wurden in 5 mL Messkölbchen vereint, mit SDSL-Extraktionslösung aufgefüllt und vor der HPLC-Analyse durch einen 0,45 μm Filter filtriert.

Extraktion des Gluteninmakropolymers (GMP)

Der Rückstand der SDSL-Extraktion wurde mit 1,0 mL 50 % (v/v) Propan-1-ol, 0,05 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7,5) und 1 % (w/v) DTT versetzt. Die Proben wurden für 2 min mit einem Multi-Tube Vortexer gemischt und anschließend für 30 min bei 60 °C und 1500 U/min in einem Thermoschüttler inkubiert. Danach wurden die Proben für 30 min bei 22 °C und 21 300 \times g

zentrifugiert (Z216MK, Heraeus, Hanau, Deutschland). Die Extraktion wurde insgesamt zwei Mal durchgeführt. Vor der HPLC-Analyse wurden die Extrakte durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Für die Molekulargewichtszuordnung der Proteine wurde ein Molekülgrößenmarker bestehend aus Albumin (Molekulargewicht = 66 kDa), Carbonanhydrase (Molekulargewicht = 29 kDa) und Cytochrom C (Molekulargewicht = 12,4 kDa) in Wasser verwendet. Für die Quantifizierung wurde PWG-Gliadin ($c = 1 \text{ mg/mL}$) verwendet (Van Eckert et al., 2006). Die Bedingungen der SEC-HPLC-Analyse sind in Tabelle 14 dargestellt. Die Integration wurde mit der Software Lab Solutions 5.106 durchgeführt.

Tabelle 14: Geräteparameter des SEC-HPLC-Systems für die Analyse der SDS-löslichen (SDSL) Proteine und des Gluteninmakropolymers (GMP).

System	UHPLC Shimadzu (Nexera LC-40)
Säule	BioResolve SEC mAb (200 Å, 2,5 µm, 4,6 × 150) Vorsäule: BioResolve SEC mAb Guard (200 Å, 4,6 mm × 30 mm)
Temperatur Säulenofen	30 °C
Flussrate	0,3 ml/min
Fließmittel	A: 0,1 % TFA in H ₂ O B: 0,1 % TFA in Acetonitril
Detektor	UV-Absorption bei $\lambda = 210 \text{ nm}$
Gradient SDSL, GMP	Isokratisch, A: 50 %, B: 50 %
Injektionsvolumen	SDSL: 5 µL, GMP: 20 µL PWG: 5 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL

5.4.4. Bestimmung der freien und gebundenen Thiole per Ellman-Assay

Die Quantifizierung der freien und gebundenen Thiolgruppen wurde nach der von Schopf und Scherf beschriebenen Methode durchgeführt (Schopf und Scherf, 2021).

Bestimmung der freien Thiole

Zur Bestimmung des Gehalts an freien Thiolen wurde ein Puffer bestehend aus 900 µL 0,05 mol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 6,5), 2 % (w/v) SDS, 3 mol/L Urea und 0,001 mol/L EDTA zu 10 mg Vitalkleber gegeben. Die Proben wurden 60 min lang bei 22 °C und 500 U/min in einem Thermoschüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde 0,1 % (w/v) DTNB zu den Proben gegeben und diese weitere 45 min bei 22 °C und 500 U/min inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 22 °C und 11 000 × g zentrifugiert (Z216MK, Heraeus, Hanau, Deutschland). 200 µL des Überstands wurden in eine 96-Well-Platte überführt. Direkt im Anschluss wurde die Absorption der Proben bei 412 nm bei 22 °C mit einem Photometer (Infinite M Nano+ Multiplate Reader, Tecan AG, Männedorf, Schweiz) gemessen. Für die Quantifizierung wurde eine Kalibrierkurve mit Glutathion-Standard (GSH) mit Konzentrationen von 10 µmol/L bis 209 µmol/L erstellt (siehe Tabelle 15). Die Standards wurden nach dem Aufarbeitungsschema der Proben behandelt. Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Bestimmung der gebundenen Thiole

Zur Bestimmung der gebundenen Thiole wurde zunächst der Gesamtthiolgehalt bestimmt. Dafür wurden 2 mg Vitalkleber mit 200 μL 2,5 % NaBH_4 versetzt und 60 min bei 500 U/min und 50 °C in einem Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurden zu den Proben 100 μL 1 mol/L HCl gegeben.

Die nachfolgenden Extraktionsschritte wurden entsprechend der Bestimmung der freien Thiole durchgeführt. Zur Kalibrierung wurde ein oxidiertes Glutathionstandard (GSSG) im Bereich von 3,8 $\mu\text{mol/L}$ bis 152,09 $\mu\text{mol/L}$ verwendet (siehe Tabelle 16). Die Aufarbeitung der Kalibrierungspunkte erfolgte entsprechend der Probenaufarbeitung. Der Gehalt an gebundenen Thiolen wurde ermittelt, indem der Gehalt an freien Thiolen vom Gesamtthiolgehalt abgezogen wurde.

Tabelle 15: Pipettierschema zur Herstellung der GSH-Kalibrierpunkte zur Bestimmung der freien Thiole.

Standardlösung				Puffer		Finale Konzentration	
A	61,47	mg	Glutathion, reduziert (GSH)	100	mL	2,0	mM
M = 307,33 g/mol							
B	750	μL	A	250	μL	1,5	mM
C	1000	μL	A	1000	μL	1,0	mM
D	200	μL	C	1800	μL	0,1	mM
E	200	μL	C	800	μL	0,2	mM
F	300	μL	C	700	μL	0,3	mM
G	400	μL	C	600	μL	0,4	mM
H	500	μL	C	500	μL	0,5	mM
I - Blindwert	0	μL	-	1000	μL	0	mM

Tabelle 16: Pipettierschema zur Herstellung der GSSG-Kalibrierpunkte zur Bestimmung der freien Thiole.

Standardlösung				Puffer		Finale Konzentration	
A	122,53	mg	Glutathion, oxidiert (GSSG)	100	mL	2	mM
M = 612,63 g/mol							
B	200	μL	A	1800	μL	200	μM
C	200	μL	A	800	μL	400	μM
D	300	μL	A	700	μL	600	μM
E	400	μL	A	600	μL	800	μM
F	500	μL	A	500	μL	1000	μM
G	750	μL	A	250	μL	1500	μM
H - Blindwert	0	μL	B	1000	μL	0	μM
I	250	μL	B	750	μL	50	μM
J	500	μL	B	500	μL	100	μM
K	750	μL	B	250	μL	150	μM

5.4.5. Massenspektrometrie

5.4.5.1. Probenaufarbeitung

Die Proben für die LC-MS/MS-Analyse wurden entsprechend des in 5.2 beschriebenen Workflows hergestellt. Für die Aufarbeitung vor der massenspektrometrischen Analyse der Proben wurden jeweils 20 mg Vitalkleber in Dreifachbestimmung mit 1 mL einer Extraktionslösung aus 50 % (v/v) Propan-1-ol, 0,05 mol/L Tris-HCl (pH 7,5), 2 mol/L (w/v) Urea und 1 % (w/v) Dithiothreitol (DTT) versetzt, 5 min gemischt und anschließend für 5 min in ein Ultraschallbad gegeben. Die Proben wurden danach für 20 min bei 60 °C und 1500 U/min in einem Thermoschüttler inkubiert und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur und 21 380 × g zentrifugiert (Z216MK, Heraeus, Hanau, Deutschland). 800 µL des Überstands wurden in einer Vakuumzentrifuge bei 40 °C und 8 mbar getrocknet.

Zur Reduzierung der Proben wurde der Rückstand in 600 µL 50 % (v/v) Propan-1-ol und 0,5 mol/L Tris-HCl (pH 8,5) gelöst und mit 100 µL 0,5 mol/L Tris-HCl (pH 8,5) und 0,05 mol/L Tris(2-carboxyethyl)phosphin-Hydrochlorid (TCEP) versetzt. Die Alkylierung der Proben erfolgte durch die Zugabe von 200 µL 0,5 mol/L Tris-HCl (pH 8,5) und 0,5 mol/L 2-Chloracetamid (CAA). Im Anschluss folgte die Inkubierung der Proben für 45 min bei 37 °C und 1000 U/min im Dunklen und die Trocknung in der Vakuumzentrifuge bei 40 °C und 8 mbar.

Für den enzymatischen Verdau wurden die getrockneten Proben in 800 µL 0,1 mol/L Tris-HCl, 0,04 mol/L Urea (pH 7,8) und 200 µL Trypsinlösung aus 0,1 mol/L Tris-HCl und 0,04 mol/L Urea (pH 7,8, c = 1 mg/mL, 1:50 Enzym:Substrat) gelöst. Die Proben wurden für mindestens 18 h bei 37 °C und 1000 U/min im Dunklen inkubiert. Die Beendigung des enzymatischen Verdaus erfolgte durch die Zugabe von 10 µL TFA.

Die Aufreinigung der Proben erfolgte durch eine Festphasenextraktion (SPE). Hierfür wurden die SPE-Säulen (Discovery® DSC-18, 100 mg, Supelco, St. Louis, MO, USA) zunächst mit 100 % Methanol aktiviert, mit 80 % wässrigem Acetonitril (v/v) mit 0,1 % Ameisensäure equilibriert und mit 2 % wässrigem Acetonitril (v/v) mit 0,1 % Ameisensäure gewaschen. Die mit Probe beladene Säule wurde mit 2 % wässrigem Acetonitril (v/v) mit 0,1 % Ameisensäure gewaschen und mit 40 % wässrigem Acetonitril (v/v) mit 0,1 % Ameisensäure eluiert. Das Eluat wurde bei 40 °C bei 8 mbar in der Vakuumzentrifuge getrocknet und bis zur LC-MS/MS-Analyse bei -20 °C gelagert.

5.4.5.2. LC-MS/MS-Analyse

Die Proben wurden in 1 mL 2 % wässrigem Acetonitril (v/v) und 0,1 % Ameisensäure gelöst und durch einen 0,45 µm Filter filtriert. 10 µL jeder Probe wurde in ein Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC)-System injiziert, das mit einem Q-Exactive Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap-Massenspektrometer gekoppelt war. Die Geräteparameter sind in Tabelle 17 angegeben. Es erfolgten nicht-zielgerichtete Messungen. Als Software wurde Thermo Scientific Xcalibur V 4.2.47 genutzt.

Tabelle 17: Gerätespezifische Parameter der Tandem-Massenspektrometrie mit Flüssigkeitschromatographie (LC-MS/MS).

Sytem	UHPLC Vanquish (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	
Säule	Aeris PEPTIDE XB-C18, 1,7 µm, 150 × 2,1 mm	
Temperatur	30 °C	
Säulenofen		
Flussrate	0,2 mL/min	
Fließmittel	A: 0,1 % Ameisensäure in Wasser B: 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril	
Gradient	Zeit [min]	A [%]
	0,0	98
	2,0	90
	28,0	70
	34,0	60
	38,0	40
	42,0	20
	46,0	20
	48,0	98
	55,0	98
Detektor (DA)	210 nm	
Injektionsvolumen	10 µL	
System	Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	
MS ¹	Ionisierung	ESI (Nanospray Flex Series, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
	Ionenladung	2+
	Auflösung	70000
	Automatic Gain Control	3E+06
	Massenbereich	360-1300 m/z
	Maximale Injektionszeit	50 ms
MS ²	TopN	10
	Ionenladung	2+ bis 7+
	Auflösung	17500
	Isolierungsfenster	2,0 m/z
	Automatic Gain Control	1E+05
	Maximale Injektionszeit	100 ms
	Festgelegte erste Masse	120 m/z

5.4.5.3. Auswertung der massenspektrometrischen Analysen

Für die Auswertung der massenspektrometrischen Analysen wurde die Software MaxQuant Version 2.4.13.0 verwendet. Die Rohdaten der MS-Messungen wurden über die in MaxQuant integrierte Suchmaschine Andromeda mit dem Fasta File für den Eintrag *Triticum aestivum* der UniProtKB Datenbank (Fasta File Download am 24.01.2024) verglichen. Für die Auswertungen in MaxQuant wurden einige Suchparameter angepasst. Als variable Modifikationen wurden Methioninoxidationen und Acetylierungen am N-Terminus der Proteine ausgewählt, als feste Modifikation wurde Carbamidomethyl am C-Terminus der Proteine eingestellt. Die maximale Anzahl an Modifikationen wurde auf 5 gesetzt. Zur relativen Quantifizierung wurde die LFQ-Quantifizierung gewählt. Als Enzym wurde Trypsin/P ausgewählt, mit maximal 2 *missed cleavages* und einer Peptidlänge von mindestens 7. Als Anteil der falsch-positiv identifizierten Übereinstimmungen zwischen Peptiden und Proteinen wurde eine *False Discovery Rate* (FDR) von 1 % eingestellt. Bei der Auswertung der MaxQuant Ergebnistabellen wurden keine Filter verwendet.

5.4.6. Raman-Spektroskopie

Die FT-Raman-Messungen wurden mit Vitalkleberproben mit einem FT-Raman-Spektrometer (Bruker IFS 66v/S, Billerica, MA, USA) mit Raman-Modul (Bruker FRA 106/s, Billerica, MA, USA) mit einer Anregungswellenlänge von 1064 nm und einer spektralen Auflösung von 4 cm^{-1} unter Verwendung einer 180° -Rückstreuungsgeometrie durchgeführt. Insgesamt wurden 10 000 Scans im Bereich von 200 bis 4000 cm^{-1} mit einer Laserleistung von 525 mW aufgenommen. Zur Messung wurden die Vitalkleberproben jeweils in einen Probenhalter mit 2 mm Durchmesser gepresst. Jede Probe wurde in Zweifachbestimmung gemessen.

Die Raman-Spektren wurden vor der Auswertung mit der Software SpectraGryph 1.2.16.1 basislinienkorrigiert (advanced baseline, linear). Die basislinienkorrigierten Spektren wurden auf den Phenylalanin-Peak bei 1003 cm^{-1} normiert.

Von jedem Raman-Spektrum wurde der charakteristische Bereich für Disulfidbrücken ($490\text{--}550\text{ cm}^{-1}$), für die aromatischen Aminosäuren Tyrosin (I_{850}/I_{830}) und Tryptophan (I_{760}) sowie die Amid-I-Bande ($1590\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) analysiert.

Zur Auswertung der Amid-I-Bande wurden die Peaks des charakteristischen Bereichs des Raman-Spektrums dekonvoluiert. Dafür wurde die nach Sadat und Joye (2020) beschriebene Methode zur Analyse verborgener Peaks der zweiten Ableitung mit Origin 2023 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) durchgeführt. Die jeweiligen Peaks wurden durch eine Gauss'sche Funktion beschrieben. Zur Bewertung der Peakanpassung wurde der Wert von χ^2 geprüft, der in allen Fällen unter 3×10^{-5} lag und zufällig verteilt war. Die dekonvoluierten Peaks der Amid-I-Bande wurden je nach Position der Ramanverschiebung den entsprechenden Sekundärstrukturelementen nach Lancelot et al. (2021) und Nawrocka et al. (2015) zugeordnet (siehe Tabelle 18). Die Peakflächen der Absorptionsbanden jeder Sekundärstruktur wurden als relativer Anteil an der Gesamtfläche der Absorptionsbanden dargestellt.

Tabelle 18: Raman-Verschiebung für Sekundärstrukturelemente nach Lancelot et al. (2021) und Nawrocka et al. (2015).

Sekundärstrukturelement	Raman-Verschiebung [cm ⁻¹]
parallele β -Faltblatt-Strukturen	1630–1640
<i>Random Coils</i>	1640–1650
α -Helix	1650–1658
β -Schleifen	1670–1679
antiparallele β -Faltblatt-Strukturen	1687–1700

Die Region des Spektrums, die charakteristisch für die Disulfidbindungskonformationen ist, wurde auf die gleiche Weise wie die Amid-I-Bande durch Dekonvolution ausgewertet. Die Peaks wurden je nach Ramanverschiebung den charakteristischen Ramanverschiebungen für die jeweilige Disulfidbindungskonformation nach Pfeuti et al. (2019) und Sadat et al. (2022) (siehe Tabelle 19) zugeordnet.

Tabelle 19: Raman-Verschiebung für Disulfidbindungskonformationen nach Pfeuti et al. (2019) und Sadat et al. (2022).

Disulfidkonformation	Raman-Verschiebung [cm ⁻¹]
<i>gauche-gauche-gauche (ggg)</i>	490–513
<i>trans-gauche-gauche (tgg)</i>	514–527
<i>trans-gauche-trans (tgt)</i>	528–548

Für den Bereich des Tryptophan-Peaks und des Tyrosin-Doppelpеaks wurde die Intensität der Peakmaxima mit Origin 2023 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) bestimmt.

5.5. Statistik

Mittelwerte, Standardabweichungen, Variationskoeffizienten, Steigungen und lineare Regression wurden mit Microsoft Excel Funktionen berechnet. Für den Test auf Normalverteilung und Varianzhomogenität sowie für die Berechnung von Korrelationen wurden die Programme IBM SPSS Statistics 27 (International Business Machines Corporation, Armonk, NY, USA) und Origin 2023 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) verwendet. Für die Auswertung signifikanter Unterschiede zwischen den Kontrollproben und den Glutenproben mit Zusatz wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit zweiseitigem Dunnett's t-Test ($p \leq 0.05$) durchgeführt. Signifikante Unterschiede des Einflusses der Trocknungstemperatur oder der Konzentration eines Zusatzes wurden mittels einfaktorieller ANOVA und Tukey's post hoc Test ($p \leq 0,05$) ermittelt. Dafür wurde das Programm IBM SPSS Statistics 27 (International Business Machines Corporation, Armonk, NY, USA) verwendet. Die Identifizierung von Wendepunkten des Verlustfaktors $\tan(\delta)$ des Temperatursweeps wurde mit Origin 2023 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) durchgeführt.

6. Literaturverzeichnis

Literatur

- Aamodt, A., Magnus, E. M., & Færgestad, E. M. (2003). Effect of Flour Quality, Ascorbic Acid and DATEM on Dough Rheological Parameters and Hearth Loaves Characteristics. *Journal of Food Science*, 68, 2201–2210.
- Abedi, E., & Pourmohammadi, K. (2021). Chemical Modifications and Their Effects on Gluten Protein: An Extensive Review. *Food Chemistry*, 343, 128398.
- Ackermann, K. R., Koster, J., & Schlücker, S. (2009). Conformations and Vibrational Properties of Disulfide Bridges: Potential Energy Distribution in the Model System Diethyl Disulfide. *Chemical Physics*, 355, 81–84.
- Ahmed, J., Almusallam, A. S., Al-Salman, F., AbdulRahman, M. H., & Al-Salem, E. (2013). Rheological Properties of Water Insoluble Date Fiber Incorporated Wheat Flour Dough. *LWT - Food Science and Technology*, 51, 409–416.
- Alves, T. O., D'Almeida, C. T. S., Scherf, K. A., & Ferreira, M. S. L. (2019). Modern Approaches in the Identification and Quantification of Immunogenic Peptides in Cereals by LC-MS/MS. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1470.
- Apichartsrangkoon, A., Ledward, D. A., Bell, A. E., & Brennan, J. G. (1998). Physicochemical Properties of High Pressure Treated Wheat Gluten. *Food Chemistry*, 63, 215–220.
- Armero, E., & Collar, C. (1996). Antistaling Additives, Flour Type and Sourdough Process Effects on Functionality of Wheat Doughs. *Journal of Food Science*, 61, 299–303.
- Asquith, R. S., Otterburn, M. S., & Sinclair, W. J. (1974). Isopeptide Crosslinks - Their Occurrence and Importance in Protein Structure. *Angewandte Chemie International Edition*, 13, 514–520.
- Bahlo, L. (2023). Einfluss verschiedener Salze auf die Struktur und Funktionalität von Gluten. Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe.
- Bak, A., & Podgórska, W. (2016). Interfacial and Surface Tensions of Toluene/Water and Air/Water Systems with Nonionic Surfactants Tween 20 and Tween 80. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 504, 414–425.
- Bardini, G., Boukid, F., Carini, E., Curti, E., Pizzigalli, E., & Vittadini, E. (2018). Enhancing Dough-Making Rheological Performance of Wheat Flour by Transglutaminase and Vital Gluten Supplementation. *LWT - Food Science and Technology*, 91, 467–476.
- Beghin, A. S., Ooms, N., Hooyberghs, K., Coppens, E., Pareyt, B., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2022). The Influence of Varying Levels of Molecular Oxygen on the Functionality of Azodicarbonamide and Ascorbic Acid During Wheat Bread Making. *Food Research International*, 161, 111878.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2007). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer Berlin Heidelberg.
- Belton, P. S. (1999). Mini Review: On the Elasticity of Wheat Gluten. *Journal of Cereal Science*, 29, 103–107.
- Belton, P. S. (2005). New Approaches to Study the Molecular Basis of the Mechanical Properties of Gluten. *Journal of Cereal Science*, 41, 203–211.

- Belton, P. S., Colquhoun, I. J., Grant, A., Wellner, N., Field, J. M., Shewry, P. R., & Tatham, A. S. (1995). FTIR and NMR Studies on the Hydration of a High-Mr Subunit of Glutenin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 17, 74–80.
- Berland, S., & Launay, B. (1995). Rheological Properties of Wheat Flour Doughs in Steady and Dynamic Shear: Effect of Water Content and Some Additives. *Cereal Chemistry*, 72, 48–52.
- Bonner, W. D. (1957). Soluble Oxidases and Their Functions. *Annual Review of Plant Biology*, 8, 427–452.
- Breuillet, C., Yildiz, E., Cuq, B., & Kokini, J. L. (2002). Study of the Anomalous Capillary Bagley Factor Behavior of Three Types Of Wheat Flour Doughs at Two Moisture Contents. *Journal of Texture Studies*, 33, 315–340.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. (2023). Deutschland, wie es isst - Der BMEL-Ernährungsreport 2023.
- Bundessortenamt. (2022). Beschreibende Sortenliste. Getreide, Mais, Öl- und Faserpflanzen, Leguminosen, Rüben, Zwischenfrüchte.
- Carcea, M., Narducci, V., Turfani, V., & Mellara, F. (2020). A Comprehensive Study on the Influence of Sodium Chloride on the Technological Quality Parameters of Soft Wheat Dough. *Foods*, 9, 952.
- Ceresino, E. B., Kuktaite, R., Hedenqvist, M. S., Sato, H. H., & Johansson, E. (2020). Processing Conditions and Transglutaminase Sources to “Drive” the Wheat Gluten Dough Quality. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 65, 102439.
- Chauhan, J., Shukla, R., Bishoyi, A. K., Goyal, S., & Sanghvi, G. (2023). Investigation of Physical, Nutritional and Sensory Properties of Wheat Bread Treated with Purified Thermostable Cellulase and Alpha Amylase. *Cogent Food & Agriculture*, 9, 2261839.
- Chen, G., Ehmke, L., Miller, R., Faa, P., Smith, G., & Li, Y. (2018). Effect of Sodium Chloride and Sodium Bicarbonate on the Physicochemical Properties of Soft Wheat Flour Doughs and Gluten Polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 6840–6850.
- Chiou, B.-S., Jafri, H., Cao, T., Robertson, G. H., Gregorski, K. S., Imam, S. H., Glenn, G. M., & Orts, W. J. (2013). Modification of Wheat Gluten with Citric Acid to Produce Superabsorbent Materials. *Journal of Applied Polymer Science*, 129, 3192–3197.
- Chompoorat, P., Ambardekar, A., Mulvaney, S., & Rayas-Duarte, P. (2013). Rheological Characteristics of Gluten After Modified by DATEM, Ascorbic Acid, Urea and DTT Using Creep-Recovery Test. *Journal of Modern Physics*, 4, 1–8.
- Chompoorat, P., Fasasi, A., Lavine, B. K., & Rayas-Duarte, P. (2022). Gluten Conformation at Different Temperatures and Additive Treatments. *Foods*, 11, 430.
- Christophersen, C., Andersen, E., Jakobsen, T. S., & Wagner, P. (1997). Xylanases in Wheat Separation. *Starch - Stärke*, 49, 5–12.
- Codex Alimentarius. (2001). Standard for Wheat Protein Products Including Wheat Gluten (CODEX STAN 163-1987, Rev. 1-2001).
- Colakoglu, A. S., & Özkaya, H. (2012). Potential Use of Exogenous Lipases for DATEM Replacement to Modify the Rheological and Thermal Properties of Wheat Flour Dough. *Journal of Cereal Science*, 55, 397–404.
- Colgrave, M. L., Byrne, K., & Howitt, C. A. (2017). Food for Thought: Selecting the Right Enzyme for the Digestion of Gluten. *Food Chemistry*, 234, 389–397.

