



universität
wien

Diplomarbeit

Titel der Diplomarbeit

Vergleichende Analyse ausgewählter Primär- und
Sekundärstoffe von unterschiedlichen Zuchtformen der
Art *Glycine max* L. (Merr.)

Verfasserin

Scheffknecht Christine Maria

Angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, im Oktober 2010

Studienkennzahl lt. Studienblatt:
Studienrichtung lt. Studienblatt::
Matrikelnummer.:
Betreuerin:

A 438
Botanik
021 65 34
ao Univ.-Prof. Dr. Karin Vetschera

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Biologie von <i>Glycine max</i> L. (Merr.)	4
2.1. Herkunft, Systematik und Morphologie	4
2.2. Biologische Stickstoff-Fixierung.....	7
2.2.1. Chemischer Signalaustausch - Prä-Infektionsphase	10
2.2.2. Wurzelhaarinfektion und Nodulbildung	11
2.2.3. Stoffaustausch zwischen Pflanzenzellen und intrazellulären Bakterien	13
3. Ernährungsphysiologisch bedeutsame Inhaltsstoffe	14
3.1 Primärstoffe – Überblick	14
3.1.1 Primärstoffe – Fette und Öle: Fettsäurezusammensetzung	15
3.1.2 Primärstoffe – Proteine: Aminosäurezusammensetzung	17
3.2 Sekundärstoffe – Überblick	19
3.2.1 Flavonoide – Biosynthese	19
3.2.2 Flavonoide – biologische und ernährungsphysiologische Wirkung	23
4. Material und Methoden	25
4.1. Rahmenbedingungen der Diplomarbeit	25
4.2. Probennahme im Detail	25
4.3. Analytik	26
4.3.1. TKG und Primärinhaltsstoffe, Analytik und Auswertung	26
4.3.2. Sekundärstoffe – Isoflavone: Probenauswahl und Vorbereitung ..	27
4.3.2.1. Herstellung der Standardlösungen	27
4.3.2.2. Extraktion des Pflanzenmaterials	28
4.3.2.3. Identifizierung und Quantifizierung der mittels HPLC	29
4.3.2.4. Auswertung der HPLC – Profile	30
4.3.2.5. Testversuch zur Isoflavonverteilung in der Pflanze	31
4.3.2.6. Verwendete Geräte und Chemikalien	31

5. Ergebnisse	33
5.1. Primärstoffe und TKG	33
5.1.1 Korrelationen zwischen den Variablen	33
5.1.2 Sortenunterschiede in Primärstoffgehalt und TKG	35
5.1.3 Einfluss der geographischen Lage und der Bodenart des	38
Anbaugebietes	
5.1.4 Einfluss der Kulturführungsmaßnahmen auf Primärstoffgehalt	39
und TKG	
5.1.5 Einfluss des Knöllchenbesatzes auf TKG und Primärinhaltsstoffe	41
5.2 Sekundärstoffe – Isoflavone	42
5.2.1 HPLC-Messung der Isoflavonstandards und Kalibration	42
5.2.2 Isoflavongehalt reifer Samen	45
5.2.3 Testversuch zur Isoflavonverteilung in der Pflanze	51
5.2.4 Entwicklungsbedingte Akkumulationsunterschiede	53
5.3 Korrelation zwischen Proteingehalt und Isoflavonprofil	54
6. Diskussion	56
6.1 Primärinhaltsstoffe	56
6.2 Sekundärinhaltsstoffe	59
7. Literaturverzeichnis	61
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	67
9. Zusammenfassung	69
10. Anhang	72
11. Danksagung.....	78
12. Curriculum Vitae	79

1. Einleitung

Glycine max L. (Merr.) stammt aus der Familie der Leguminosae (Fabaceae) und ist eine wärmeliebende Kurztagspflanze, die Tageslängen von weniger als 14 Stunden benötigt, um in die generative Phase zu wechseln. Die ursprüngliche Heimat der Sojabohne ist nicht genau bekannt; vermutlich stammt die Pflanze aus Süd-Ost Asien. Die Geschichte des Sojabohnenanbaus in Österreich und Europa wurde von Prof. Dr. Friedrich Haberlandt, der bis 1878 an der Wiener Universität für Bodenkultur am Ordinariat für Pflanzenproduktion wirkte, maßgeblich beeinflusst. Im Jahr 1873 erwarb er im Zuge der Wiener Weltausstellung Sojasamen verschiedener Herkünfte, mit denen er in Folge umfangreiche Anbauversuche startete (Ruckenbauer, 2008). Es gelang ihm, einige Varietäten zur Keimung zu bringen. Seine Arbeit vor rund 135 Jahren bildet den Grundstein zur Erforschung und Kultivierung der Sojabohne in Österreich.

Heute werden in Österreich rund 55.000 Tonnen Sojabohnen pro Jahr geerntet (Krumphuber, 2008). Aufgrund des hohen Wärmebedarfs der Pflanze konzentrieren sich die Hauptanbauflächen auf den trockeneren ostösterreichischen Raum, wobei ausschließlich frühreife Sorten kultiviert werden. Derzeit sind 22 Sorten für den Anbau zugelassen, die hauptsächlich den Reifegruppen 000 (=sehr früh) bzw. 00 (=mittelfrüh) zuzuordnen sind (Hofer et al., 2008). Einzelne Sorten gehören der Reifegruppe 0 (=früh) an, später reifende Sorten gelangen in Österreich wegen des hohen Wärmebedarfs der Sojabohne nur in Ausnahmefällen zur Abreife (Vollmann, 2005). Geographisch befindet sich die klimatische Grenze für die erfolgreiche Kultivierung der Pflanze im Waldviertel.

Aufgrund der zahlreichen Verwendungsmöglichkeiten der Sojabohne in Tier- und Humanernährung sowie Medizin sind ihre Inhaltsstoffe des Primär- und Sekundärstoffwechsels relativ gut erforscht. Der durchschnittliche Proteinanteil der Samen beträgt ca. 40%, der Ölgehalt ca. 20%. Die Samenqualität, meist ausgedrückt in Prozentgehalt Protein, variiert sowohl sortenbedingt, wie auch aufgrund verschiedener Umweltfaktoren. Die Proteingehalte der aus

mitteleuropäischem Anbau stammenden Sojabohnen liegen aus klimatischen Gründen meist unter 40% (Vollmann et al., 2000). Sojabohnen, die für die Lebensmittelproduktion verwendet werden, müssen bestimmte Qualitätskriterien erfüllen. Ein hoher Proteingehalt der Samen ermöglicht mehr Proteinausbeute bei der Produktion und somit eine wirtschaftlich bedeutende, höhere Produktionsmenge. Daher stellt sich die Frage, ob es Möglichkeiten gibt, die anteilige Zusammensetzung bzw. Menge der Hauptinhaltsstoffe der Samen zu steuern. Ein wesentliches Ziel der Arbeit war daher eine vergleichende Bewertung der untersuchten Einflussfaktoren wie Kulturführungsmaßnahmen, geographische Lage, Bodenart, und Knöllchenbesatz auf die Zusammensetzung der Speicherprodukte (Protein, Öl) sowie Sekundärstoffe (Isoflavone) der reifen Samen.

Da die Sojabohne in enger Symbiose mit der bodenlebenden Bakterienart *Bradyrhizobium japonicum* lebt, sollten allfällige Auswirkungen dieser Symbiose auf den Gehalt an Primär-, und Sekundärstoffen als weiteres Ziel dieser Arbeit untersucht werden. In den Wurzelknöllchen wird mit Hilfe der symbiontischen Bakterien Luftstickstoff fixiert, der so für die Wirtspflanze verfügbar gemacht wird. Die Syntheseleistung der Pflanze wird durch die Bereitstellung dieses essentiellen Nährstoffes erhöht, welcher direkten Einfluss auf die Primärstoffproduktion nimmt. Die Interaktion zwischen Pflanze und Bakterium wird durch die Abgabe von spezifischen endogenen Isoflavon-Signalmolekülen über die Pflanzenwurzel in den Boden initiiert (Subramanian et al., 2007). Da die Produktion von Isoflavonen essentiell für die Etablierung der Symbiose ist (Subramanian et al., 2006), wäre ein Einfluss des Isoflavongehalts in Wurzelgeweben auf die Quantität der angelockten Bakterien und ausgebildeten Wurzelknöllchen zu erwarten.

Ebenso könnte die symbiontische Beziehung zwischen Pflanze und Mikroorganismen Einfluss auf organspezifische oder ontogenetisch bedingte Unterschiede vor allem der Sekundärstoffe haben. Zur Klärung dieser Frage war es daher notwendig, die Isoflavonprofile diesbezüglich vergleichend zu analysieren. Da Primär- und Sekundärstoffwechsel nicht scharf gegeneinander abgrenzbar sind und die Ressourcen von der Pflanze optimal eingesetzt werden

müssen, sollte überdies ein Vergleich zwischen Mengen der gebildeten Samenproteine in Relation zur Menge an gebildeten Isoflavonen durchgeführt werden. Daraus könnten weitere Bewertungskriterien für die Qualität der Samen resultieren.

2. Biologie von *Glycine max*

In diesem Kapitel werden Herkunft, Systematik und Morphologie der Sojabohne besprochen. Weiters wird genauer auf symbiontische Beziehung zwischen der Pflanze mit bodenlebenden Bakterien, welche zur biologischen Stickstofffixierung befähigt sind, eingegangen.

2.1 Herkunft, Systematik und Morphologie

Die in Nord- und Zentralchina beheimatete Sojabohne gilt als eine der ältesten Kulturpflanzen der Welt. Aufgrund historischer und geographischer Hinweise wird angenommen, dass Sojabohnen erstmals in der östlichen Hälfte von China, zwischen dem 17. und 11. Jahrhundert vor Christus angebaut wurden (Hymnowitz, 1970). Die kultivierte Sojabohne *Glycine max* L. (Merr.) (Leguminosae - Schmetterlingsblütler) wird dem Tribus *Phaseoleae* der Unterfamilie *Faboideae* und innerhalb der Gattung der Untergattung *Soja* zugeordnet. Weitere wichtige Arten dieser Untergattung sind *G. soja* und *G. gracilis*. *Glycine soja* ist eine wild vorkommende Art, die auf Feldern, an Straßenrändern und Flussufern vieler asiatischer Länder wächst und welche aufgrund zytologischer, morphologischer und molekularer Forschungsergebnisse als Ausgangssippe der heute kultivierten Sojabohne gesehen wird (Canadian Food Inspection Agency, 1996). *Glycine gracilis* hingegen könnte entweder eine Zwischenstufe der Speziation von *G. max* aus *G. soja* (Feduka, 1933), oder ein Hybrid zwischen *G. soja* und *G. max* (Hymnowitz, 1970) sein. Die kultivierte Sojabohne, *G. max* L. (Merr.), besitzt einen Chromosomensatz von $2n=40$.

Die Sojabohne ist eine krautige, aufrecht wachsende Annuelle mit einer Wuchshöhe von bis zu 1,5 m und buschigen Seitenverzweigungen. Es gibt Genotypen mit determiniertem, semi-determiniertem und indeterminiertem Wachstum. Der indeterminierte Typ ist charakterisiert durch die fortwährende Aktivität des apikalen Meristems, die fast die gesamte Wachstumsperiode hindurch andauert. Die vegetative Entwicklung des determinierten Typs endet,

wenn sich das apikale Meristem zur Infloreszenz entwickelt. Beim semi-determinierten Typ endet das vegetative Wachstum der indeterminierten Stängel nach der Blühperiode. Keine der zahlreichen Varietäten ist frosttolerant (Canadian Food Inspection Agency, 1996).

Unter geeigneten Bedingungen keimt die dikotyle Pflanze nach 3-7 Tagen und bildet nach der Keimung zwei gegenständige, ungeteilte Primärblätter aus. Diese besitzen 1-2 cm lange Blattstiele und zwei in den Blattachseln sitzende Stipel. Die ganzrandigen, dreiteiligen Folgeblätter sind lang gestielt und alternierend am Stamm angeordnet und weisen ebenfalls stipel auf. Die Fiederblättchen können länglich bis ovat oder lanceolat geformt sein und werden 4-20 cm lang und 3-10 cm breit. Am Ansatzpunkt der Petiolen am Stamm ist ein Pulvinus ausgebildet; dieser ist im Falle der Primär- und dreiteiligen Blätter groß, bei den Einzelblättchen jedoch deutlich kleiner. Paare kleiner Prophylls befinden sich an der Basis der lateralen Zweige und am unteren Teil des Blütenstiels jeder Blüte. Stamm, Blätter, Sepalen und Hülsen der meisten Varietäten sind dicht mit feinen Trichomen besetzt (Hicks, 1987). Zum Habitus und Aufbau der Sojapflanze siehe Abb.1.

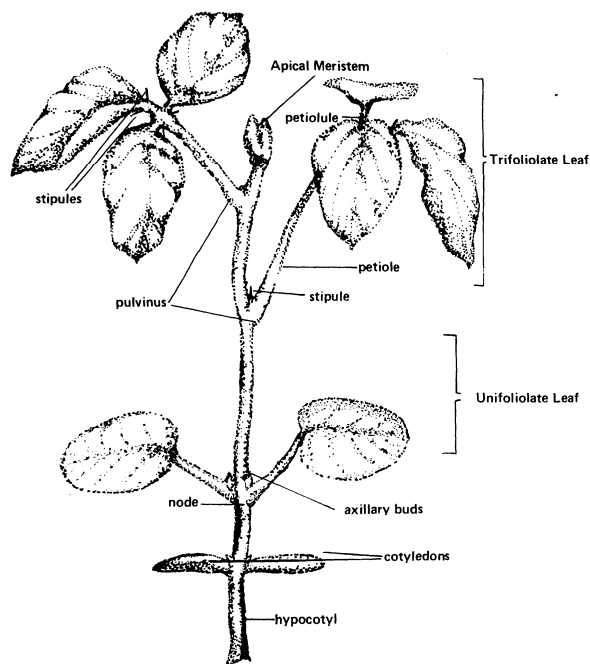


Abb.1: Aufbau und Habitus einer Sojapflanze; Quelle: Hicks (1978)

Die als Seitentriebe ausgebildeten Infloreszenzen entsprechen einer Traube. Die selbstfertilen, weiß-rosa bis violett- farbigen zygomorphen Einzelblüten sind klein und unscheinbar. Der Blütenbau entspricht einer typischen Schmetterlingsblüte. Die fünfzähligen Blüten bestehen aus einer tubulären Calyx mit fünf Sepalen und einer Corolla aus fünf Petalen (Fahne, Schiffchen, Flügel). Neun der zehn Antheren sind an der Basis der Filamente miteinander verwachsen. Zur Blütenmorphologie siehe Abb. 2. Die Früchte sind Hülsen, welche aus einem Karpell bestehen und sich bei Reife an Rücken- und Bauchnaht öffnen. Sie werden in Clustern von 3-5 ausgebildet und beinhalten jeweils 3-5 Samen. Form und Größe der Samen variieren stark innerhalb der verschiedenen Varietäten. Meist sind die Samen oval, je nach Nutzungsrichtung können sie jedoch auch fast rund, länglich oder abgeflacht geformt sein (Sprent, 2009). Die Samengröße kultivierter Sorten schwankt in ihrem Tausendkorngewicht in einem Bereich von 140-240 g (Deix, 2008).

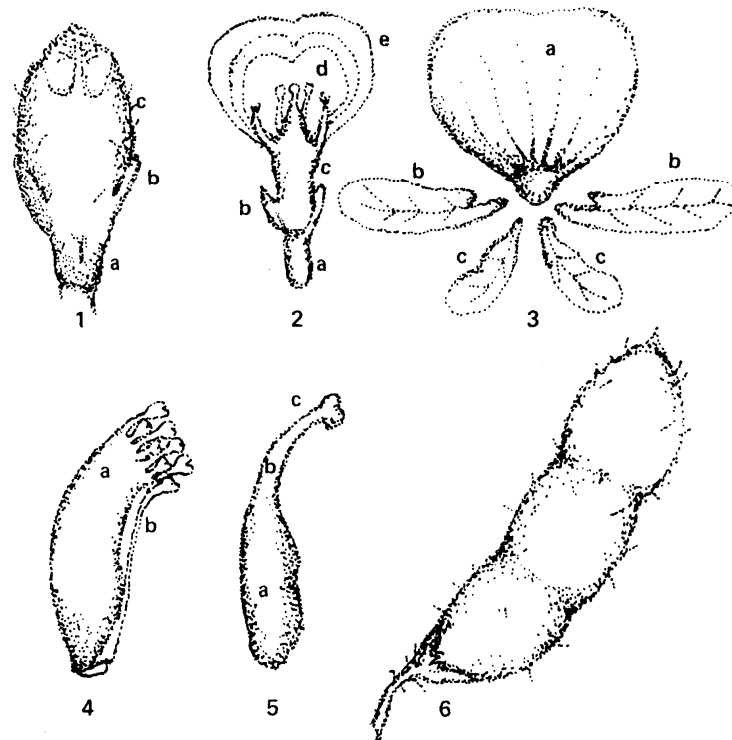


Abb.2: Sojabohnenblüte und ihre Teile; Quelle: Hicks (1978) (1) junge Knospe: a. Blütenstiel, b. Braktee, c. Kelch. (2) Blüte: a. Pedikel, b. Braktee, c. Kelch, d. Stamen, e. Petale. (3) Teil der Corolla: a. Fahne, b. Schiffchen, c. Flügel. (4) Androceum: a. neun verwachsene Stamen, b. ein freier Stamen. (5) Pistill mit Ovarium: a. Ovarium, b. Griffel, c. Narbe. (6) reife Hülse

Die Sojabohne bildet eine durchschnittlich 10 cm lange Pfahlwurzel aus. An der Hauptwurzel werden zahlreiche Seitenwurzeln, sowie Kronen- und Adventivwurzeln ausgebildet. In der obersten Bodenschicht von 15-20 cm befindet sich der Hauptanteil der Wurzeln: ihm kommt die größte Bedeutung bei Wasser- und Nährstoffaufnahme zu (Deix, 2008).

2.2 Biologische N₂ Fixierung

Stickstoff ist ein integrales Element von organischen Verbindungen. Somit ist er wesentlicher Bestandteil von Aminosäuren, Amiden, Proteinen, Nukleinsäuren, Nucleotiden, Polyaminen und vielen anderen Metaboliten. Dies erklärt den hohen Stickstoffbedarf der Pflanzen und damit die Wichtigkeit von N als essentiellen Makronährstoff. Im Boden liegt Stickstoff zu mehr als 90% in organisch gebundener Form vor (Amberger, 1996) und ist nicht pflanzenverfügbar. Nur ein kleiner Teil (~ 5%) liegt in Form Ammonium (NH₄⁺) und Nitrat (NO₃⁻) gebunden vor (Amberger, 1996). Im Gegensatz zum Kohlenstoff, der als CO₂ über die Spaltöffnungen der Blätter aus der Luft aufgenommen wird, kann der riesige Vorrat an Luftstickstoff (N₂~78%) von Pflanzen nicht genutzt werden. Der Grund dafür liegt in der sehr stabilen Dreifachbindung, die den Stickstoff sehr reaktionsträge macht, und deren Aufbrechen viel Energie erfordert (N≡N = 942 kJ/mol). Erst nach Bindungsspaltung und Überführung in Salzform (v.a. Ammonium und Nitrat), kann Stickstoff über die Pflanzenwurzeln aufgenommen werden (Amberger, 1996). Die biologische Stickstoff-Fixierung, also die Umwandlung von N₂ in Ammoniak (NH₃), ist einer der wichtigsten biologischen Prozesse.

Die Fähigkeit gewisser Mikroorganismengruppen N₂ mit Hilfe des speziellen Enzymsystems Nitrogenase direkt aufzunehmen und zu NH₃ zu reduzieren, hat eine große Bedeutung im globalen Stickstoff-Kreislauf. Der durch Denitrifikation der Biosphäre verloren gegangene Stickstoff wird durch die Fixierung des Luftstickstoffs ersetzt. Der für die Pflanzen nutzbar gemachte Stickstoff ermöglicht es diesen, auch auf stickstoffarmen Böden zu wachsen. Auch in der

Landwirtschaft spielt die Fixierung des Luftstickstoffs eine wichtige Rolle, da durch intensiven Ackerbau der Boden an Nährstoffen verarmt. Schon lange ist die „natürliche Gründüngung“ bekannt. Dabei werden z.B. Leguminosen als Vor- oder Zwischenfrüchte angebaut und in den Boden eingearbeitet, wodurch die Bodenfruchtbarkeit nachhaltig aufrechterhalten wird und die Ausbringung von Stickstoffdünger auf ein Minimum reduziert werden kann.

Nach der Lebensweise der Mikroben werden drei N₂-fixierende Systeme unterschieden: frei im Boden lebende Bakterien, Mikroorganismen-Assoziationen, die auf der Wurzeloberfläche oder in den Interzellularen leben, und in Symbiose mit Pflanzenwurzeln lebende und knöllchenbildende Bakterien (Amberger, 1996). Letztere besitzen die höchste N₂-Fixierungskapazität. Die Bakteriengattungen *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* und *Azorhizobium* aus der Familie der Rhizobiaceae gehen eine Symbiose mit Leguminosen ein (Hirsch 1992, Van Rhijn et al. 1995). Ein wichtiger Symbiont von *G. max* ist die gram-negative und langsam wachsende Bakterienart *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982; Hirsch, 1992). Weitere Arten die mit der Sojabohne eine Symbiose eingehen, sind *Bradyrhizobium elkanii*, *Rhizobium fredii* (Hirsch, 1992), *Sinorhizobium fredii* (Pueppke et al., 1998; Sprent, 2009) und *Bradyrhizobium liaoningense* (Sprent, 2009). Die Lebensgemeinschaft ist sehr eng, und im Verlauf der Symbiose erfahren die Bakterien umfassende morphologische und physiologische Veränderungen. Die Pflanzenpartner bilden spezielle Strukturen, die Nodule (Knöllchen) aus, in denen sich die Rhizobien ansiedeln und wo die biologische Stickstofffixierung stattfindet (Subramanian et al., 2007). Es wird zwischen zwei Typen unterschieden: Desmodioide Nodule mit determiniertem Wachstum sind charakteristisch für Pflanzen aus tropischen und sub-tropischen Regionen, während indeterminierte Nodule oft von Pflanzen aus temperaten Klimata ausgebildet werden (Mylona et al., 1995). Weitere Unterschiede zwischen den Nodultypen siehe Kapitel 2.2.2 und Tabelle. 1.

Tab. 1: Hauptunterschiede zwischen determinierten und indeterminierten Knöllchen von fortgeschrittenen papilionoiden Leguminosen mit Wurzelhaarinfektion

Merkmal	Indeterminiert	Determiniert
Initiierung der Zellteilung ¹	innerer Kortex	äußerer Kortex
Meristematisches Wachstum	Apikal, kontinuierlich	Limitiert
Teilung infizierter Zellen	Nein	Ja
Lebensspanne	langlebig	kurzlebig
Nodul-Form	Zylindrisch, oft verzweigt	Sphärisch, mit Lentizellen
Bakterioide in Symbiosomen	Einzel, Stäbchen oder (selten) pleomorph	Mehrere, meist stäbchenförmig
Exportprodukte	Amide	Ureide ²
Ursprung	Gemäßigte Klimazonen	Tropische und subtropische Regionen
Nod-Gen Auslöser	Flavone	Hauptsächlich Isoflavone
Pflanzenbeispiele	<i>Medicago, Pisum, Vicia</i>	<i>Glycine, Phaseolus, Lotus</i>

Angabe zu Merkmalsunterschieden zwischen determinierten Nodulen der phaseoloiden Triben und *Lotus* (Modifiziert nach Hirsch, 1992; Sprent, 2009):

¹ in *Lotus* im mittleren Kortex

² bei determinierten Knöllchen mit Ausnahme von *Lotus* und anderen Lotaeae

2.2.1 Chemischer Signalaustausch - Prä-Infektionsphase

Die Interaktion beginnt mit einem Signalaustausch zwischen den beiden Symbiosepartnern. Die in den Boden abgegebenen Wurzelexsudate von *G. max* fungieren dabei als Lockstoffe, die eine positive Chemotaxis von *Bradyrhizobium japonicum* in Richtung Pflanzenwurzel auslösen. Die dabei hauptsächlich wirkenden Substanzen sind Dicarbonsäuren und die Säureamide Glutamat und Aspartat, während die im Exsudat enthaltenen Isoflavone nur sehr schwache chemotaktische Wirkung besitzen (Barbour et al., 1991). Die Bakterien kolonisieren die Wurzelhaaroberfläche und sind fähig spezifische Flavonoid-Komponenten von kompatiblen Wirtspflanzen zu erkennen, welche daraufhin absorbiert werden. Ausschlaggebend ist die chemische Struktur des Flavonoid-Signalmoleküls, wobei je nach Leguminosen-Art spezifische Derivate ausgeschieden werden, welche wiederum nur von einer bestimmten Rhizobienart erkannt werden. Für weitere und grundlegende Informationen zu Flavonoiden siehe Kapitel 3.

Das Eindringen des Moleküls in die Bakterienzelle induziert die Aktivierung eines genregulierenden Enzyms, welches eine Gruppe von Bakteriengen (Nodulationsgene; (Nod-Genes) anschaltet. Diese sind ebenso wie die Gene der Stickstoff-Fixierung (Nif-Genes) bei *Bradyrhizobium japonicum* auf den Chromosomen lokalisiert, bei der schnell wachsenden Art *Rhizobium japonicum* dagegen auf den Plasmiden (Masterson et al., 1982). Die von *G. max* produzierten Isoflavone Daidzein und Genistein induzieren effektiv die Expression der Nod-Gene von *Bradyrhizobium japonicum* (Hirsch et al., 2001).

Die Produkte der Nod-Gene sind Enzyme, die ein lipo-chitooligosaccharid Signalmolekül synthetisieren, kurz Nod-Signal oder Nod-Faktor genannt (Subramanian et al., 2007). Diese Nod-Faktoren werden von den Bakterien abgegeben, initiieren den Nodulationsprozess in der Pflanze und sind verantwortlich für Wurzelhaardeformation und Teilung der Kortikalzellen in der kompatiblen Wirtspflanze (Hirsch, 1992). Sie werden von Rezeptoren der Wurzelepidermis, und zwar in der Region der Wurzelhaarbildung, erkannt

(Sprent, 2009). Weitere Komponenten der Prä-Infektionsphase sind Lectine der Wurzelhaare, welche den Rhizobien die Adhäsion an diese ermöglichen, sowie Oberflächen-Polysaccharide der Bakterien (Sprent, 2009). Zur Grundstruktur der Nod-Faktoren siehe Abb. 3.

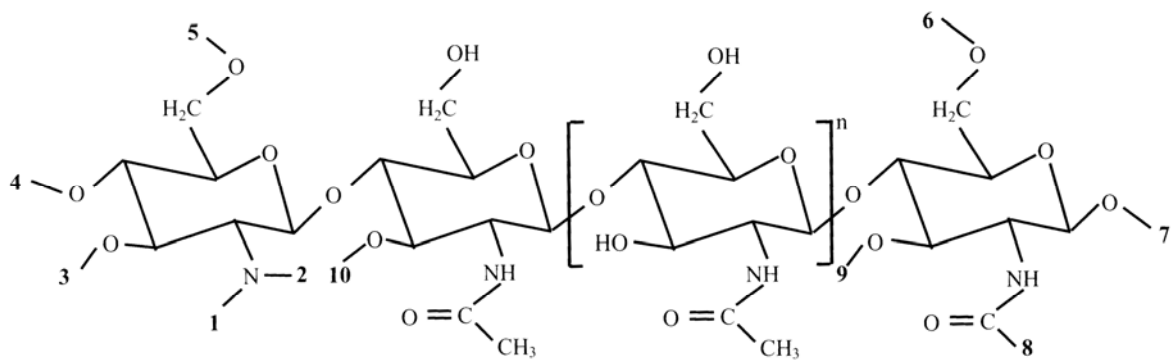


Abb.3: Generelle Merkmale von Lipochitin-Oligosacchariden. Alle besitzen ein β -1-4 verknüpftes N-Acetylglucosamin- Rückgrat mit einer variierenden Anzahl von Resten. In der Abbildung ist $n = 0-3$. Das Rückgrat ist mit bis zu zehn Gruppen unterschiedlicher Komplexität besetzt. Angegeben sind die bedeutendsten aus dem Review von D'Haeze & Holsters (2002). (1, Fettsäurereste mit 14-20 Kohlenstoff Atomen und unterschiedlichem Grad an Ungesättigtheit; 2 Me oder H; 3, 4, 5 Cb, Ac oder H; 6 Fuc, Ara, S oder H; 7 normalerweise H, selten Man oder Gro; 8 normalerweise Me, manchmal H; 9 normalerweise H, manchmal Ara oder Fuc; 10, normalerweise H, selten Ac oder Fuc.) Quelle: Sprent (2009)

Abkürzungen: Ara, Arabinosyl; Ac, Acetyl; Cb, Carbamoyl; Fuc, Fucosyl; Gro, Glycerol; H, Wasserstoff; Man, Mannosyl; Me, Metyl, S, Sulfatether

2.2.2 Wurzelhaarinfektion und Nodulbildung

Infizierte Wurzelhaare rollen sich ein und bilden eine Tasche, welche Rhizobien darin einschließt, worauf diese durch die Wurzelhaarzellwand in die Pflanze eindringen können. Rund um die Bakterien werden von der Pflanze tubuläre Strukturen (infection threads) ausgebildet, die es den Rhizobien ermöglichen, sich zwischen den Wurzelhaarzellen zu bewegen. Gleichzeitig aktivieren die Nod-Faktoren die Kortikalzellen auf der gegenüberliegenden Seite der Infektion. Dies führt zu Dedifferenzierung und Teilung dieser Zellen, und zur Bildung des Nodul-Primordiums. Im Falle der determinierten Knöllchen entwickelt sich dieses in den äußeren Kortikalzellen. Erreichen die wachsenden

Infektionsschläuche die primordialen Zellen, werden die Bakterien durch Endozytose in deren Cytoplasma entlassen (Manoury et al., 2008). Die Peribakteroid-Membran ist pflanzlichen Ursprungs und umschließt die Symbionten. Sie stellt die physiologische Barriere zwischen Mikrosymbiont und Cytoplasma der Wirtszelle dar und verhindert, dass eine pflanzliche Abwehrreaktion stattfindet. Weiters ist sie die Schnittstelle für Signal- und Stoffaustausch zwischen den Symbiosepartnern (Mylona et al., 1995). Während der Nodulentwicklung differenzieren die Bakterien in ihre endosymbiontische Form, und werden nun Bakterioide genannt. Bakterioide und die umschließende Peribakteroid-Membran werden als Symbiosom bezeichnet (Mylona et al., 1995). In einem Symbiosom befinden sich bis zu acht Bakterioide, wobei diese in determinierten Nodulen stäbchenförmig sind. Charakteristischerweise treten die im Tribus *Phaseoleae* vorkommenden Symbionten in Form von kurzen Stäbchen auf (Sprent, 2009).

Beim determinierten Nodultyp beinhaltet das infizierte Gewebe immer nicht-infizierte und infizierte Zellen. Im Gegensatz zu den indeterminierten Knöllchen, die bei temperaten Leguminosen weit verbreitet sind, fehlt den determinierten Nodulen ein persistierendes Meristem. Das meristematische Wachstum ist limitiert; es findet Wachstum durch Zellexpansion statt, um die sich teilenden Bakterien unterzubringen (Manoury et al., 2008). Manche Zellen werden von den Infektionsschläuchen durchdrungen, und diese bleiben meristematisch. Die Fixierung des Stickstoffs beginnt, bevor diese Zellen ausgewachsen sind, und die primären Produkte werden für das Wachstum der Nodule verwendet. Bei indeterminierten Knöllchen dagegen werden diese Produkte exportiert (Sprent, 2009). Ist die Differenzierung der determinierten Knöllchen abgeschlossen, endet das Zellwachstum. Das Resultat sind kugelige Nodule mit einer einzelnen, homogenen und zentral liegenden Stickstoff-Fixierungszone. Sie besitzen charakteristische Lentizellen, die für den Gasaustausch verantwortlich sind, und vom Korkkambium produziert werden (Sprent, 2009).

2.2.3 Stoffaustausch zwischen Pflanzenzellen und intrazellulären Bakterien

Die Reduktion von N_2 zu Ammonium ist ein sehr energieaufwendiger Vorgang. Es sind 16 Moleküle Adenosin-Triphosphat (ATP), und ein komplexes Set von Enzymen nötig, um die drei-kovalente Bindung des Stickstoffs zu spalten, so dass er eine Bindung mit Wasserstoff eingehen kann. Der Prozess findet in den Bakteroiden statt, wobei folgende Reaktion vom Enzymkomplex Nitrogenase katalysiert wird: $N_2 + 16 ATP + 8e^- + 10H^+ \rightarrow 2 NH_4^+ + H_2 + 16 ADP + Pi$ (Vance, 2008). Der Nitrogenase-Enzymkomplex besteht aus zwei Komponenten, einem homodimeren Eisen-Protein, und einem tetrameren Eisen-Molybdän-Protein (Mylona et al., 1995). Aus der Photosynthese stammende Sucrose wird zu Oxalacetat und Malat metabolisiert, letzteres wird von den Bakteroiden als Energiequelle verwendet, um die Nitrogenase anzutreiben (Vance, 2008). Ammonium wird im Cytosol der Wirtspflanze in Aminosäuren eingebaut. Die primären Produkte, welche fixierten Stickstoff enthalten, werden aus den Nodulen in den Xylemstrom transportiert. Im Falle der meisten temperaten Leguminosen sind dies die Amide Asparagin und Glutamin (Vance 2008, Sprent 2009). Dagegen inkorporieren viele tropische und subtropische Leguminosen mit determinierten Nodulen Ammonium in Ureide (Purin-Derivate). Die Ureide Allantoin und Allantoinsäure werden aus den Nodulen in den Xylemstrom exportiert (Vance 2008, Sprent 1980).

Der Nitrogenase-Enzymkomplex ist empfindlich gegenüber Sauerstoff und wird durch diesen inaktiviert. Um das Enzym vor einer zu hohen Sauerstoff-Konzentration innerhalb des Noduls zu schützen, wird das Protein Leghämoglobin synthetisiert. Dieser Vorgang passiert kurz bevor die reifenden Knöllchen zur Stickstoff-Fixierung fähig sind (Liu, 1997). Leghämoglobin hat eine hohe Affinität zu Sauerstoff und wirkt als Sauerstoff-Carrier. Es kontrolliert die Konzentration von freiem Sauerstoff in den Nodulen und ermöglicht die kontrollierte Diffusion von Sauerstoff zu den Bakteroiden und verleiht den Nodulen ihre charakteristisch rote Farbe (Liu, 1997).

3. Ernährungsphysiologisch bedeutsame Inhaltsstoffe

In diesem Kapitel werden die von der Sojabohne synthetisierten Inhaltsstoffe beschrieben. Dabei wird zwischen Primär- und Sekundärstoffen unterschieden, es wird lediglich auf ernährungsphysiologisch wichtige Inhaltsstoffe näher eingegangen.

3.1 Primärstoffe – Überblick

Aufgrund der einzigartigen chemischen Zusammensetzung der Samen zählt die Sojabohne zu den wertvollsten landwirtschaftlichen Rohstoffen. Seit über fünftausend Jahren wird die Pflanze in ostasiatischen Kulturkreisen angebaut, und wegen des hohen ernährungsphysiologischen Wertes der Samen zur Herstellung zahlreicher Lebensmittel genutzt (Berghofer, 2008). Die inhaltsstoffliche Komposition der Samen ist genetisch determiniert, variiert jedoch je nach Anbaugebiet und Standortbedingungen. Die Samen sind reich an qualitativ hochwertigem Öl- und Protein, weshalb die Sojabohne eine der wichtigsten Kulturpflanzen der Welt darstellt. Die Samen werden nicht nur zur Herstellung von Lebensmitteln verwendet, sondern auch bei der Produktion von Viehfutter spielt das aus dem Sojamehl stammende Protein eine wichtige Rolle.

Es wird zwischen zwei Sojabohntypen unterschieden: Ölbohnen und Speisesojabohnen. Speisesojabohnen werden speziell für die Verwendung in der Lebensmittelindustrie gezüchtet, wobei der Ernteertrag und Ölgehalt niedriger ist als bei Ölbohnen. Sie zeichnen sich jedoch durch einen höheren Proteingehalt aus (Liu, 1997). Durchschnittlich besteht eine getrocknete Sojabohne aus 40% Protein und 20% Öl. Die verbleibende Trockensubstanz setzt sich aus Kohlenhydraten (~35%) und Mineralstoffen (~5%) zusammen (Tab.2; Liu, 1997). Diese Werte variieren in Abhängigkeit vieler Faktoren, wie zum Beispiel Sojabohnen-Varietät, Wachstumsperiode, geographische Lage und den standörtlichen Umweltbedingungen. Nach Liu (1997) liegt der Proteingehalt zwischen 30% und 50%, und der Gehalt an Öl schwankt von 12-30%. Der

Wassergehalt reifer, getrockneter Samen beträgt etwa 10% (Yoshida et al., 2005). Den höchsten Gehalt an Öl und Protein besitzen die Kotyledonen, welche ungefähr 90% des Samens ausmachen. In der Schale (~ 8%) sind diese Komponenten nur in sehr geringen Mengen enthalten. Der Proteingehalt der Hypocotyl-Achse entspricht ungefähr jenem der Kotyledonen, jedoch beträgt der Ölgehalt der Kotyledonen nur etwa die Hälfte (Liu, 1997). Eine Übersicht der Inhaltsstoffe von Sojabohnen gibt Tab. 2.

Tab.2: Übersicht der Inhaltsstoffe von Sojabohnen. Quelle: Zeller (1999)

Komponenten	Anteile im Samen
Protein	~ 40 %
Öl	~ 18 %
gesättigte Fettsäuren	< 0,5 % Arachinsäure C_{20:0} < 0,4 % Myristinsäure C_{14:0} 2-7 % Stearinsäure C_{18:0} 4-11 % Palmitinsäure C_{16:0}
ungesättigte Fettsäuren	4-12 % α-Linolensäure C_{18:3} 23-32 % Ölsäure C_{18:1} 48-52 % Linolsäure C_{18:2}
Lecithin	~ 2 %
Kohlenhydrate	34 %
Asche	4,9 %

3.1.1 Primärstoffe – Fette und Öle: Fettsäurezusammensetzung

Natürliche Fette und Öle sind Ester des dreiwertigen Alkohols Glycerin (1,2,3-Propantriol) mit verschiedenen langkettigen Fettsäuren (gesättigte oder ungesättigte aliphatische Monocarbonsäuren). Die Fettsäuren unterscheiden sich in ihrer Kettenlänge (von 12-20 C-Atomen) und dem Grad der Ungesättigtheit (Anzahl von C=C Doppelbindungen im Molekül). Natürlich vorkommende

Fettsäuren sind unverzweigt und haben infolge ihrer biochemischen Synthese eine gerade Anzahl von C-Atomen, weil sie aus C_2 -Einheiten (über Acetyl-Coenzym A) aufgebaut werden.