- Correa, M. J., Ferrer, E., Añón, M. C., & Ferrero, C. (2014). Interaction of Modified Celluloses and Pectins with Gluten Proteins. *Food Hydrocolloids*, 35, 91–99.
- Courtin, C. M., & Delcour, J. A. (2002). Arabinoxylans and Endoxylanases in Wheat Flour Bread-Making. *Journal of Cereal Science*, 35, 225–243.
- Dai, Y., & Tyl, C. (2021). A Review on Mechanistic Aspects of Individual Versus Combined Uses of Enzymes as Clean Label-Friendly Dough Conditioners in Breads. *Journal of Food Science*, 86, 1583–1598.
- Day, L., Augustin, M. A., Batey, I. L., & Wrigley, C. W. (2006). Wheat-Gluten Uses and Industry Needs. *Trends in Food Science Technology*, 17, 82–90.
- Delcour, J. A., Joye, I. J., Pareyt, B., Wilderjans, E., Brijs, K., & Lagrain, B. (2012). Wheat Gluten Functionality as a Quality Determinant in Cereal-Based Food Products. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 469–492.
- Dewettinck, K., Van Bockstaele, F., Kühne, B., Van de Walle, D., Courtens, T. M., & Gellynck, X. (2008). Nutritional Value of Bread: Influence of Processing, Food Interaction and Consumer Perception. *Journal of Cereal Science*, 48, 243–257.
- Ding, S., & Yang, J. (2013). The Influence of Emulsifiers on the Rheological Properties of Wheat Flour Dough and Quality of Fried Instant Noodles. *LWT - Food Science and Technology*, 53, 61–69.
- Dong, W., & Hosene, R. C. (1995). Effects of Certain Breadmaking Oxidants and Reducing Agents on Dough Rheological Properties. *Cereal Chemistry*, 72, 58–63.
- Eckert, B., Amend, T., & Belitz, H. D. (1993). The Course of the SDS and Zeleny Sedimentation Tests For Gluten Quality and Related Phenomena Studied Using the Light Microscope. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 196, 122–125.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue Sulfhydryl Groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70–77.
- Fallahbaghery, A., Zou, W., Byrne, K., Howitt, C. A., & Colgrave, M. L. (2017). Comparison of Gluten Extraction Protocols Assessed by LC-MS/MS Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 2857–2866.
- Ferrer, E. G., Gómez, A. V., Añón, M. C., & Puppo, M. C. (2011). Structural Changes in Gluten Protein Structure After Addition of Emulsifier. A Raman Spectroscopy Study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79, 278–281.
- Frazier, P. J., Leigh-Dugmore, F. A., Daniels, N. W. R., Eggitt, P. W. R., & Coppock, J. B. M. (1973). The Effect of Lipoxygenase Action on the Mechanical Development of Wheat Flour Doughs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24, 421–436.
- Friedman, M. (1999). Chemistry, Biochemistry, Nutrition, and Microbiology of Lysinoalanine, Lanthionine, and Histidinoalanine in Food and Other Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1295–319.
- Fu, B. X., Sapirstein, H. D., & Bushuk, W. (1996). Salt-Induced Disaggregation/Solubilization of Gliadin and Glutenin Proteins in Water. *Journal of Cereal Science*, 24, 241–246.
- Gabler, A. M., & Scherf, K. A. (2020). Comparative Characterization of Gluten and Hydrolyzed Wheat Proteins. *Biomolecules*, 10, 1227.
- Geist, K. (2023). Einfluss verschiedener Zusätze in Gluten auf Backeigenschaften. Masterarbeit, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe.

- Gerits, L. R., Pareyt, B., Decamps, K., & Delcour, J. A. (2014). Lipases and Their Functionality in the Production of Wheat-Based Food Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 978–989.
- Gerrard, J. A., Fayle, S. E., Wilson, A. J., Newberry, M. P., Ross, M., & Kavale, S. (1998). Dough Properties and Crumb Strength of White Pan Bread as Affected by Microbial Transglutaminase. *Journal of Food Science*, 63, 472–475.
- Gómez, A. V., Buchner, D., Tadini, C. C., Añón, M. C., & Puppo, M. C. (2013a). Emulsifiers: Effects on Quality of Fibre-Enriched Wheat Bread. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 1228–1239.
- Gómez, A. V., Ferrer, E. G., Añón, M. C., & Puppo, M. C. (2012). Analysis of Soluble Proteins/Aggregates Derived from Gluten-Emulsifiers Systems. *Food Research International*, 46, 62–68.
- Gómez, A. V., Ferrer, E. G., Añón, M. C., & Puppo, M. C. (2013b). Changes in Secondary Structure of Gluten Proteins Due to Emulsifiers. *Journal of Molecular Structure*, 1033, 51–58.
- Gómez, M., del Real, S., Rosell, C. M., Ronda, F., Blanco, C. A., & Caballero, P. A. (2004). Functionality of Different Emulsifiers on the Performance of Breadmaking and Wheat Bread Quality. *European Food Research and Technology*, 219, 145–150.
- Görbitz, C. H. (1994). Conformational Properties of Disulphide Bridges. 2. Rotational Potentials of Diethyl Disulphide. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 7, 259–267.
- Grosch, W., & Wieser, H. (1999). Redox Reactions in Wheat Dough as Affected by Ascorbic Acid. *Journal of Cereal Science*, 29, 1–16.
- Gross, J. H. (2019). Prinzip der Massenspektrometrie. In J. H. Gross (Hrsg.), *Massenspektrometrie: Spektroskopiekurs kompakt* (S. 3–4). Springer Berlin Heidelberg.
- Hahn, B., & Grosch, W. (1998). Distribution of Glutathione in Osborne Fractions as Affected by Additions of Ascorbic Acid, Reduced and Oxidised Glutathione. *Journal of Cereal Science*, 27, 117–125.
- Hähnel, W., Jussofie, I., & Müller, F. (1995). Investigations Into the Properties of Emulsifiers in Yeast-Leavened Dough by Means of Infrared Spectroscopy. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 200, 244–246.
- Hanft, F., & Köhler, P. (2005). Quantitation of Dityrosine in Wheat Flour and Dough by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2418–23.
- Hanft, F., & Köhler, P. (2006). Studies on the Effect of Glucose Oxidase in Bread Making. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1699–1704.
- Hayta, M., & Schofield, J. D. (2004). Heat and Additive Induced Biochemical Transitions in Gluten From Good and Poor Breadmaking Quality Wheats. *Journal of Cereal Science*, 40, 245–256.
- Hermans, W., Geißlitz, S., De Bondt, Y., Langenaeken, N. A., Scherf, K. A., & Courtin, C. M. (2024). NanoLC-MS/MS Protein Analysis on Laser-Microdissected Wheat Endosperm Tissues: A Comparison Between Aleurone, Sub-Aleurone and Inner Endosperm. *Food Chemistry*, 437, 137735.
- Höller, N., & Scherf, K. A. (2024). Influence of Salts on the Protein Composition and Functionality of Gluten. *Journal of Cereal Science*, 118, 103978.

- Honzatko, R. B., & Williams, R. W. (1982). Raman Spectroscopy of Avidin: Secondary Structure, Disulfide Conformation, and the Environment of Tyrosine. *Biochemistry*, 21, 6201–5.
- Hoseney, R. C., & Faubion, J. M. (1981). A Mechanism for the Oxidative Gelation of Wheat Flour Water-Soluble Pentosans. *Cereal Chemistry*, 58, 421–424.
- Jekle, M., & Becker, T. (2011). Dough Microstructure: Novel Analysis by Quantification Using Confocal Laser Scanning Microscopy. *Food Research International*, 44, 984–991.
- Johnston, P. H., & Fellers, D. A. (1971). Process for Protein-Starch Separation in Wheat Flour. *Journal of Cereal Science*, 36, 649–652.
- Jones, I. K., Phillips, J. W., & Hird, F. J. R. (1974). The Estimation of Rheologically Important Thiol and Disulphide Groups in Dough. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25, 1–10.
- Joye, I. J., Lagrain, B., & Delcour, J. A. (2009). Use of Chemical Redox Agents and Exogenous Enzymes to Modify the Protein Network During Breadmaking – A Review. *Journal of Cereal Science*, 50, 11–21.
- Kellermann, J. (2022). Spaltung von Proteinen. In J. Kurreck, J. W. Engels & F. Lottspeich (Hrsg.), *Bioanalytik* (S. 225–237). Springer Berlin Heidelberg.
- Kieffer, R., Schurer, F., Köhler, P., & Wieser, H. (2007). Effect of Hydrostatic Pressure and Temperature on the Chemical and Functional Properties of Wheat Gluten: Studies on Gluten, Gliadin and Glutenin. *Journal of Cereal Science*, 45, 285–292.
- Kieffer, R., Garnreiter, F., & Belitz, H.-D. (1981a). Beurteilung von Teigeigenschaften durch Zugversuche im Mikromaßstab. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 172, 193–194.
- Kieffer, R., Kim, J.-J., & Belitz, H.-D. (1981b). Zugversuche mit Weizenkleber im Mikromaßstab. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 172, 190–192.
- Kieffer, R., Kim, J.-J., Walther, C., Laskawy, G., & Grosch, W. (1990). Influence of Glutathione and Cysteine on the Improver Effect of Ascorbic Acid Stereoisomers. *Journal of Cereal Science*, 11, 143–152.
- Kinsella, J. E., & Hale, M. L. (1984). Hydrophobic Associations and Gluten Consistency: Effect of Specific Anions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 1054–1056.
- Knoch, H., Ulbrich, M. H., Mittag, J. J., Buske, J., Garidel, P., & Heerklotz, H. (2021). Complex Micellization Behavior of the Polysorbates Tween 20 and Tween 80. *Molecular Pharmaceutics*, 18, 3147–3157.
- Köhler, P. (2003a). Concentrations of Low and High Molecular Weight Thiols in Wheat Dough as Affected by Different Concentrations of Ascorbic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4948–4953.
- Köhler, P. (2003b). Effect of Ascorbic Acid in Dough: Reaction of Oxidized Glutathione With Reactive Thiol Groups of Wheat Glutelin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4954–4959.
- Köhler, P., & Grosch, W. (1999). Study of the Effect of DATEM. 1. Influence of Fatty Acid Chain Length on Rheology and Baking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1863–1869.
- Kong, X., Zhou, H., & Qian, H. (2007). Enzymatic Preparation and Functional Properties of Wheat Gluten Hydrolysates. *Food Chemistry*, 101, 615–620.

- Krog, N. (1977). Functions of Emulsifiers in Food Systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 54, 124–131.
- Kuhar, N., Sil, S., & Umapathy, S. (2021). Potential of Raman Spectroscopic Techniques to Study Proteins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 258, 119712.
- Kunz, W., Henle, J., & Ninham, B. W. (2004). 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (About the Science of the Effect of Salts): Franz Hofmeister's Historical Papers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9, 19–37.
- Kunz, W. (2010). Specific Ion Effects in Colloidal and Biological Systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 34–39.
- Lagrain, B., De Vleeschouwer, K., Rombouts, I., Brijs, K., Hendrickx, M. E., & Delcour, J. A. (2010a). The Kinetics of β -Elimination of Cystine and the Formation of Lanthionine in Gliadin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10761–7.
- Lagrain, B., Brijs, K., Veraverbeke, W. S., & Delcour, J. A. (2005). The Impact of Heating and Cooling on the Physico-Chemical Properties of Wheat Gluten–Water Suspensions. *Journal of Cereal Science*, 42, 327–333.
- Lagrain, B., Goderis, B., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2010b). Molecular Basis of Processing Wheat Gluten toward Biobased Materials. *Biomacromolecules*, 11, 533–541.
- Lagrain, B., Rombouts, I., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2011). Kinetics of Heat-Induced Polymerization of Gliadin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2034–2039.
- Lagrain, B., Thewissen, B. G., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2008). Mechanism of Gliadin–Glutenin Cross-Linking During Hydrothermal Treatment. *Food Chemistry*, 107, 753–760.
- Lancelot, E., Fontaine, J., Grua-Priol, J., Assaf, A., Thouand, G., & Le-Bail, A. (2021). Study of Structural Changes of Gluten Proteins During Bread Dough Mixing by Raman Spectroscopy. *Food Chemistry*, 358, 129916.
- Laurière, M., Pecquet, C., Bouchez-Mahiou, I., Snégaroff, J., Bayrou, O., Raison-Peyron, N., & Vigan, M. (2006). Hydrolysed Wheat Proteins Present in Cosmetics Can Induce Immediate Hypersensitivities. *Contact Dermatitis*, 54, 283–289.
- León, A., Rosell, C. M., & Benedito de Barber, C. (2003). A Differential Scanning Calorimetry Study of Wheat Proteins. *European Food Research and Technology*, 217, 13–16.
- Lexhaller, B., Colgrave, M. L., & Scherf, K. A. (2019). Characterization and Relative Quantitation of Wheat, Rye, and Barley Gluten Protein Types by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1530.
- Li, C., Chen, G., Ran, C., Liu, L., Wang, S., Xu, Y., Tan, Y., & Kan, J. (2019). Adlay Starch–Gluten Composite Gel: Effects of Adlay Starch on Rheological and Structural Properties of Gluten Gel to Molecular and Physico-Chemical Characteristics. *Food Chemistry*, 289, 121–129.
- Li, J., Smith, L. S., & Zhu, H. J. (2021). Data-Independent Acquisition (DIA): An Emerging Proteomics Technology for Analysis of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters. *Drug Discovery Today: Technologies*, 39, 49–56.
- Liao, L., Liu, T.-X., Zhao, M.-M., Cui, C., Yuan, B.-E., Tang, S., & Yang, F. (2010). Functional, Nutritional and Conformational Changes from Deamidation of Wheat Gluten with Succinic Acid and Citric Acid. *Food Chemistry*, 123, 123–130.

- Li-Chan, E. C. Y. (1996). The Applications of Raman Spectroscopy in Food Science. *Trends in Food Science & Technology*, 7, 361–370.
- Liu, R., Cong, X., Song, Y., Wu, T., & Zhang, M. (2018). Edible Gum–Phenolic–Lipid Incorporated Gluten Films for Food Packaging. *Journal of Food Science*, 83, 1622–1630.
- Lo Nostro, P., & Ninham, B. W. (2012). Hofmeister Phenomena: An Update on Ion Specificity in Biology. *Chemical Reviews*, 112, 2286–2322.
- Lottspeich, F., Jooß, K., Kelleher, N. L., Götze, M., Friedrich, B., & Aebersold, R. (2022). Proteomanalyse. In J. Kurreck, J. W. Engels & F. Lottspeich (Hrsg.), *Bioanalytik* (S. 1013–1063). Springer Berlin Heidelberg.
- Lucas, I., Becker, T., & Jekle, M. (2018). Gluten Polymer Networks - A Microstructural Classification in Complex Systems. *Polymers*, 10.
- Ma, S., Han, W., Li, L., & Wang, X. (2020). Small and Large Strain Rheology of Gluten and Gluten–Starch Doughs Containing Wheat Bran Dietary Fiber. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, 177–183.
- Macmurray, W. R., T. A. und Morrison. (1970). Composition of Wheat-Flour Lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 21, 520–528.
- MacRitchie, F. (1975). Mechanical Degradation of Gluten Proteins During High-Speed Mixing of Doughs. *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia*, 49, 85–90.
- Manu, B. T., & Prasada Rao, U. J. S. (2011). Role of Peroxidase and H₂O₂ in Cross-Linking of Gluten Proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 35, 1695–1702.
- Marsh, S., & Rummel, F. (2024). Rheometry and Rheological Characterisation. In A. Rosenthal & J. Chen (Hrsg.), *Food Texturology: Measurement and Perception of Food Textural Properties* (S. 195–216). Springer International Publishing.
- Martínez-Esteso, M. J., Nørgaard, J., Brohée, M., Haraszi, R., Maquet, A., & O'Connor, G. (2016). Defining the Wheat Gluten Peptide Fingerprint via a Discovery and Targeted Proteomics Approach. *Journal of Proteomics*, 147, 156–168.
- Matissek, R., & Fischer, M. (2021). Massenspektrometrie. In R. Matissek & M. Fischer (Hrsg.), *Lebensmittelanalytik* (S. 151–165). Springer Berlin Heidelberg.
- McCann, T. H., & Day, L. (2013). Effect of Sodium Chloride on Gluten Network Formation, Dough Microstructure and Rheology in Relation to Breadmaking. *Journal of Cereal Science*, 57, 444–452.
- Mejri, M., Rogé, B., BenSouissi, A., Michels, F., & Mathlouthi, M. (2005). Effects of Some Additives on Wheat Gluten Solubility: A Structural Approach. *Food Chemistry*, 92, 7–15.
- Melis, S., Pauly, A., Gerits, L. R., Pareyt, B., & Delcour, J. A. (2017). Lipases as Processing Aids in the Separation of Wheat Flour Into Gluten and Starch: Impact on the Lipid Population, Gluten Agglomeration, and Yield. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 1932–1940.
- Melnyk, J., Dreisoerner, J., Bonomi, F., Marcone, M., & Seetharaman, K. (2011). Effect of the Hofmeister Series on Gluten Aggregation Measured Using a High Shear-Based Technique. *Food Research International*, 44, 893–896.
- Meyer, H. E., Fröhlich, T., Nordhoff, E., & Kuhlmann, K. (2022). Massenspektrometrie. In J. Kurreck, J. W. Engels & F. Lottspeich (Hrsg.), *Bioanalytik* (S. 359–414). Springer Berlin Heidelberg.

- Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J.-P., Lange, O., Wieghaus, A., Makarov, A., Nagaraj, N., Cox, J., Mann, M., & Horning, S. (2011). Mass Spectrometry-Based Proteomics Using Q Exactive, a High-Performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10, M111.011015.
- Miller, K. A., & Hoskeney, R. C. (1999). Effect of Oxidation on the Dynamic Rheological Properties of Wheat Flour-Water Doughs. *Cereal Chemistry*, 76, 100–104.
- Moayedallaie, S., Mirzaei, M., & Paterson, J. (2010). Bread Improvers: Comparison of a Range of Lipases with a Traditional Emulsifier. *Food Chemistry*, 122, 495–499.
- Nawrocka, A., Szymańska-Chargot, M., Miś, A., Ptaszyńska, A. A., Kowalski, R., Waśko, P., & Gruszecki, W. I. (2015). Influence of Dietary Fibre on Gluten Proteins Structure – A Study on Model Flour with Application of FT-Raman Spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 46, 309–316.
- Nawrocka, A., Miś, A., & Szymańska-Chargot, M. (2016a). Characteristics of Relationships Between Structure of Gluten Proteins and Dough Rheology – Influence of Dietary Fibres Studied by FT-Raman Spectroscopy. *Food Biophysics*, 11, 81–90.
- Nawrocka, A., Szymańska-Chargot, M., Miś, A., Kowalski, R., & Gruszecki, W. I. (2016b). Raman Studies of Gluten Proteins Aggregation Induced by Dietary Fibres. *Food Chemistry*, 194, 86–94.
- Némethy, G. (1967). Hydrophobic Interactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 6, 195–206.
- Nonaka, M., Li-Chan, E., & Nakai, S. (1993). Raman Spectroscopic Study of Thermally Induced Gelation of Whey Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1176–1181.
- Nonaka, M., Tanaka, H., Okiyama, A., Motoki, M., Ando, H., Umeda, K., & Matsuura, A. (1989). Polymerization of Several Proteins by Ca^{2+} -Independent Transglutaminase Derived From Microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 2619–2623.
- Okur, H. I., Hladílková, J., Rembert, K. B., Cho, Y., Heyda, J., Dzubiella, J., Cremer, P. S., & Jungwirth, P. (2017). Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 121, 1997–2014.
- Ortolan, F., Corrêa, G. P., da Cunha, R. L., & Steel, C. J. (2017). Rheological Properties of Vital Wheat Glutens With Water or Sodium Chloride. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 647–654.
- Osborne, T. B. (1907). *The Proteins of the Wheat Kernel*. Publication No. 84. Carnegie Institution of Washington, Judd Detweiler, Inc.
- Pareyt, B., Finnie, S. M., Putseys, J. A., & Delcour, J. A. (2011). Lipids in Bread Making: Sources, Interactions, and Impact on Bread Quality. *Journal of Cereal Science*, 54, 266–279.
- Pecquet, C., Bayrou, O., Vigan, M., Raison, N., & Laurière, M. (2004). Hydrolysed Wheat Protein: A New Allergen in Cosmetics and Food. *Contact Dermatitis*, 50, 182–183.
- Peña, E., Bernardo, A., Soler, C., & Jouve, N. (2006). Do Tyrosine Crosslinks Contribute to the Formation of the Gluten Network in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) Dough? *Journal of Cereal Science*, 44, 144–153.
- Pfeuti, G., Cant, J. P., Shoveller, A. K., & Bureau, D. P. (2019). A Novel Enzymatic Pre-treatment Improves Amino Acid Utilization in Feather Meal Fed to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 30, 1459–1474.

- Piber, M., & Köhler, P. (2005). Identification of Dehydro-Ferulic Acid-Tyrosine in Rye and Wheat: Evidence for a Covalent Cross-Link between Arabinoxylans and Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5276–5284.
- Pourmohammadi, K., & Abedi, E. (2021a). Enzymatic Modifications of Gluten Protein: Oxidative Enzymes. *Food Chemistry*, 356, 129679.
- Pourmohammadi, K., & Abedi, E. (2021b). Hydrolytic Enzymes and Their Directly and Indirectly Effects on Gluten and Dough Properties: An Extensive Review. *Food Science & Nutrition*, 9, 3988–4006.
- Prabhasankar, P., & Haridas Rao, P. (1999). Lipids in Wheat Flour Streams. *Journal of Cereal Science*, 30, 315–322.
- Prabhasankar, P., & Haridas Rao, P. (2001). Effect of Different Milling Methods on Chemical Composition of Whole Wheat Flour. *European Food Research and Technology*, 213, 465–469.
- Preston, K. R. (1981). Effects of Neutral Salts Upon Wheat Gluten Protein-Properties. I. Relationship Between the Hydrophobic Properties of Gluten Proteins and Their Extractability and Turbidity in Neutral Salts. *Cereal Chemistry*, 58, 317–324.
- Prestrelski, S. J., Tedeschi, N., Arakawa, T., & Carpenter, J. F. (1993). Dehydration-Induced Conformational Transitions in Proteins and Their Inhibition by Stabilizers. *Biophysical Journal*, 65, 661–671.
- Primo-Martín, C., Pijpekamp, A. v. d., Vliet, T. v., Jongh, H. H. J. d., Plijter, J. J., & Hamer, R. J. (2006). The Role of the Gluten Network in the Crispness of Bread Crust. *Journal of Cereal Science*, 43, 342–352.
- Pronin, D., Börner, A., Weber, H., & Scherf, K. A. (2020). Wheat (*Triticum aestivum* L.) Breeding from 1891 to 2010 Contributed to Increasing Yield and Glutenin Contents but Decreasing Protein and Gliadin Contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 13247–13256.
- Robertson, G. H., Cao, T. K., Gregorski, K. S., Hurkman, W. J., Tanaka, C. K., Chiou, B.-S., Glenn, G. M., & Orts, W. J. (2014). Modification of Vital Wheat Gluten with Phosphoric Acid to Produce High Free Swelling Capacity. *Journal of Applied Polymer Science*, 131, 39440.
- Rodriguez-Mateos, A., Millar, S. J., Bhandari, D. G., & Frazier, R. A. (2006). Formation of Dityrosine Cross-Links During Breadmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2761–2766.
- Rombouts, I., Lagrain, B., Brunnbauer, M., Köhler, P., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2011). Identification of Isopeptide Bonds in Heat-Treated Wheat Gluten Peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1236–43.
- Rombouts, I., Lagrain, B., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2010). β -Elimination Reactions and Formation of Covalent Cross-Links in Gliadin During Heating at Alkaline pH. *Journal of Cereal Science*, 52, 362–367.
- Rombouts, I., Lagrain, B., & Delcour, J. A. (2012). Heat-Induced Cross-Linking and Degradation of Wheat Gluten, Serum Albumin, and Mixtures Thereof. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10133–10140.
- Sadat, A., Corradini, M. G., & Joye, I. J. (2019). Molecular Spectroscopy to Assess Protein Structures Within Cereal Systems. *Current Opinion in Food Science*, 25, 42–51.

- Sadat, A., Corradini, M. G., & Joye, I. J. (2022). Vibrational and Fluorescence Spectroscopy to Study Gluten and Zein Interactions in Complex Dough Systems. *Current Research in Food Science*, 5, 479–490.
- Sadat, A., & Joye, I. J. (2020). Peak Fitting Applied to Fourier Transform Infrared and Raman Spectroscopic Analysis of Proteins. *Applied Sciences*, 10, 5918.
- Sarwin, R., Laskawy, G., & Grosch, W. (1993). Changes in the Levels of Glutathione and Cysteine During the Mixing of Doughs with L-threo- and D-erythro-Ascorbic Acid. *Cereal Chemistry*, 70, 553–557.
- Sayaslan, A., Seib, P. A., & Chung, O. K. (2010). Properties of Starch and Vital Gluten Isolated from Wheat Flour by Three Different Wet-Milling Methods. *Journal of Applied Biological Sciences*, 4, 57–62.
- Schalk, K., Lexhaller, B., Köhler, P., & Scherf, K. A. (2017). Isolation and Characterization of Gluten Protein Types from Wheat, Rye, Barley and Oats for Use as Reference Materials. *PLoS One*, 12, 0172819.
- Scherf, K., Umseher, L., Kieffer, R., & Köhler, P. (2016). Optimization of a Micro-Scale Extension Test for Rehydrated Vital Wheat Gluten. *Journal of Cereal Science*, 68, 140–147.
- Scherf, K. A., & Köhler, P. (2018). Optimization of Micro-Scale Extension Tests for Wheat Dough and Wet Gluten. *Journal of Cereal Science*, 79, 477–485.
- Schofield, J. D., Bottomley, R. C., Timms, M. F., & Booth, M. R. (1983). The Effect of Heat on Wheat Gluten and the Involvement of Sulphydryl-Disulphide Interchange Reactions. *Journal of Cereal Science*, 1, 241–253.
- Schopf, M., & Scherf, K. A. (2020). Predicting Vital Wheat Gluten Quality Using the Gluten Aggregation Test and the Microscale Extension Test. *Current Research in Food Science*, 3, 322–328.
- Schopf, M., & Scherf, K. A. (2021). Water Absorption Capacity Determines the Functionality of Vital Gluten Related to Specific Bread Volume. *Foods*, 10, 10020228.
- Schopf, M., Wehrli, M. C., Becker, T., Jekle, M., & Scherf, K. A. (2021). Fundamental Characterization of Wheat Gluten. *European Food Research and Technology*, 247, 985–997.
- Schrader, B. (1973). Chemical Applications of Raman Spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 12, 884–908.
- Segura, V., Díaz, J., Ruiz-Carnicer, Á., Muñoz-Suano, A., Carrillo-Carrión, C., Sousa, C., Cebolla, Á., & Comino, I. (2021). Rapid, Effective, and Versatile Extraction of Gluten in Food with Application on Different Immunological Methods. *Foods*, 10, 652.
- Shewry, P. R., Halford, N. G., & Tatham, A. S. (1992). High Molecular Weight Subunits of Wheat Glutenin. *Journal of Cereal Science*, 15, 105–120.
- Shewry, P. R., & Belton, P. S. (2024). What Do We Really Understand About Wheat Gluten Structure and Functionality? *Journal of Cereal Science*, 117, 103895.
- Sievert, D., Sapirstein, H. D., & Bushuk, W. (1991). Changes in Electrophoretic Patterns of Acetic Acid-Insoluble Wheat Flour Proteins During Dough Mixing. *Journal of Cereal Science*, 14, 243–256.
- Singh, S., & Singh, N. (2013). Relationship of Polymeric Proteins and Empirical Dough Rheology With Dynamic Rheology of Dough and Gluten From Different Wheat Varieties. *Food Hydrocolloids*, 33, 342–348.

- Sochorová, M., Vávrová, K., Fedorova, M., Ni, Z., Slenter, D., Kutmon, M., Willighagen, E., Letsiou, S., Törőcsik, D., Marchetti-Deschmann, M., Zoratto, S., Kremslehner, C., & Gruber, F. (2022). Research Techniques Made Simple: Lipidomic Analysis in Skin Research. *Journal of Investigative Dermatology*, 142, 4–11.
- Stampfli, L., & Nersten, B. (1995). Emulsifiers in Bread Making. *Food Chemistry*, 52, 353–360.
- Statistisches Bundesamt. (2024). Trend zu Fleischersatz ungebrochen: Produktion steigt 2023 um 16,6 % gegenüber dem Vorjahr. Abgerufen am 27.08.2024. https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2024/05/PD24_N018_42.html.
- Suttapitugsakul, S., Xiao, H., Smeekens, J., & Wu, R. (2017). Evaluation and Optimization of Reduction and Alkylation Methods to Maximize Peptide Identification with MS-based Proteomics. *Molecular BioSystems*, 13, 2574–2582.
- Swaney, D. L., Wenger, C. D., & Coon, J. J. (2010). Value of Using Multiple Proteases for Large-Scale Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Journal of Proteome Research*, 9, 1323–1329.
- Tatham, A. S., & Shewry, P. R. (1985). The Conformation of Wheat Gluten Proteins. The Secondary Structures and Thermal Stabilities of α -, β -, γ - and ω -Gliadins. *Journal of Cereal Science*, 3, 103–113.
- Tebben, L., Chen, G., Tilley, M., & Li, Y. (2022). Improvement of Whole Wheat Dough and Bread Properties by Emulsifiers. *Grain & Oil Science and Technology*, 5, 59–69.
- Thanhaeuser, S., Wieser, H., & Köhler, P. (2014). Correlation of Quality Parameters with the Baking Performance of Wheat Flours. *Cereal Chemistry*, 91, 333–341.
- Tilley, K. A., Benjamin, R. E., Bagorogoza, K. E., Okot-Kotber, B. M., Prakash, O., & Kwen, H. (2001). Tyrosine Cross-Links: Molecular Basis of Gluten Structure and Function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2627–2632.
- Tsiatsiani, L., & Heck, A. J. R. (2015). Proteomics Beyond Trypsin. *FEBS Journal*, 282, 2612–2626.
- Tuhumury, H., Small, D. M., & Day, L. (2014). The Effect of Sodium Chloride on Gluten Network Formation and Rheology. *Journal of Cereal Science*, 60, 229–237.
- Tuhumury, H., Small, D. M., & Day, L. (2016a). Effects of Hofmeister Salt Series on Gluten Network Formation: Part II. Anion Series. *Food Chemistry*, 212, 798–806.
- Tuhumury, H., Small, D., & Day, L. (2016b). Effects of Hofmeister Salt Series on Gluten Network Formation: Part I. Cation Series. *Food Chemistry*, 212, 789–797.
- Ukai, T., Matsumura, Y., & Urade, R. (2008). Disaggregation and Reaggregation of Gluten Proteins by Sodium Chloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1122–1130.
- Van Der Borgh, A., Goesaert, H., Veraverbeke, W. S., & Delcour, J. A. (2005). Fractionation of Wheat and Wheat Flour Into Starch and Gluten: Overview of the Main Processes and the Factors Involved. *Journal of Cereal Science*, 41, 221–237.
- Van Eckert, R., Berghofer, E., Ciclitira, P. J., Chirido, F., Denery-Papini, S., Ellis, H. J., Ferranti, P., Goodwin, P., Immer, U., Mamone, G., Méndez, E., Mothes, T., Novalín, S., Osman, A., Rumbo, M., Stern, M., Thorell, L., Whim, A., & Wieser, H. (2006). Towards a New Gliadin Reference Material—Isolation and Characterisation. *Journal of Cereal Science*, 43, 331–341.
- Vargas, M. C., & Simsek, S. (2021). Clean Label in Bread. *Foods*, 10, 2054.

- Veraverbeke, W. S., Courtin, C. M., Verbruggen, I. M., & Delcour, J. A. (1999). Factors Governing Levels and Composition of the Sodium Dodecyl Sulphate-Unextractable Glutenin Polymers During Straight Dough Breadmaking. *Journal of Cereal Science*, 29, 129–138.
- Vogel, C., Scherf, K. A., & Köhler, P. (2018). Effects of Thermal and Mechanical Treatments on the Physicochemical Properties of Wheat Flour. *European Food Research and Technology*, 244, 1367–1379.
- Volkin, D. B., & Klibanov, A. M. (1987). Thermal Destruction Processes in Proteins Involving Cystine Residues. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 2945–2950.
- Wall, J. S. (1971). Disulfide Bonds. Determination, Location, and Influence on Molecular Properties of Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19, 619–625.
- Wang, J., Sun, X., Xu, X., Sun, Q., Li, M., Wang, Y., & Xie, F. (2022). Wheat Flour-Based Edible Films: Effect of Gluten on the Rheological Properties, Structure, and Film Characteristics. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 11668.
- Wang, K.-Q., Luo, S.-Z., Zhong, X.-Y., Cai, J., Jiang, S.-T., & Zheng, Z. (2017a). Changes in Chemical Interactions and Protein Conformation During Heat-Induced Wheat Gluten Gel Formation. *Food Chemistry*, 214, 393–399.
- Wang, M., Hamer, R. J., van Vliet, T., Gruppen, H., Marseille, H., & Weegels, P. L. (2003). Effect of Water Unextractable Solids on Gluten Formation and Properties: Mechanistic Considerations. *Journal of Cereal Science*, 37, 55–64.
- Wang, M., van Vliet, T., & Hamer, R. J. (2005). Interaction of Water Unextractable Solids and Xylanase With Gluten Protein: Effect of Wheat Cultivar. *Journal of Cereal Science*, 41, 251–258.
- Wang, P., Zhao, X., Yang, R., Zhou, Y., Zhou, Q., Gu, Z., & Jiang, D. (2020). Water-Extractable Arabinoxylan-Induced Changes in the Conformation and Polymerization Behavior of Gluten Upon Thermal Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 4005–4016.
- Wang, Y., Gan, J., Zhou, Y., Cheng, Y., & Nirasawa, S. (2017b). Improving Solubility and Emulsifying Property of Wheat Gluten by Deamidation With Four Different Acids: Effect of Replacement of Folded Conformation by Extended Structure. *Food Hydrocolloids*, 72, 105–114.
- Wang, Z., Li, Y., Jiang, L., Qi, B., & Zhou, L. (2014). Relationship Between Secondary Structure and Surface Hydrophobicity of Soybean Protein Isolate Subjected to Heat Treatment. *Journal of Chemistry*, 2014, 475389.
- Weegels, P. L., Marseille, J. P., & Hamer, R. J. (1992). Enzymes as a Processing Aid in the Separation of Wheat Flour Into Starch and Gluten. *Starch - Stärke*, 44, 44–48.
- Weegels, P. L., Groot, A. d., Verhoek, J. A., & Hamer, R. J. (1994). Effects on Gluten of Heating at Different Moisture Contents. II. Changes in Physico-Chemical Properties and Secondary Structure. *Journal of Cereal Science*, 19, 39–47.
- Wehrle, K., Grau, H., & Arendt, E. K. (1997). Effects of Lactic Acid, Acetic Acid, and Table Salt on Fundamental Rheological Properties of Wheat Dough. *Cereal Chemistry*, 74, 739–744.
- Wehrli, M. C., Kratky, T., Schopf, M., Scherf, K. A., Becker, T., & Jekle, M. (2021). Thermally Induced Gluten Modification Observed with Rheology and Spectroscopies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, 26–33.

- Wellner, N., Bianchini, D., Mills, E. N. C., & Belton, P. S. (2003). Effect of Selected Hofmeister Anions on the Secondary Structure and Dynamics of Wheat Prolamins in Gluten. *Cereal Chemistry*, 80, 596–600.
- Wieser, H., & Kieffer, R. (2001). Correlations of the Amount of Gluten Protein Types to the Technological Properties of Wheat Flours Determined on a Micro-Scale. *Journal of Cereal Science*, 34, 19–27.
- Wieser, H. (1996). Relation Between Gliadin Structure and Coeliac Toxicity. *Acta Pædiatrica*, 85, 3–9.
- Wieser, H. (2007). Chemistry of Gluten Proteins. *Food Microbiology*, 24, 115–119.
- Wieser, H., Antes, S., & Seilmeier, W. (1998). Quantitative Determination of Gluten Protein Types in Wheat Flour by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Chemistry*, 75, 644–650.
- Wieser, H., Köhler, P., & Scherf, K. A. (2020). *Wheat - An Exceptional Crop: Botanical Features, Chemistry, Utilization, Nutritional and Health Aspects*. Woodhead Publishing und AACC International Press.
- Wieser, H., Köhler, P., & Scherf, K. A. (2023). Chemistry of Wheat Gluten Proteins: Qualitative Composition. *Cereal Chemistry*, 100, 23–35.
- Wieser, H., & Scherf, K. A. (2018). Preparation of a Defined Gluten Hydrolysate for Diagnosis and Clinical Investigations of Wheat Hypersensitivities. *Nutrients*, 10, 1411.
- Winther, J. R., & Thorpe, C. (2014). Quantification of Thiols and Disulfides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840, 838–846.
- Xhaferaj, M., & Scherf, K. A. (2024). Gluten Is Not Gluten. *Nutrients*, 16, 2745.
- Xie, W. J., & Gao, Y. Q. (2013). A Simple Theory for the Hofmeister Series. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 4, 4247–4252.
- Yeh, A., & Shiau, S. (1999). Effects of Oxido-Reductants on Rheological Properties of Wheat Flour Dough and Comparison With Some Characteristics of Extruded Noodles. *Cereal Chemistry*, 76, 614–620.
- Zhang, Y., & Cremer, P. S. (2006). Interactions Between Macromolecules and Ions: The Hofmeister Series. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10, 658–663.
- Zhou, Y., Zhao, D., Foster, T. J., Liu, Y., Wang, Y., Nirasawa, S., Tatsumi, E., & Cheng, Y. (2014). Konjac Glucomannan-Induced Changes in Thiol/Disulphide Exchange and Gluten Conformation Upon Dough Mixing. *Food Chemistry*, 143, 163–169.

A. Anhang

Tabelle 20: Genaue Dosierungen der dem Feuchtkleber zugesetzten Salze.

Salz	Molare Konzentration	Salzdosierung
	[mmol/g]	[g Salz/100 g Feuchtkleber]
KCl	0,086	0,64
KCl	0,513	3,83
NaCl	0,086	0,50
NaCl	0,513	3,00
MgCl ₂	0,043	0,41
MgCl ₂	0,257	2,44
CaCl ₂	0,043	0,48
CaCl ₂	0,257	2,85

A.1. Einfluss der Prozessparameter auf die Glutenproteinzusammensetzung

Tabelle 21: Gehalt der Gliadine und der Glutenproteintypen α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine, der Glutenine, ω b-Gliadine, *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS), der Summe aus Gliadinen und Gluteninen (Glia und Glut) und das Verhältnis von Gliadin zu Glutenin (Glia/Glut) von Vitalkleberproben ohne Zusatz, die bei unterschiedlichen Trocknungstemperaturen getrocknet wurden. Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben (n = 3). Signifikante Unterschiede zwischen den Vitalkleberproben sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet (ANOVA, Tukey's-Test, $p \leq 0,05$). Der Variationskoeffizient (*Coefficient of Variation*, CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben.

Probe	Trocknungs- temperatur	Gliadine gesamt	ω 5-Gliadine	ω 1,2-Gliadine	α -Gliadine	γ -Gliadine	Glutenine gesamt	ω b-Gliadine	HMW-GS	LMW-GS	Summe Gliadine und Glutenine	Verhältnis Gliadine/Glutenine
		[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	
ohne Zusatz	Gefrier- trocknung	478,8 ^c	34,1 ^b	43,9 ^c	207,8 ^b	193,0 ^d	336,7 ^b	23,6 ^{bc}	81,7 ^b	231,4 ^a	815,5 ^b	1,42 ^c
ohne Zusatz	40	439,0 ^b	31,9 ^a	40,7 ^b	195,4 ^a	171,0 ^b	322,1 ^a	21,6 ^a	77,9 ^a	222,6 ^a	761,0 ^a	1,36 ^{bc}
ohne Zusatz	65	467,3 ^c	34,7 ^b	43,6 ^c	207,2 ^b	181,7 ^c	352,0 ^c	22,6 ^{ab}	85,1 ^c	244,3 ^b	819,3 ^b	1,33 ^b
ohne Zusatz	80	399,0 ^a	32,9 ^a	40,4 ^a	182,2 ^a	143,5 ^a	398,6 ^d	24,8 ^c	89,4 ^d	284,4 ^c	797,6 ^b	1,00 ^a
CV		0,06	0,04	0,04	0,04	0,09	0,08	0,05	0,05	0,10	0,03	0,12

Tabelle 22: Gehalt der Gliadine und der Glutenproteintypen α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine, der Glutenine, ω b-Gliadine, *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS), der Summe aus Gliadinen und Gluteninen (Glia und Glut) und das Verhältnis von Gliadin zu Glutenin (Glia/Glut) von Vitalkleberproben ohne Zusatz, die bei unterschiedlichen Vermahlungsparametern gemahlen wurden. Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben (n = 3). Signifikante Unterschiede zwischen den Vitalkleberproben sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet (ANOVA, Tukey's-Test, $p \leq 0,05$). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben.

Probe	Siebma- schen- größe	Umdrehungs- zahl	Gliadine gesamt	ω 5-Gliadine	ω 1,2-Gliadine	α -Gliadine	γ -Gliadine	Glutenine gesamt	ω b-Gliadine	HMW-GS	LMW-GS	Summe Gliadine und Glutenine	Verhältnis Gliadine/ Glutenine
	μm	U/min	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	
ohne Zusatz	80	6000	39,6 ^{ab}	3,0 ^{ab}	3,3 ^a	18,7 ^b	14,6 ^{ab}	30,3 ^a	1,8 ^a	6,7 ^a	21,8 ^a	69,8 ^a	1,31 ^{cd}
ohne Zusatz	80	20000	41,1 ^b	3,2 ^b	3,4 ^a	19,1 ^b	15,4 ^b	30,4 ^a	1,8 ^a	6,6 ^a	22,0 ^a	71,5 ^{ab}	1,35 ^d
ohne Zusatz	200	6000	39,4 ^{ab}	3,1 ^{ab}	3,4 ^a	18,1 ^{ab}	14,8 ^{ab}	34,3 ^b	2,1 ^b	7,5 ^b	24,8 ^b	73,8 ^b	1,15 ^b
ohne Zusatz	200	20000	40,3 ^b	3,1 ^{ab}	3,5 ^a	18,7 ^b	15,0 ^{ab}	33,0 ^b	2,0 ^{ab}	7,1 ^b	23,8 ^b	73,3 ^b	1,22 ^{bc}
ohne Zusatz	500	6000	37,1 ^a	2,9 ^a	3,2 ^a	17,1 ^a	13,9 ^a	36,4 ^c	2,3 ^b	7,9 ^c	26,2 ^c	73,5 ^b	1,02 ^a
ohne Zusatz	500	20000	38,4 ^{ab}	3,0 ^{ab}	3,31 ^a	17,9 ^{ab}	14,3 ^{ab}	33,8 ^b	2,1 ^b	7,4 ^b	24,3 ^b	72,2 ^{ab}	1,14 ^{ab}
CV			0,04	0,04	0,03	0,04	0,04	0,07	0,09	0,07	0,07	0,02	0,10

A.2. Einfluss von Zusätzen auf die Glutenproteinfunktionalität

A.2.1. Mikrozugversuch

Tabelle 23: Per Mikrozugversuch bestimmter Dehnwiderstand (R_{\max}), Dehnbarkeit (E_{\max}) und Verhältnis aus Dehnbarkeit und Dehnwiderstand (E_{\max}/R_{\max}) von Feuchtkleberproben mit Salzen, Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) und Kontrollprobe ohne Zusatz. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben ($n = 12$). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben. Proben mit Salzen, PS 20 und AS wurden jeweils separat statistisch ausgewertet. Die Daten wurden bereits in Höller & Scherf (2024) veröffentlicht.

	R_{\max}	E_{\max}	E_{\max}/R_{\max}
	[N]	[mm]	
Kontrolle	1,38	84,3	61,2
0,64 % KCl	1,11 ^{A,B}	101,1 ^{A,B}	90,8 ^A
3,83 % KCl	1,40 ^B	123,3 ^{A,B}	88,4 ^A
0,50 % NaCl	1,27 ^{A,B}	105,0 ^A	83,4 ^A
3,00 % NaCl	1,47 ^{A,B}	111,0 ^A	76,5 ^A
0,41 % $MgCl_2$	1,05 ^{A,B}	106,3 ^A	102,4 ^{A,B}
2,44 % $MgCl_2$	0,91 ^{A,B}	109,8 ^A	120,9 ^{A,B}
0,48 % $CaCl_2$	0,91 ^A	95,9 ^A	106,1 ^A
2,85 % $CaCl_2$	1,18 ^A	100,2 ^A	70,2 ^A
0,25 % PS 20	1,04 ^{A,B}	82,8 ^B	106,3 ^B
1,00 % PS 20	0,95 ^{A,B}	110,1 ^{A,B}	105,6 ^{A,B}
20 mg/kg AS	1,35 ^B	71,9 ^{A,B}	54,1
200 mg/kg AS	1,23 ^{A,B}	64,8 ^{A,B}	52,9
CV	0,17	0,17	0,26

^A Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

^B Signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen desselben Zusatzes (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

A.2.2. Oszillationsrheologie

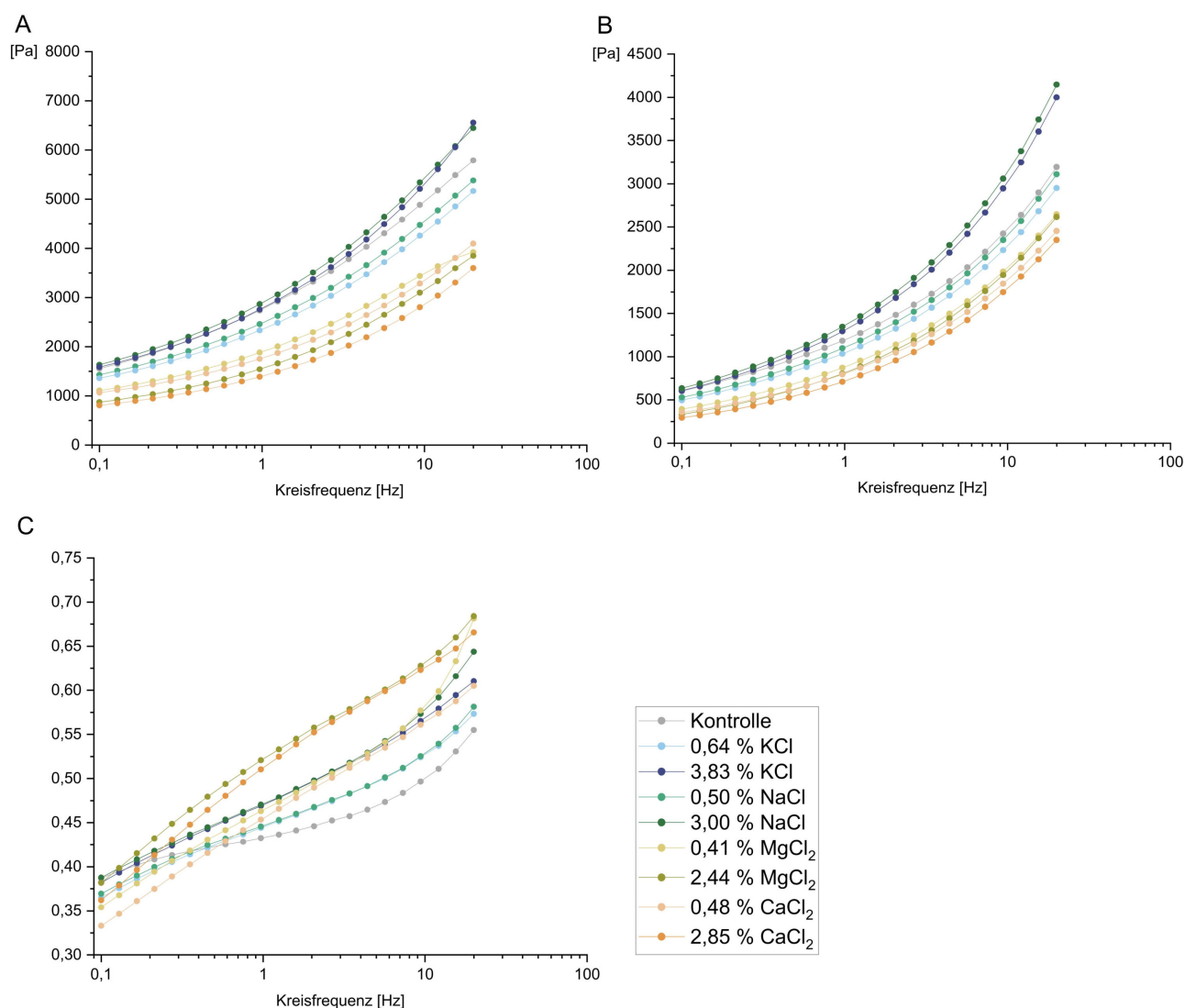


Abbildung 30: Rheologische Charakterisierung von Feuchtkleberproben mit oszillierendem Frequenzsweep. Kurven des Speichermoduls G' (A), des Verlustmoduls G'' (B) und des Verlustfaktors $\tan \delta$ (C) der mit Salz behandelten Feuchtkleberproben und der Kontrollprobe ohne Salz. Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben ($n = 3$).

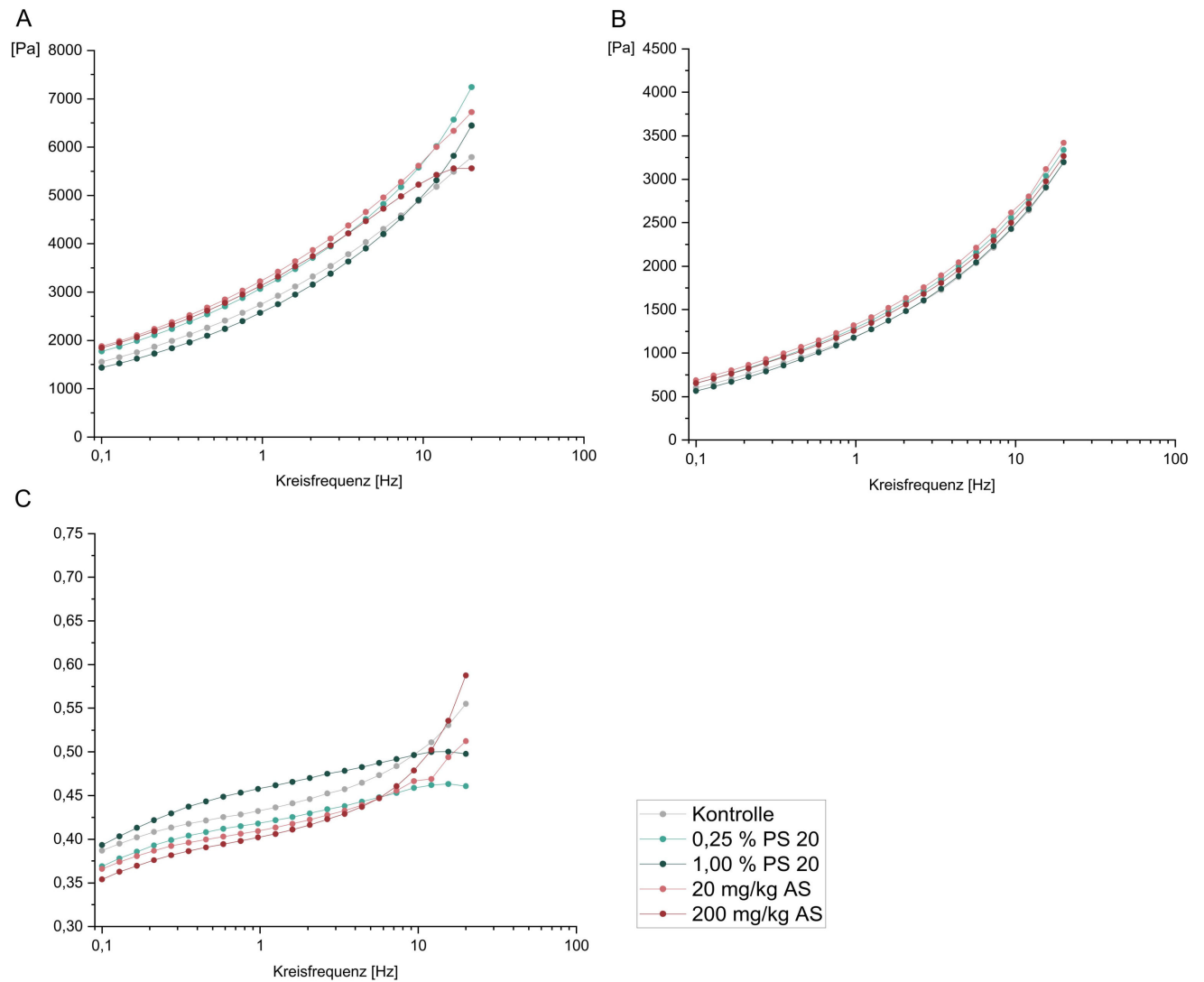


Abbildung 31: Rheologische Charakterisierung von Feuchtkleberproben mit oszillierendem Frequenzsweep. Kurven des Speichermoduls G' (A), des Verlustmoduls G'' (B) und des Verlustfaktors $\tan \delta$ (C) der mit Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) behandelten Feuchtkleberproben und der Kontrollprobe ohne Zusatz. Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben ($n = 3$).