Während gesättigte Fettsäuren (Alkansäuren) keine Doppelbindungen zwischen den C-Atomen enthalten, besitzen ungesättigte Fettsäuren (Alkensäuren) mindestens eine C=C Doppelbindung im Molekül. Enthält ein Fett mehr ungesättigte als gesättigte Fettsäuren, ist es bei Zimmertemperatur flüssig und wird als Öl bezeichnet. In den meisten natürlich vorkommenden Fettsäuren liegen die Doppelbindungen isoliert und in der cis-Form vor.

Gemäß der American Soybean Association (ASA, 2001) stammt mehr als die Hälfte des weltweit produzierten Pflanzenöls aus der Sojabohne. Das Öl ist ernährungsphysiologisch wertvoll, da es einen hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren enthält. Während Ölsäure eine einfach ungesättigte Fettsäure ist, zählen Linolen- und α -Linolensäure zu den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Tab.2). Einfach ungesättigte Fettsäuren senken den Gesamtcholesterinspiegel im Blut und sind aufgrund dieser Eigenschaft ein wirksames Mittel zur Vorbeugung gegen Herz-Kreislauferkrankungen (ASA, 2001). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren werden auch als „essentielle Fettsäuren“ bezeichnet. Der menschliche Organismus ist nicht zur Synthese fähig, weshalb sie über die Nahrung aufgenommen werden müssen (Zeller, 1999). Da in der Lebensmitteltechnologie Aspekte wie Haltbarkeit, thermische Stabilität und Geschmack im Vordergrund stehen (Zeller, 1999), wird durch züchterische Maßnahmen versucht, den Gehalt der an sich ernährungsphysiologisch wertvollen α -Linolensäure im Soja-Öl zu senken. Weiters werden pflanzliche Öle industriell teilweise gehärtet, um die Oxidationsstabilität zu erhöhen und somit die Haltbarkeit zu verlängern (Zeller, 1999). Dabei wird mittels eines metallischen Katalysators Wasserstoff an die Doppelbindungen angelagert (Hydrierung), wodurch sich der Schmelzpunkt des Fettes erhöht. Dies begünstigt die Entstehung von trans-Fettsäuren bei denen sich die H-Atome auf der gegenüberliegenden Seite der Doppelbindung befinden (Zeller, 1999). Industriell hergestellte trans-Fettsäuren erhöhen den LDL-(low density lipoprotein)

Cholesterin-Spiegel im Blut, und senken gleichzeitig das HDL-(high density lipoprotein)-Cholesterin. Das Risiko von koronarer Herzerkrankung wird erhöht (Ascherio et al. 1994; Brouwer et al., 2010). Gesättigte Fettsäuren können vom Körper selbst synthetisiert werden, und verschiedenen Studien zufolge besteht ein Zusammenhang zwischen gesättigten Fettsäuren und einer Erhöhung des LDL-Cholesterinspiegels (ASA, 2001).

3.1.2 Primärstoffe – Protein: Aminosäurezusammensetzung

Aufgrund ihrer Nährstoffzusammensetzung und hohem Proteingehalt (Tab.2) trägt die Sojabohne wesentlich zur weltweiten Proteinversorgung bei. Obwohl *G. max* zu den Ölsaaten gezählt wird, gehört sie zu den Leguminosen mit dem höchsten Gehalt an Protein (Messina, 1999). Im Vergleich zu den häufig konsumierten Lebensmitteln wie Milch, Käse, Fleisch, Fisch, Brot und Eiern weist die Sojabohne den höchsten Proteinwert auf (Abb.4).

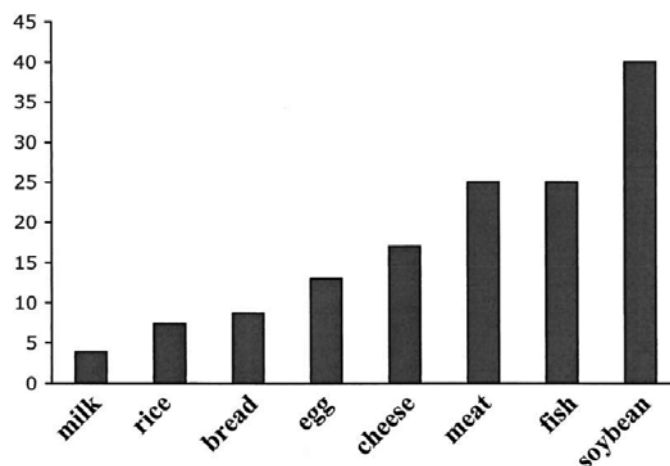


Abb.4: Proteingehalt verschiedener Lebensmittel. Quelle: Krishnan (2005)

Der Hauptanteil der Speicherproteine (~ 70%) besteht aus β -Conglycinin (7S-Protein) und Glycinin (11S-Protein), und wird in den Globulinen der Aleuronkörner gebildet (Meinke et al., 1981). Diese Reserveproteine bilden das Aminosäurereservoir für Keimung und Entwicklung der Pflanze. Die Aminosäurezusammensetzung des Proteins ist so ausgewogen, dass es als

alleinige Eiweißquelle für die menschliche Ernährung ausreichen würde (ASA, 2001). Alle acht lebenswichtigen Aminosäuren sind im Sojaprotein enthalten, nur der Gehalt der schwefelhaltigen Aminosäure Methionin ist relativ gering (Tab.3).

Tab.3: Aminosäurezusammensetzung von Sojabohnenschrot. Quelle: Zeller (1999)

Aminosäure	g pro 100g Protein	Aminosäure	g pro 100g Protein
Alanin	4.0	Lysin*	6.4
Arginin	7.0	Methionin*	1.4
Asparaginsäure	11.3	Phenylalanin*	5.3
Cystein	1.6	Prolin	4.7
Glutaminsäure	17.0	Serin	5.0
Glycin	4.0	Threonin*	4.2
Histidin	2.7	Tryptophan*	1.2
Isoleucin	4.9*	Tyrosin	3.9
Leucin	8.0*	Valin*	5.3

Anmerkung: Essentielle Aminosäuren sind mit * gekennzeichnet.

Die Bewertung von proteinhaltigen Nahrungsmitteln erfolgt bezüglich ihrer Proteinverdaulichkeit nach dem PDCAAS (protein digestibility corrected amino acid score), welcher im Idealfall (bei vollständiger Proteinverdaulichkeit) 1.00 beträgt. Dieser Bewertung zufolge ist die Verdaulichkeit des Sojaproteins (Sojamehl, entölt) vergleichbar mit jener von Kuhmilch und Hühnereiweiß, und besser als die von Fleisch. Dies ist besonders in der veganen Ernährung (ohne tierisches Eiweiß) sowie für die Versorgung in Entwicklungsländern von Bedeutung (ASA, 2001).

3.2 Sekundärstoffe - Überblick

Die Biosynthesekapazität der Sojabohne führt zur Bildung unterschiedlichster Sekundärstoffe. Neben Vertretern der Flavonoide (Isoflavone; Flavonolglycoside, C-Glycosylflavone, Flavone) werden vor allem auch Terpenoide (speziell Triterpensaponine), Vertreter der Alkaloide, nicht-proteinogene Aminosäuren und Peptide akkumuliert. Die verschiedenen Sekundärstoffe finden sich nicht nur in den Samen, sondern kommen in allen Pflanzenorganen vor (Zarucchi et al., 1994). Innerhalb der Stoffklasse der Flavonoide, welche mehr als 8000 Derivate umfasst, spielen vor allem die Isoflavonoide in den Leguminosen eine wesentliche biologische Rolle. Derzeit sind ca. 1600 Derivate bekannt, mit Schwerpunkt der Verbreitung in den Leguminosae. Es gibt aber zunehmend Befunde ihres Vorkommens in anderen nicht mit den Leguminosen verwandten Familien (Lapcik, 2007).

3.2.1 Flavonoide – Biosynthese

Die Biosynthese aller Flavonoide erfolgt über einen gemischten Biosyntheseweg. Ein Teil der Biosynthese geht von der aromatischen Aminosäure Phenylalanin (aus dem Shikimatstoffwechsel) aus, welche zunächst durch das Enzym Phenylalanin-Ammonium Lyase (PAL) desaminiert wird. Das Produkt dieser Reaktion wird weiter durch Cinnamat-4-Hydroxylase (C4H) zu 4-Coumarat hydroxyliert (Abb. 5). Die Aktivierung von 4-Coumarat erfolgt durch die Bildung des Co-A Esters, mittels 4-Coumarat-CoA-Ligase (4CL) (Hamdoon, 2009). Das Flavonoid-Grundgerüst besteht aus 2 Benzolringen (A- und B-Ring), die über einen heterozyklischen Pyran-Ring (Ring C) miteinander verknüpft sind (Abb. 5), und ist das Produkt des Enzyms Chalkon-Synthase (CHS), welche die schrittweise Kondensation von drei Molekülen Malonyl-CoA (aus dem Polyketidstoffwechsel) mit 4-Coumaryl-CoA katalysiert. Die Zyklisierung der entstandenen Chalkone, Naringenin-Chalkon und 4,2',4' - Trihydroxychalkon (Isoliquiritigenin) erfolgt enzymatisch durch Chalkon-Isomerase, was zur Bildung der Flavanone Naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavanon) beziehungsweise

Liquiritigenin (4',7-Dihydroxyflavanon) führt (Abb. 6). Von den Flavanonen leiten sich Flavone, Dihydroflavonole und Isoflavone ab. Weitere wichtige Flavonoid-Klassen sind Catechine, Anthocyanidine und Flavonole, die ausgehend von den Dihydroflavonolen synthetisiert werden. Eine Übersicht über das allgemeine Biosyntheschema der Flavonoide gibt Abb.5.

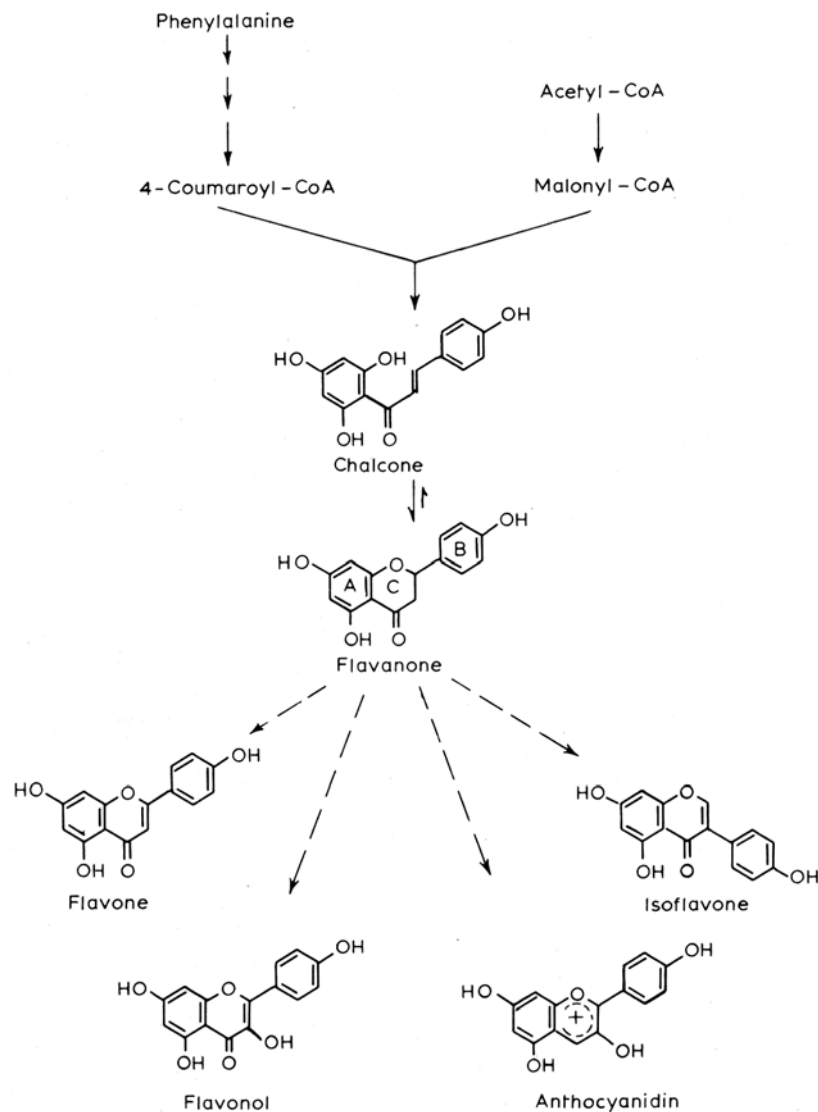


Abb. 5: Schema der Flavonoidbiosynthese (nach Vetschera, verändert)

Isoflavone unterscheiden sich von Flavonen durch die Position des aromatischen Ringes B, der im Gegensatz zu den Flavonen an der dritten Position des Heterozyklus ansetzt (Abb.5). Das Schlüsselenzym der Isoflavonbiosynthese, 2-Hydroxyisoflavanon-Synthase (IFS), katalysiert diese

Arylmigration. Dadurch werden beispielsweise Naringenin und Liquiritigenin in die entsprechenden Isoflavone Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavon) und Daidzein (4',7-Dihydroxyisoflavon) umgewandelt (Abb.6). Das Enzym gehört zur Gruppe der Cytochrom P450 Monooxygenasen (Steele et al., 1999; Latunde Dada et al., 2001). Die Biosynthese des 5-Deoxychalkons Liquiritigenin erfolgt über Chalkonsynthase, und anschließende Polyketidreduktase-Aktivität führt zum Wegfall der 5-OH-Gruppe am Ring A. Das strukturell davon abzuleitende Isoflavon Daidzein entsteht durch die Aktivität einer Leguminosen-spezifischen Chalkon-Reduktase (Yu et al., 2003; Berger et al., 2008). Die Biosynthese von Glycitein hingegen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Abgesehen von der nachweislichen Arylmigration durch IFS (Berger et al., 2008) wird angenommen, dass Glycitein von Isoliquiritigenin als Zwischenprodukt der Daidzein-Synthese abzuleiten ist (Abb.6) (Latunde-Dada et al., 2001). Die grundlegenden Biosyntheseschritte sind in Abb. 6 dargestellt.

Isoflavone kommen in Pflanzen meist glycosidisch gebunden vor. Freivorkommende Isoflavone, die nicht mit einem Zucker verknüpft sind, werden als Isoflavonaglyca bezeichnet. Isoflavonoide haben auch einen wesentlichen Anteil an der Stoffausstattung von *G. max*, welche mit 1-3 mg/g Trockenmasse, den höchsten Isoflavongehalt unter den zum Verzehr geeigneten Pflanzen hat. Die primär gebildeten Isoflavone der Sojabohne sind Genistein und Daidzein und ihre entsprechenden β -O-Glycoside, Genistin und Daidzin (Kudou et al., 1991; Wang & Murphy, 1994). Die glycosidische Bindung erfolgt an Position 7 des A-Ringes (Abb. 6), durch die Aktivität von Glucosyl-Transferase (GT). Wesentlich geringere Mengen werden von Glycitein (7,4'-Dihydroxy-6-Methoxyisoflavon) und dem korrespondierenden Glucosid Glycitin synthetisiert (Wang & Murphy, 1994). An weiteren Zuckerkomponenten kommen auch Malonyl-Glucose- (6'-O-Malonyldaidzin, 6'-O-Malonylglycitin, und 6'-O-Malonylgenistin) und Acetyl-Glucose Derivate (6'-O-Acetyldaidzin, 6'-O-Acetylglycitin, 6'-O-Acetylgenistin) vor (Kudou et al., 1991). Die Bindung des Malonyl-Restes an Glucose erfolgt enzymatisch durch Malonyl-Transferase (MT).

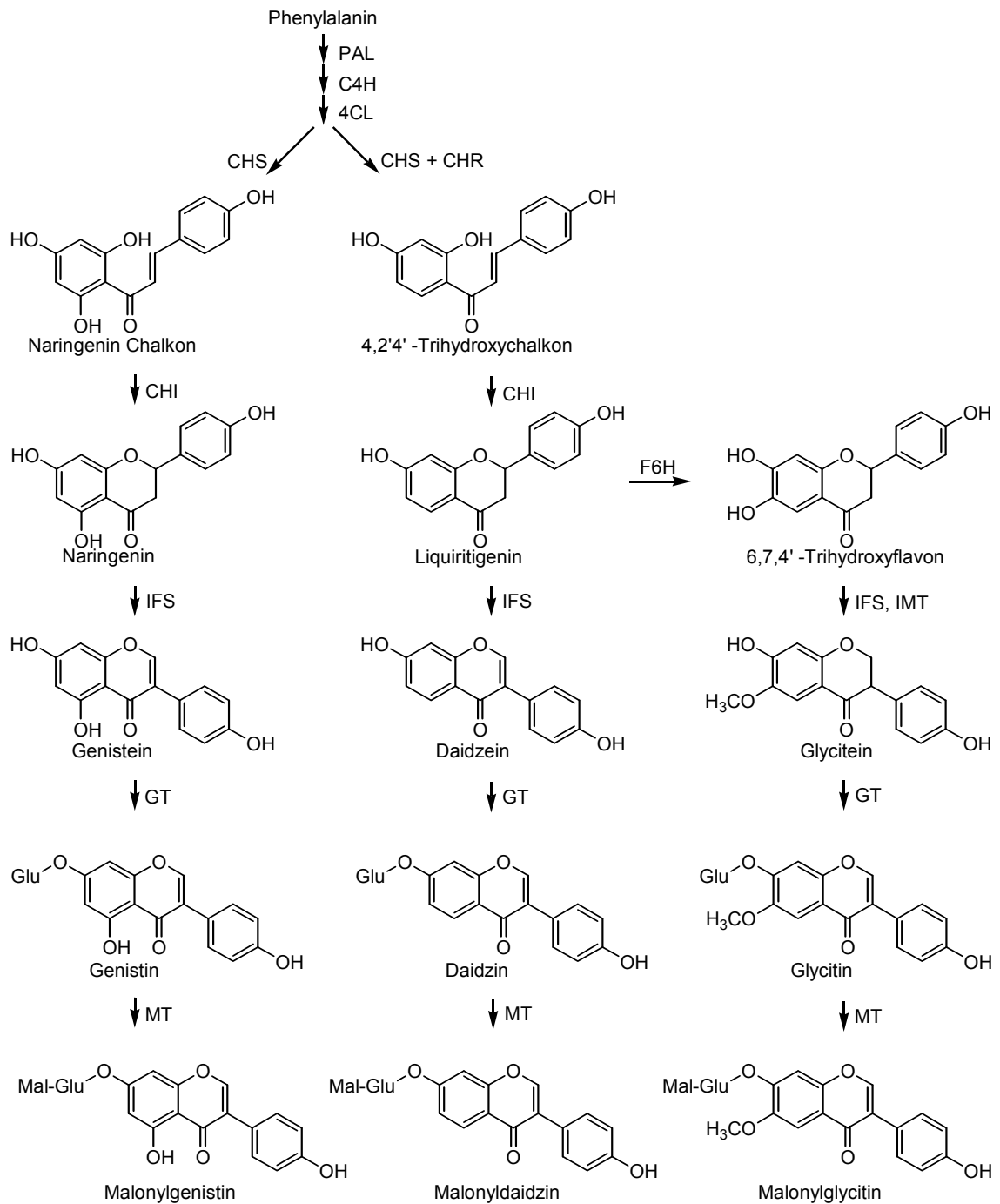


Abb.6: Synthesewege der Isoflavonaglyca, Glycoside und Malonylglycoside aus Sojabohnensamen, und beteiligte Enzyme: 4CL, 4-Coumarat-CoA-Ligase; C4H, Cinnamate-4-Hydroxylase; CHI, Chalkon-Isomerase; CHR, Chalkon-Reduktase; CHS, Chalkon-Synthase; F6H, Flavonon-6-Hydroxylase; GT, Glucosyl-Transferase; IFS, 2-Hydroxyisoflavanonsynthase; IMT, Isoflavone Methyl-Transferase; MT, Malonyl-Transferase; PAL, Phenylalanin Ammonia-Lyase. Quelle: Dhaubhadel et al. (2003)

In den reifen Samen werden die Isoflavone hauptsächlich in ihrer konjugierten Form, als Glucose- und Malonyl-Glucose Derivate gespeichert (Kudou et al., 1991; Yu et al., 2003), entsprechend der Speicherform in Vakuolen (Graham, 1991).