A.3. Einfluss von Zusätzen auf die Glutenproteinzusammensetzung

A.3.1. Rohproteingehalt

Tabelle 24: Rohproteingehalt der mit Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) behandelten Proben und der Kontrollproben ohne Zusatz bei 40 °C und 80 °C Trocknungstemperatur. Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben (n = 3). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben. Proben mit PS 20 und AS wurden jeweils separat statistisch ausgewertet.

Probe	Trocknungstemperatur	Rohproteingehalt
		[%]
Kontrolle	40 °C	78,8 ^B
0,25 % PS 20	40 °C	79,2 ^{B,C}
1,00 % PS 20	40 °C	77,6 ^{A, B,C}
20 mg/kg AS	40 °C	78,8 ^{B,C}
200 mg/kg AS	40 °C	78,3 ^{B,C}
Kontrolle	80 °C	82,5 ^B
0,25 % PS 20	80 °C	81,3 ^{B,C}
1,00 % PS 20	80 °C	80,2 ^{B,C}
20 mg/kg AS	80 °C	80,2 ^{B,C}
200 mg/kg AS	80 °C	81,6 ^{B,C}
CV		0,02

^A Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-test, $p \leq 0,05$, n = 3).

^B Signifikanter Unterschied zwischen der gleichen Probe bei verschiedenen Trocknungstemperaturen (ANOVA mit Tukey's Test, $p \leq 0,05$, n = 3).

^C Signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen desselben Zusatzes bei gleicher Trocknungstemperatur (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, n = 3).

A.3.2. Gehalt an Gliadinen und Gluteninen

Tabelle 25: Gehalt der Gliadine und der Glutenproteintypen α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine, der Glutenine, ω b-Gliadine, *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS), der Summe aus Gliadinen und Gluteninen (Glia und Glut) und das Verhältnis von Gliadin zu Glutenin (Glia/Glut) in salzbehandelten Proben und Kontrollproben ohne Salz bei 40 °C und 80 °C Trocknungstemperatur. Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben (n = 3). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben. Die Daten wurden bereits in Höller & Scherf (2024) veröffentlicht.

Probe	Trocknungs- temperatur	Gliadine gesamt	ω 5-Gliadine	ω 1,2-Gliadine	α -Gliadine	γ -Gliadine	Glutenine gesamt	ω b-Gliadine	HMW-GS	LMW-GS	Summe Gliadine und Glutenine	Verhältnis Gliadine/Glutenine
		[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	
Kontrolle	40 °C	438,7 ^B	32,0	40,4	195,1	171,2 ^B	319,2 ^B	21,2 ^B	77,6 ^B	220,4 ^B	758,0 ^B	1,37 ^B
0,64 % KCl	40 °C	472,8	34,4 ^{A,B}	43,2 ^{A,B}	206,7 ^A	188,5 ^{A,B}	291,3 ^{A,B,C}	17,1 ^{A,B,C}	74,2 ^{A,B,C}	200,1 ^{A,B,C}	764,1 ^{B,C}	1,62 ^{A,B,C}
3,83 % KCl	40 °C	470,4 ^{A,B}	34,3 ^{A,B}	42,8 ^A	204,5 ^A	188,8 ^{A,B}	267,2 ^{A,B,C}	15,2 ^{A,B,C}	69,9 ^{A,B,C}	182,1 ^{A,B,C}	737,5 ^{A,B,C}	1,76 ^{A,B,C}
0,50 % NaCl	40 °C	478,9 ^{A,B,C}	34,7 ^{A,B,C}	43,3 ^{A,C}	208,1 ^{A,C}	192,8 ^{A,B,C}	295,4 ^{A,B,C}	18,0 ^{A,B,C}	73,1 ^{A,B}	204,2 ^{A,B,C}	774,2 ^{A,B,C}	1,62 ^{A,B}
3,00 % NaCl	40 °C	444,1 ^{B,C}	32,3 ^{B,C}	41,4 ^{A,C}	192,2 ^C	178,2 ^{A,B,C}	279,3 ^{A,B,C}	16,7 ^{A,B,C}	70,8 ^{A,B}	191,8 ^{A,B,C}	723,4 ^{A,B,C}	1,59 ^{A,B}
0,41 % MgCl ₂	40 °C	514,6 ^{A,B,C}	38,4 ^{A,B,C}	45,2 ^{A,C}	224,0 ^{A,B,C}	207,0 ^{A,B,C}	287,8 ^{A,B,C}	16,9 ^{A,B,C}	74,7 ^{A,B,C}	196,2 ^{A,B,C}	802,4 ^{A,B,C}	1,79 ^{A,B,C}
2,44 % MgCl ₂	40 °C	427,6 ^{A,B,C}	33,9 ^{A,B,C}	41,7 ^{A,B,C}	193,1 ^{B,C}	158,9 ^{A,B,C}	268,2 ^{A,B,C}	14,3 ^{A,B,C}	68,4 ^{A,B,C}	185,5 ^{A,B,C}	695,8 ^{A,B,C}	1,59 ^{A,B,C}
0,48 % CaCl ₂	40 °C	494,4 ^{A,B,C}	36,8 ^{A,B,C}	44,8 ^{A,C}	218,7 ^{A,B,C}	194,1 ^{A,B,C}	274,8 ^{A,B,C}	15,9 ^{A,B,C}	70,4 ^{A,B,C}	188,5 ^{A,B}	769,3 ^{B,C}	1,80 ^{A,B}
2,85 % CaCl ₂	40 °C	468,0 ^{A,B,C}	38,0 ^{A,B,C}	42,4 ^{A,C}	212,7 ^{A,B,C}	173,6 ^{B,C}	257,6 ^{A,B,C}	13,8 ^{A,B,C}	65,3 ^{A,B,C}	178,5 ^{A,B}	725,5 ^{A,B,C}	1,82 ^{A,B}
Kontrolle	80 °C	419,4 ^B	32,6	40,2	191,9	154,7 ^B	396,8 ^B	24,3 ^B	88,5 ^B	284,0 ^B	816,2 ^B	1,06 ^B
0,64 % KCl	80 °C	459,1 ^{A,B}	36,5 ^{A,B,C}	44,6 ^{A,B,C}	204,2 ^A	173,8 ^{A,B}	353,7 ^{A,B,C}	20,3 ^{A,B,C}	86,2 ^{A,B,C}	247,2 ^{A,B,C}	812,7 ^{B,C}	1,30 ^{A,B,C}
3,83 % KCl	80 °C	455,2 ^{A,B}	35,5 ^{A,B,C}	42,5 ^{A,C}	202,3 ^A	175,0 ^{A,B}	313,5 ^{A,B,C}	18,1 ^{A,B,C}	79,7 ^{A,B,C}	215,7 ^{A,B,C}	768,7 ^{A,B,C}	1,45 ^{A,B,C}
0,50 % NaCl	80 °C	461,4 ^{A,B,C}	36,4 ^{A,B,C}	43,8 ^{A,C}	204,6 ^{A,C}	176,5 ^{A,B,C}	353,6 ^{A,B}	20,8 ^{A,B}	84,9 ^{A,B}	247,9 ^{A,B}	815,0 ^{B,C}	1,31 ^{A,B}
3,00 % NaCl	80 °C	430,6 ^{A,B,C}	34,7 ^{A,B,C}	41,0 ^{A,C}	191,3 ^C	163,7 ^{A,B,C}	338,6 ^{A,B}	19,3 ^{A,B}	84,3 ^{A,B}	235,1 ^{A,B}	769,3 ^{A,B,C}	1,27 ^{A,B}
0,41 % MgCl ₂	80 °C	489,0 ^{A,B,C}	39,9 ^{A,B}	45,7 ^{A,C}	215,2 ^{A,B}	188,2 ^{A,B,C}	353,8 ^{A,B,C}	19,8 ^{A,B,C}	85,7 ^{A,B,C}	353,8 ^{A,B,C}	842,8 ^{A,B,C}	1,38 ^{A,B,C}
2,44 % MgCl ₂	80 °C	472,3 ^{A,B,C}	40,4 ^{A,B}	44,7 ^{A,B,C}	175,1 ^{A,B}	175,1 ^{A,B,C}	307,6 ^{A,B,C}	15,7 ^{A,B,C}	76,1 ^{A,B,C}	307,6 ^{A,B,C}	779,9 ^{A,B,C}	1,54 ^{A,B,C}
0,48 % CaCl ₂	80 °C	465,3 ^{A,B,C}	38,8 ^{A,B}	44,7 ^{A,C}	208,8 ^{A,B,C}	173,0 ^{A,B,C}	347,7 ^{A,B,C}	19,1 ^{A,B,C}	82,9 ^{A,B,C}	245,7 ^{A,B,C}	813,0 ^{B,C}	1,34 ^{A,B}
2,85 % CaCl ₂	80 °C	441,9 ^{A,B,C}	39,6 ^{A,B}	43,1 ^{A,C}	201,3 ^{A,B,C}	157,9 ^{B,C}	323,7 ^{A,B,C}	15,8 ^{A,B,C}	78,7 ^{A,B,C}	229,3 ^{A,B,C}	765,6 ^{A,B,C}	1,37 ^{A,B}
CV		0,05	0,07	0,04	0,06	0,08	0,12	0,15	0,09	0,21	0,05	0,14

^A Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

^B Signifikanter Unterschied zwischen der gleichen Probe bei verschiedenen Trocknungstemperaturen (ANOVA mit Tukey's Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

^C Signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen desselben Salzes bei gleicher Trocknungstemperatur (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

Tabelle 26: Gehalt der Gliadine und der Glutenproteintypen α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine, der Glutenine, ω b-Gliadine, *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS), der Summe aus Gliadinen und Gluteninen (Glia und Glut) und das Verhältnis von Gliadin zu Glutenin (Glia/Glut) in Proben mit Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) und Kontrollproben ohne Zusatz bei 40 °C und 80 °C Trocknungstemperatur. Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben (n = 3). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben. Proben mit PS 20 und AS wurden jeweils separat statistisch ausgewertet.

Probe	Trocknungs- temperatur	Gliadine gesamt	ω 5-Gliadine	ω 1,2-Gliadine	α -Gliadine	γ -Gliadine	Glutenine gesamt	ω b-Gliadine	HMW-GS	LMW-GS	Summe Gliadine und Glutenine	Verhältnis Gliadine/Glutenine
		[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	
Kontrolle	40 °C	438,7 ^B	32,0	40,4	195,1	171,2 ^B	319,2 ^B	21,2 ^B	77,6 ^B	220,4 ^B	758,0 ^B	1,37 ^B
0,25 % PS 20	40 °C	487,1 ^{A,B}	22,7 ^{A,B}	45,0 ^A	217,6 ^{A,B}	201,7 ^{A,B}	356,5 ^{A,B}	18,3 ^A	81,8 ^{A,B}	256,5 ^{A,B}	843,6 ^A	1,37 ^B
1,00 % PS 20	40 °C	478,2 ^{A,B}	22,7 ^A	44,2 ^A	212,6 ^A	198,8 ^{A,B}	349,8 ^{A,B}	17,8 ^{A,B}	80,3 ^{A,B}	251,7 ^{A,B}	828,0 ^{A,B}	1,37 ^B
20 mg/kg AS	40 °C	483,5 ^{A,B}	23,0 ^{A,B}	44,4 ^A	216,0 ^{A,B,C}	200,1 ^{A,B}	363,4 ^{A,B}	19,0 ^A	83,5 ^{A,B}	260,9 ^{A,B}	857,1 ^A	1,33 ^{A,B,C}
200 mg/kg AS	40 °C	472,4 ^A	22,3 ^{A,B}	44,6 ^{A,B}	210,2 ^{A,C}	195,4 ^{A,B}	366,0 ^{A,B}	19,2 ^{A,B}	82,5 ^{A,B}	264,3 ^{A,B}	848,0 ^{A,B}	1,29 ^{A,B,C}
Kontrolle	80 °C	419,4 ^{A,B}	32,6	40,2	191,9	154,7 ^B	396,8 ^B	24,3 ^B	88,5 ^B	284,0 ^B	816,2 ^B	1,06 ^B
0,25 % PS 20	80 °C	458,5 ^{A,B}	24,1 ^{A,B}	44,5 ^A	209,3 ^{A,B}	180,7 ^{A,B}	398,6 ^B	19,6 ^A	88,1 ^B	290,9 ^B	846,9 ^A	1,15 ^{A,B}
1,00 % PS 20	80 °C	454,6 ^{A,B}	23,7 ^A	44,5 ^A	207,3 ^A	207,3 ^{A,B}	393,3 ^B	19,9 ^{A,B}	86,6 ^B	286,8 ^B	838,4 ^{A,B}	1,16 ^{A,B}
20 mg/kg AS	80 °C	462,7 ^{A,B}	24,1 ^{A,B}	45,1 ^A	210,2 ^{A,B}	183,4 ^{A,B}	392,9 ^{B,C}	20,5 ^A	87,7 ^B	284,7 ^{B,C}	855,6 ^A	1,18 ^{A,B,C}
200 mg/kg AS	80 °C	462,0 ^A	24,2 ^{A,B}	45,8 ^{A,B}	212,4 ^A	179,5 ^{A,B}	403,9 ^{B,C}	21,1 ^{A,B}	89,3 ^B	293,6 ^{B,C}	865,9 ^{A,B}	1,14 ^{A,B,C}
CV		0,03	0,03	0,01	0,02	0,06	0,06	0,06	0,04	0,06	0,01	0,08

^A Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-test, $p \leq 0,05$, n = 3).

^B Signifikanter Unterschied zwischen der gleichen Probe bei verschiedenen Trocknungstemperaturen (ANOVA mit Tukey's Test, $p \leq 0,05$, n = 3).

^C Signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen desselben Zusatzes bei gleicher Trocknungstemperatur (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, n = 3).

A.3.3. Gehalt an Natriumdodecylsulfat-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer

Tabelle 27: Gehalt SDS-löslicher Proteine (SDSL), Gesamtgehalt an Gluteninmakropolymer (GMP) und Gehalt an *Low-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (LMW-GMP), *High-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (HMW-GMP), der Summe aus SDS-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer und das Verhältnis aus SDS-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer (SDSL/GMP) in salzbehandelten Proben und Kontrollproben ohne Salz bei 40 °C und 80 °C Trocknungstemperatur. Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben (n = 3). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben. Die Daten wurden bereits in Höller & Scherf (2024) veröffentlicht.

Probe	Trocknungs- temperatur	SDSL [mg/g]	GMP gesamt [mg/g]	HMW-GMP [mg/g]	LMW-GMP [mg/g]	Summe SDSL und GMP [mg/g]	Verhältnis SDSL/GMP
Kontrolle	40 °C	645,9 ^B	215,4 ^B	49,6 ^B	165,9 ^B	861,4	3,00 ^B
0,64 % KCl	40 °C	613,8 ^{A,B,C}	240,9 ^{B,C}	60,4 ^{B,C}	180,5 ^{B,C}	854,7 ^C	2,55 ^B
3,83 % KCl	40 °C	538,4 ^{A,C}	184,3 ^{B,C}	45,3 ^{B,C}	139,0 ^{B,C}	722,8 ^{A,B,C}	2,94 ^B
0,50 % NaCl	40 °C	617,8 ^{B,C}	185,7 ^{B,C}	45,4 ^{B,C}	140,2 ^{B,C}	803,5 ^B	3,33 ^{B,C}
3,00 % NaCl	40 °C	565,5 ^{A,C}	240,1 ^C	62,0 ^{A,C}	178,1 ^C	805,6	2,36 ^{A,C}
0,41 % MgCl ₂	40 °C	638,1 ^{B,C}	213,4 ^B	52,8 ^B	160,6 ^B	851,5 ^C	2,99 ^{B,C}
2,44 % MgCl ₂	40 °C	534,4 ^{A,C}	205,8 ^B	52,3 ^B	153,5 ^B	740,2 ^{A,B,C}	2,60 ^{A,C}
0,48 % CaCl ₂	40 °C	554,8 ^A	189,3 ^{B,C}	46,1 ^{B,C}	143,3 ^{B,C}	744,1 ^{A,B,C}	2,93 ^{B,C}
2,85 % CaCl ₂	40 °C	566,7 ^{A,B}	105,9 ^{A,B,C}	23,5 ^{A,B,C}	82,3 ^{A,B,C}	672,5 ^{A,B,C}	5,39 ^{A,B,C}
Kontrolle	80 °C	540,1 ^B	320,4 ^B	84,1 ^B	236,3 ^B	860,5	1,69 ^B
0,64 % KCl	80 °C	554,6	290,4 ^{A,B,C}	80,0 ^{B,C}	210,4 ^{A,B,C}	845,0	1,91 ^B
3,83 % KCl	80 °C	546,7	253,7 ^{A,B,C}	69,4 ^{A,B,C}	184,3 ^{A,B,C}	800,4 ^{A,B}	2,16 ^{A,B}
0,50 % NaCl	80 °C	561,6	295,8 ^{A,B,C}	76,1 ^{A,B,C}	219,8 ^{A,B,C}	857,4 ^{B,C}	1,90 ^B
3,00 % NaCl	80 °C	530,6	242,9 ^{A,C}	66,3 ^{A,C}	176,7 ^{A,C}	773,5 ^{A,C}	2,19 ^A
0,41 % MgCl ₂	80 °C	562,1	286,8 ^{A,B,C}	80,5 ^{B,C}	206,4 ^{A,B,C}	848,9	1,96 ^{A,B}
2,44 % MgCl ₂	80 °C	562,4	240,3 ^{A,B,C}	61,6 ^{A,B,C}	178,7 ^{A,B,C}	802,6 ^{A,B}	2,34 ^A
0,48 % CaCl ₂	80 °C	554,2	283,4 ^{A,B,C}	74,4 ^{A,B}	209,0 ^{A,B,C}	837,6 ^{B,C}	1,96 ^{A,B}
2,85 % CaCl ₂	80 °C	519,6 ^B	251,0 ^{A,B,C}	67,2 ^{A,B}	183,9 ^{A,B,C}	770,7 ^{A,B,C}	2,07 ^{A,B}
CV		0,07	0,22	0,26	0,21	0,07	0,33

^A Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

^B Signifikanter Unterschied zwischen der gleichen Probe bei verschiedenen Trocknungstemperaturen (ANOVA mit Tukey's Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

^C Signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen desselben Salzes bei gleicher Trocknungstemperatur (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

Tabelle 28: Gehalt SDS-löslicher Proteine (SDSL), Gesamtgehalt an Gluteninmakropolymer (GMP) und Gehalt an *Low-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (LMW-GMP), *High-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (HMW-GMP), der Summe aus SDS-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer und das Verhältnis aus SDS-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer (SDSL/GMP) in Proben mit Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) und Kontrollproben ohne Zusatz bei 40 °C und 80 °C Trocknungstemperatur. Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben (n = 3). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben. Proben mit PS 20 und AS wurden jeweils separat statistisch ausgewertet.

Probe	Trocknungs- temperatur	SDSL	GMP gesamt	HMW-GMP	LMW-GMP	Summe SDSL und GMP	Verhältnis SDSL/GMP
		[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	
Kontrolle	40 °C	645,9 ^B	215,4 ^B	49,6 ^B	165,9 ^B	861,4	3,00 ^B
0,25 % PS 20	40 °C	595,6 ^{A,B,C}	199,9 ^{A,B}	54,2 ^{A,B,C}	145,7 ^{A,B}	795,5 ^{B,C}	2,98 ^{B,C}
1,00 % PS 20	40 °C	692,5 ^{A,B,C}	190,8 ^{A,B}	46,3 ^{B,C}	144,5 ^{A,B}	883,3 ^{B,C}	3,63 ^{A,B,C}
20 mg/kg AS	40 °C	688,5 ^{A,B}	216,4 ^B	54,1 ^{A,B}	162,3 ^B	904,9 ^A	3,18 ^{B,C}
200 mg/kg AS	40 °C	663,8	227,4 ^B	59,1 ^{A,B}	168,3 ^B	891,2 ^B	2,92 ^{B,C}
Kontrolle	80 °C	540,1 ^B	320,4 ^B	84,1 ^B	236,3 ^B	860,5	1,69 ^B
0,25 % PS 20	80 °C	628,0 ^{A,B}	301,1 ^B	77,8 ^B	223,2 ^B	929,1 ^{A,B}	2,09 ^{A,B}
1,00 % PS 20	80 °C	640,7 ^{A,B}	295,8 ^{A,B}	78,0 ^B	217,8 ^{A,B}	936,5 ^{A,B}	2,17 ^{A,B}
20 mg/kg AS	80 °C	646,7 ^{A,B}	275,5 ^{A,B,C}	73,5 ^{A,B,C}	202,2 ^{A,B,C}	922,1 ^A	2,35 ^{A,B,C}
200 mg/kg AS	80 °C	635,5 ^A	306,6 ^{B,C}	82,2 ^{B,C}	223,7 ^{B,C}	941,5 ^{A,B}	2,08 ^{A,B,C}
CV		0,05	0,19	0,21	0,19	0,05	0,22

^A Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-test, $p \leq 0,05$, n = 3).

^B Signifikanter Unterschied zwischen der gleichen Probe bei verschiedenen Trocknungstemperaturen (ANOVA mit Tukey's Test, $p \leq 0,05$, n = 3).

^C Signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen desselben Zusatzes bei gleicher Trocknungstemperatur (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, n = 3).

A.3.4. Gehalt an freien und gebundenen Thiolen

Tabelle 29: Gehalt an freien (SH) und gebundenen (SS) Thiolen, Gesamtthiolgehalt (SH und SS) und Verhältnis aus gebundenen und freien Thiolen (SS/SH) in salzbehandelten Proben und Kontrollproben ohne Salz bei 40 °C und 80 °C Trocknungstemperatur. Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben (n = 3). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben. Die Daten wurden bereits in Höller & Scherf (2024) veröffentlicht.

Probe	Trocknungs- temperatur	SH	SS	Gesamtthiolgehalt (SH und SS)	Verhältnis SS/SH
		[$\mu\text{mol/g Protein}$]	[$\mu\text{mol/g Protein}$]	[$\mu\text{mol/g Protein}$]	
Kontrolle	40 °C	1,63 ^B	27,14 ^B	28,77	16,64 ^B
0,64 % KCl	40 °C	1,32 ^{A,B,C}	20,25 ^{A,B,C}	21,57 ^{A, B, C}	15,38 ^B
3,83 % KCl	40 °C	1,38 ^{A,B,C}	26,78 ^C	28,16 ^C	19,43 ^A
0,50 % NaCl	40 °C	1,39 ^{A,B,C}	27,39 ^C	28,78 ^C	19,76 ^A
3,00 % NaCl	40 °C	1,08 ^{A,B,C}	17,88 ^{A,B,C}	18,96 ^{A, B, C}	16,52 ^B
0,41 % MgCl ₂	40 °C	1,23 ^{A,B,C}	24,84 ^B	26,07 ^B	20,21 ^{A,B,C}
2,44 % MgCl ₂	40 °C	0,75 ^{A,C}	21,89 ^{A,B}	22,64 ^{A, B}	29,33 ^{A,B,C}
0,48 % CaCl ₂	40 °C	1,12 ^{A,B,C}	25,80 ^B	26,92	22,99 ^{A,B}
2,85 % CaCl ₂	40 °C	0,97 ^{A,B,C}	24,23 ^B	25,20 ^{A, B}	24,95 ^{A,B}
Kontrolle	80 °C	1,20 ^B	30,03 ^B	31,23	24,98 ^B
0,64 % KCl	80 °C	1,03 ^{A,B}	24,93 ^{A,B}	25,96 ^{A, B}	24,21 ^B
3,83 % KCl	80 °C	0,99 ^{A,B}	23,31 ^A	24,31 ^A	23,44
0,50 % NaCl	80 °C	1,00 ^{A,B,C}	24,00 ^A	25,01 ^A	23,88 ^C
3,00 % NaCl	80 °C	0,87 ^{A,B,C}	25,38 ^{A,B}	26,24 ^{A, B}	29,30 ^{A,B,C}
0,41 % MgCl ₂	80 °C	0,83 ^{A,B,C}	30,63 ^B	31,45 ^B	37,04 ^{A,B}
2,44 % MgCl ₂	80 °C	0,70 ^{A,B,C}	26,96 ^B	27,66 ^{A, B}	38,38 ^{A,B}
0,48 % CaCl ₂	80 °C	0,78 ^{A,B,C}	29,90 ^{B,C}	30,68 ^C	38,22 ^{A,B}
2,85 % CaCl ₂	80 °C	0,57 ^{A,B,C}	19,40 ^{A,B,C}	19,96 ^{A, B, C}	34,17 ^{A,B}
CV		0,26	0,14	0,14	0,29

^A Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

^B Signifikanter Unterschied zwischen der gleichen Probe bei verschiedenen Trocknungstemperaturen (ANOVA mit Tukey's Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

^C Signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen desselben Salzes bei gleicher Trocknungstemperatur (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, $n = 3$).