Die höchsten Isoflavonoidgehalte finden sich in reifen Samen, Blättern und embryonalem Gewebe im späten Entwicklungsstadium (Dhaubhadel et al., 2003). Verschiedenen Studien zufolge werden viele Pflanzenmetabolite in einem Pflanzenorgan synthetisiert, und dann an einen Ort der Akkumulation transportiert. Es gibt jedoch Hinweise, dass Sojabohnen-Embryos die Fähigkeit besitzen, Isoflavonoide aus simplen Vorstufen zu synthetisieren. Ein experimenteller Nachweis von Dhaubhadel et al. (2003), bestätigt das Vorhandensein entsprechender Biosynthese-Enzyme.

3.2.2 Flavonoide – biologische und ernährungsphysiologische Wirkung

Flavonoide und Isoflavonoide weisen unterschiedliche und ökologisch bedeutsame biologische Aktivitäten auf. Somit spielen Sie eine wichtige Rolle in den Interaktionen zwischen Pflanzen und ihrer Umwelt. Oftmals sind Flavonoide in die Epidermis eingelagert, wo sie als Schutzpigmente durch UV-Absorption die Pflanze vor zu starken Strahlungseinflüssen schützen. Das Wirkungsspektrum der Isoflavone in der Symbiose mit bodenlebenden Bakterien ist im Kapitel 2.3 beschrieben. Darüber hinaus können isoflavonoide Phytoalexine bei Pathogenbefall von *G. max* synthetisiert werden, um das Wachstum der Pathogene zu hemmen (Parniske et al., 1991).

Isoflavonoide sind vor allem auch wegen ihrer hormonähnlichen Wirkung bei Menschen und Tieren bekannt (Dixon, 2004). Sie gehören zu jenen Pflanzenmetaboliten die eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Steroidnucleus weiblicher Hormone besitzen, und werden deshalb oft als „Phytoöstrogene“ bezeichnet (Abb. 7). Diese Ähnlichkeit ermöglicht ein Erkennen und Andocken an

Östrogenrezeptoren, was ihre hormonähnliche Wirkung bei Vertebraten und Menschen erklärt (Committee on Toxicity, 2003). Die Auswirkungen der Isoflavone auf die Fruchtbarkeit von Säugetieren wurden erstmals 1946 entdeckt. Australische Schafe fraßen über einen längeren Zeitraum hinweg auf Wiesen, die mit *Trifolium subterraneum* bewachsen waren. Das Resultat waren Probleme bei Geburt oder Laktation, sowie vollständige Unfruchtbarkeit der Schafe (Bennetts et al., 1946). Während der Fruchtbildung werden Isoflavonoide in den Samen akkumuliert (Dhaubhadel et al., 2003) und sind daher in Nahrungsmitteln auf Soja-Basis enthalten. Der Verzehr solcher Lebensmittel wurde mit geringerem Auftreten von hormonell verursachten Krebs-Typen (Messina & Barnes, 1992; Messina, 1999), der Linderung post-menopausaler Beschwerden (Cassidy & Bingham, 1995), und Reduzierung des Risikos von Osteoporose und kardiovaskulären Erkrankungen (Messina, 1999) assoziiert.

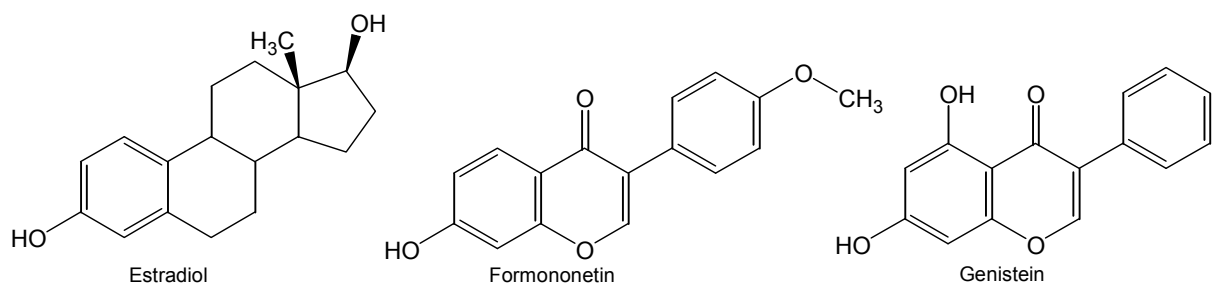


Abb.7 Strukturelle Ähnlichkeit von Phytoestrogenen mit Estradiol

4. Material und Methoden

4.1 Rahmenbedingungen der Diplomarbeit

Im Rahmen des Vertragsanbau der Firma Mona Naturprodukte GmbH, wurden im Frühling 2008 zehn mit Rhizobien (*Bradyrhizobium japonicum*) inokulierte Sojabohnensorten (Cardiff, Eссор, Kent, Cordoba, Gallec, Daccor, Lotus, Ohgata, Primus, Idefix) im Burgenland angesät. An diesen Anbauversuchen waren 38 Landwirte beteiligt, welche sich zu Aufzeichnungen hinsichtlich Anbau- und Erntezeitpunkt, Sorte, Pflanzenschutz und Einsatzzeitpunkt der Pflanzenschutzmaßnahmen, Düngung und Einsatzzeitpunkt von Düngungsmaßnahmen, Vorfrucht, Zwischenfrucht und Bodenbearbeitung, verpflichteten. Insgesamt wurde auf 316 ha Soja kultiviert.

4.2 Probennahme im Detail

Die Bohnenproben stammen aus dem Mittel- und Südburgenland, zur genauen geographischen Lage siehe Probenziehungsflächen im Anhang. Die Probennahme der reifen Samen erfolgte vier Tage vor der Ernte, dazu wurde in der Mitte des Feldstücks 1m² der Pflanzen vollständig abgeerntet. 133 Proben, bestehend aus sechs verschiedenen Sorten (Kent, Cardiff, Eссор, Cordoba, Gallec und Idefix) wurden bis zu weiteren Analysen bei Raumtemperatur gelagert.

Bei jeder Probenentnahme erfolgte eine optische Abschätzung des Knöllchenbesatzes der Wurzel mittels einer Boniturskala von 1 – 3: Knöllchenzahl 0-10, 10-20, 20-30. Dazu wurden die Pflanzen vorsichtig aus der Erde gezogen, die Wurzeln behutsam von anhaftender Erde befreit und die Knöllchenanzahl geschätzt.

4.3 Analytik

Die Analyse der Primärstoffe wurde an der Universität für Bodenkultur in Wien, am Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung durchgeführt. Die Untersuchung der Isoflavone erfolgte am Zentrum für Biodiversität in Wien, in der Arbeitsgruppe Chemodiversitätsforschung am Department für botanische Systematik und Evolutionsforschung.

4.3.1 Tausendkorngewicht und Primärinhaltsstoffe, Analytik und Auswertung

Nach vier Wochen Trocknungsphase bei Raumtemperatur wurden die Samen aus den Hülsen herausgelöst, je 100 Samen aus jeder Probe abgezählt (Zählmaschine Contador, Pfeuffer) und gewogen. Der erhaltene Wert wurde mit zehn multipliziert und das somit ermittelte Tausendkorngewicht in Gramm angegeben. Für die Analyse der Protein- und Ölgehalte wurden ungefähr 20 Samen pro Probe zu feinem Pulver zermahlen (Mühle Cyclotec 1093 sample mill, Foss Tecator), anschließend in ein Analysenröhrchen gefüllt und mittels Nahinfrarot-Reflexions Spektroskopie (Matrix-IT-NIR System, Bruker) analysiert. Jede Probe wurde zweimal untersucht. Erhaltene Protein- und Ölgehalte wurden in g kg^{-1} bezogen auf Trockenmasse angegeben.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programmpaket SAS. Mithilfe von mehrfaktoriellen Varianzanalysen (general linear models) wurden die Faktoren Sorte, Bodenart, Vorfrucht, Zwischenfrucht, vorhandene Knöllchenbakterien und geographische Lage der Feldstücke, hinsichtlich ihres Einflusses auf die Variablen TKG, Öl- und Proteingehalt der Samen untersucht. Die Signifikanz einzelner Varianzursachen wurde dabei mittels F-Tests überprüft.

4.3.2 Sekundärstoffe – Isoflavone: Probenauswahl und Vorbereitung

Die Probenauswahl erfolgte aufgrund der Ergebnisse der Primärstoffanalysen. Pro Sorte wurden jeweils Proben mit minimalem und maximalem Proteingehalt jeweils aus nördlicherer und südlicherer geographischer Lage analysiert.

Zum Vergleich wurden zusätzlich Samen der Sorten Lotus, Alma Ata, Brillmayer und Apache untersucht. Dieses Material stammte aus den Lagerbeständen der Firma Mona Naturprodukte GmbH. Insgesamt wurden somit 10 verschiedene Varietäten untersucht.

Die getrockneten Sojabohnen wurden fein zermahlen, und durchschnittlich 200 mg (genaue Einwaagen siehe Anhang) wurden für die Extraktion verwendet. Als Referenzsubstanzen wurden die Isoflavonaglyca Daidzein, Genistein und Glycitein, sowie deren Glycoside Daidzin, Genistin und Glycitin verwendet.

4.3.2.1 Herstellung der Standardlösungen

Aufgrund der für Soja bekannten Isoflavonprofile wurden die Einzelverbindungen entsprechend konzentriert, wobei das Verhältnis zwischen den Glycosiden Genistin, Daidzin und Glycitin zu den Aglyconen Genistein, Daidzein und Glycitein 3:1 betragen sollte. Jeweils 2 mg der Stoffe wurden in Methanol (MeOH) gelöst, wobei zur besseren Löslichkeit des Aglycons Glycitein Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt werden musste. Von der erhaltenen Stammlösung wurde anschließend eine Verdünnungsreihe mit definierten Konzentrationen angefertigt. Details zur Zusammensetzung der Verdünnungen sind in Tab. 4 ersichtlich. Alle verwendeten Pipetten wurden zuvor kalibriert, und die Abweichungen wurden bei der Konzentrationsberechnung berücksichtigt. Die Lösungen wurden bei 4°C gelagert.

Tab 4: Liste der verwendeten Referenzsubstanzen

Referenz- substanz	V. 1	V. 2	V. 3	V. 4	V. 5
Daidzein	20	2	1	0,5	0,25
Genistein	20	2	1	0,5	0,25
Glycitein	20	2	1	0,5	0,25
Daidzin	60	6	3	1,5	0,76
Genistin	60	6	3	1,5	0,76
Glycitin	60	6	3	1,5	0,76

Konzentrationen der Standardsubstanzen in µg/mL der hergestellten Verdünnungsreihe.
Abkürzung: V. - Verdünnung

4.3.2.2 Extraktion des Pflanzenmaterials

Als Extraktionsmittel diente eine Mischung aus MeOH, Wasser (aqua dest.) und Dimethylsulfoxid im Verhältnis 80:20:34. Die Proben wurden dreimal mit 1,2 mL Extraktionsmittel extrahiert. Dazwischen wurde zentrifugiert um den Überstand vom Festmaterial zu trennen. Die drei Überstände jeder Probe wurden in einem 5 mL Messkolben vereinigt, die verwendeten Pipetten und Eprouvetten wurden mit MeOH 80% (MeOH/Wasser 80:20) gründlich nachgewaschen. Um eine quantitative Analyse durchführen zu können wurde mit gleichen Volumina weiter gearbeitet, wozu wurde der Kolben mit MeOH 80% auf exakt 5 mL aufgefüllt wurde. Die gewonnenen Extrakte wurden in Braunglasfläschchen gefüllt und über Nacht im Tiefkühlschrank bei -20°C aufbewahrt.

Der Extraktionserfolg wurde durch die Wiederfindung des internen Standards p-Hydroxybenzoesäure überprüft, indem 50 µl einer p-Hydroxybenzoesäurelösung (0,58 mg/mL) zu Beginn der Extraktionsprozedur, jeder Probe zugegeben wurde.

4.3.2.3 Identifizierung und Quantifizierung der Isoflavone mittels HPLC

Die für die HPLC Messungen herangezogenen Proben wurden über einen 0,2 µm Filter in Glasvials filtriert. Zur Etablierung und Optimierung eines geeigneten HPLC-Verfahrens, bzw. um eine gute Auftrennung der gesuchten Isoflavone zu erreichen, wurden verschiedene Laufmittelgemische und Gradienten, sowie Durchflussgeschwindigkeiten ausprobiert. Als Anhaltspunkte zur Etablierung der geeigneten Methode, dienten die Arbeiten von Penalvo et al., 2004; Griffith & Collinson, 2001; Nakamura et al., 2001; und Graham, 1991.

In das HPLC System mit gekoppeltem UV Dioden-array Detektor wurde per auto-sampling 10 µl jeder Probe eingespritzt. Die mobile Phase, ein Gemisch aus wässrigem Puffer und Acetonitril, wurde mit einer Flussrate von 0,8 mL/min durch die Trennsäule gepumpt. Der während der Analyse gefahrene Gradient des Laufmittelgemisches ist Tab. 5 zu entnehmen.

Technische Parameter der HPLC-Messung

HPLC System:	1100 series (Agilent) mit UV Dioden-array Detektor (200-400nm)
stationäre Phase:	Zorbax eclipse -C18 analytical; 4,6x150 mm, 5 µm (Agilent technologies)
mobile Phase:	Acetonitril in wässrigem Puffer nach Reisch et al., 1990: 0,015 M o-Phosphorsäure, 0,0015 M Tetrabutylammoniumhydroxid, pH=3

Tab. 5: Laufmittelgradient

Zeit (min)	% Acetonitril	Fluss (mL/min)
0	15	0,8
5	15	0,8
36	29	0,8
44	85	0,8
45	100	1
50	100	1

4.3.2.4 Auswertung der HPLC – Profile

Die Identifizierung der Peaks, bzw. die Zuordnung der drei Isoflavonaglyca Daidzein, Genistein und Glycitein und ihrer korrespondierenden Glycoside, erfolgte sowohl durch Retentionszeitenvergleich als auch durch Vergleich der UV-Spektren der Standardsubstanzen, bei 254nm. Die quantitative Bestimmung der Isoflavonkonzentrationen erfolgte anhand einer Kalibrationskurve über die Peakflächen. Um den Peakflächen korrespondierende Stoff-Konzentrationen zuordnen zu können, wurden Kalibriergeraden der Standardsubstanzen erstellt. Dies erfolgte, indem die Fläche des Analytenpeaks gegen die jeweilige Isoflavonkonzentration aufgetragen wurde. Mittelwerte aus dreifachen Messungen ergaben eine Regressionsgerade, welche zur Bestimmung der Konzentration einzelner Isoflavone in den Proben herangezogen werden konnte. Der Kalibrationsbereich entspricht den gefundenen Konzentrationen der einzelnen Isoflavone in den Sojabohnen. Zu den Peakflächen und korrespondierenden Substanzkonzentration siehe Tabelle 11, Kapitel 5.2.1.

4.3.2.5 Testversuch zur Isoflavonverteilung in der Pflanze

Am 28. Mai 2009 wurden die Sorten Brillmayer, Kent, Eссор, Idefix und Gallec im Versuchsgarten der Universität für Bodenkultur angesät. Nach drei Wochen wurde die Hälfte der Pflanzen geerntet, die Ernte der restlichen Pflanzen erfolgte zehn Tage später. Nachdem die Wurzeln von anhaftender Erde befreit waren, wurden Ober- und Unterirdische Pflanzenteile getrennt, mit flüssigem Stickstoff übergossen, und über Nacht bei -80° C eingefroren. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial im Trockenschrank für 24 Stunden bei 40°C getrocknet. Das Pflanzenmaterial wurde fein gemahlen, in Eppendorf Röhrchen eingewogen und nach selbiger Extraktionsmethode wie die Bohnenproben extrahiert (siehe Kapitel 4.3.2.2). Die Parameter der HPLC-Analyse wurden ebenfalls beibehalten (siehe Kapitel 4.3.2.3).

4.3.2.6 Verwendete Geräte und Chemikalien

Universalmühle UM 105 (Elta)

Analysenwaage 260 Delta Range (Mettler AE)

Vortexmischer VF2 (Janke u. Kunkel – IKA Labortechnik)

Ultraschallbad Sonorex RK 100H (Bandelin)

Centrifuge 5417R (Eppendorf)

Eprouvetten 2ml (Eppendorf)

Braunomnifix 2ml Einmalspritzen (Braun Melsungen AG)

Einmal Spritzenfilter Porengröße 0,2µm (Roth)

Einmal Injektionskanüle Sterican Gr. 2 (Braun Melsungen AG)

Daidzein > 98% HPLC (Fa. Trans MIT)

Genistein > 98% HPLC (Fa. Trans MIT)

Glycitein (LC Laboratories)

Daidzin (LC Laboratories)

Genistin (LC Laboratories)

Glycitin (LC Laboratories)

Water HPLC Gradient grade (Fisher Scientific)

Methanol HPLC Gradient grade (Fisher Scientific)

Acetonitril HPLC Gradient grade (Fisher Scientific)

Dimethylsulfoxid for analysis (Merck)

Phosphorsäure 85 % (Roth)

Tetrabutylammoniumhydroxid Lösung 259.5 g/mol (Sigma-Aldrich)

5. Ergebnisse

5.1 Primärstoffe und Tausendkorngewicht

Es wurde einerseits untersucht, ob Korrelationen zwischen den Variablen (TKG, Öl- und Proteingehalt) bestehen. Im Weiteren, ob der Einfluss verschiedener Faktoren (Varietät, geographische Lage, Kulturführung, Knöllchenbesatz) in Bezug auf Korngröße und inhaltsstoffliche Zusammensetzung statistische Signifikanz zeigt. Zu den Einzelwerten der Proben siehe Anhang.

5.1.1 Korrelationen zwischen den Variablen

Die graphische Auswertung der erhaltenen Werte des Protein- und Ölgehaltes (Abb.8) zeigt deutlich die starke negative Korrelation zwischen den beiden Primärstoffen. Demnach haben Samen mit hohem Anteil an Öl einen geringeren Proteingehalt, und umgekehrt.

Proteingehalt und TKG korrelieren positiv miteinander (Abb.9), demnach nimmt der Proteingehalt mit steigender Korngröße tendenziell zu. Diese Korrelation ist nicht so stark wie jene zwischen Öl und Protein.

Das TKG ist negativ mit dem Ölgehalt korreliert (Abb.10). Dass diese Korrelation nicht sehr eng ist, zeigt die große Streuung der Punkte entlang der Regressionsgeraden.

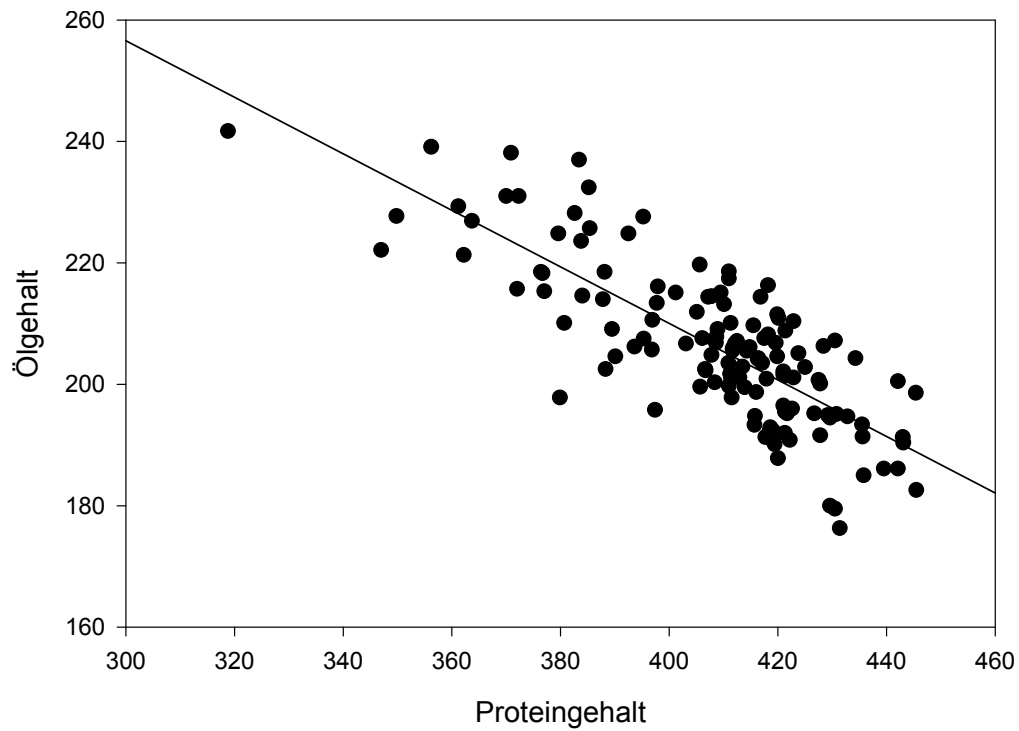


Abb. 8: Die negative Korrelation zwischen Protein- und Ölgehalt der Sojabohnen. Einheit: g/kg bezogen auf Trockenmasse. ($r = -0,748$; $p < 0,05$)

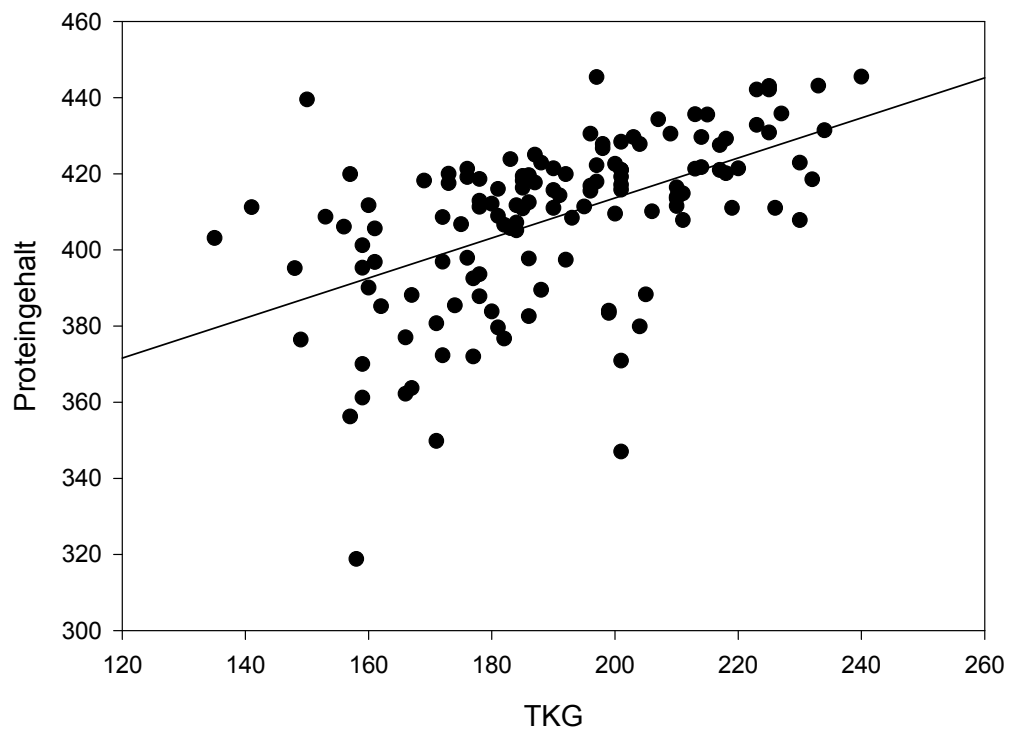


Abb. 9: Die positive Korrelation zwischen TKG (g) und Proteingehalt (g/kg bezogen auf Trockenmasse). ($r = +0,486$; $p < 0,05$)

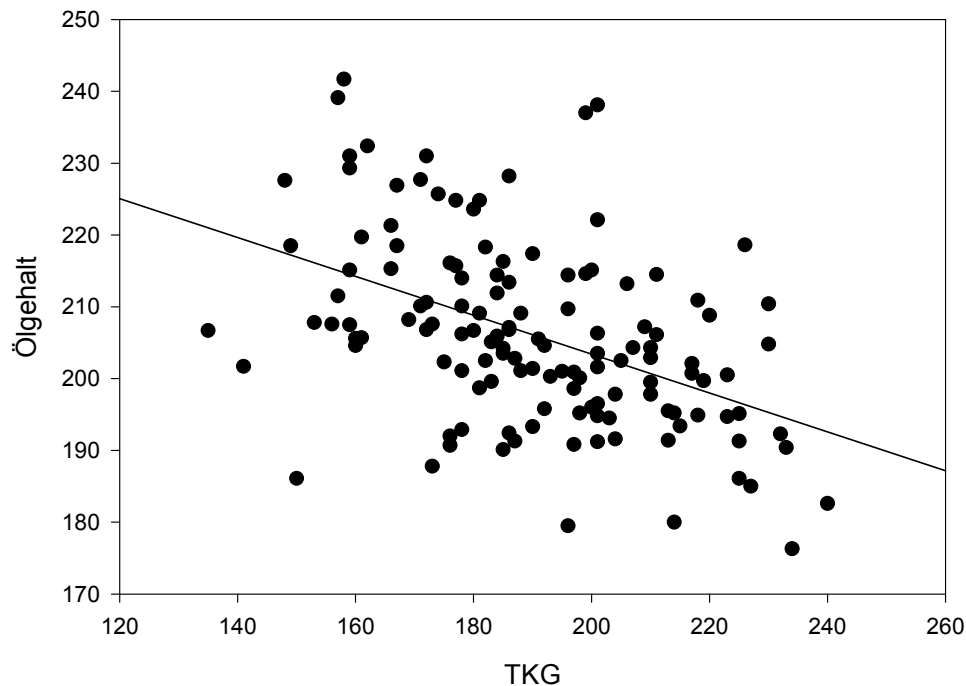


Abb. 10: Korrelation von TKG (g) mit dem Ölgehalt (g/kg bezogen auf Trockenmasse). ($r = -0,424$; $p < 0,05$)

5.1.2 Sortenunterschiede in Primärstoffgehalt und TKG

Der Einfluss der Sortenwahl erweist sich als hoch signifikant ($p < 0,01$) bezüglich der Parameter TKG und Ölgehalt. Die Box Plot Darstellung der statistisch signifikanten Sortenunterschiede im TKG (Abb.11) und Ölgehalt (Abb.12) zeigt, in welchem Bereich eine Sorte im Vergleich zu den anderen schwankt. Insgesamt wurden fünf verschiedene Varietäten analysiert. Die Probenanzahl ist in den Abbildungen in Klammer angeführt. Die Sorte Gallec wurde aufgrund zu geringer Probenzahl ($n=2$) nicht berücksichtigt. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Proben, die auf Feldern mit gemischtem Saatgut gezogen wurden.

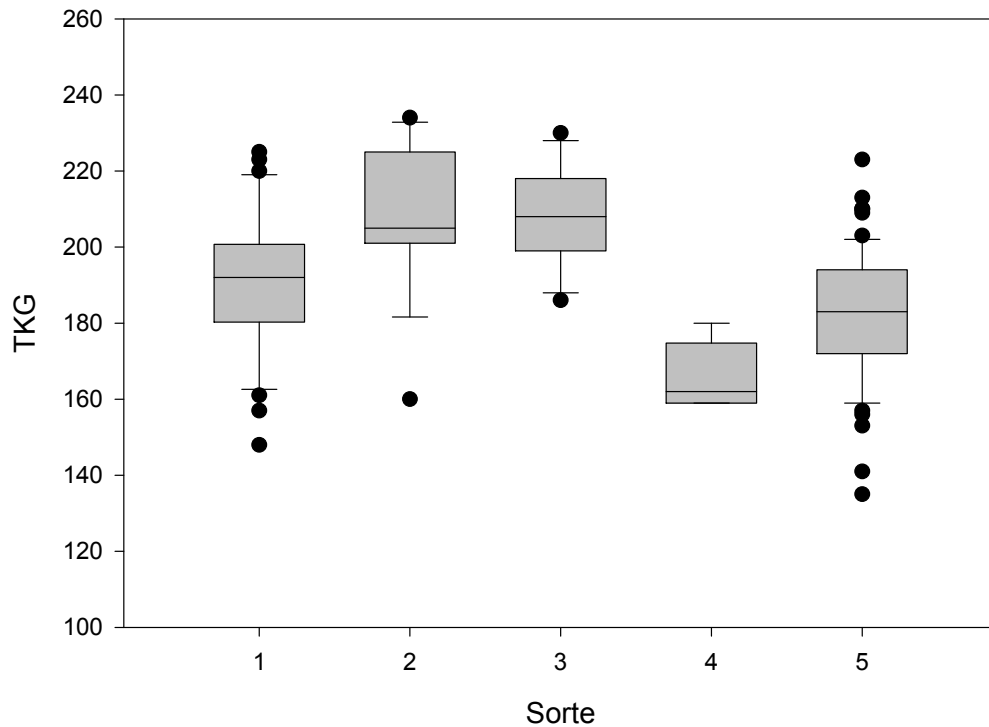


Abb.11: Box Plot Darstellung der signifikanten Sortenunterschiede im TKG (g). Sorten*: 1=Cardiff (26), 2=Cordoba (11), 3=Essor (10), 4=Idefix (5), 5=Kent (60); *Probenanzahl ist in Klammer angegeben

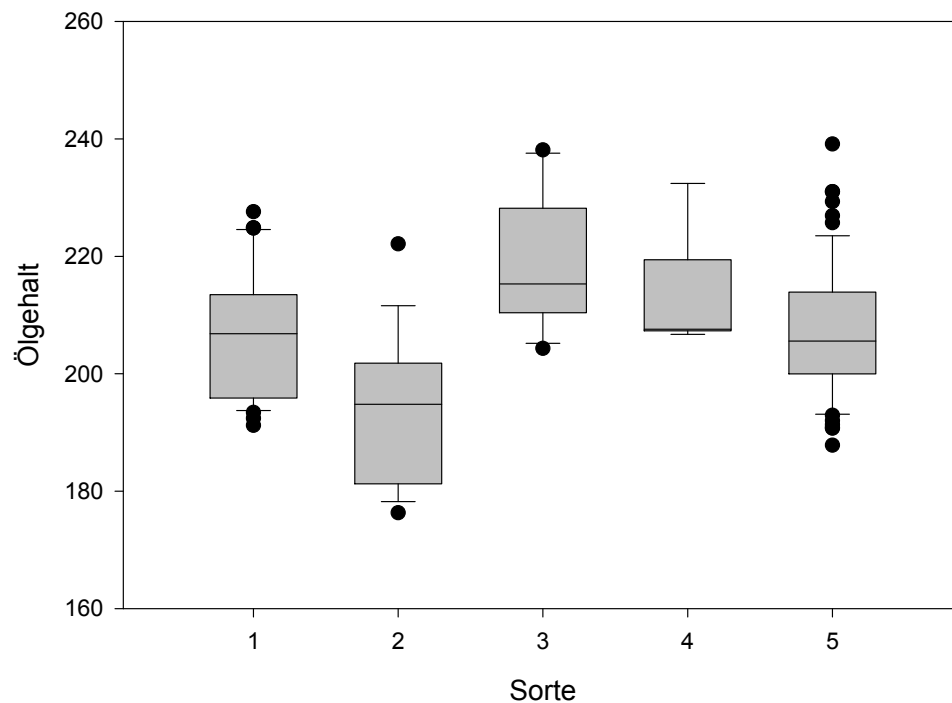


Abb.12: Box Plot Darstellung der signifikanten Sortenunterschiede im Ölgehalt (g/kg bezogen auf Trockenmasse). Sorten*: 1=Cardiff (26), 2=Cordoba (11), 3=Essor (10), 4=Idefix (5), 5=Kent (60); *Probenanzahl in Klammer angegeben

Aufgrund signifikanter Sortenunterschiede in TKG und Ölgehalt ergibt sich eine Platzierung der einzelnen Sorten in unterschiedlichen Bereichen des Streudiagramms (Abb.13). Der Korrelation zwischen Ölgehalt und TKG folgend, weist die Varietät Cordoba einen niedrigen Ölgehalt und gleichzeitig ein hohes TKG auf (Tab.6). Diese Sorte besitzt im Mittel den geringsten Gehalt an Öl (Tab.6). Dass eine Korrelation zwischen den beiden Variablen besteht, zeigen auch die Werte der Varietät Idefix, welche das niedrigste TKG, aber den höchsten Ölgehalt aufweist (Tab.6). Einen hohen Ölgehalt innerhalb der verschiedenen Sorten hat auch die Varietät Essor, gleichzeitig liegt jedoch der Mittelwert des Tausendkorngewichtes ebenfalls im oberen Bereich (Tab.6). Die Verteilung dieser beiden Variablen bei den Varietäten Kent und Cardiff liegt im mittleren Bereich des Diagramms (Abb.13; Tab.6).

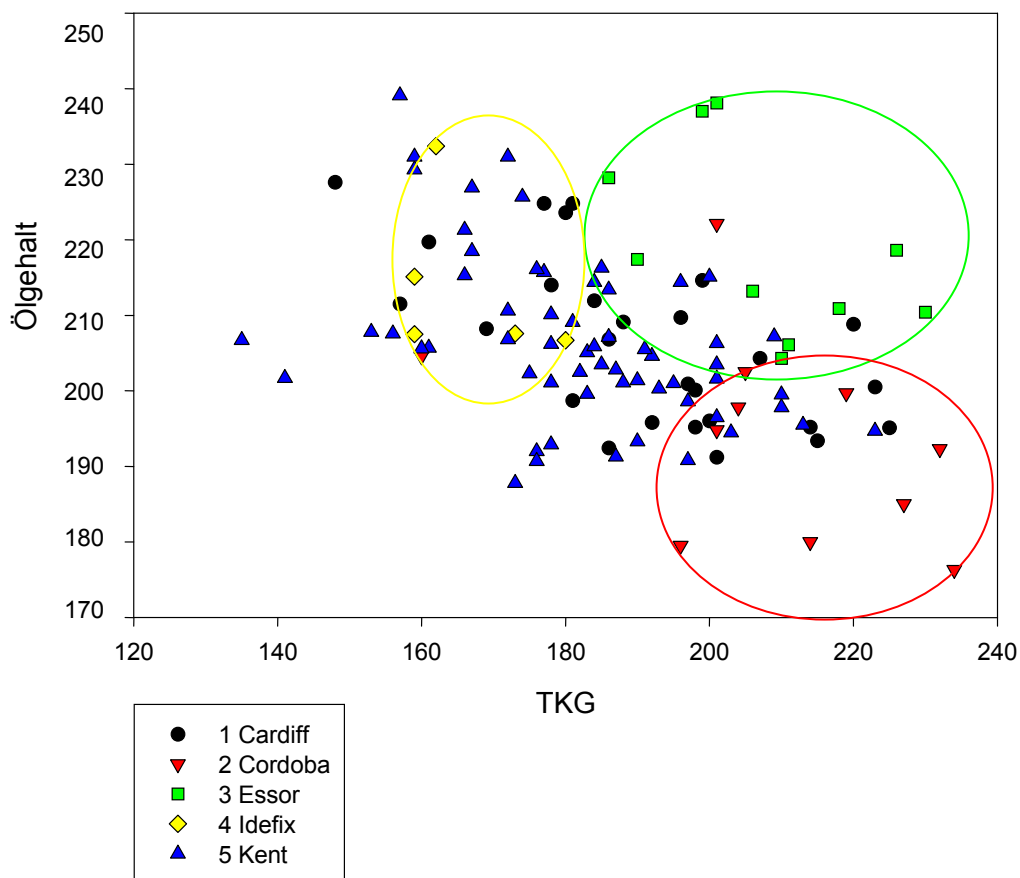


Abb.13: Verteilung der einzelnen Sorten aufgrund signifikanter Sortenunterschiede von TKG (g) und Ölgehalt (g/kg bezogen auf Trockenmasse).

Der Einfluss der Varianzursache Sorte auf den Proteingehalt der Samen, ist aufgrund zu hoher Irrtumswahrscheinlichkeit ($p > 0,05$) statistisch nicht signifikant. Die höchsten Mittelwerte bezogen auf den Proteingehalt, haben die Sorten Cordoba und Eссор, den niedrigsten Wert zeigt die Varietät Idefix (Tab.6). Tab. 6 zeigt die errechneten Mittelwerte (LSMEANS) der untersuchten Variablen nach Sorten.

Tab.6: LSMean-Werte des TKG, Öl- und Proteingehaltes der verschiedenen Sorten.

Sorte	TKG	Protein	Öl
Cardiff	195,4	410,0	209,3
Cordoba	208,8	413,3	196,0
Eссор	213,0	414,3	215,8
Idefix	170,0	406,8	216,3
Kent	182,2	410,6	209,3

Einheiten: TKG - g; Protein und Öl - g/kg bezogen auf Trockenmasse.

5.1.3 Einfluss der geographischen Lage und der Bodenart des Anbaubereiches

Ein signifikanter Einfluss der geographischen Lage konnte weder auf die inhaltsstoffliche Komposition, noch auf das Tausendkorngewicht festgestellt werden ($p > 0,05$). Die Mittelwerte der Primärstoffe und des Tausendkorngewichtes, unterscheiden sich nur unwesentlich zwischen den im Mittel- bzw Südburgenland angebauten Sorten.

Auch der Einfluss des Faktors Bodenart auf die Variablen ist statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Tab. 7 zeigt die Mittelwerte von TKG, Protein- und Ölgehalt von Sojabohnen, die auf Böden verschiedener Zusammensetzung angebaut wurden. Die Art des Bodens der Probenziehungsfläche wurde mittels Bodenkarten des Finanzamtes Burgenland bestimmt.

Tab. 7: Verschiedene Bodenarten und Mittelwerte von TKG, Öl- und Proteingehalt der geernteten Sojabohnen.

Bodenart	TKG	Protein	Öl
Lehm, sandiger Lehm	178,3	408,2	204,7
lehmiger Sand	178,0	391,8	215,1
lehmiger Ton	189,1	408,3	211,4
sandiger Lehm, stark lehmiger Sand	188,7	403,8	206,7

Einheiten: TKG - g; Protein und Öl - g/kg bezogen auf Trockenmasse.

5.1.4 Einfluss der Kulturführungsmaßnahmen auf Primärstoffgehalt und TKG

Der Faktor Vorfrucht hat einen signifikanten Einfluss auf den Ölgehalt ($p=0,002$) der Sojabohnen und das TKG ($p=0,017$), nicht jedoch auf den Gehalt an Protein ($p>0,05$). In Tab. 8 sind die Mittelwerte (LSMEANS) der Primärstoffe und des Tausendkorngewichtes nach vorjähriger Brache oder verschiedenen Vorfrüchten dargestellt. Proben ohne Angabe der Vorfrucht durch die Landwirte, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Auch der Parameter Zwischenfrucht zeigt einen signifikanten Einfluss auf das TKG ($p=0,011$). Öl- und Proteingehalt dagegen, werden durch diesen Faktor nicht signifikant beeinflusst ($p>0,05$). Tab.9 zeigt die Mittelwerte der Variablen nach Anbau verschiedener Zwischenfrüchte. Die meisten Landwirte verzichteten jedoch auf den Anbau einer Zwischenfrucht, dies ist in Tab. 10 mit „keine“ angegeben.