Tabelle 30: Gehalt an freien (SH) und gebundenen (SS) Thiolen, Gesamtthiolgehalt (SH und SS) und Verhältnis aus gebundenen und freien Thiolen (SS/SH) in Proben mit Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) ohne Salz bei 40 °C und 80 °C Trocknungstemperatur. Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben (n = 3). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben. Proben mit PS 20 und AS wurden jeweils separat statistisch ausgewertet.

Probe	Trocknungs- temperatur	SH [μmol/g Protein]	SS [μmol/g Protein]	Gesamtthiolgehalt (SH und SS) [μmol/g Protein]	Verhältnis SS/SH
Kontrolle	40 °C	1,63 ^B	27,14 ^B	28,77	16,64 ^B
0,25 % PS 20	40 °C	1,30 ^{A,B}	25,71	27,01	19,76 ^{A,B}
1,00 % PS 20	40 °C	1,31 ^{A,B}	26,73	28,04	20,36 ^{A, B}
20 mg/kg AS	40 °C	1,28 ^{A,B}	21,55 ^A	22,83 ^A	16,85 ^B
200 mg/kg AS	40 °C	1,29 ^{A,B}	24,62	25,90	19,11 ^{A,B}
Kontrolle	80 °C	1,20 ^B	30,03 ^B	31,23	24,98 ^B
0,25 % PS 20	80 °C	1,00 ^{A, B}	26,98	27,98	26,97 ^B
1,00 % PS 20	80 °C	1,05 ^{A, B}	26,90	27,95	25,66 ^B
20 mg/kg AS	80 °C	1,12 ^B	24,65 ^A	25,77 ^A	22,03 ^B
200 mg/kg AS	80 °C	1,08 ^{A, B}	25,31 ^A	26,40 ^A	23,36 ^B
CV		0,11	0,07	0,07	0,16

^A Signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle (ANOVA mit Dunnett's t-test, $p \leq 0,05$, n = 3).

^B Signifikanter Unterschied zwischen der gleichen Probe bei verschiedenen Trocknungstemperaturen (ANOVA mit Tukey's Test, $p \leq 0,05$, n = 3).

^C Signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen desselben Zusatzes bei gleicher Trocknungstemperatur (ANOVA mit Tukey's-Test, $p \leq 0,05$, n = 3).

A.3.5. Prozentuale Abweichungen von Messparametern

Tabelle 31: Prozentuale Abweichungen des Dehnwiderstands (R_{\max}), der Dehnbarkeit (E_{\max}) und des Verhältnisses aus Dehnbarkeit und Dehnwiderstand (E_{\max}/R_{\max}), des linear-viskoelastischen Bereichs (LVE), der Summe des Speichermoduls, des Verlustmoduls und des Verlustfaktors von Proben mit Salz, Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) und Kontrollproben ohne Zusatz. Alle Werte sind aus Mittelwerten berechnet ($n = 12$, Kieffer Rig bzw. $n = 3$, Oszillationsrheologie).

Probe	R_{\max}	E_{\max}	E_{\max}/R_{\max}	LVE	Summe Speichermodul	Summe Verlustmodul	Summe Verlustfaktor
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
0,64 % KCl	-19,6	19,9	48,3	2,8	-13,4	-10,3	2,2
3,83 % KCl	1,5	46,3	44,3	-15,8	4,4	15,7	8,6
0,50 % NaCl	-8,0	24,6	36,2	3,8	-8,9	-5,3	2,7
3,00 % NaCl	6,5	31,7	25,0	-20,2	7,1	20,3	9,8
0,41 % $MgCl_2$	-23,9	26,1	67,2	20,2	-30,5	-22,4	8,3
2,44 % $MgCl_2$	-34,1	30,3	97,5	23,4	-39,8	-26,1	18,8
0,48 % $CaCl_2$	-34,1	13,7	73,4	10,4	-33,6	-28,6	4,6
2,85 % $CaCl_2$	-31,2	18,8	72,5	34,2	-45,4	-34,2	16,4
0,25 % PS 20	-14,5	-1,8	14,7	2,1	14,2	6,7	-5,7
1,00 % PS 20	-24,6	30,6	73,6	-8,1	-2,0	-0,5	2,3
20 mg/kg AS	-2,2	-14,7	-11,7	10,3	16,7	9,6	-5,8
200 mg/kg AS	-10,9	-23,2	-13,6	9,9	10,0	4,7	-5,4

Tabelle 32: Prozentuale Abweichungen des Rohproteingehalts, des Gehalts der Gliadine (Glia) und der Glutenproteintypen α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine, der Glutenine (Glut), ω b-Gliadine, *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS), der Summe aus Gliadinen und Gluteninen (Glia und Glut) und des Verhältnisses von Gliadin zu Glutenin (Glia/Glut) von Proben mit Salz, Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) und Kontrollproben ohne Zusatz bei 40 °C und 80 °C Trocknungstemperatur. Alle Werte sind aus Mittelwerten berechnet (n = 3).

Probe	Trocknungs- temperatur	Rohprotein- gehalt	Glia gesamt	ω 5- Glia	ω 1,2- Glia	α - Glia	γ - Glia	Glut gesamt	ω b- Glia	HMW- GS	LMW- GS	Summe Glia und Glut	Glia/ Glut
		[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
0,64 % KCl	40 °C	-2,1	7,8	7,5	6,9	5,9	10,1	-8,7	-19,7	-4,4	-9,2	0,8	18,2
3,83 % KCl	40 °C	-6,3	7,2	7,1	5,9	4,8	10,3	-16,3	-28,3	-10,0	-17,4	-2,7	28,5
0,50 % NaCl	40 °C	-0,1	9,1	8,5	7,1	6,7	12,6	-7,5	-15,1	-5,8	-7,3	2,1	18,2
3,00 % NaCl	40 °C	-6,6	1,2	1,1	2,3	-1,5	4,1	-12,5	-21,6	-8,7	-13,0	-4,6	16,1
0,41 % MgCl ₂	40 °C	-1,7	17,3	20,0	11,7	14,8	20,9	-9,8	-20,3	-3,7	-11,0	5,9	30,7
2,44 % MgCl ₂	40 °C	-9,4	-2,5	6,0	3,1	-1,0	-7,2	-16,0	-32,6	-11,8	-15,8	-8,2	16,1
0,48 % CaCl ₂	40 °C	-1,4	12,7	15,1	10,8	12,1	13,4	-13,9	-25,0	-9,3	-14,4	1,5	31,4
2,85 % CaCl ₂	40 °C	-8,0	6,7	18,9	8,0	9,0	1,4	-19,3	-35,2	-15,8	-19,0	-4,3	32,8
0,25 % PS 20	40 °C	0,5	11,0	-29,0	11,3	11,5	17,8	11,7	-13,9	5,4	16,4	11,3	0,0
1,00 % PS 20	40 °C	-1,5	9,0	-29,1	9,3	8,9	16,1	9,6	-16,2	3,5	14,2	9,2	0,0
20 mg/kg AS	40 °C	0,0	10,2	-28,0	9,9	10,7	16,9	13,8	-10,8	7,6	18,4	11,7	-2,9
200 mg/kg AS	40 °C	-0,7	7,7	-30,3	10,2	7,7	14,1	14,7	-9,7	6,3	19,9	10,6	-5,8
0,64 % KCl	80 °C	-1,9	9,5	12,0	10,9	6,4	12,3	-10,9	-16,6	-2,6	-13,0	-0,4	22,6
3,83 % KCl	80 °C	-6,8	8,5	8,8	5,6	5,4	13,1	-21,0	-25,6	-10,0	-24,0	-5,8	36,8
0,50 % NaCl	80 °C	-0,6	10,0	11,7	9,0	6,6	14,1	-10,9	-14,4	-4,1	-12,7	-0,1	23,6
3,00 % NaCl	80 °C	-6,8	2,7	6,3	1,9	-0,3	5,8	-14,7	-20,7	-4,8	-17,2	-5,7	19,8
0,41 % MgCl ₂	80 °C	-1,1	16,6	22,3	13,7	12,1	21,7	-10,8	-18,6	-3,2	-12,6	3,3	30,2
2,44 % MgCl ₂	80 °C	-9,6	12,6	23,9	11,1	10,6	13,2	-22,5	-35,6	-14,0	-24,0	-4,4	45,3
0,48 % CaCl ₂	80 °C	-2,2	10,9	18,9	11,1	8,8	11,8	-12,4	-21,5	-6,3	-13,5	-0,4	26,4
2,85 % CaCl ₂	80 °C	-8,5	5,4	21,3	7,1	4,9	2,1	-18,4	-35,2	-11,1	-19,3	-6,2	29,2
0,25 % PS 20	80 °C	-1,5	9,3	-26,0	10,5	9,1	16,8	0,5	-19,3	-0,5	2,4	5,0	8,5
1,00 % PS 20	80 °C	-2,8	8,4	-27,4	10,5	8,0	34,0	-0,9	-18,1	-2,1	1,0	3,9	9,4
20 mg/kg AS	80 °C	-2,8	10,3	-26,2	12,1	9,5	18,6	-1,0	-15,6	-0,9	0,3	4,8	11,3
200 mg/kg AS	80 °C	-1,2	10,1	-25,7	13,9	10,7	16,0	1,8	-13,4	1,0	3,4	6,1	7,5

Tabelle 33: Prozentuale Abweichungen des Gehalts der SDS-löslichen Proteine (SDSL), des Gesamtgehalts an Gluteninmakropolymer (GMP), *Low-Molecular Weight* Gluteninmakropolymer (LMW-GMP), *High-Molecular Weight* Gluteninmakropolymer (HMW-GMP) und der Summe und des Verhältnisses aus SDS-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer (SDSL/GMP) von Proben mit Salz, Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) und Kontrollproben ohne Zusatz bei 40 °C und 80 °C Trocknungstemperatur. Alle Werte sind aus Mittelwerten berechnet (n = 3).

Probe	Trocknungs- temperatur	SDSL	GMP	HMW-	LMW-	SDSL	SDSL/
		[%]	gesamt	GMP	GMP	und GMP	GMP
		[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
0,64 % KCl	40 °C	-5,0	11,8	21,8	8,8	-0,8	-14,9
3,83 % KCl	40 °C	-16,6	-14,4	-8,7	-16,2	-16,1	-2,0
0,50 % NaCl	40 °C	-4,4	-13,8	-8,4	-15,4	-6,7	11,0
3,00 % NaCl	40 °C	-12,5	11,4	25,1	7,4	-6,5	-21,4
0,41 % MgCl ₂	40 °C	-1,2	-0,9	6,5	-3,2	-1,1	-0,3
2,44 % MgCl ₂	40 °C	-17,3	-4,5	5,4	-7,4	-14,1	-13,5
0,48 % CaCl ₂	40 °C	-14,1	-12,1	-7,1	-13,6	-13,6	-2,2
2,85 % CaCl ₂	40 °C	-12,3	-50,9	-52,6	-50,4	-21,9	79,7
0,25 % PS 20	40 °C	-7,8	-7,2	9,2	-12,1	-7,6	-0,6
1,00 % PS 20	40 °C	7,2	-11,4	-6,7	-12,9	2,5	21,0
20 mg/kg AS	40 °C	6,6	0,5	9,2	-2,2	5,1	6,1
200 mg/kg AS	40 °C	2,8	5,6	19,2	1,5	3,5	-2,7
0,64 % KCl	80 °C	2,7	-9,4	-4,9	-11,0	-1,8	13,2
3,83 % KCl	80 °C	1,2	-20,8	-17,5	-22,0	-7,0	28,0
0,50 % NaCl	80 °C	4,0	-7,7	-9,5	-7,0	-0,4	12,8
3,00 % NaCl	80 °C	-1,8	-24,2	-21,2	-25,2	-10,1	29,6
0,41 % MgCl ₂	80 °C	4,1	-10,5	-4,3	-12,7	-1,3	16,2
2,44 % MgCl ₂	80 °C	4,1	-25,0	-26,8	-24,4	-6,7	38,8
0,48 % CaCl ₂	80 °C	2,6	-11,6	-11,6	-11,6	-2,7	16,2
2,85 % CaCl ₂	80 °C	-3,8	-21,7	-20,1	-22,2	-10,4	22,8
0,25 % PS 20	80 °C	16,3	-6,0	-7,4	-5,5	8,0	23,7
1,00 % PS 20	80 °C	18,6	-7,7	-7,3	-7,9	8,8	28,5
20 mg/kg AS	80 °C	19,7	-14,0	-12,6	-14,5	7,2	39,2
200 mg/kg AS	80 °C	17,7	-4,5	-2,2	-5,3	9,4	23,3

Tabelle 34: Prozentuale Abweichungen des Gehalts an freien (SH) und gebundenen (SS) Thiolen, des Gesamtthiolgehalts (SH und SS) und des Verhältnisses aus gebundenen und freien Thiolen (SS/SH) von Proben mit Salz, Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) und Kontrollproben ohne Zusatz bei 40 °C und 80 °C Trocknungstemperatur. Alle Werte sind aus Mittelwerten berechnet (n = 3).

Probe	Trocknungs- temperatur	SH	SS	SH und SS	SS/SH
		[%]	[%]	[%]	[%]
0,64 % KCl	40 °C	-19,3	-25,4	-25,0	-7,6
3,83 % KCl	40 °C	-15,5	-1,3	-2,1	16,7
0,50 % NaCl	40 °C	-15,0	0,9	0,0	18,7
3,00 % NaCl	40 °C	-33,6	-34,1	-34,1	-0,8
0,41 % MgCl ₂	40 °C	-24,7	-8,5	-9,4	21,5
2,44 % MgCl ₂	40 °C	-54,2	-19,3	-21,3	76,2
0,48 % CaCl ₂	40 °C	-31,2	-5,0	-6,4	38,0
2,85 % CaCl ₂	40 °C	-40,5	-10,7	-12,4	50,0
0,25 % PS 20	40 °C	-20,1	-5,3	-6,1	18,7
1,00 % PS 20	40 °C	-19,5	-1,5	-2,5	22,3
20 mg/kg AS	40 °C	-21,5	-20,6	-20,6	1,2
200 mg/kg AS	40 °C	-21,0	-9,3	-10,0	14,8
0,64 % KCl	80 °C	-14,4	-17,0	-16,9	-3,1
3,83 % KCl	80 °C	-17,3	-22,4	-22,2	-6,2
0,50 % NaCl	80 °C	-16,4	-20,1	-19,9	-4,4
3,00 % NaCl	80 °C	-27,9	-15,5	-16,0	17,2
0,41 % MgCl ₂	80 °C	-31,2	2,0	0,7	48,3
2,44 % MgCl ₂	80 °C	-41,6	-10,2	-11,4	53,6
0,48 % CaCl ₂	80 °C	-34,9	-0,4	-1,8	53,0
2,85 % CaCl ₂	80 °C	-52,8	-35,4	-36,1	36,8
0,25 % PS 20	80 °C	-16,8	-10,1	-10,4	8,0
1,00 % PS 20	80 °C	-12,8	-10,4	-10,5	2,7
20 mg/kg AS	80 °C	-6,9	-17,9	-17,5	-11,8
200 mg/kg AS	80 °C	-9,9	-15,7	-15,5	-6,5

A.3.6. Massenspektrometrische Bestimmung von Glutenproteintypen

Tabelle 35: Per Tandem-Massenspektrometrie mit Flüssigchromatographie (LC-MS/MS) bestimmte Anzahl der Proteingruppen, die α - und γ -Gliadinen, *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS) und *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS) in Kontrollproben und salzbehandelten Vitalkleberproben zugeordnet werden können.

	α -Gliadine	γ -Gliadine	LMW-GS	HMW-GS	nicht charakterisierte Proteingruppen
Kontrolle, 40 °C	19	18	18	9	11
Kontrolle, 80 °C	15	21	21	8	11
3,00% NaCl, 40 °C	17	21	21	9	6
3,00% NaCl, 80 °C	20	26	18	8	4
2,85 % CaCl ₂ , 40 °C	9	20	12	9	9
2,85 % CaCl ₂ , 80 °C	10	13	15	7	3

Tabelle 36: Per Tandem-Massenspektrometrie mit Flüssigchromatographie (LC-MS/MS) bestimmte Glutenproteintypen mit den durchschnittlich höchsten LFQ-Intensitäten (markierungsfreie massenspektrometrischen Quantifizierung, *Label-free Quantification*), Score, mit der Proteingruppe assoziierte Peptide und berechnetes Molekulargewicht der Proteine in Kontrollproben und salzbehandelten Vitalkleberproben. Von Proteingruppen, die mehr als 10 Proteine enthalten, werden nur die ersten 10 Proteine angegeben.

Probe	UniProtKB Protein ID	Anzahl Proteine in der Proteingruppe	UniProtKB Gluten-proteintypzuordnung	Score	Peptide	Molekulargewicht [kDa]
Kontrolle, 40 °C	B2BZC7	1	LMW-GS	216	8	33
	A0A7D5BJ88	1	LMW-GS	165	7	38
	B6UKP1;Q1W676;B6DQB1;B6UKM8; A0A4D6Q688;A0A4D6Q658; A0A9R1DIU2; B6UKQ7; B6UKP0; A0A5B9Y1W2	10	γ -Gliadin	36	3	32
	Q41543;D0ES84;Q94G92; A0A4D6Q9K7;D0ES82;A0A5B9Y2E5; H2DEI4; F2X0K9; F2X0K7	9	γ -Gliadin	61	7	32
	Q6SPY8;P10385;D2DII3;R4JAQ1;Q8W3V1;Q0PW11; A0A1U9XLA9; R4JB19;R4JBH8;R4JFL5...	63	LMW-GS	199	4	41
	R9XUS6	1	γ -Gliadin	31	2	41
	Q52JL3;Q6RX92;P08488;E4W506; 6RX93;A9QUS3;A0A0H4SR12; A4URY8; A0A1W6C2K2; E0W6G5...	21	HMW-GS	323	12	71
	A0A060MZIP1;Q41516;Q8H0L2; Q9SYY0;Q8H0L5;A0A9R1N580; P02862; X5CQ58	8	HMW-GS	323	17	86
	Q94G91;Q9M6P7;U5UA54;R9XUB0; R9XUB9;K7X1S8;Q6EEW9; R9XT02; R9XWB3;P08453...	17	γ -Gliadin	108	5	37
	Q1ZZT4	1	LMW-GS	73	6	32
Kontrolle, 80 °C	B2BZC7	1	LMW-GS	145	8	32
	A0A7D5BJ88	2	LMW-GS	140	6	38
	B6UKP1;Q1W676;B6DQB1;B6UKM8; A0A4D6Q688;A0A4D6Q658; A0A9R1DIU2; B6UKQ7; B6UKP0; A0A5B9Y1W2	10	γ -Gliadin	28	3	32
	Q41543; D0ES84; Q94G92; A0A4D6Q9K7; D0ES82; A0A5B9Y2E5; F2X0K9; F2X0K7	8	γ -Gliadin	48	7	32
	R9XUS6	1	γ -Gliadin	9	2	41
	Q0Q5D3;P10387;A9ZMG8;A9YSK3; A0A165B8S1;A0A1W6C2J9; V9TRL3; A0A2L1K3K4; B8YPU3; Q8H0L3	12	HMW-GS	269	13	70
	A0A060MZIP1Q41543;D0ES84; Q94G92;A0A4D6Q9K7; D0ES82; A0A5B9Y2E5;F2X0K9;F2X0K7	8	HMW-GS	323	18	86
	Q94G91;Q9M6P7;U5UA54;R9XUB0; R9XUB9; K7X1S8; Q6EEW9; R9XT02; R9XWB3;P08453	17	γ -Gliadin	86	5	37
	R4JAQ1;P10385;D2DII3;Q6SPY8	4	LMW-GS	257	4	39
	Q1ZZT4	1	LMW-GS	39	6	32

Probe	UniProtKB Protein ID	Anzahl Proteine in der Proteingruppe	UniProtKB Gluten-proteintypzuordnung	Score	Peptide	Molekulargewicht [kDa]
3,00 % NaCl, 40 °C	B2BZC7	1	LMW-GS	44	7	33
	A0A7D5BJ88	1	LMW-GS	112	6	38
	D0ES80;Q1W676;B6DQB1;B6UKM8; A0A4D6Q688;A0A4D6Q658;	10	γ -Gliadin	57	4	34
	A0A9R1DIU2;B6UKQ7;B6UKP0; A0A5B9Y1W2					
	Q41543;D0ES84;Q94G92;A0A4D6Q9K7;D0ES82;	9	γ -Gliadin	48	7	32
	A0A5B9Y2E5; H2DEI4;F2X0K9;F2X0K7					
	R9XUS6	1	γ -Gliadin	11	2	41
	R4JAQ1;P10385;D2DII3;Q6SPY8	4	LMW-GS	221	6	39
	Q1ZZT4	1	LMW-GS	60	6	32
	A0A060MZP1;Q41516;Q8H0L2; Q9SYY0;Q8H0L5;A0A9R1N580; P02862;X5CQ58	8	HMW-GS	323	17	86
	Q0Q5D3;P10387;A9ZMG8;A9YSK3; A0A165B8S1;A0A1W6C2J9;V9TRL3;	12	HMW-GS	315	14	70
	A0A2L1K3K4; B8YPU3; Q8H0L3					
3,00 % NaCl, 80 °C	Q94G91;Q9M6P7;U5UA54;R9XUB0; R9XUB9;K7X1S8;Q6EEW9;R9XT02;	17	γ -Gliadin	103	5	37
	R9XWB3;P08453					
	B2BZC7	1	LMW-GS	179	8	33
	A0A7D5BJ88	1	LMW-GS	105	6	38
	D0ES80;Q1W676;B6DQB1;B6UKM8; A0A4D6Q688;A0A4D6Q658;	10	γ -Gliadin	42	4	34
	A0A9R1DIU2;B6UKQ7;B6UKP0; A0A5B9Y1W2					
	Q0Q5D3;P10387;A9ZMG8;A9YSK3; A0A165B8S1;A0A1W6C2J9; V9TRL3;	9	γ -Gliadin	18	6	32
	A0A2L1K3K4;B8YPU3;Q8H0L3					
	R9XUS6	1	γ -Gliadin	12	2	41
	Q0Q5D3;P10387;A9ZMG8;A9YSK3; A0A165B8S1;A0A1W6C2J9; V9TRL3;	12	HMW-GS	323	13	70
	A0A2L1K3K4;B8YPU3;Q8H0L3...					
	A0A060MZP1;Q8H0L2;Q41516;Q8H0L5;A0A9R1N580;	10	HMW-GS	323	16	86
	Q9SYY0; P02862;X5CQ58;W6AW98;Q94IJ7					
	Q94G91;Q9M6P7;U5UA54;R9XUB0; R9XUB9;K7X1S8;Q6EEW9;	17	γ -Gliadin	66	5	37
	R9XT02; R9XWB3;P08453...					
	K7WVC4;R9XV71;R9XV82;B6UKP3; R9XT08;B6UKP4;B6UKN2;	48	γ -Gliadin	323	6	33
	U5U9Q4; A0A4D6Q642;A0A4D6QE74...					
	B1B520;X2JUA0;A0A0H4PMT1; D0IQ07;D7REK2;E2CT66;	33	HMW-GS	77	8	11
	C6L669; A9YSK4;Q0Q5D2;P10388...					

Probe	UniProtKB Protein ID	Anzahl Proteine in der Proteingruppe	UniProtKB Gluten-proteintypzuordnung	Score	Peptide	Molekulargewicht [kDa]
2,85 % CaCl ₂ , 40 °C	B2BZC7	1	LMW-GS	209	7	33
	R9XUS6	1	γ-Gliadin	14	2	41
	B6DQB2;A0A4D6QE67	2	γ-Gliadin	16	6	32
	Q94G91;Q9M6P7;U5UA54;R9XUB0; R9XUB9;K7X1S8;Q6EEW9; R9XT02; R9XWB3;P08453...	17	γ-Gliadin	31	5	37
	P08488;Q52JL3;Q6RX92;Q6RX93; E4W506;A0A1W6C2K2; A9QUS3; A0A0H4SR12;A4URY8;A0A0H4SMF2...	23	HMW-GS	323	12	71
	A0A4D6Q9J3;H9A6C1;H9A6B8; A0A290XZ18;R9XUQ5	5	γ-Gliadin	8	2	33
	B1B520;Q599I0;G3FLC7;J7G6L4; C6L669; A9YSK4;E2CT66;D7REK2; D0IQ07;A0A0H4PMT1...	26	HMW-GS	17	9	109
	A0A060MZP1;Q41516;Q8H0L2; Q9SYY0;Q8H0L5;A0A9R1N580; P02862;X5CQ58;Q94IJ7	9	HMW-GS	323	16	86
	A0A0K0KDM6;X5D5A6	2	HMW-GS	98	9	85
	A0A3G4ZJR3;A0A1G4P1V7;W0C8N8;A0A1G4P1W4; A0A1G4P219; A0A1B0Z3C8;B8ZX17;A0A060AAZ6; W6AY13; Q6UKZ5...	24	HMW-GS	123	9	85
2,85 % CaCl ₂ , 80 °C	B2BZC7	1	LMW-GS	168	7	33
	Q94G91;Q9M6P7;U5UA54;R9XUB0;R9XUB9;K7X1S8; Q6EEW9; R9XT02;R9XWB3;P08453...	17	γ-Gliadin	73	5	37
	R9XUS6	1	γ-Gliadin	9	2	41
	B2Y2Q2;I1XB56;B2Y2Q3;B2Y2Q4;B2Y2Q1;A0A2U8JCZ2; Q18NR2;Q75ZV8;A0A7D4XSI0;R4JF82...	19	LMW-GS	92	6	42
	A0A0S2GJQ0	1	LMW-GS	7	4	35
	Q0Q5D3;A0A165B8S1;A9YSK3;A9ZMG8;P10387; A0A1W6C2J9; V9TRL3;A0A2L1K3K4;B8YPU3;Q8H0L3...	21	HMW-GS	317	13	70
	Q1ZZT4	1	LMW-GS	67	6	32
	A0A4D6Q9J3;H9A6C1;H9A6B8;U5U6P1;A0A5B9Y2H5; A0A4D6Q6S3;A0A4D6Q640;R9XUQ5;A0A290XZ18	9	γ-Gliadin	8	3	33
	Q0Q5D2;P10388;E2CT66;Q7M1M7;A0A0H4PMT1;X2JUA0; D0IQ07;D7REK2;D0IQ05;B1B520...	32	HMW-GS	94	9	90
	Q6SPY8;D2DII3;P10385;R4JAQ1;Q8W3V1;Q6SPZ1;X2J8E3; R4JB27;A0A1U9XL81;C3VN74...	75	LMW-GS	166	4	41

A.4. Einfluss von Zusätzen auf die Sekundärstruktur von Gluten

Abbildung 32: Auswertung der Amid-I-Bande (oben) und Disulfidbindungskonformation (unten) der Kontrollprobe über Dekonvolution.

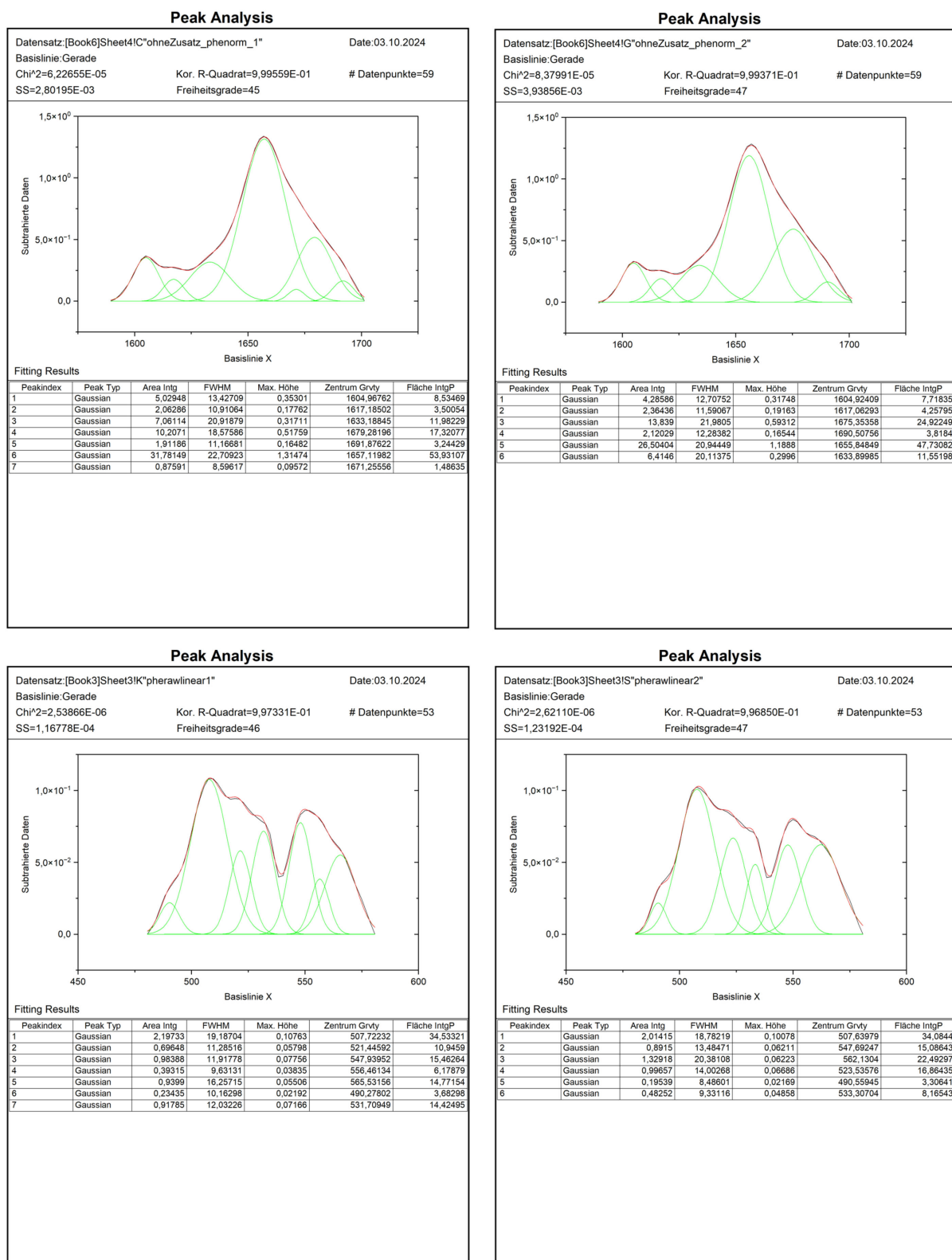


Abbildung 33: Auswertung der Amid-I-Bande (oben) und Disulfidbindungskonformation (unten) der Probe mit KCl über Dekonvolution.

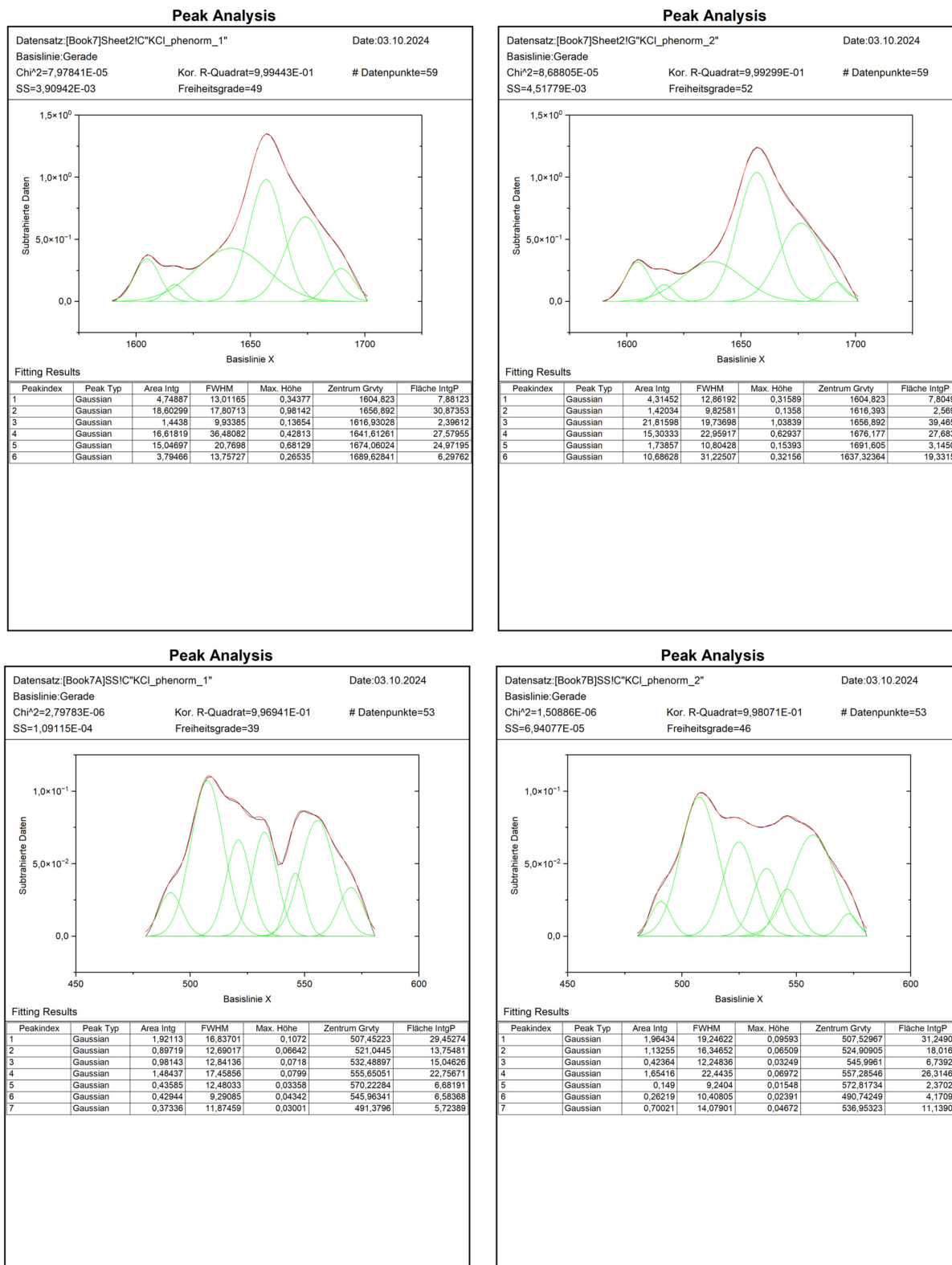
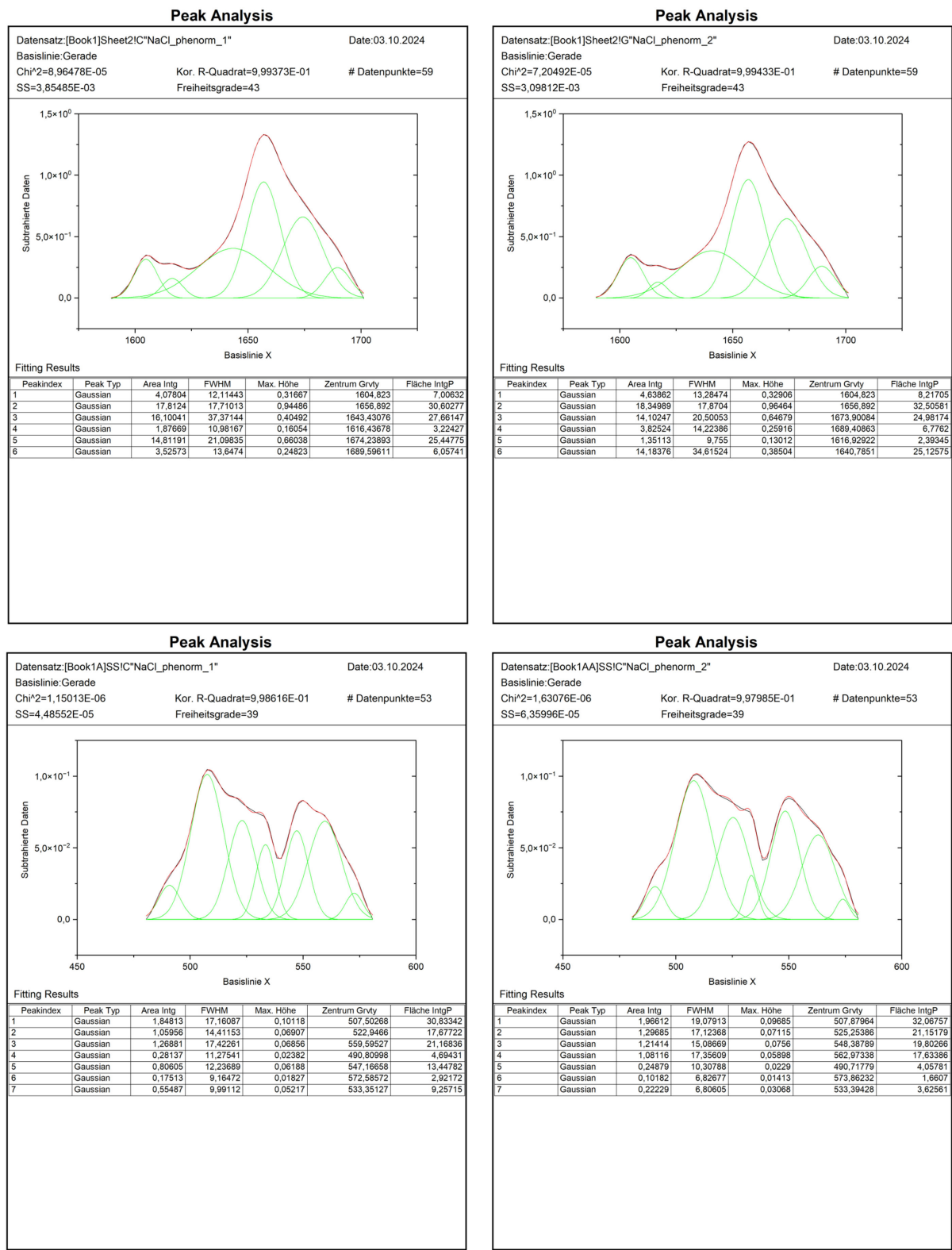


Abbildung 34: Auswertung der Amid-I-Bande (oben) und Disulfidbindungskonformation (unten) der Probe mit NaCl über Dekonvolution.



Peak Analysis

Datensatz:[Book1]Sheet2IG*NaCl_phenorm_2"

Date:03.10.2024

Basislinie:Gerade

Chi²=7,20492E-05

Kor. R-Quadrat=9,99433E-01

Datenpunkte=59

SS=3,09812E-03

Freiheitsgrade=43



Subtrahierte Daten

Basislinie X

Peakindex	Peak Typ	Area Intg	FWHM	Max. Höhe	Zentrum Grvty	Fläche IntgP
1	Gaussian	4,63862	13,28474	0,32906	1604,823	8,21705
2	Gaussian	18,34989	17,8704	0,96464	1656,892	32,50581
3	Gaussian	14,10247	20,50053	0,64679	1673,90084	24,98174
4	Gaussian	3,82524	14,22398	0,25916	1689,40863	6,7762
5	Gaussian	1,35113	9,755	0,13012	1616,92822	2,39345
6	Gaussian	14,18376	34,61524	0,38504	1640,7851	25,12575

Peak Analysis

Datensatz:[Book1A]SSIC*NaCl_phenorm_1"

Date:03.10.2024

Basislinie:Gerade

Chi²=1,15013E-06

Kor. R-Quadrat=9,98616E-01

Datenpunkte=53

SS=4,48552E-05

Freiheitsgrade=39



Subtrahierte Daten

Basislinie X

Peakindex	Peak Typ	Area Intg	FWHM	Max. Höhe	Zentrum Grvty	Fläche IntgP
1	Gaussian	1,84813	17,16087	0,10118	507,50268	30,83342
2	Gaussian	1,05956	14,41153	0,06907	522,9466	17,67722
3	Gaussian	1,26881	17,42261	0,06856	559,59527	21,16836
4	Gaussian	0,28137	11,27541	0,02382	490,80998	4,69431
5	Gaussian	0,80605	12,23689	0,06188	547,16658	13,44782
6	Gaussian	0,17513	9,16472	0,01827	572,58572	2,92172
7	Gaussian	0,55487	9,99112	0,05217	533,35127	9,25715

Peak Analysis

Datensatz:[Book1AA]SSIC*NaCl_phenorm_2"

Date:03.10.2024

Basislinie:Gerade

Chi²=1,63076E-06

Kor. R-Quadrat=9,97985E-01

Datenpunkte=53

SS=6,35996E-05

Freiheitsgrade=39



Subtrahierte Daten

Basislinie X

Peakindex	Peak Typ	Area Intg	FWHM	Max. Höhe	Zentrum Grvty	Fläche IntgP
1	Gaussian	1,96612	19,07913	0,09685	507,87964	32,06757
2	Gaussian	1,29685	17,12368	0,07115	525,25386	21,15179
3	Gaussian	1,21414	15,08669	0,0756	548,38789	19,80266
4	Gaussian	1,08116	17,35609	0,05898	562,97338	17,63386
5	Gaussian	0,24879	10,30788	0,02229	490,71779	4,05781
6	Gaussian	0,10182	6,82677	0,01413	573,86232	1,6687
7	Gaussian	0,22229	6,80605	0,03068	533,39428	3,62561

Abbildung 35: Auswertung der Amid-I-Bande (oben) und Disulfidbindungskonformation (unten) der Probe mit MgCl_2 über Dekonvolution.

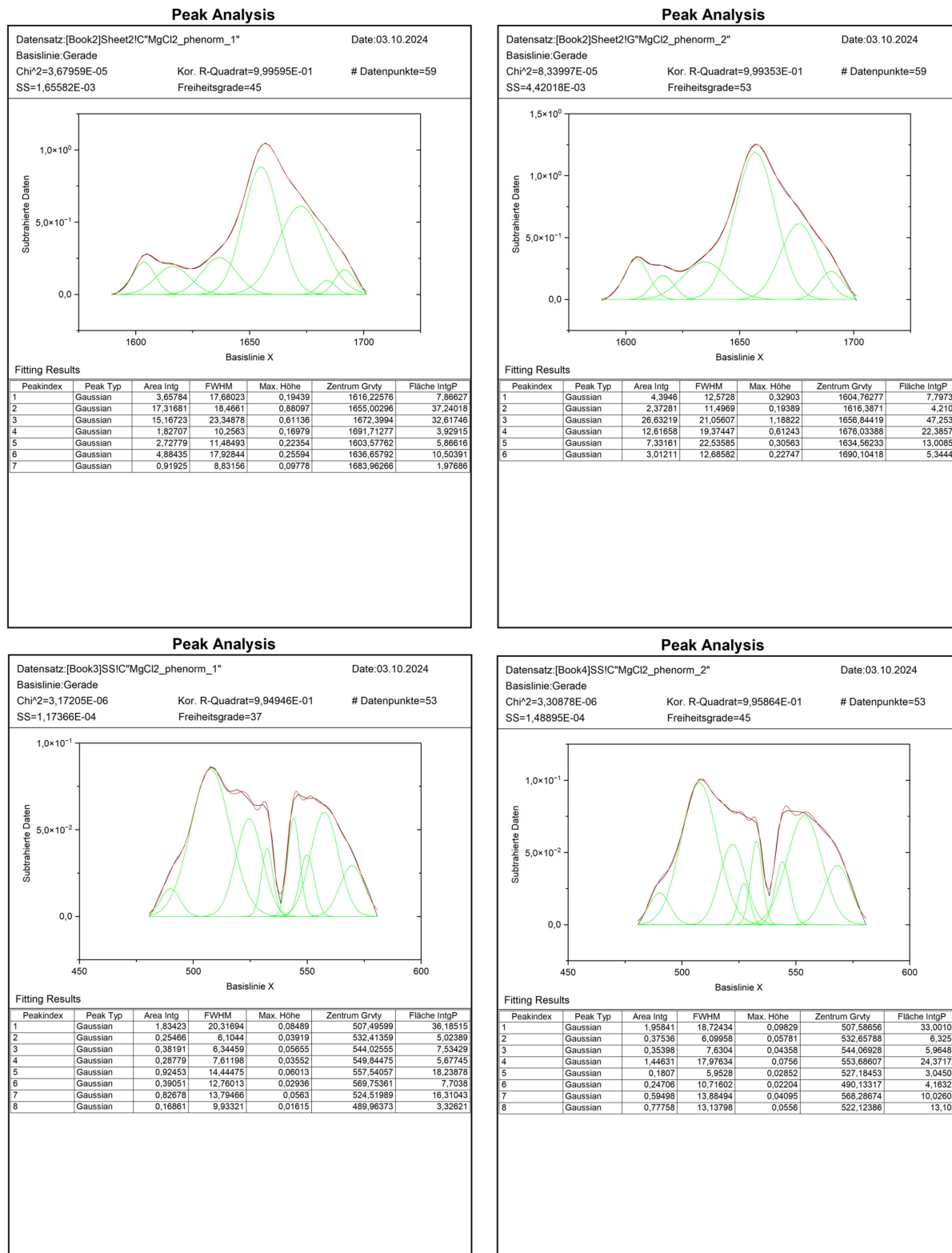


Abbildung 36: Auswertung der Amid-I-Bande (oben) und Disulfidbindungskonformation (unten) der Probe mit CaCl₂ über Dekonvolution.

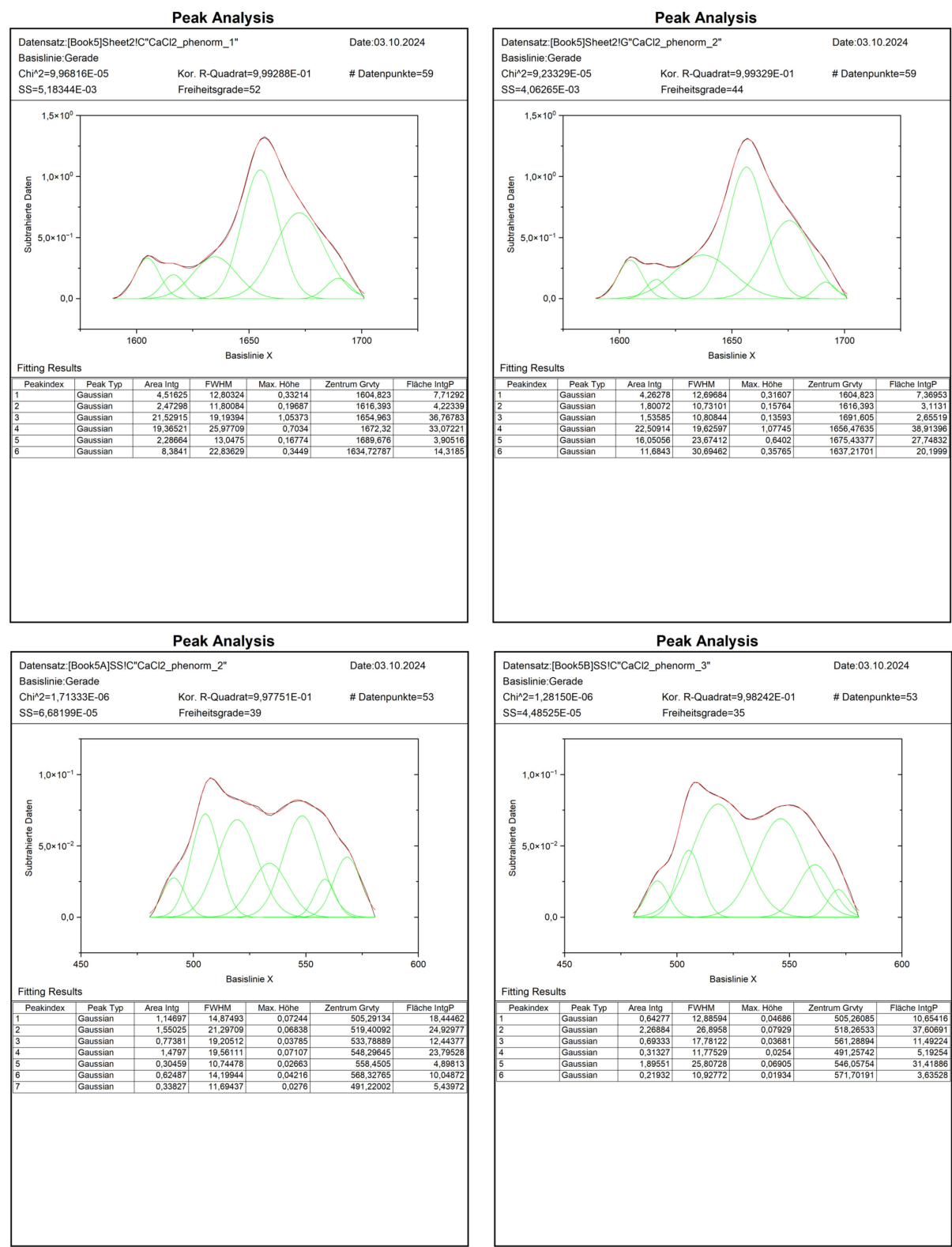


Abbildung 37: Auswertung der Amid-I-Bande (oben) und Disulfidbindungskonformation (unten) der Probe mit Polysorbat 20 über Dekonvolution.