Tab.8: LSMEAN- Werte von TKG, Protein- und Ölgehalt, nach vorjähriger Brache oder Anbau verschiedener Vorfrüchte.

Vorfrucht	TKG	Protein	Öl
Brache (7)*	187,3	392,3	213,3
Mais (48)*	194,7	410,6	201,8
Winterweizen (17)*	192,0	408,0	211,3
Wintergerste (9)*	170,7	406,3	207,0

Einheiten: TKG - g; Protein und Öl - g/kg bezogen auf Trockenmasse. *In Klammer angegeben: Probenanzahl

Tab. 9: Die Mittelwerte der Variablen ohne Anbau einer Zwischenfrucht, und nach Anbau verschiedener Zwischenfrüchte.

Zwischenfrucht	TKG	Protein	Öl
keine (89)*	196,1	408,5	206,1
Erbse (6)*	203,0	415,1	209,9
Senf (11)*	177,6	416,9	205,2
Phac./BW (3)*	186,1	388,1	221,8
Öpul (6)*	206,1	426,4	203,7

Einheiten: TKG - g; Protein und Öl - g/kg bezogen auf Trockenmasse. *In Klammer angegeben: Probenanzahl. Abkürzungen: Phac. – Phacelia, BW – Buchweizen

5.1.5 Einfluss des Knöllchenbesatzes auf TKG und Primärinhaltsstoffe

Die Varianzanalyse des Faktors Knöllchenbakterien ergab keine signifikanten Werte ($p > 0,05$). Die in Tab.10 abgebildeten Mittelwerte der untersuchten Variablen weisen darauf hin, dass Sojapflanzen mit vielen Wurzelknöllchen ein hohes TKG, sowie einen hohen Proteingehalt besitzen. Der Ölgehalt dagegen ist niedriger.

Tab. 10: Die ermittelte Nodulanzahl der Pflanzenwurzeln und Mittelwerte der Primärinhaltsstoffe und TKG.

Nodulanzahl	TKG	Protein	Öl
0-10 (63)*	187,7	409,5	209,9
10-20 (42)*	191,9	406,8	210,8
20-30 (10)*	201,7	416,7	207,3

Einheiten: TKG - g; Protein und Öl - g/kg bezogen auf Trockenmasse. * In Klammer angegeben: Probenanzahl

5.2. Sekundärstoffe – Isoflavone

Die ausgewählten Standardsubstanzen entsprechen der Grundausstattung an Isoflavonen in den Samen von *Glycine max*. Die primär gebildeten Isoflavone sind Genistein und Daidzein und ihre entsprechenden β -O-Glycoside, Genistin und Daidzin (Kudou et al., 1991; Wang & Murphy, 1994). Wesentlich geringere Mengen werden von Glycitein und dem korrespondierenden Glucosid Glycitin synthetisiert (Wang & Murphy, 1994). Eine Reihe malonylierter Derivate wird darüber hinaus in den Samen akkumuliert (Kudou et al., 1991), welche allerdings in der Zusammenstellung der Referenzsubstanzen nicht berücksichtigt wurden.

5.2.1 HPLC-Messung der Isoflavonstandards und Kalibration

Abb. 14 zeigt ein HPLC-Chromatogramm der gemessenen Isoflavonstandards bei 254 nm, und die dazugehörigen UV-Spektren. Mit der gewählten Methode wurde eine sehr gute chromatographische Auftrennung der einzelnen Substanzen erzielt. In Tab. 11 sind die Mittelwerte der Peakflächen der einzelnen Isoflavonaglyca und den korrespondierenden Glycosiden, bei verschiedenen Stoffkonzentrationen (c) dargestellt. Ebenfalls in Tab. 11 enthalten sind die Werte der relativen Standardabweichung (s%), die Gleichung der erhaltenen Regressionsgeraden, sowie das Quadrat des Korrelationskoeffizienten r (r^2). Bei den erstellten Kalibrierlösungen weisen die Analysewerte der Verdünnungen 4 und 5 eine hohe relative Standardabweichung auf (Vgl. Tab. 11). Die relative Standardabweichung erlaubt den Vergleich der Streuung unterschiedlicher Konzentrationen. Die starke Streuung der beiden Verdünnungen könnte auf die niedrigen Stoffkonzentrationen in diesen Lösungen zurückzuführen sein. Die Abweichungen von s% bedingen eine Ungenauigkeit der Messungen von Isoflavonen, die in diesem Konzentrationsbereich vorkommen.

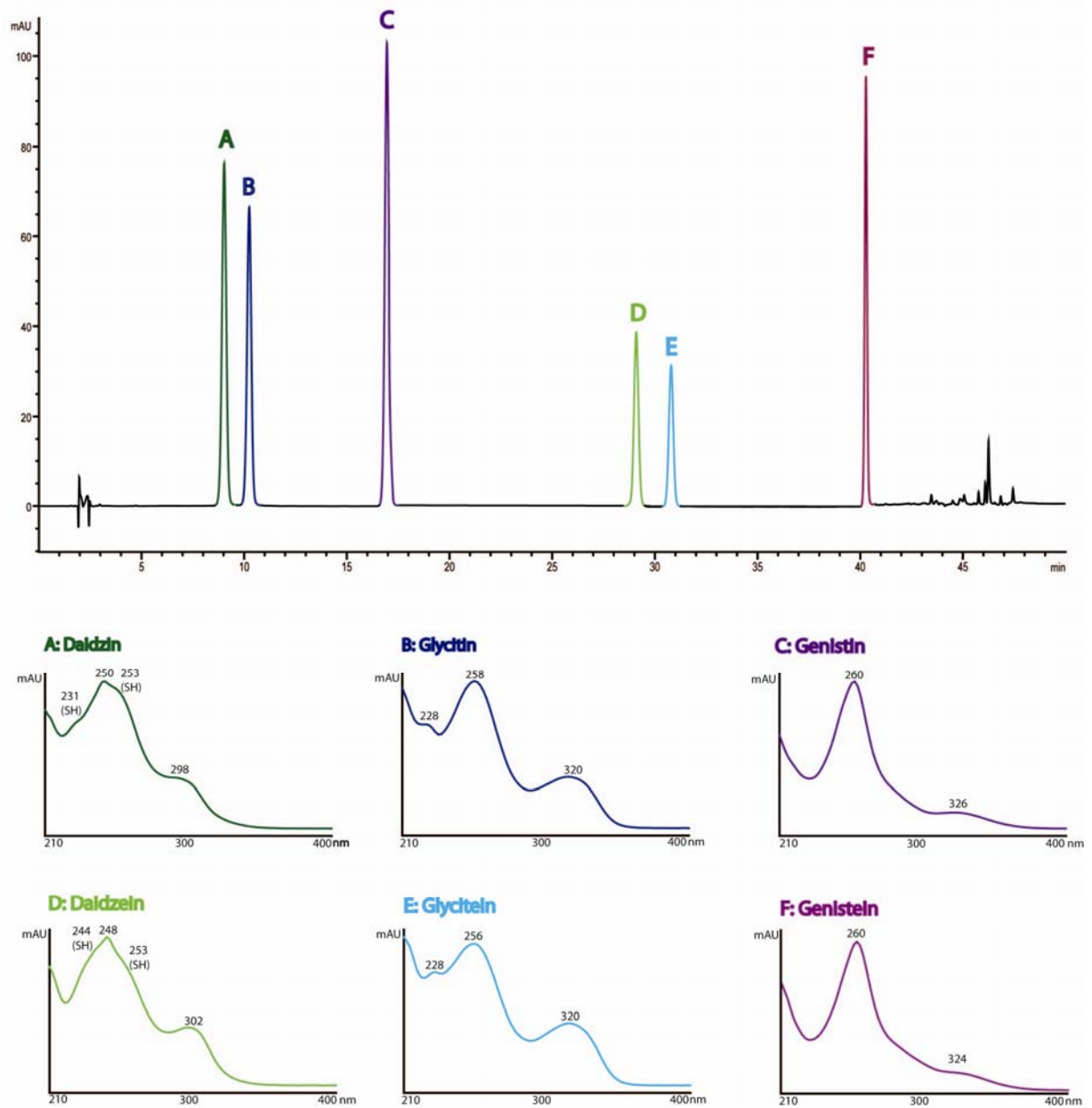


Abb. 14: HPLC-Chromatogramm und UV-Spektren der Standardsubstanzen in der Stammlösung bei 254 nm. UV λ max. in Acetonitril / Wasser. Abkürzung: SH - Schulter

Tab. 11: Peakflächen der Isoflavonstandards und korrelierende Substanzkonzentrationen

Substanz	Verdünnung 1			Verdünnung 2			Verdünnung 3			Verdünnung 4			Verdünnung 5			y = kx + d	r ²
	[c]	A	[s%]	[c]	A	[s%]	[c]	A	[s%]	[c]	A	[s%]	[c]	A	[s%]		
Daidzein	20	620	16	2	72	10	1	30	10	0,5	21	25	0,25	10	30	y=3408,6x+1,1838	0,987
Genistein	20	808	16	2	57	8	1	42	9	0,5	32	21	0,25	16	32	y=2984,4x+33,014	0,984
Glycitein	20	496	16	2	97	10	1	23	9	0,5	16	23	0,25	9	6	y=2469,1x+2,5071	0,999
Daidzin	60	1164	16	6	141	13	3	60	14	1,5	46	26	0,76	21	36	y=1844,6x+15,954	0,999
Genistin	60	1515	16	6	178	10	3	77	8	1,5	57	23	0,76	27	29	y=2146,2x+25,205	0,979
Glycitin	60	999	16	6	114	9	3	48	9	1,5	32	22	0,76	14	32	y=1220,2x+12,411	0,966

Die Substanzkonzentrationen sind in der Einheit $\mu\text{g/mL}$ angegeben. Die Werte der Flächen sind Mittelwerte von Dreifachmessungen ($n=3$).
 Abkürzungen: [c] – Konzentration, A – Fläche, [s%] – relative Standardabweichung

5.2.2 Isoflavongehalt reifer Samen

Die Quantitäten an gebildeten Isoflavonen sowie die Zusammensetzung des Isoflavonprofils könnten als Qualitätskriterium wesentlich sein, weshalb dieselben Sorten parallel zu Primärstoffen diesbezüglich untersucht wurden. Da sich der Isoflavongehalt im Zuge des Reifungsprozesses der Samen deutlich erhöht, wurden hier nur ausgereifte Samen analysiert. Die in den Samen akkumulierten Isoflavonderivate leiten sich sowohl vom klassischen Biosyntheseweg (Genistein, Genistin) als auch vom 5-Deoxyweg (Daidzein, Glycytein und deren Glycoside) ab. Die entsprechenden Biosyntheseenzyme wurden jedenfalls in den Geweben der Samen nachgewiesen, womit in diesem Fall ein Transport von anderen Pflanzenorganen unwahrscheinlich ist (Dhaubhadel et al., 2003).

In allen untersuchten Sorten konnten die Glycoside Daidzin, Genistin und Glycitin detektiert werden. Das Aglycon Genistein hingegen wurde nur in geringer Menge gefunden (Tab. 13, Abb. 15 u. 16), und die Aglyca Daidzein und Glycytein konnten überhaupt nicht nachgewiesen werden. Der Grund dafür könnte ein generell geringer Gehalt von Aglyca sein, da Isoflavone in reifen Samen hauptsächlich als Glucose- und Malonyl-Glucose Derivate gespeichert werden (Kudou et al., 1991; Yu et al., 2003), was mit der besseren Transportfähigkeit dieser Derivate in der Pflanze zusammenhängen könnte. Die in allen Chromatogrammen detektierten unbekannten Isoflavonoide a und b (vgl. Abb. 15 u. 16) weisen ein mit Daidzin bzw. Genistin identes UV-Spektrum auf, unterscheiden sich jedoch in den Retentionszeiten. Es könnte sich dabei um malonylierte Formen der Glycoside Daidzin bzw. Genistin handeln. Aufgrund der Retentionszeiten und der Angaben von Kudou et al. (1991) liegt jedenfalls die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um die entsprechenden malonylierten Derivate handelt. Generell weisen die UV-Spektren der Isoflavonaglyca gegenüber jenen der Glycoside nur eine minimale Differenzierung auf (Mabry et al., 1970) und ebenso dürfte die Malonylgruppe offenbar keinen Einfluss auf das UV-Spektrum haben (Berger et al., 2008). Deshalb kann in den HPLC-Chromatogrammen ausschließlich die Retentionszeit zur eindeutigen

Identifizierung herangezogen werden, wie sich dies auch in der vorliegenden Arbeit bestätigte (siehe Abb. 14).

Tab. 12 zeigt die Mittelwerte des Gesamt-Isoflavongehaltes der einzelnen Sorten, wobei dieser bei der Sorte Kent am Höchsten ist. In Tab. 13 sind die Mittelwerte der einzelnen Isoflavone aller analysierten Proben (n=41), sowie der untersuchten Sorten angegeben. Mengenmäßig dominieren Genistin und Daidzin, Glycitin ist jedoch in wesentlich geringeren Mengen enthalten (Tab.13). Den höchsten Daidzin-Gehalt weist die Sorte Kent auf, den höchsten Gehalt an Genistin dagegen die Sorte Gallec (Tab. 13, Abb. 15, 16 u. 17). Für die jeweiligen Messwerte der einzelnen Proben und Angaben zur Einwaage siehe Anhang.

Tab. 12: Mittelwerte des Gesamt-Isoflavongehaltes nach Sorten

Sorte	Mittelwert	Min – Max
Gesamt (n=41)	2607	6 – 2817
Kent (n=10)	3247	2107 – 4631
Cardiff (n=7)	2739	2037 – 4451
Essor (n=7)	2775	2009 – 3430
Cordoba (n=6)	1763	922 – 3064
Gallec (n=2)	2911	2412 – 3411
Idefix (n=2)	2965	2738 – 3191
Brillmayer (n=4)	1653	1059 – 2733
Apache (n=1)	2643	
Alma Ata (n=1)	2961	
Lotus (n=1)	1282	

Die Werte sind in µg/g Trockenmasse angeführt. Die Probenzahl n ist in Klammer angegeben.

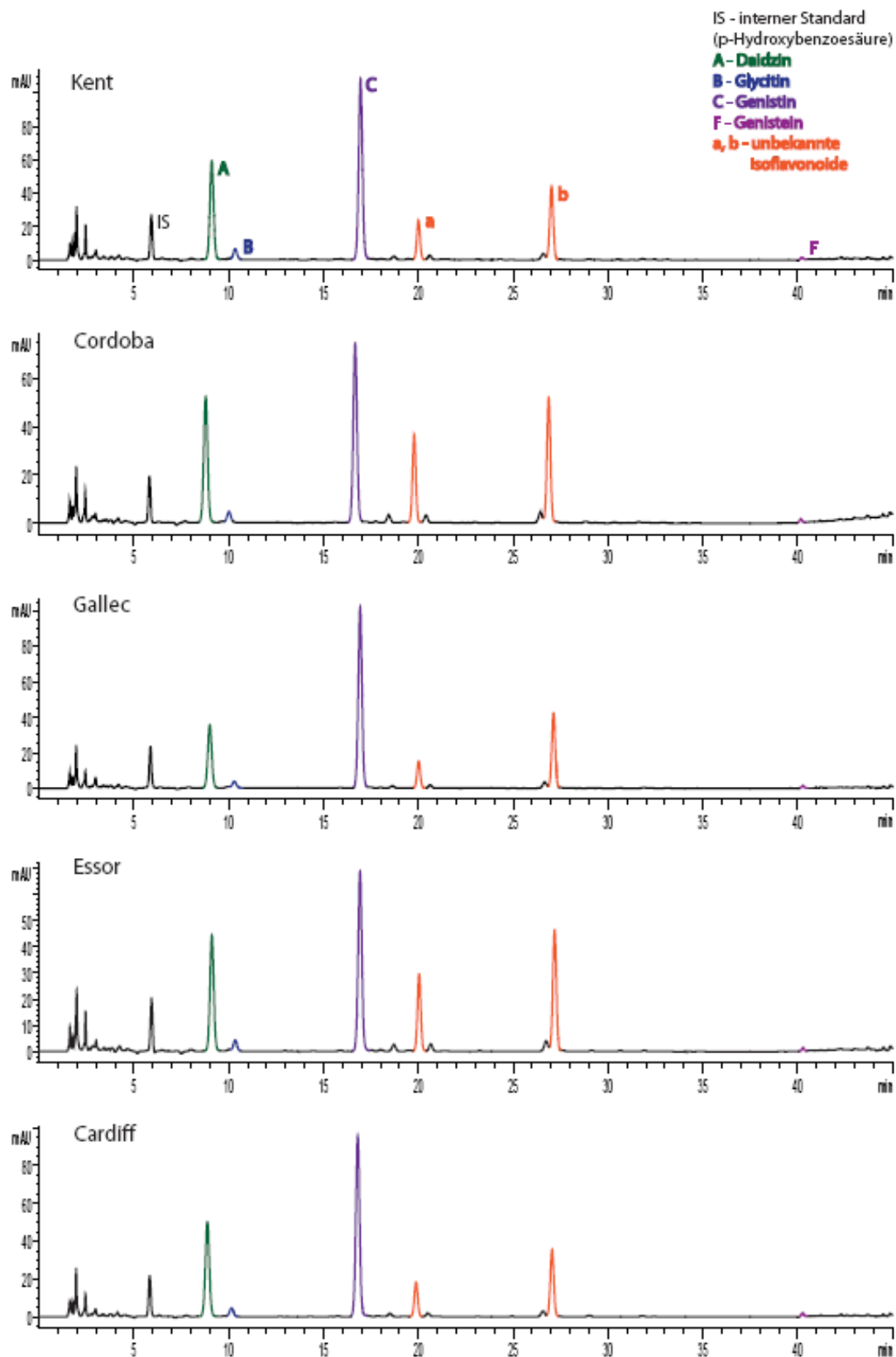


Abb. 15: HPLC-Chromatogramme der verschiedenen Sorten bei 254 nm. Bei den nicht identifizierten Isoflavonoiden a und b könnte es sich um malonylierte Formen der Glycoside Daidzin bzw. Genistin handeln. Die Samen wurden im Burgenland geerntet.