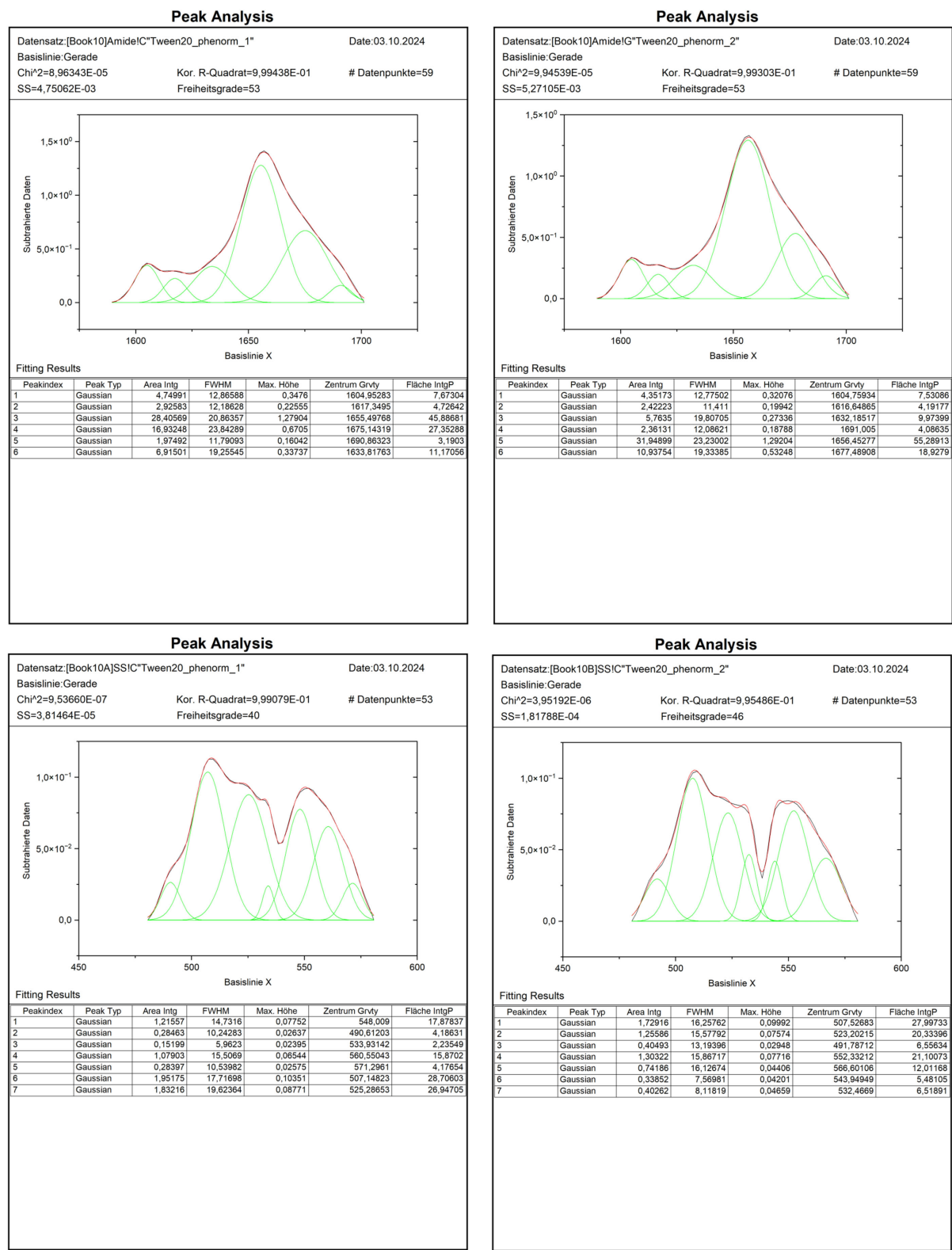
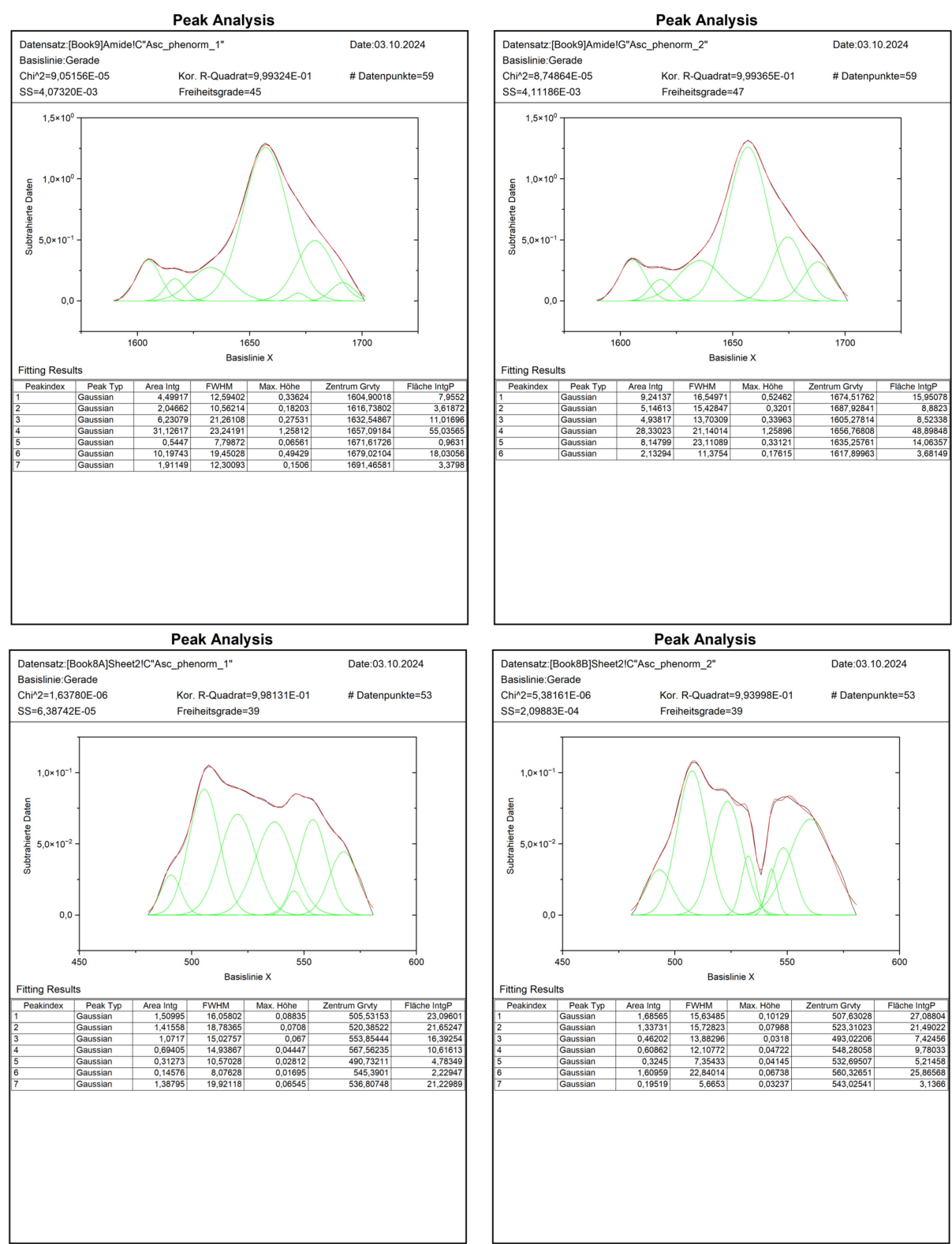


Abbildung 38: Auswertung der Amid-I-Bande (oben) und Disulfidbindungskonformation (unten) der Probe mit Ascorbinsäure über Dekonvolution.



Peak Analysis

Datensatz:[Book8A]Sheet2IC*Asc_phenorm_1"

Date:03.10.2024

Basislinie:Gerade

Chi²=1,63780E-06

Kor. R-Quadrat=9,98131E-01

Datenpunkte=53

SS=6,38742E-05

Freiheitsgrade=39



Fitting Results

Peakindex	Peak Typ	Area Intg	FWHM	Max. Höhe	Zentrum Grvty	Fläche IntgP
1	Gaussian	1,50995	16,05602	0,08835	505,53153	23,08601
2	Gaussian	1,41558	18,78365	0,0708	520,38522	21,65247
3	Gaussian	1,0717	15,02757	0,067	553,85444	16,39254
4	Gaussian	0,69405	14,93867	0,04447	567,56235	10,61613
5	Gaussian	0,31273	10,57028	0,02812	490,73211	4,78349
6	Gaussian	0,14576	8,07628	0,01695	545,3901	2,22947
7	Gaussian	1,38795	19,92118	0,06545	536,80748	21,22989

Peak Analysis

Datensatz:[Book8B]Sheet2IC*Asc_phenorm_2"

Date:03.10.2024

Basislinie:Gerade

Chi²=5,38161E-06

Kor. R-Quadrat=9,93998E-01

Datenpunkte=53

SS=2,09883E-04

Freiheitsgrade=39



Fitting Results

Peakindex	Peak Typ	Area Intg	FWHM	Max. Höhe	Zentrum Grvty	Fläche IntgP
1	Gaussian	1,88565	15,63485	0,10129	507,63028	27,08804
2	Gaussian	1,33731	15,72823	0,07988	523,31023	21,49022
3	Gaussian	0,46202	13,88296	0,0318	493,02206	7,42456
4	Gaussian	0,60862	12,10772	0,04722	548,28058	9,78033
5	Gaussian	0,3245	7,35433	0,04145	532,69507	5,21458
6	Gaussian	1,60959	22,84014	0,06738	560,32651	25,86568
7	Gaussian	0,19519	5,6653	0,03237	543,02541	3,1366

A.5. Synergistischer Effekt aus Milieu- und Prozessbedingungen

Tabelle 37: Rohproteingehalt in salzbehandelten Proben und Kontrollproben ohne Salz, getrocknet bei 40 °C oder gefriergetrocknet (GT). Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben (n = 3). Signifikante Unterschiede zwischen den Vitalkleberproben sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet (ANOVA, Tukey's-Test, $p \leq 0,05$). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben.

Probe	Trocknungstemperatur	Rohproteingehalt
		[%]
20 °C	GT	80,6 ^c
50 °C	GT	78,6 ^e
20 °C, 3 %NaCl	40 °C	73,4 ⁱ
50 °C, 3 %NaCl	40 °C	71,1 ^k
20 °C, 3 %NaCl	GT	73,4 ⁱ
50 °C, 3 %NaCl	GT	72,6 ^g
20 °C, 0,48 % CaCl ₂	GT	77,8 ^f
50 °C, 0,48 % CaCl ₂	GT	79,6 ^d
20 °C, 0,58 % NaCl	GT	81,7 ^b
50 °C, 0,58 % NaCl	GT	82,7 ^a
20 °C, 0,58 % NaCl, 3 % NaCl	GT	74,4 ^h
50 °C, 0,58 % NaCl, 3 % NaCl	GT	75,3 ^g
CV		0,05

Tabelle 38: Gehalt der Gliadine und der Glutenproteintypen α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine, der Glutenine, ω b-Gliadine, *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS), der Summe aus Gliadinen und Gluteninen (Glia und Glut) und das Verhältnis von Gliadin zu Glutenin (Glia/Glut) in salzbehandelten Proben und Kontrollproben ohne Salz, getrocknet bei 40 °C oder gefriergetrocknet (GT). Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben (n = 3). Signifikante Unterschiede zwischen den Vitalkleberproben sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet (ANOVA, Tukey's-Test, $p \leq 0,05$). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben.

Probe	Trocknungs- temperatur	Gliadine gesamt	ω 5-Gliadine	ω 1,2-Gliadine	α -Gliadine	γ -Gliadine	Glutenine gesamt	ω b-Gliadine	HMW-GS	LMW-GS	Summe Gliadine und Glutenine	Verhältnis Gliadine/ Glutenine
		[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	
20 °C	GT	443,4 ^{bde}	30,0 ^b	35,4 ^d	184,7 ^d	193,3 ^{bcd}	331,2 ^{ab}	27,7 ^b	68,1 ^{bcde}	235,5 ^{ab}	774,7 ^b	1,34 ^{de}
50 °C	GT	400,9 ^{gh}	25,9 ^{ef}	36,0 ^{cd}	164,5 ^e	174,5 ^f	357,2 ^a	31,2 ^a	73,7 ^a	252,2 ^a	758,0 ^{bc}	1,12 ^f
20 °C, 3 %NaCl	40 °C	432,2 ^{ef}	27,4 ^{cde}	37,8 ^{bcd}	186,2 ^d	180,9 ^{ef}	289,8 ^{defg}	20,2 ^e	69,7 ^{abcd}	200,0 ^{def}	722,0 ^{ef}	1,49 ^{bcd}
50 °C, 3 %NaCl	40 °C	384,4 ^h	24,9 ^f	38,2 ^{bcd}	162,2 ^e	159,0 ^g	310,2 ^{bcde}	20,2 ^e	73,1 ^{ab}	216,9 ^{bcd}	694,6 ^{ef}	1,24 ^{ef}
20 °C, 3 %NaC	GT	437,1 ^e	30,0 ^b	35,4 ^d	184,7 ^d	193,3 ^{bcd}	277,4 ^{fg}	18,2 ^{ef}	66,2 ^{cdef}	193,0 ^{ef}	714,5 ^e	1,58 ^b
50 °C, 3 %NaCl	GT	411,6 ^{fg}	25,9 ^{ef}	36,0 ^{cd}	164,5 ^e	174,5 ^f	299,8 ^{cdef}	24,4 ^{cd}	66,5 ^{cdef}	208,9 ^{cde}	711,4 ^f	1,37 ^{cde}
20 °C, 0,48 % CaCl ₂	GT	451,8 ^{cde}	33,2 ^a	41,8 ^a	191,7 ^d	185,1 ^{de}	309,1 ^{bcde}	26,3 ^{bc}	64,3 ^{def}	218,5 ^{bcd}	760,9 ^{bc}	1,46 ^{bcd}
50 °C, 0,48 % CaCl ₂	GT	481,3 ^{ab}	30,3 ^b	38,9 ^{abc}	209,9 ^{bc}	202,1 ^{ab}	296,3 ^{cdef}	18,6 ^{ef}	70,3 ^{abc}	207,4 ^{cde}	777,6 ^b	1,62 ^{ab}
20 °C, 0,58 % NaCl	GT	491,2 ^a	29,0 ^{bc}	36,6 ^{cd}	218,8 ^{ab}	206,8 ^a	313,9 ^{bcd}	23,9 ^{cd}	68,6 ^{abcde}	221,4 ^{bc}	805,1 ^a	1,57 ^b
50 °C, 0,58 % NaCl	GT	491,7 ^a	27,9 ^{cd}	40,6 ^{ab}	222,9 ^a	200,2 ^{ab}	317,6 ^{bc}	25,8 ^{bc}	67,3 ^{abc}	224,5 ^{bc}	809,3 ^a	1,55 ^{bc}
20 °C, 0,58 % NaCl, 3 % NaCl	GT	466,7 ^{bc}	26,1 ^{def}	36,8 ^{cd}	208,8 ^c	195,0 ^{bc}	263,0 ^g	16,8 ^e	61,7 ^f	184,5 ^f	729,7 ^{de}	1,78 ^a
50 °C, 0,58 % NaCl, 3 % NaCl	GT	462,2 ^{bcd}	25,2 ^f	37,7 ^{bcd}	211,6 ^{bc}	187,7 ^{cde}	284,6 ^{efg}	21,3 ^{de}	63,7 ^{ef}	199,7 ^{def}	746,8 ^{cd}	1,62 ^{ab}
CV		0,08	0,09	0,05	0,11	0,07	0,08	0,19	0,05	0,09	0,05	0,12

Tabelle 39: Gehalt SDS-löslicher Proteine (SDSL), Gesamtgehalt an Gluteninmakropolymer (GMP) und Gehalt an *Low-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (LMW-GMP), *High-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (HMW-GMP), der Summe aus SDS-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer und das Verhältnis aus SDS-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer (SDSL/GMP) in salzbehandelten Proben und Kontrollproben ohne Salz, getrocknet bei 40 °C oder gefriergetrocknet (GT). Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben (n = 3). Signifikante Unterschiede zwischen den Vitalkleberproben sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet (ANOVA, Tukey's-Test, $p \leq 0,05$). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben.

Probe	Trocknungs- temperatur	SDSL	GMP gesamt	HMW-GMP	LMW-GMP	Summe SDSL und GMP	Verhältnis SDSL/GMP
		[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	
20 °C	GT	511,7 ^b	132,1 ^{de}	38,2 ^d	93,9 ^{de}	643,9 ^c	3,91 ^{cd}
50 °C	GT	597,9 ^a	213,6 ^{bc}	65,2 ^a	148,4 ^{bc}	811,5 ^a	2,81 ^{def}
20 °C, 3%NaCl	40 °C	554,4 ^{ab}	174,4 ^{cd}	51,9 ^{bc}	122,5 ^{cd}	728,8 ^b	3,18 ^{cdef}
50 °C, 3%NaCl	40 °C	497,9 ^b	232,4 ^{ab}	63,8 ^{ab}	168,6 ^{ab}	730,2 ^b	2,14 ^f
20 °C, 3%NaCl	GT	382,9 ^c	49,9 ^{fg}	12,9 ^e	37,0 ^g	432,9 ^{de}	7,767 ^{ab}
50 °C, 3%NaCl	GT	543,2 ^{ab}	162,7 ^d	45,9 ^{cd}	116,8 ^{cd}	705,9 ^{bc}	3,35 ^{cde}
20 °C, 0,48 % CaCl ₂	GT	583,6 ^a	158,3 ^d	46,1 ^{cd}	112,2 ^{cde}	741,9 ^b	3,80 ^{cd}
50 °C, 0,48 % CaCl ₂	GT	363,3 ^c	45,5 ^g	11,1 ^e	34,5 ^g	408,8 ^e	7,99 ^a
20 °C, 0,58 % NaCl	GT	399,5 ^c	60,2 ^{fg}	15,4 ^e	44,7 ^{fg}	459,7 ^{de}	6,65 ^b
50 °C, 0,58 % NaCl	GT	576,9 ^a	264,5 ^a	68,0 ^a	196,5 ^a	841,4 ^a	2,22 ^{ef}
20 °C, 0,58 % NaCl, 3 % NaCl	GT	397,2 ^c	99,1 ^{ef}	22,5 ^e	76,7 ^{ef}	496,3 ^d	4,01 ^c
50 °C, 0,58 % NaCl, 3 % NaCl	GT	545,6 ^{ab}	163,5 ^d	43,4 ^{cd}	120,1 ^{cd}	709,1 ^b	3,35 ^{cde}
CV		0,17	0,49	0,51	0,49	0,24	0,48

Tabelle 40: Gehalt an freien (SH) und gebundenen (SS) Thiolen, Gesamtthiolgehalt (SH und SS) und Verhältnis aus gebundenen und freien Thiolen (SS/SH) in salzbehandelten Proben und Kontrollproben ohne Salz, getrocknet bei 40 °C oder gefriergetrocknet (GT). Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben (n = 3). Signifikante Unterschiede zwischen den Vitalkleberproben sind durch kleine Buchstaben gekennzeichnet (ANOVA, Tukey's-Test, $p \leq 0,05$). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben.

Probe	Trocknungs- temperatur	SH [μmol/g Protein]	SS [μmol/g Protein]	Gesamtthiolgehalt (SH und SS) [μmol/g Protein]	Verhältnis SS/SH
20 °C	GT	1,84 ^a	23,14 ^{bc}	24,99 ^{ab}	12,54 ^{fg}
50 °C	GT	1,06 ^{ef}	27,02 ^a	28,08 ^a	25,54 ^a
20 °C, 3%NaCl	40 °C	1,27 ^{de}	21,12 ^{cd}	22,39 ^{bc}	16,69 ^{de}
50 °C, 3%NaCl	40 °C	1,23 ^{def}	18,28 ^{de}	19,50 ^{cd}	14,91 ^{efg}
20 °C, 3%NaC	GT	1,79 ^{ab}	20,61 ^{cde}	22,40 ^{bc}	11,62 ^g
50 °C, 3%NaCl	GT	1,07 ^{ef}	17,13 ^e	18,20 ^d	16,03 ^{de}
20 °C, 0,48 % CaCl ₂	GT	1,23 ^{def}	18,98 ^{de}	20,20 ^{cd}	15,50 ^{ef}
50 °C, 0,48 % CaCl ₂	GT	1,91 ^a	22,88 ^{bc}	24,79 ^{ab}	12,04 ^g
20 °C, 0,58 % NaCl	GT	1,61 ^{bc}	26,21 ^{ab}	27,82 ^a	16,31 ^{de}
50 °C, 0,58 % NaCl	GT	1,04 ^f	23,23 ^{abc}	24,27 ^{ab}	22,41 ^{ab}
20 °C, 0,58 % NaCl, 3 % NaCl	GT	1,41 ^{cd}	26,74 ^{ab}	28,15 ^a	18,95 ^{cd}
50 °C, 0,58 % NaCl, 3 % NaCl	GT	1,06 ^{ef}	23,39 ^{abc}	24,46 ^{ab}	22,05 ^{bc}
CV		0,24	0,15	0,59	0,26

Tabelle 41: Feuchtigkeit, Wasserbindungskapazität (SRC), Krumenhärte, Spezifisches Volumen (spez. Volumen) und rheologische Messwerte *Power law*-Parameter (A_f und z), elastische und viskoelastische Nachgiebigkeit (J_0 und J_1), Nullviskosität η_0 , Retardationszeit λ und relative Rückstellung (rel. Rückstellung) im Kriech-Erholungsversuch in salzbehandelten Proben und Kontrollproben ohne Salz, getrocknet bei 40 °C oder gefriergetrocknet (GT). Alle Werte sind als Mittelwerte angegeben (n = 3). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben. Die Daten wurden von den Projektpartnern der TUM-BGT im Rahmen des FEI Projekts 21289 N erhoben.

Probe	Trocknungs- temperatur	Feuchtigkeit	SRC	Krumenhärte	spez. Volumen	A_f	z	J_0	J_1	λ	η_0	rel. Rückstellung
		[%]	[%]	[g]	[cm ³ /g]	[Pa·s ^{1/z}]	[-]	[Pa ⁻¹]	[Pa ⁻¹]	[s]	[Pa·s]	[%]
20 °C	GT	3,1	170,0	585,7	2,1	2187,5	4,1	5,9E-04	3,9E-04	62,5	1378172,7	70,5
50 °C	GT	3,4	155,9	651,0	2,0	4573,7	4,6	2,9E-04	1,8E-04	62,8	3063659,3	72,3
20 °C, 3 %NaCl	40 °C	7,5	141,1	484,5	2,1	2277,1	3,8	6,4E-04	4,5E-04	53,8	1348657,5	71,5
50 °C, 3 %NaCl	40 °C	6,8	139,2	549,0	2,2	3102,2	4,0	4,3E-04	2,9E-04	57,4	2211194,5	72,8
20 °C, 3 %NaC	GT	3,8	145,1	317,0	2,4	1492,9	3,3	9,4E-04	7,2E-04	53,1	791798,4	69,8
50 °C, 3 %NaCl	GT	4,2	139,7	563,5	2,0	2278,2	3,5	5,7E-04	4,1E-04	59,4	1554987,8	70,8
20 °C, 0,48 % CaCl ₂	GT	3,4	164,1	203,5	2,6	1295,9	3,4	1,1E-03	7,6E-04	53,2	750918,7	69,3
50 °C, 0,48 % CaCl ₂	GT	3,5	167,3	379,3	2,5	2273,5	4,0	6,1E-04	4,2E-04	59,6	1512370,3	70,9
20 °C, 0,58 % NaCl	GT	2,4	151,5	374,5	2,3	1619,9	3,3	8,9E-04	7,8E-04	55,4	744192,9	69,6
50 °C, 0,58 % NaCl	GT	2,4	152,8	492,5	2,1	2200,6	3,9	7,0E-04	6,5E-04	61,4	919456,9	70,8
20 °C, 0,58 % NaCl,	GT	4,0	142,4	198,0	2,7	1385,7	3,2	1,1E-03	9,3E-04	53,7	633316,6	69,0
3 % NaCl												
50 °C, 0,58 % NaCl,	GT	4,0	142,5	256,5	2,5	1645,1	3,4	9,2E-04	8,4E-04	57,8	758654,8	70,5
3 % NaCl												
CV		0,39	0,07	0,37	0,10	0,41	0,11	0,35	0,42	0,06	0,56	0,02

A.6. Einfluss von Zusätzen auf die Glutenproteinzusammensetzung und -funktionalität verschiedener Mehlsorten und -sorten

Tabelle 42: Per Mikrozugversuch bestimmter Dehnwiderstand (R_{\max}), Dehnbarkeit (E_{\max}) und Verhältnis aus Dehnbarkeit und Dehnwiderstand (E_{\max}/R_{\max}) von Feuchtkleberproben mit Salz, Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) sowie Kontrollproben ohne Zusatz aus verschiedenen Mehlsorten und -sorten und prozentuale Abweichungen von der jeweiligen Kontrolle. Alle Werte sind aus Mittelwerten berechnet ($n = 12$). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben.

Probe	Mehlsorte	Absolutwerte			Prozentuale Abweichung		
		R_{\max}	E_{\max}	E_{\max}/R_{\max}	R_{\max}	E_{\max}	E_{\max}/R_{\max}
		[N]	[mm]		[%]	[%]	[%]
Kontrolle	Standard	1,4	84,3	61,2			
3,83 % KCl	Standard	1,4	123,3	88,4	46,3	1,5	44,3
3,00 % NaCl	Standard	1,5	111,0	76,5	31,7	6,3	24,9
2,44 % $MgCl_2$	Standard	0,9	109,8	120,9	30,3	-33,9	97,5
0,48 % $CaCl_2$	Standard	0,9	95,9	106,1	13,7	-34,1	73,4
200 mg/kg AS	Standard	1,2	64,8	52,9	-23,2	-10,8	-13,7
1,00 % PS 20	Standard	1,0	110,1	106,2	30,6	-24,7	73,6
Kontrolle	RGT Reform	2,1	65,1	31,9			
3,83 % KCl	RGT Reform	2,3	76,1	34,0	17,0	10,0	6,6
3,00 % NaCl	RGT Reform	2,2	89,7	40,9	37,8	7,4	28,2
2,44 % $MgCl_2$	RGT Reform	1,9	93,6	50,0	43,7	-9,0	57,1
0,48 % $CaCl_2$	RGT Reform	1,7	82,0	48,8	25,9	-17,7	53,0
200 mg/kg AS	RGT Reform	2,1	61,7	29,9	-5,3	0,6	-6,3
1,00 % PS 20	RGT Reform	1,6	99,4	60,6	52,7	-20,5	90,1
Kontrolle	Asory	1,8	68,1	38,0			
3,83 % KCl	Asory	2,0	82,4	42,2	21,1	8,4	11,1
3,00 % NaCl	Asory	2,1	77,6	36,2	14,0	13,8	-4,8
2,44 % $MgCl_2$	Asory	1,9	73,9	39,5	8,6	3,5	3,9
0,48 % $CaCl_2$	Asory	1,6	73,5	47,9	8,0	-14,5	25,9
200 mg/kg AS	Asory	1,7	65,1	38,3	-4,4	-5,3	0,7
1,00 % PS 20	Asory	1,5	93,4	64,1	37,2	-19,0	68,5
CV		0,25	0,21	0,46			

Tabelle 43: Rohproteingehalt in Proben mit Salz, Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) sowie Kontrollproben ohne Zusatz aus verschiedenen Mehlsqualitäten und -sorten und prozentuale Abweichungen von der jeweiligen Kontrolle. Alle Werte sind aus Mittelwerten berechnet ($n = 3$). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben.

Probe	Mehlsorte	Absolutwerte	Prozentuale Abweichung
		Rohproteingehalt [%]	Rohproteingehalt [%]
Kontrolle	Standard	78,8	
3,83 % KCl	Standard	73,9	-6,3
3,00 % NaCl	Standard	73,7	-6,6
2,44 % MgCl ₂	Standard	71,4	-9,4
0,48 % CaCl ₂	Standard	77,7	-1,4
200 mg/kg AS	Standard	78,3	-0,7
1,00 % PS 20	Standard	77,6	-1,5
Kontrolle	RGT Reform	81,9	
3,83 % KCl	RGT Reform	82,9	1,3
3,00 % NaCl	RGT Reform	70,4	-14,1
2,44 % MgCl ₂	RGT Reform	76,3	-6,7
0,48 % CaCl ₂	RGT Reform	81,6	-0,4
200 mg/kg AS	RGT Reform	76,5	-0,2
1,00 % PS 20	RGT Reform	81,7	-6,6
Kontrolle	Asory	79,0	
3,83 % KCl	Asory	75,6	-4,2
3,00 % NaCl	Asory	73,7	-6,7
2,44 % MgCl ₂	Asory	70,1	-11,2
0,48 % CaCl ₂	Asory	79,2	0,2
200 mg/kg AS	Asory	80,4	1,7
1,00 % PS 20	Asory	80,3	1,8
CV		0,05	

Tabelle 44: Gehalt der Gliadine und der Glutenproteintypen α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine, der Glutenine, ω b-Gliadine, *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS) und der Summe und des Verhältnisses von Gliadin zu Glutenin (Glia/Glut) in Proben mit Salz, Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) sowie Kontrollproben ohne Zusatz aus verschiedenen Mehlqualitäten und -sorten. Alle Werte sind aus Mittelwerten berechnet (n = 3). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben.

Probe	Mehlsorte	Gliadine gesamt	ω 5-Gliadine	ω 1,2-Gliadine	α -Gliadine	γ -Gliadine	Glutenine gesamt	ω b-Gliadine	HMW-GS	LMW-GS	Summe Gliadine und Glutenine	Glia/Glut
		[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	
Kontrolle	Standard	438,7	32,0	40,4	195,1	171,2	319,2	21,2	77,6	220,4	758,0	1,37
3,83 % KCl	Standard	470,4	34,3	42,8	204,5	188,8	267,2	15,2	69,9	182,1	737,5	1,76
3,00 % NaCl	Standard	444,1	32,3	41,4	192,2	178,2	279,3	16,7	70,8	191,8	723,4	1,59
2,44 % MgCl ₂	Standard	427,6	33,9	41,7	193,1	158,9	268,2	14,3	68,4	185,5	695,8	1,59
0,48 % CaCl ₂	Standard	494,4	36,8	44,8	218,7	194,1	274,8	15,9	70,4	188,5	769,3	1,80
200 mg/kg AS	Standard	472,4	22,3	44,5	210,2	195,4	366,0	19,2	82,5	264,3	838,4	1,29
1,00 % PS 20	Standard	478,2	22,7	44,2	212,6	198,8	349,8	17,8	80,3	251,7	828,0	1,37
Kontrolle	RGT Reform	402,6	26,0	34,3	174,1	168,2	476,9	30,1	107,8	339,0	879,5	0,84
3,83 % KCl	RGT Reform	406,9	26,0	35,6	180,3	165,1	400,8	23,7	98,1	279,1	807,7	1,02
3,00 % NaCl	RGT Reform	395,1	25,9	35,2	174,8	159,2	404,4	24,3	95,3	284,9	799,5	0,98
2,44 % MgCl ₂	RGT Reform	402,8	27,9	36,1	184,2	154,7	367,4	23,7	87,1	256,6	770,2	1,10
0,48 % CaCl ₂	RGT Reform	447,8	29,5	38,6	201,0	178,7	412,5	24,9	99,8	287,8	860,3	1,09
200 mg/kg AS	RGT Reform	424,9	25,6	34,8	183,7	180,7	445,0	26,8	106,9	311,2	869,8	0,95
1,00 % PS 20	RGT Reform	424,3	26,0	36,5	184,3	177,5	459,8	27,3	109,3	323,2	884,0	0,92
Kontrolle	Asory	453,0	14,2	50,1	179,7	209,0	385,1	22,7	94,7	267,7	838,1	1,18
3,83 % KCl	Asory	536,0	17,5	68,5	196,9	253,2	379,3	20,4	97,5	261,4	915,3	1,41
3,00 % NaCl	Asory	513,8	16,5	67,2	189,7	240,4	372,9	20,9	95,9	256,1	886,7	1,38
2,44 % MgCl ₂	Asory	521,2	18,4	65,2	192,8	244,8	361,2	18,8	90,4	252,0	882,4	1,44
0,48 % CaCl ₂	Asory	569,6	18,4	75,0	208,6	267,6	386,0	19,9	99,5	266,5	955,5	1,48
200 mg/kg AS	Asory	467,1	14,4	50,7	186,0	215,8	397,5	22,4	98,5	276,6	864,6	1,17
1,00 % PS 20	Asory	547,8	15,6	68,4	201,2	262,6	418,8	24,1	105,4	289,3	966,6	1,31
CV		0,11	0,28	0,28	0,07	0,18	0,16	0,19	0,15	0,17	0,09	0,21

Tabelle 45: Prozentuale Abweichungen des Gehalts der Gliadine und der Glutenproteintypen α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine, der Glutenine, ω b-Gliadine, *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS) und der Summe und des Verhältnisses von Gliadin zu Glutenin (Glia/Glut) zwischen Proben mit Salz, Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) und Kontrollproben ohne Zusatz aus verschiedenen Mehlqualitäten und -sorten. Alle Werte sind aus Mittelwerten berechnet (n = 3).

Probe	Mehlsorte	Gliadine gesamt	ω 5-Gliadine	ω 1,2-Gliadine	α -Gliadine	γ -Gliadine	Glutenine gesamt	ω b-Gliadine	HMW-GS	LMW-GS	Summe Gliadine und Glutenine	Glia/Glut
		[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	
3,83 % KCl	Standard	7,2	7,0	6,0	4,8	10,3	-16,3	-28,1	-10,0	-17,4	-2,7	28,5
3,00 % NaCl	Standard	1,2	1,1	2,4	-1,5	4,1	-12,5	-21,4	-8,7	-13,0	-4,6	16,1
2,44 % MgCl ₂	Standard	-2,5	6,0	3,2	-1,0	-7,2	-16,0	-32,5	-11,8	-15,9	-8,2	16,4
0,48 % CaCl ₂	Standard	12,7	15,1	10,9	12,1	13,4	-13,9	-24,9	-9,3	-14,5	1,5	31,3
200 mg/kg AS	Standard	7,7	-30,3	10,3	7,7	14,1	14,7	-9,5	6,3	19,9	10,6	-5,8
1,00 % PS 20	Standard	9,0	-29,1	9,4	8,9	16,1	9,6	-16,0	3,5	14,2	9,2	-0,2
3,83 % KCl	RGT Reform	1,1	-0,1	3,8	3,5	-1,9	-16,0	-21,3	-9,0	-17,7	-8,2	20,3
3,00 % NaCl	RGT Reform	-1,9	-0,6	2,8	0,4	-5,3	-15,2	-19,3	-11,6	-16,0	-9,1	15,7
2,44 % MgCl ₂	RGT Reform	0,1	7,2	5,2	5,8	-8,0	-23,0	-21,4	-19,2	-24,3	-12,4	29,9
0,48 % CaCl ₂	RGT Reform	11,2	13,3	12,5	15,4	6,2	-13,5	-17,3	-7,4	-15,1	-2,2	28,6
200 mg/kg AS	RGT Reform	5,5	-1,4	1,7	5,5	7,4	-6,7	-11,0	-0,8	-8,2	-1,1	13,1
1,00 % PS 20	RGT Reform	5,4	-0,2	6,4	5,8	5,5	-3,6	-9,3	1,4	-4,7	0,5	9,3
3,83 % KCl	Asory	18,3	23,0	36,8	9,6	21,1	-1,5	-9,9	2,9	-2,4	9,2	20,2
3,00 % NaCl	Asory	13,4	16,2	34,3	5,6	15,0	-3,2	-7,9	1,3	-4,4	5,8	17,1
2,44 % MgCl ₂	Asory	15,1	29,4	30,1	7,3	17,1	-6,2	-17,0	-4,5	-5,9	5,3	22,7
0,48 % CaCl ₂	Asory	25,7	29,0	49,8	16,1	28,0	0,2	-12,3	5,1	-0,5	14,0	25,5
200 mg/kg AS	Asory	3,1	1,4	1,3	3,6	3,2	3,2	-1,0	4,0	3,3	3,2	-0,1
1,00 % PS 20	Asory	20,9	9,4	36,7	12,0	25,6	8,7	6,3	11,3	8,0	15,3	11,2

Tabelle 46: Gehalt SDS-löslicher Proteine (SDSL), Gesamtgehalt an Gluteninmakropolymer (GMP) und Gehalt an *Low-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (LMW-GMP), *High-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (HMW-GMP), der Summe aus SDS-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer und das Verhältnis aus SDS-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer (SDSL/GMP) in Proben mit Salz, Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) sowie Kontrollproben ohne Zusatz aus verschiedenen Mehlqualitäten und -sorten. Alle Werte sind aus Mittelwerten berechnet (n = 3). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben.

Probe	Mehlsorte	SDSL	GMP gesamt	HMW-GMP	LMW-GMP	Summe SDSL und GMP	SDSL/GMP
		[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	
Kontrolle	Standard	645,9	215,4	49,6	165,9	861,4	3,00
3,83 % KCl	Standard	538,4	184,3	45,3	139,0	722,8	2,94
3,00 % NaCl	Standard	565,5	240,1	62,0	178,1	805,6	2,36
2,44 % MgCl ₂	Standard	534,4	205,8	52,3	153,5	740,2	2,60
0,48 % CaCl ₂	Standard	554,8	189,3	46,1	143,3	744,1	2,93
200 mg/kg AS	Standard	663,8	227,4	59,1	168,3	891,2	2,92
1,00 % PS 20	Standard	692,5	190,8	46,3	144,5	883,3	3,63
Kontrolle	RGT Reform	620,1	384,8	111,0	273,9	1004,9	1,61
3,83 % KCl	RGT Reform	519,3	392,5	91,7	300,8	911,8	1,32
3,00 % NaCl	RGT Reform	537,7	369,8	95,5	274,3	907,5	1,45
2,44 % MgCl ₂	RGT Reform	539,8	326,1	69,2	256,9	865,9	1,67
0,48 % CaCl ₂	RGT Reform	677,5	310,5	78,0	232,5	988,0	2,19
200 mg/kg AS	RGT Reform	687,3	295,4	81,7	213,7	982,7	2,33
1,00 % PS 20	RGT Reform	715,9	327,9	100,0	227,9	1043,7	2,18
Kontrolle	Asory	692,9	235,9	54,7	181,2	928,8	2,94
3,83 % KCl	Asory	604,8	295,1	63,5	231,6	899,8	2,06
3,00 % NaCl	Asory	592,2	286,1	64,4	221,7	878,4	2,08
2,44 % MgCl ₂	Asory	578,4	302,9	60,1	242,8	881,3	1,92
0,48 % CaCl ₂	Asory	697,8	226,1	50,4	175,7	923,9	3,09
200 mg/kg AS	Asory	699,2	257,5	66,9	190,6	956,6	2,72
1,00 % PS 20	Asory	705,9	232,1	54,6	177,5	938,0	3,04
CV		0,11	0,24	0,29	0,23	0,10	0,26

Tabelle 47: Prozentuale Abweichungen des Gehalts der SDS-löslichen Proteine (SDSL), des Gesamtgehalts an Gluteninmakropolymer (GMP) und des Gehalts an *Low-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (LMW-GMP), *High-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (HMW-GMP), der Summe und Verhältnisses aus SDS-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer (SDSL/GMP) zwischen Proben mit Salz, Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) und Kontrollproben ohne Zusatz aus verschiedenen Mehlqualitäten und -sorten. Alle Werte sind aus Mittelwerten berechnet (n = 3).

Probe	Mehlsorte	SDSL	GMP gesamt	HMW-GMP	LMW-GMP	Summe SDSL und GMP	Verhältnis SDSL/GMP
		[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	
3,83 % KCl	Standard	-16,6	-14,4	-8,7	-16,2	-16,1	-2,0
3,00 % NaCl	Standard	0,1	71,4	92,7	65,1	6,2	-50,8
2,44 % MgCl ₂	Standard	-17,3	-4,5	5,4	-7,4	-14,1	-13,5
0,48 % CaCl ₂	Standard	-14,1	-12,1	-7,1	-13,6	-13,6	-2,2
200 mg/kg AS	Standard	2,8	5,6	19,2	1,5	3,5	-2,7
1,00 % PS 20	Standard	7,2	-11,4	-6,7	-12,9	2,5	21,0
3,83 % KCl	RGT Reform	-16,3	2,0	-17,4	9,8	-9,3	-17,9
3,00 % NaCl	RGT Reform	-13,3	-3,9	-13,9	0,2	-9,7	-9,8
2,44 % MgCl ₂	RGT Reform	-12,9	-15,3	-37,6	-6,2	-13,8	3,3
0,48 % CaCl ₂	RGT Reform	9,2	-19,3	-29,7	-15,1	-1,7	35,8
200 mg/kg AS	RGT Reform	10,8	-23,2	-26,4	-22,0	-2,2	44,4
1,00 % PS 20	RGT Reform	15,4	-14,8	-9,9	-16,8	3,9	35,4
3,83 % KCl	Asory	-12,7	25,1	16,1	27,8	-3,1	-29,9
3,00 % NaCl	Asory	-14,5	21,3	17,8	22,3	-5,4	-29,2
2,44 % MgCl ₂	Asory	-16,5	28,4	9,7	34,0	-5,1	-34,8
0,48 % CaCl ₂	Asory	0,7	-4,2	-7,9	-3,1	-0,5	5,1
200 mg/kg AS	Asory	0,9	9,1	22,3	5,2	3,0	-7,6
1,00 % PS 20	Asory	1,9	-1,6	-0,2	-2,1	1,0	3,6

Tabelle 48: Gehalt an freien (SH) und gebundenen (SS) Thiolen, Gesamtthiolgehalt (SH+SS) und Verhältnis aus gebundenen und freien Thiolen (SS/SH) Proben mit Salz, Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) sowie Kontrollproben ohne Zusatz aus verschiedenen Mehlqualitäten und -sorten. Alle Werte sind aus Mittelwerten berechnet (n = 3). Der Variationskoeffizient (CV) ist als Mittelwert über alle Proben angegeben.

Probe	Mehlsorte	SH	SS	Gesamtthiolgehalt (SH+SS)	Verhältnis SS/SH
		[$\mu\text{mol/g Protein}$]	[$\mu\text{mol/g Protein}$]	[$\mu\text{mol/g Protein}$]	
Kontrolle	Standard	1,6	27,1	28,8	16,65
3,83 % KCl	Standard	1,4	26,8	28,2	19,43
3,00 % NaCl	Standard	1,1	17,9	19,0	16,52
2,44 % MgCl_2	Standard	0,7	21,9	22,6	29,33
0,48 % CaCl_2	Standard	1,1	25,8	26,9	22,97
200 mg/kg AS	Standard	1,3	24,6	25,9	19,11
1,00 % PS 20	Standard	1,3	26,7	28,0	20,36
Kontrolle	RGT Reform	0,9	15,3	16,2	16,16
3,83 % KCl	RGT Reform	1,1	27,9	29,0	26,43
3,00 % NaCl	RGT Reform	0,6	13,0	13,6	23,42
2,44 % MgCl_2	RGT Reform	0,8	15,7	16,5	19,03
0,48 % CaCl_2	RGT Reform	0,9	19,3	20,2	21,25
200 mg/kg AS	RGT Reform	1,0	14,1	15,1	14,12
1,00 % PS 20	RGT Reform	1,1	15,7	16,8	14,44
Kontrolle	Asory	1,0	14,5	15,6	13,95
3,83 % KCl	Asory	1,2	26,4	27,6	21,32
3,00 % NaCl	Asory	0,9	24,9	25,8	27,13
2,44 % MgCl_2	Asory	0,7	14,8	15,5	21,52
0,48 % CaCl_2	Asory	1,3	34,1	35,4	25,83
200 mg/kg AS	Asory	1,0	13,6	14,6	13,34
1,00 % PS 20	Asory	1,0	14,9	15,9	14,40
CV		0,24	0,30	0,30	0,24

Tabelle 49: Prozentuale Abweichung des Gehalts an freien (SH) und gebundenen (SS) Thiolen, des Gesamtthiolgehalts (SH+SS) und des Verhältnisses aus gebundenen und freien Thiolen (SS/SH) zwischen Proben mit Salz, Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) und Kontrollproben ohne Zusatz aus verschiedenen Mehlqualitäten und -sorten. Alle Werte sind aus Mittelwerten berechnet (n = 3).

Probe	Mehlsorte	SH	SS	Gesamtthiolgehalt (SH+SS)	Verhältnis SS/SH
		[%]	[%]	[%]	[%]
3,83 % KCl	Standard	-22,0	-1,3	-2,1	16,7
3,00 % NaCl	Standard	-38,8	-34,1	-34,1	-0,8
2,44 % MgCl ₂	Standard	-57,8	-19,3	-21,3	76,2
0,48 % CaCl ₂	Standard	-45,1	-10,7	-6,4	50,0
200 mg/kg AS	Standard	-27,1	-9,3	-10,0	14,8
1,00 % PS 20	Standard	-25,7	7,8	-2,5	22,3
3,83 % KCl	RGT Reform	11,8	82,9	78,8	-93,5
3,00 % NaCl	RGT Reform	-41,1	-14,7	-16,2	45,0
2,44 % MgCl ₂	RGT Reform	-12,9	2,6	1,7	17,8
0,48 % CaCl ₂	RGT Reform	-3,7	26,5	24,7	31,5
200 mg/kg AS	RGT Reform	5,7	-7,6	-6,9	-12,6
1,00 % PS 20	RGT Reform	15,2	3,0	3,7	-10,6
3,83 % KCl	Asory	18,7	81,6	77,4	52,8
3,00 % NaCl	Asory	-12,0	71,0	65,4	94,4
2,44 % MgCl ₂	Asory	-34,1	1,6	-0,8	54,2
0,48 % CaCl ₂	Asory	26,6	134,2	127,0	85,1
200 mg/kg AS	Asory	-2,2	-6,5	-6,2	-4,4
1,00 % PS 20	Asory	-0,8	2,4	2,2	3,2

Tabelle 50: Positive (+20 %) und negative (-20 %) Effekte der Zusätze Salz, Polysorbat 20 (PS 20) und Ascorbinsäure (AS) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollprobe ohne Zusatz auf den Rohproteingehalt, den Gehalt der Gliadine (Glia) und der Glutenproteintypen α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine, der Glutenine (Glut) und *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS), die Summe aus Gliadinen und Gluteninen (Glia und Glut), das Verhältnis von Gliadin zu Glutenin (Glia/Glut), den Gehalt der SDS-löslichen Proteine (SDSL), den Gesamtgehalt an Gluteninmakropolymer (GMP), *Low-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (LMW-GMP), *High-Molecular-Weight* Gluteninmakropolymer (HMW-GMP), die Summe und das Verhältnis aus SDS-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer (SDSL/GMP), den Gehalt an freien (SH) und gebundenen (SS) Thiolen und das Verhältnis aus gebundenen und freien Thiolen (SS/SH). Alle Werte sind aus Mittelwerten berechnet (n = 3).

	3,83 % KCl		3,00 % NaCl		2,44 % MgCl ₂		0,48 % CaCl ₂		1,00 % PS 20		200 mg/kg AS	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
E _{max}	2		2		2		1		3			1
R _{max}						1		1		2		
E _{max} /R _{max}	1		2		2		3		3			
Rohproteingehalt												
Glia gesamt							1		1			
α -Gliadine												
γ -Gliadine	1						1		1			
ω 1,2- Gliadine,	1		1		1		1		1			
ω 5-Gliadine,	1			1	1	1	1	1		1		
Glut gesamt						1						
ω b-Gliadine		2		1		2		1				1
LMW-GS						1						
HMW-GS												
Summe												
Glia und Glut												
Glia/Glut	3				2		3					
SDSL												
LMW-GMP	1		1		1					1		1
HMW-GMP			1			1		1		1	1	1
GMP gesamt	1		1		1					1		1
Summe												
SDSL und GMP												
SDSL/GMP		1		1		1	1		2		1	
SH				2		1	1	1		1		1
SS	2		1	1			2					
SS/SH	2	1	2		2		3		1		1	
Gesamtzahl positive/ negative Effekte	15	4	11	5	12	9	18	4	12	7	3	6
Effekte insgesamt	19		16		21		22		19		9	

1: Effekt in einem Mehl für diesen Messparameter

2: Effekt in zwei Mehlen für diesen Messparameter

3: Effekt in drei Mehlen für diesen Messparameter

A.7. Glutenproteinzusammensetzung der verwendeten Mehle

Tabelle 51: Glutenproteinzusammensetzung der verwendeten Mehlsorten. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n = 3)

Probe	Roh- protein- gehalt	Glia gesamt	ω 5- Glia	ω 1,2- Glia	α - Glia	γ - Glia	Glut gesamt	ω b- Glia	HMW- GS	LMW- GS	Summe Glia und Glut	Glia/ Glut	SDSL	GMP gesamt	HMW- GMP	LMW- GMP	SDSL und GMP	SDSL/ GMP
	[%]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]		[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	
Standard	10,83	58,0	4,1	4,2	26,7	23,0	33,4	1,5	9,0	22,9	91,4	1,74	111,2	21,3	3,8	17,5	132,5	5,2
	$\pm 0,02$	$\pm 1,4$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,8$	$\pm 0,5$	$\pm 0,2$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,2$	$\pm 1,5$	$\pm 0,0$	$\pm 0,3$	$\pm 0,9$	$\pm 0,2$	$\pm 0,7$	$\pm 0,7$	$\pm 0,2$
RGT	10,27	54,6	2,5	6,9	22,5	22,7	31,4	1,3	8,6	21,5	86,0	1,74	95,9	29,1	5,5	23,7	125,0	3,3
Reform	$\pm 0,04$	$\pm 0,6$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,2$	$\pm 0,4$	$\pm 0,5$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,4$	$\pm 0,5$	$\pm 0,0$	$\pm 0,8$	$\pm 0,6$	$\pm 0,2$	$\pm 0,5$	$\pm 0,2$	$\pm 0,1$
Asory	9,52	54,3	5,0	3,9	25,2	20,2	37,3	1,7	10,2	25,5	91,7	1,45	96,9	22,7	3,6	19,1	119,6	4,3
	$\pm 0,03$	$\pm 2,9$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$	$\pm 0,5$	$\pm 2,3$	$\pm 0,1$	$\pm 0,0$	$\pm 0,0$	$\pm 0,1$	$\pm 3,0$	$\pm 0,1$	$\pm 0,4$	$\pm 0,4$	$\pm 0,1$	$\pm 0,3$	$\pm 0,2$	$\pm 0,1$

A.8. Glutenproteinzusammensetzung industrieller Vitalkleber

Tabelle 52: Rohproteingehalt, Gehalt der Gliadine (Glia) und der Glutenproteintypen α -, γ -, ω 1,2- und ω 5-Gliadine, der Glutenine (Glut), ω b-Gliadine, *Low-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (LMW-GS), *High-Molecular-Weight* Glutenin-Untereinheiten (HMW-GS), der Summe aus Gliadinen und Gluteninen (Glia und Glut), Verhältnis von Gliadin zu Glutenin (Glia/Glut), Gehalt der SDS-löslichen Proteine (SDSL), Gesamtgehalt an Gluteninmakropolymer (GMP), *Low-Molecular Weight* Gluteninmakropolymer (LMW-GMP), *High-Molecular Weight* Gluteninmakropolymer (HMW-GMP), Summe und Verhältnis aus SDS-löslichen Proteinen und Gluteninmakropolymer (SDSL/GMP), Gehalt an freien (SH) und gebundenen (SS) Thiolen, Gesamtthiolgehalt (SH und SS) und Verhältnis aus gebundenen und freien Thiolen (SS/SH) von industriell hergestellten Vitalkleberproben guter und schlechter Qualität. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n = 3).

	Roh- protein- gehalt	Glia gesamt	ω 5- Glia	ω 1,2- Glia	α - Glia	γ - Glia	Glut gesamt	ω b- Glia	HMW- GS	LMW- GS	Summe Glia und Glut	Glia/ Glut	SDSL	GMP gesamt	HMW- GMP	LMW- GMP	SDSL und GMP	SDSL/ GMP	SH	SS	SH und SS	SS/SH
	[%]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]		[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]	[mg/g]		[μ mol/g Protein]	[μ mol/g Protein]	[μ mol/g Protein]	
Vitalkleber	72,77	580,1	20,9	68,7	286,2	204,3	205,5	10,8	59,7	135,0	785,6	2,82	772,7	88,0	19,9	68,1	860,8	9,1	1,6	27,1	28,7	16,9
guter	$\pm 0,02$	$\pm 10,7$	$\pm 0,2$	$\pm 1,1$	$\pm 4,6$	$\pm 4,8$	$\pm 5,4$	$\pm 0,7$	$\pm 1,4$	$\pm 3,4$	$\pm 5,3$	$\pm 0,12$	$\pm 18,2$	$\pm 21,2$	$\pm 2,6$	$\pm 18,5$	$\pm 12,1$	$\pm 2,3$	$\pm 0,33$	$\pm 2,23$	$\pm 2,55$	$\pm 2,35$
Qualität																						
Vitalkleber	73,65	491,5	22,6	47,0	252,7	169,2	295,5	16,4	75,2	204,0	787,0	1,66	800,9	225,3	55,4	169,9	1026,2	3,6	1,6	30,1	31,7	18,4
schlechter	$\pm 0,04$	$\pm 14,7$	$\pm 0,6$	$\pm 1,5$	$\pm 7,1$	$\pm 5,5$	$\pm 4,3$	$\pm 0,5$	$\pm 0,7$	$\pm 3,1$	$\pm 11,5$	$\pm 0,07$	$\pm 96,2$	$\pm 2,3$	$\pm 1,4$	$\pm 1,0$	$\pm 98,5$	$\pm 0,4$	$\pm 0,08$	$\pm 1,44$	$\pm 1,39$	$\pm 1,58$
Qualität																						