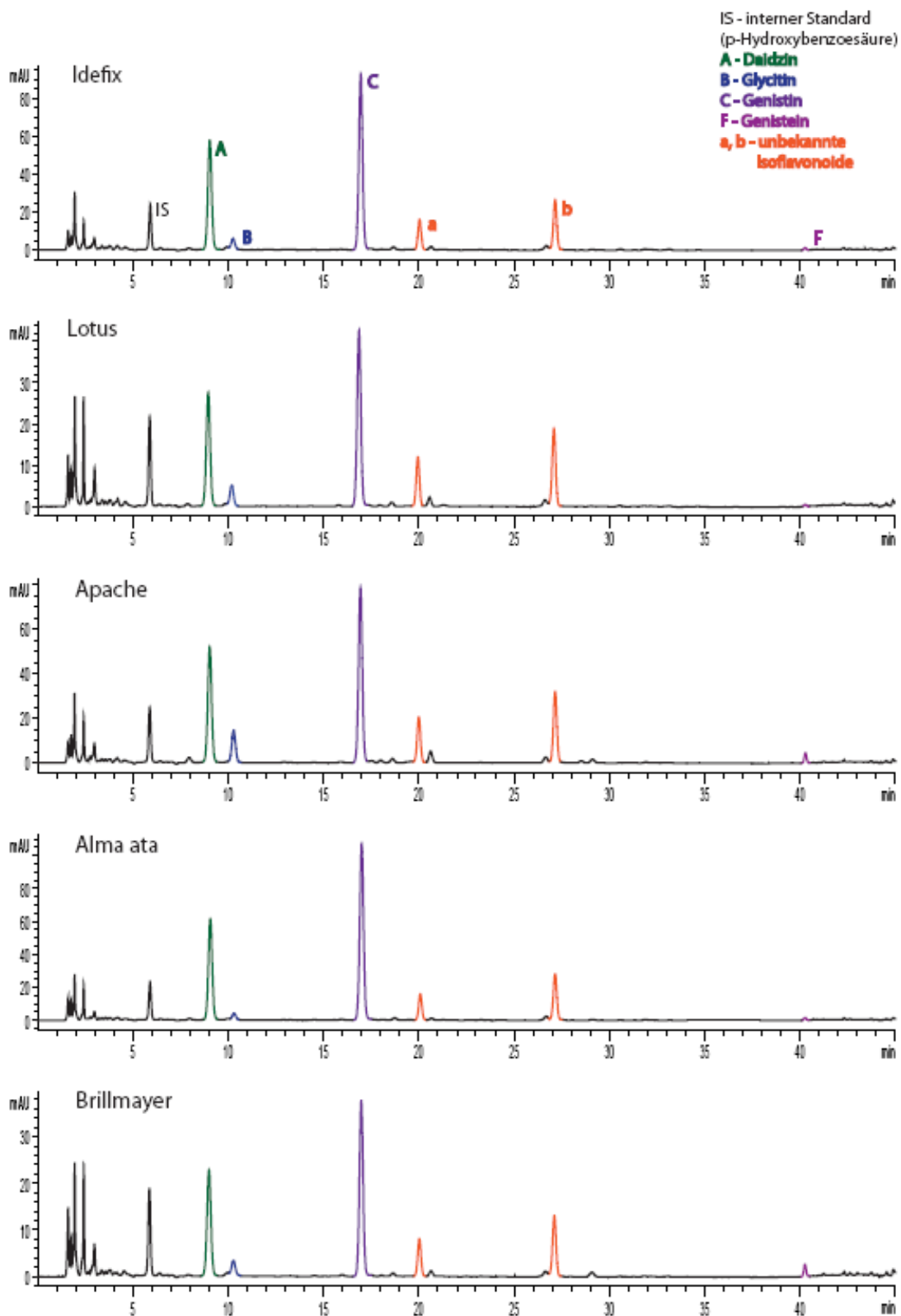


Abb. 16: HPLC-Chromatogramme der verschiedenen Sorten bei 254 nm. Die Sorten Lotus, Apache, Alma ata und Brillmayer stammen aus den Lagerbeständen der Fa. Mona Naturprodukte GmbH. Bei der Sorte Idefix handelt es sich um im Burgenland geerntete Samen.

Sowohl Quantität als auch die Zusammensetzung der Isoflavonprofile ist prinzipiell vom Genotyp abhängig, kann aber auch durch äußere Faktoren wie etwa Temperatur beeinflusst werden (Lozovaya et al., 2005; Al-Tawaha, 2010). Laut Berger et al. (2008) wird der Isoflavongehalt des Hypocotyls reifer Samen jedoch wesentlich weniger durch umweltbedingte Faktoren beeinflusst, als jener der Cotyledonen. Im Isoflavonprofil von in Kanada kultivierten Sorten dominiert mengenmäßig Genistin in den Endstadien der Samenreifung ebenso wie in Blattgewebe und Hülsenexsudaten (Dhaubhadel et al., 2003). Somit werden in diesem Fall die Derivate des klassischen Biosyntheseweges gegenüber jenen, welche aus dem 5-Deoxybiosyntheseweg stammen, bevorzugt synthetisiert. In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Sorten wurden unterschiedliche Mengen an Derivaten der beiden Biosynthesewege detektiert. Es kann jedoch derzeit nicht abgeschätzt werden, ob es sich dabei um genetisch bedingte Sortenspezifika handelt oder ob klimatische Bedingungen, die für alle hier untersuchten Sorten annähernd vergleichbar waren, für die Unterschiede zum Anbau anderer Sorten etwa in Korea (Kim & Chung, 2007) oder Kanada verantwortlich sind (Dhaubhadel et al., 2003).

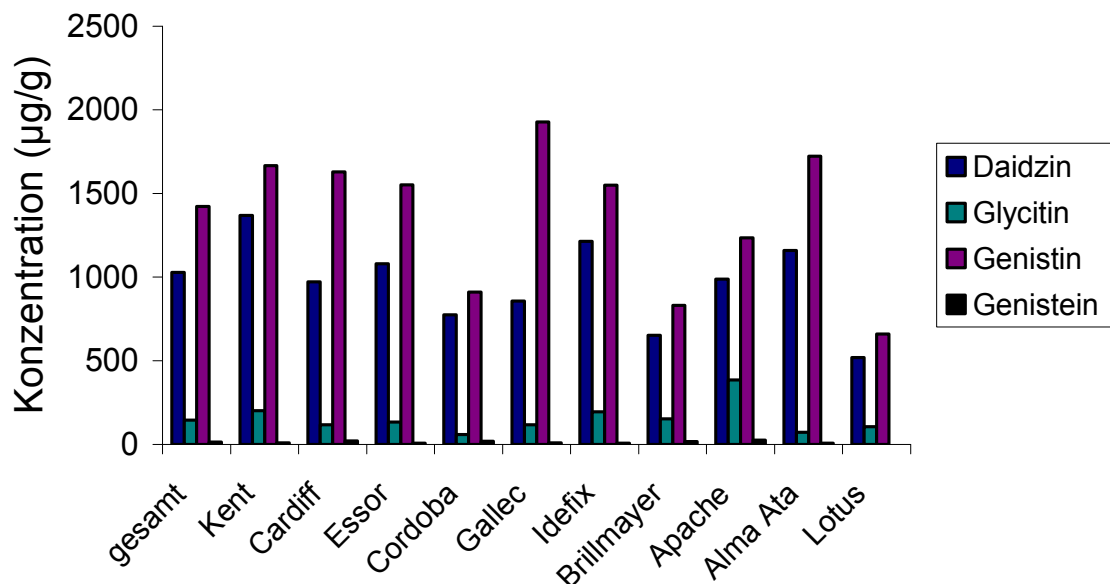


Abb.17: Isoflavongehalte gesamt und nach Sorten. Einheit: µg/g Trockengewicht

Tab. 13: Isoflavongehalte der Sojabohnenproben gesamt und nach Sorten

Sorte	Daidzin	Glycitin	Genistin	Genistein
Gesamt (n=41)	1028 (417-1932)	145 (15-385)	1422 (456-2817)	13 (6-42)
Kent (n=10)	1369 (911-1932)	202 (97-346)	1668 (1091-2341)	9 (7-12)
Cardiff (n=7)	973 (810-1398)	116 (29-193)	1628 (1190-2817)	22 (8-43)
Essor (n=7)	1081 (825-1287)	135 (83-203)	1552 (1094-1919)	7 (6-8)
Cordoba (n=6)	775 (446-1255)	59 (15-116)	912 (456-1654)	18 (6-39)
Gallec (n=2)	857 (694-1020)	118 (73-163)	1928 (1637-2200)	9 (9-9)
Idefix (n=2)	1213 (1092-1335)	195 (179-212)	1549 (1462-1635)	7 (6-8)
Brillmayer (n=4)	654 (417-1095)	152 (62-279)	830 (568-1339)	17 (12-20)
Apache (n=1)	988	385	1235	27
Alma Ata (n=1)	1159	72	1722	8
Lotus (n=1)	518	105	660	n. d.*

Die Isoflavongehalte sind in der Einheit µg/g Trockenmasse angegeben. Die min. und max. Messwerte sowie die Probenzahl n sind in Klammer angegeben. * n. d. - nicht detektiert. Die Isoflavonaglyca Daidzein und Glycitein konnten nicht detektiert werden (< n. d.)

5.2.3 Testversuch zur Isoflavonverteilung in der Pflanze

Zwecks Abklärung einer allfälligen organspezifischen Akkumulation wurden sowohl oberirdische (Stängel und Blätter) als auch unterirdische Pflanzenorgane (Wurzeln) bezüglich ihres Isoflavonprofils vergleichend untersucht. Verwendet wurden die Sorten Gallec, Eссор, Kent, Idefix und Brillmayer, welche unter standardisierten Bedingungen kultiviert wurden, um standortbedingte Faktoren ausschließen zu können. Es ergaben sich sortenbezogen kaum Unterschiede (siehe Tab.14). Am Beispiel der Sorte Kent sind die organspezifischen Verteilungsmuster dargestellt (Abb. 18). Im Vergleich zu den Samen war insgesamt der Gehalt an Isoflavonen in oberirdischen Teilen gering. Im Verhältnis zu den Wurzeln wiesen die oberirdischen Teile kaum detektierbare Mengen an Standardisoflavonen auf (Abb. 18). An Einzelsubstanzen konnte in den unterirdischen Teilen der Sorte Kent Daidzein und Genistein detektiert werden, während oberirdische Teile Daidzein und Genistein sowie das unbekannte Isoflavonoid b in sehr geringen Mengen enthielten (Abb. 18). In beiden Fällen wurden die sonst in den Samen vorkommenden Isoflavone Daidzin, Genistin, Glycitin und Glycitein nicht nachgewiesen.

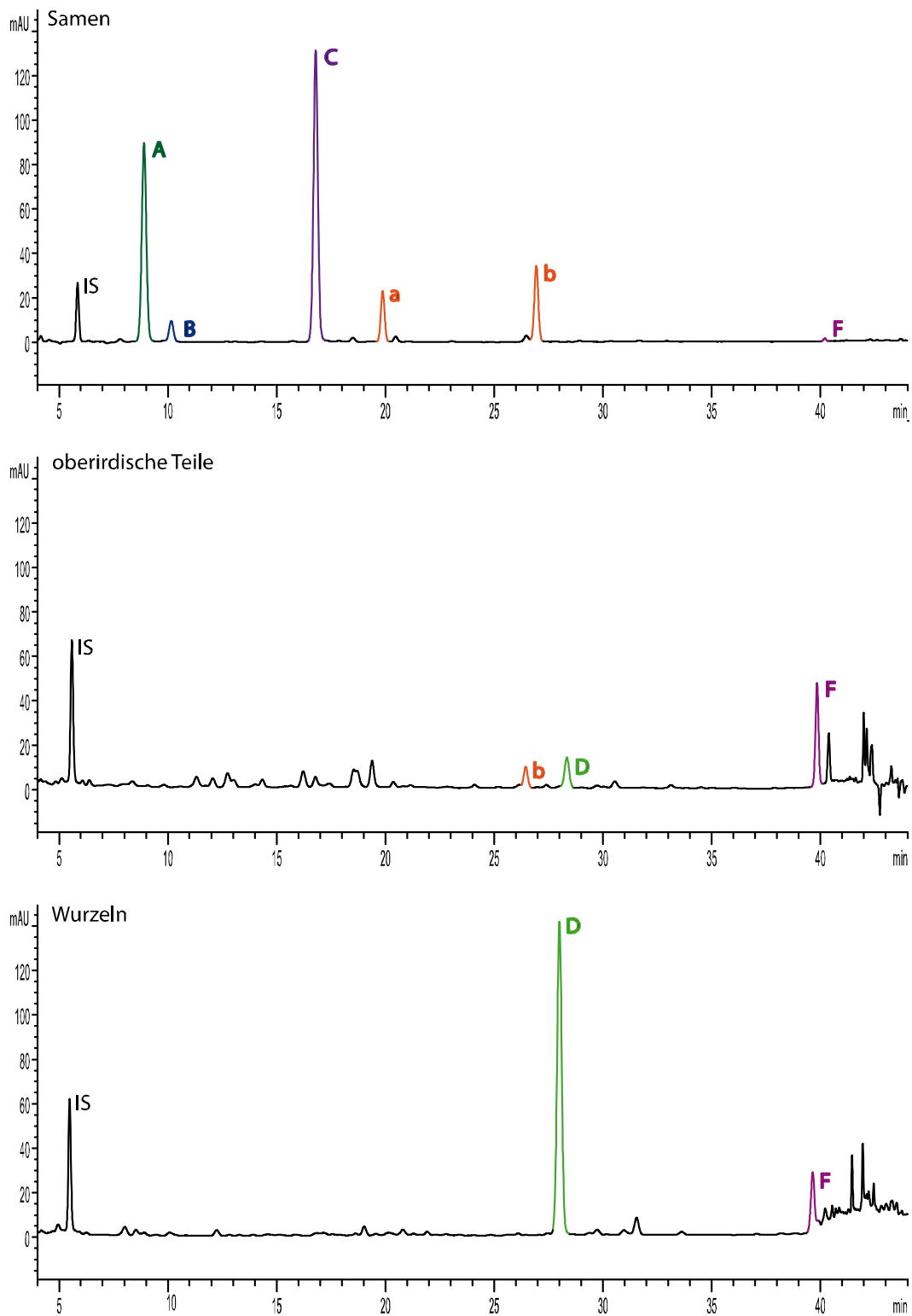


Abb. 18: HPLC-Chromatogramme reifer Samen, oberirdischen Teilen und Wurzeln der Sorte Kent bei 254 nm. Abkürzungen: IS - Interner Standard (p-Hydroxybenzoesäure), **A - Daidzin**, **B - Glycitin**, **C - Genistin**, **D - Daidzein**, **F - Genistein**, **a, b - nicht identifizierte Isoflavonoide**. Die Unterschiede in der Retentionszeit der abgebildeten Peaks sind auf Druckschwankungen innerhalb des Messzeitraumes zurückzuführen.

5.2.4. Entwicklungsbedingte Akkumulationsunterschiede

In der Literatur finden sich hauptsächlich Hinweise zur Akkumulationsdynamik im Laufe der Entwicklung des Samens (Dhaubhadel et al., 2003; Kim & Chung, 2007), jedoch kaum Hinweise in Bezug auf die Pflanzenorgane, die wirtschaftlich weniger bedeutsam sind. Dhaubhadel et al. (2008) untersuchten Biosyntheseaktivitäten von Glucosidasen und Malonyltransferasen in unterschiedlichen Organen und unter Stresseinwirkung. Demnach sind in unreifen Samen die Aktivitäten am höchsten, gefolgt von Wurzelgewebe und dem keimenden Spross, können aber auch bei pathogenem Befall steigen. Gegenüber Wurzeln weisen ganze Keimlinge, ausgereifte Blüten, Blätter sowie Hypocotyl geringere Enzymaktivitäten auf. Graham (1991) untersuchte die Flavonoiddiversifizierung an Soja-Keimlingen, welche Isoflavonoide und Flavonole akkumulierten. Dabei wurde ein Übergang von Isoflavon- auf Flavonolbildung in wachsenden Primärblättern beobachtet (Tag 5 des Wachstums), wogegen in den Folgeblättern der Jungpflanze das Flavonol Kämpferol gegenüber den Isoflavonen dominierte. Allerdings wurden nur junge Entwicklungsstadien (bis Tag 10 des Wachstums) berücksichtigt.

Eine vergleichende Analyse älterer Entwicklungsstadien ist bislang noch nicht durchgeführt worden, weshalb diese Fragestellung in die vorliegende Arbeit einbezogen wurde. Entwicklungsstadien im Alter von 21 Tagen sowie 31 Tagen unterschieden sich jedoch in ihrer qualitativen als auch quantitativen Zusammensetzung nur geringfügig, und es konnten auch keine signifikanten Änderungen im Gesamtgehalt an Isoflavonen beobachtet werden. Demnach dürfte bei den hier untersuchten Sorten im Laufe der Entwicklung keine weitere Differenzierung des Isoflavonprofils im vegetativen Bereich stattfinden. Tabelle 14 zeigt die Isoflavonverteilung in unter- und oberirdischen Pflanzenteilen.

Tab.14: Isoflavonverteilung in ober- und unterirdischen Pflanzenteilen

Sorte	Organ	Daidzin	Glycitin	Genistin	Daidzein	Glycitein	Genistein
Gallec	UT	-	-	-	++	-	+
	OT	-	-	-	+	-	+
Essor	UT	-	-	-	++	-	+
	OT	-	-	-	+	-	+
Kent	UT	-	-	-	++	-	+
	OT	-	-	-	+	-	+
Idefix	UT	-	-	-	++	-	+
	OT	-	-	-	+	-	+
Brillmayer	UT	-	-	-	++	-	+
	OT	-	-	-	+	-	+

Zeichen und Abkürzungen: ++ vorhanden, + wenig vorhanden, - nicht detektiert, UT – unterirdische Teile, OT – oberirdische Teile

5.3. Korrelation zwischen Proteingehalt und Isoflavonprofil

Nach Kim et al. (2006) sind im Zuge der Samenreifung Proteine, Lipide und freie Zucker mit konjugierten Isoflavonen und dem Gesamtgehalt an Isoflavonen positiv, der Lipidgehalt mit dem Vorkommen der Isoflavonaglyca jedoch negativ korreliert. Diese Befunde betreffen allerdings koreanische Sorten; die heimischen Kultursorten wurden diesbezüglich noch nicht analysiert. In Abb. 19 sind die Isoflavonprofile und Proteingehalte der verschiedenen Sorten dargestellt. Während der Isoflavongehalt der unterschiedlichen Sorten erheblich schwankt, unterscheiden sich die Proteingehalte nur in geringem Ausmaß. Es ist keine mengenmäßige Korrelation feststellbar, die Beobachtungen von Kim et al. (2006) können daher nicht bestätigt werden. Die beiden Biosynthesewege der Isoflavone (klassischer Biosyntheseweg, 5-Deoxybiosyntheseweg) sind in den untersuchten Sorten unterschiedlich ausgeprägt, sodass auch hier kein Zusammenhang erkennbar ist.

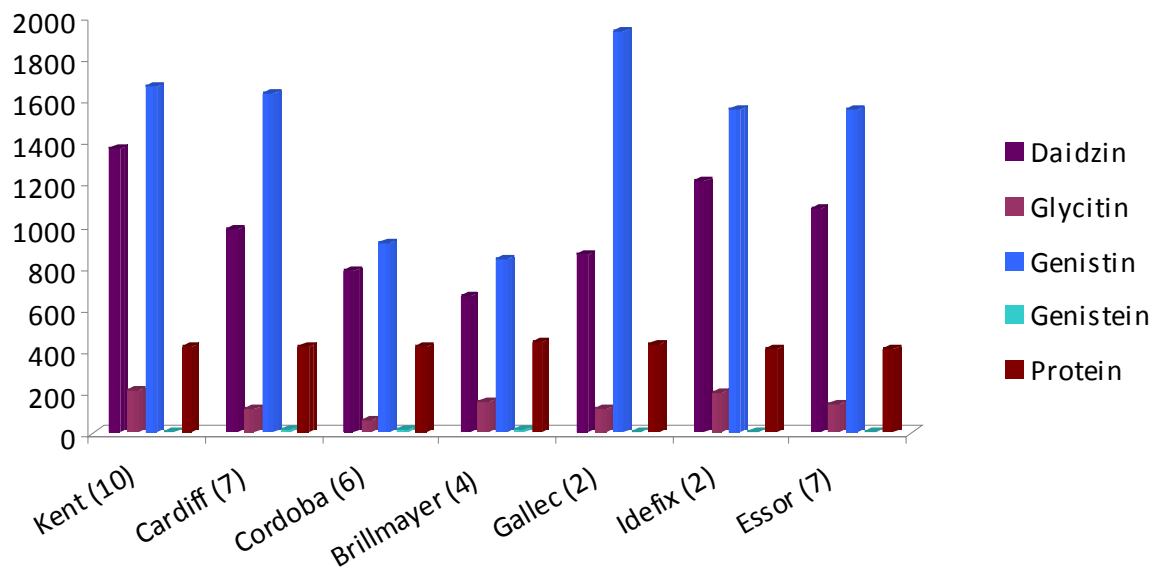


Abb.19: Isoflavonprofile und Proteingehalte der verschiedenen Sorten. Genistin und Genistein > klassischer Biosyntheseweg, Daidzin und Glycitin > 5-Deoxybiosyntheseweg

6. Diskussion

6.1 Primärinhaltsstoffe

Die Ergebnisse der Arbeit in Bezug auf Korrelationen zwischen den Variablen Öl-, und Proteingehalt und dem Tausendkorngewicht stimmen mit verschiedenen Studien überein, wie nachfolgend diskutiert wird. Sojabohnen mit einem hohen Ölgehalt besitzen einen geringeren Gehalt an Protein und umgekehrt. Diese starke, negative Korrelation zwischen Öl- und Proteingehalt wurde ebenfalls von Vollmann et al. (2000), Wilcox & Shibles (2001) und Ray et al. (2006) beschrieben. Es wird angenommen, dass diese Beziehung weitgehend einer genetischen Kontrolle unterliegt, sowie durch wechselnde Umweltbedingungen beeinflusst werden kann (Hymowitz et al. 1972). Nach Egli & Bruening (2007) ist die negative Korrelation der beiden Inhaltsstoffe mit der Aufteilung des Energieaufwandes der Protein- und Ölsynthese verbunden. Die Mechanismen, die diese Beziehung kontrollieren, sind jedoch noch nicht aufgeklärt.

Die positive Korrelation zwischen Proteingehalt und TKG, wonach der Proteingehalt mit steigender Korngröße tendenziell zunimmt, stimmt mit dem Ergebnis von Stark (1924) überein. Sojabohnen mit einem hohen Tausendkorngewicht besitzen einen niedrigeren Ölgehalt. Diese negative Korrelation der beiden Variablen entspricht den Ergebnissen der Arbeiten von Stark (1924) und Yin & Vyn (2005). Daher werden großkörnige Sojabohnensorten auch für die Verarbeitung zu Lebensmitteln (Sojamilch, Tofu) besonders gesucht, da durch diese Korrelation ein für die Verarbeitung erforderlicher höherer Proteingehalt erwartet werden kann.

Genetische und umweltbedingte Faktoren sind verantwortlich für die hohe Variabilität bezüglich der chemischen Zusammensetzung der Sojabohnen. Hartwig und Kilen (1991) berichteten, dass die inhaltsstoffliche Zusammensetzung verschiedener Kultursorten inhärent ist. Es wurde jedoch auch beobachtet, dass sich die Zusammensetzung der Samen einer Sorte

erheblich verändern kann, wenn diese in verschiedenen Jahren, oder unter verschiedenen Umweltbedingungen im selben Jahr angebaut wird (Yin, 2005). In der vorliegenden Arbeit erwies sich die Sortenwahl als hoch signifikant bezüglich des Ölgehaltes sowie des Tausendkorngewichtes. Die Werte des Tausendkorngewichtes der einzelnen Sorten schwankten in einem Bereich von 170 – 213 g. Die Schwankungen von Öl- und Proteingehalten der einzelnen Sorten lagen zwischen 196 – 216,3 g/kg bzw. 406,8 – 414,3 g/kg bezogen auf die Trockenmasse (Tab. 6). Die teilweise sehr hohen Schwankungen könnten durch lokale Klimaereignisse, wie z.B. starke Gewitter oder Hagel hervorgerufen worden sein. In der Literatur wird oft vom starken Einfluss der standörtlichen Umweltbedingungen auf die Samenzusammensetzung und das Korngewicht berichtet (Vollmann et al., 2000). Die untersuchten Parameter Bodenart und geographische Lage ergaben jedoch keine statistische Signifikanz bezüglich der Primärinhaltsstoffe und des Tausendkorngewichtes. Die Erhebung der Bodenart der einzelnen Feldstücke, auf denen die Probenziehung stattfand, erfolgte mithilfe von Bodenkarten. Diese Methode ist relativ ungenau, da sich die Zusammensetzung des Bodens innerhalb der einzelnen Feldstücke verändern kann. Diese Ungenauigkeit könnte durch die Erhebung der Standortskordinaten mittels GPS, oder durch Entnahme einer Bodenprobe an der jeweiligen Probenziehungsstelle vermieden werden. Die Probenziehungsflächen befanden sich teilweise im Norden, teilweise im Süden des Mittelburgenlandes. Es konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der untersuchten Variablen festgestellt werden. Eine gute Möglichkeit, den Einfluss des Klimas auf die Sojabohnen zu untersuchen, wäre die Verwendung von Temperatur- und Feuchtelogger, welche die während der Messperiode herrschenden Temperaturen und gefallenen Niederschlagsmengen genau aufzeichnen.

Auch die Kulturführungsmaßnahmen können einen Einfluss auf die Stoffzusammensetzung und die Größe der Samen, und somit auf ihr Gewicht ausüben. Es wurde der Einfluss des Anbaus verschiedener Vor- und Zwischenfrüchte untersucht, wobei Sojabohnen, die auf vorjährigen Maisfeldern angebaut wurden, den höchsten Proteingehalt aufwiesen. Dies könnte daran liegen, dass Mais einen sehr hohen Stickstoffbedarf hat, und der Boden im

Folgejahr einen dementsprechend geringen Anteil an verfügbarem Stickstoff enthält. Da Stickstoff ein essentieller Pflanzennährstoff ist, versucht die Sojapflanze durch Ausbildung möglichst vieler Nodule diesen Mangel auszugleichen. Besitzt eine Sojapflanze viele Wurzelknöllchen, stellen diese genügend Stickstoff zur Verfügung, wodurch eine hohe Syntheseleistung ermöglicht wird. Dies würde auch mit dem Ergebnis der Knöllchenzählung übereinstimmen, wonach jene Sojabohnen mit den meisten Knöllchen auch den höchsten Gehalt an Protein aufwiesen. Demgegenüber hatten die auf vorjährig brachliegenden Flächen angebauten Sojabohnen den geringsten Proteingehalt. Während einer Brache werden dem Boden keine Nährstoffe entzogen, dieser kann sich innerhalb dieses Zeitraumes regenerieren. Ist im frühen Vegetationsstadium genügend Stickstoff im Boden enthalten, besteht für die Sojabohne keine Notwendigkeit, sich diesen über die Ausbildung zahlreicher Knöllchen zu beschaffen. Ist der verfügbare Stickstoff aufgebraucht, besteht für die Sojabohne keine Möglichkeit mehr, diesen über die Knöllchenbakterien zu beziehen, weil die Etablierung der Symbiose lediglich in der anfänglichen Wachstumsperiode stattfindet. Dadurch wird die Syntheseleistung verringert, und die Konsequenz ist ein niedrigeres Tausendkorngewicht und ein geringerer Proteingehalt.

In zentraleuropäischen Ländern werden Sojabohnen hauptsächlich wegen des hohen Proteingehaltes der Samen angebaut. Die Ernte wird zur Futtermittelproduktion verwendet oder zu Lebensmitteln verarbeitet, wobei in beiden Fällen ein hoher und gleich bleibender Gehalt an Protein erwünscht ist (Vollmann, 2000). Abgesehen von den klimatischen Voraussetzungen, sind sowohl Sortenwahl, als auch Kulturführungsmaßnahmen wie Anbau einer Zwischenfrucht oder Düngerausbringung, für die Syntheseleistung der Sojabohne von Bedeutung. Verschiedenen Studien zufolge erhöht eine Stickstoffdüngergabe den Proteingehalt der Samen (Vollmann, 2000), kann jedoch die Proteinqualität negativ beeinflussen (Paek et al., 1997).

6.2 Sekundärinhaltsstoffe

Die organspezifische Akkumulation von Isoflavonoiden sowie die Akkumulationsdynamik im Laufe der Samenentwicklung sind in den bisher untersuchten Sorten nicht einheitlich und unterliegen oftmals größeren Schwankungen, wie etwa das Vorkommen von Daidzin und Genistin. Es ist anzunehmen, dass analog zu bisherigen Beobachtungen auch Isoflavonoidprofile der hier untersuchten Sorten vom Genotyp abhängig sind (Berger, 2008) oder durch umweltbedingte Faktoren beeinflusst werden können (Lozovaya et al., 2005). Verschiedene Sojabohnenvarietäten können in unterschiedlichen Anbaujahren starke Schwankungen im Isoflavongehalt der Samen aufweisen (Hoeck et al. 2000). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Wang & Murphy (1994), die das Anbaujahr, sowie den Genotyp als hauptsächliche Quellen dieser Variation identifizierten. Hoeck et al. (2000) fanden in ihrer Arbeit signifikante Interaktionen zwischen „Genotyp x Jahr“, Genotyp x Standort“, und Genotyp x Jahr x Standort“ bezüglich des Gesamtisoflavongehalts, sowie der Menge der einzelnen Isoflavone. Aufgrund dieser vielfältigen Zusammenhänge ist eine Vorhersage, beziehungsweise die Kontrolle des Isoflavongehaltes lediglich durch die Auswahl und den Anbau eines bestimmten Genotypes, relativ schwierig. In jedem Falle müssten die hier untersuchten Sorten auf Konstanz der Isoflavonprofile auch unter geänderten Umweltbedingungen vergleichend analysiert werden, um die Signifikanz der bisherigen Ergebnisse zu erhöhen.

Verglichen mit den Samen, waren die Isoflavongehalte in ober- und unterirdischen Teilen der Pflanze sehr gering. Daidzein und Genistein konnten in beiden Pflanzenorganen detektiert werden, wobei Daidzein das primär vorhandene Isoflavon darstellte, und in den Wurzeln stärker vertreten war als in oberirdischen Teilen. Nach Graham (1991) sind Daidzein und seine Konjugate die dominierenden Flavonoide in Wurzelgeweben, besonders in meristematischem Gewebe, welches mit dem Wachstum der Wurzeln assoziiert ist. Die nur sehr geringen, oft nicht detektierbaren Gehalte an Genistein, stimmen mit dem Ergebnis von Graham (1991) überein, der in seiner Arbeit die Verteilung der Flavonoide in verschiedenen Pflanzenorganen der Sojabohne, bei

unterschiedlichen Entwicklungsstadien untersuchte. Laut Graham (1991) variieren die Gehalte der Metaboliten in einem Pflanzenorgan mit dem Alter, dem Entwicklungsstadium, sowie den Wachstumsbedingungen. Allerdings waren in den untersuchten Proben keine mengenmäßigen Unterschiede im Verlauf der Entwicklung zu beobachten. Im Gegensatz zu Kim et al. (2006) waren auch keine Zusammenhänge zwischen Proteingehalt und Isoflavonbiosynthese in Samen zu erkennen.

Es erscheint generell schwierig, eine genaue Vorhersage über die Gehalte der untersuchten Inhaltsstoffe zu treffen. Die Biosynthese und Akkumulation der Metaboliten ist von vielen biotischen und abiotischen Faktoren abhängig, zusätzlich spielen Kulturparameter und Sortenwahl eine wichtige Rolle. Um Konstanz feststellen zu können, müssten die Untersuchungen gezielt unter kontrollierten Bedingungen und über mehrere Jahre hinweg durchgeführt werden.

7. Literaturverzeichnis

- Amberger A., 1996: Pflanzenernährung, 4. Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- American Soybean Association, 2001: Kompendium Soyabohne: Züchtung, Verwertung, Anbau und Markt. Darmstadt, Genius Biotechnologie GmbH
- Ascherio A., Hennekens C.H., Buring J.E., Master C., Stampfer M.J., Willett W.C., 1994: Trans-fatty acids intake and risk of myocardial infarction. *Circulation* 89: 94–101
- Bennetts H.W., Uuderwood E.J., Shier F.L., 1946: A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in western. *Australian Veterinary Journal* Vol.22 No.1: 2-12
- Barbour M.T., Hattermann D.R., Stacey G., 1991: Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Applied and environmental microbiology* Vol. 57 No. 9: 2635-2639
- Berger M., Rasolohery C.A, Cazalis R., Dayde J., 2008: Isoflavone accumulation kinetics in soybeanseed cotyledons and hypocotyls: distinct pathways and genetic controls. *Crop Sci.* 48:700–708
- Berghofer E., 2008: Verwendungsmöglichkeiten von Sojabohnen in der menschlichen Ernährung. Tagungsband 1. Austrian Soy Symposium, Wien; University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna, Department of Food Science and Technology
- Brouwer I.A., Wanders A.J., Katan M.B., 2010: Effect of animal and industrial trans fatty acids on HDL and LDL cholesterol levels in humans – A Quantitative Review. *PLoS ONE* 5(3): e9434
- Canadian Food Inspection Agency, 1996: The biology of *Glycine max* L. (Merr.)
- Cassidy A., Bingham S.: 1995: Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soybean products. *Br. J. Nutr.* 74:587-601
- Committee on Toxicity of Chemicals in food, consumer products and the environment – Report, 2003: Phytoestrogens and Health

- Deix W., 2008: Phänotypisierung der Nodulierung an Blattmerkmalen der Sojabohne, Diplomarbeit, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität für Bodenkultur, Wien
- D'Haeze W., Holsters M., 2002: Nod factor structures, responses and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* Vol.12 No. 6: 79-105
- Dhaubhadel S., McGarvey B.D., Williams R., Gijzen M., 2003: Isoflavonoid biosynthesis and accumulation in developing soybean seeds. *Plant Molecular Biology* 53: 733-743
- Dhaubhadel S., Farhangkhoei M., Chapman R., 2008: Identification and characterization of isoflavonoid specific glycosyltransferase and malonyltransferase from soybean seeds. *Journal of Experimental Botany* Vol. 59, No. 4: 981-994
- Dixon R., 2004: Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 225-261
- Egli D.B., Bruening W.P., 2007: Accumulation of nitrogen and dry matter by soybean seeds with genetic differences in protein concentration. *Crop Sci.* 47: 359-366
- Fekuda Y., 1933: Cytological studies on the wild and cultivated Manchurian soybeans (*Glycine* L.). *Jap. J. Bot.* 6: 489-506
- Graham T.L., 1991: Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiol.* 95: 594–603.
- Hamdoon M., 2009: Natural and synthetic flavonoid derivatives with potential antioxidant and anticancer activities. Dissertation. Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät III, Universität des Saarlandes
- Hartwig E.E., Kuo T.M., Kenty M.M., 1997: Seed protein and its relationship to soluble sugars in soybean. *Crop Science* 37:770-773
- Hartwig, E.E., Kilen T.C., 1991: Yield and composition of soybean seed from parents with different protein, similar yield. *Crop Science* 31:290–292
- Hicks D.R., 1978: Growth and Development. In: Norman A.G. (ed.) *Soybean physiology, agronomy and utilisation* p.18-27, Academic press, London
- Hirsch A.M., 1992: Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122: 211-237
- Hirsch A.M., Lum M.R., Downie A.J., 2001: What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiology* 127: 1484–1492

- Hoeck J.A., Fehr W.R., Murphy P.A., Welke G.A., 2000: Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. *Crop Sci.* 40: 48–51
- Hofer M., Schweiger P., Putz B., 2008: Produktivität verschiedener Sojasorten im ostösterreichischen Anbaugebiet. Abschlussbericht Bio Forschung Austria, Grundlagen zur Züchtung, Vermehrung und Sorten-/Saatgutprüfung für den Biolandbau: 116-127
- Hymowitz T., 1970: On the domestication of the soybean. *Econ. Bot.* 24: 408-421
- Hymowitz T., Collins F.I., Panczner J., Walker W.M., 1972: Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed. *Agron. J.* 64:613-616
- Jordan D.C., 1982: Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of systematic bacteriology* Vol. 32, No. 1: 136-139
- Kim S.L., Berhow M.A., Kim J.T., Chi H.Y., Lee S.J., Chung M.I., 2006: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 10003-10010
- Kim J.A., Chung I.M., 2007: Change in isoflavone concentration of soybean (*Glycine max*. L.) seeds at different growth stages. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 496-503
- Krishnan H.B., 2005: Engineering Soybean for Enhanced Sulfur Amino Acid Content. *Crop science* 45: 454-460
- Krumphuber C., 2008: Sojaanbau in Österreich und Europa – Situationsanalyse, Tagungsband 1. Austrian Soy Symposium, Wien; Landwirtschaftskammer Linz, Abteilung Pflanzenproduktion
- Kudou S., Fleury Y., Welti D., Magnolato D., Uchida T., Kitamura K., Okubo K., 1991: Malonyl isoflavone glucosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agric Biol Chem* 55:2227–2233
- Lapcik O., 2007: Isoflavonoids in non-leguminous taxa: A rarity or a rule? *Phytochemistry* 68:2909–2916
- Latunde-Dada A.O., Cabello-Hurtado F., Czitttrich N., Didierjean L., Schopfer C., Hertkorn N., Werck-Reichhart D., Ebe J., 2001: Flavonoid 6-Hydroxylase from

- soybean (*Glycine max* L.), a novel plant P-450 monooxygenase. The Journal of biological chemistry Vol. 276 No. 3: 1688–1695
- Liu K.S., 1997: Agronomic characteristics, production and marketing. *In*: Liu K.S. Liu (ed.) Soybeans – Chemistry, Technology and Utilisation, p. 1-22. Chapman & Hall, New York
- Lozovaya V.V., Lygin A.V., Ulanov A.V., Nelson R.L., Daydé J., Widholm J.M., 2005: Effect of temperature and soil moisture status during seed development on soybean seed isoflavone concentration and composition. Crop Sci. 45, 1934–1940
- Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B., 1970: The systematic identification of flavonoids, Springer Verlag, Berlin
- Manoury N., Kondorosi A., Kondorosi E., Mergaert P., 2008: Cell biology of nodule infection and development, *In*: Dilworth M. et al. (eds.) Nitrogen-fixing leguminous symbioses, p.153-189. Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht, NL
- Masterson R.V., Russell P.R., Atherly A.G., 1982: Nitrogen fixation (nif) genes in large plasmids of *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 152: 928-931
- Meinke D., Chen W.J., Beachy R.N., 1981: Expression of storage-protein during soybean seed development, Planta 153: 130-139
- Messina M., Barnes S., 1991: The role of soy products in reducing cancer risk. J. Natl. Cancer Inst. 83:541-546
- Messina M.J., 1999: Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. Am J Clin Nutr 70:439–450
- Mylona P., Pawlowski K., Bisseling T., 1995: Symbiotic nitrogen fixation. The Plant Cell. Vol.7: 869-885
- Paek N.C., Imsande J., Shoemaker R.C. and Shibbles R., 1997: Nutritional control of soybean seed storage protein. Crop Sci 37:498-503
- Parniske M., Ahlborn B., Werner D., 1991: Isoflavonoid-Inducible Resistance to the Phytoalexin Glyceollin in Soybean Rhizobia. Journal of Bacteriology Vol.173 No.11: 3432-3439

- Pueppke S.G., Bolanos-Vasquez M.C., Werner D., Bec-Ferté M.P., Prome J.C., Krishnan H.B., 1998: Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perception as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. *Plant Physiol.* 117: 599–608
- Ray J.D., Frittschi F.B., Heatherly L.G., 2006: Large application of fertilizer N at planting affects seed protein and oil concentrations in the early soybean production system. *Field Crops Res.* 99:67–74
- Ruckenbauer P., 2008: Haberlandt und die Geschichte der Sojabohne in Österreich und Europa, Tagungsband 1. Austrian Soy Symposium, Wien; University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna, Institute of Agronomy and Plant Breeding
- Sprent J., 2009: Legume nodulation – a global perspective, press Wiley – Blackwell, Oxford, UK
- Sprent J., 1980: Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. *Plant, Cell and Environment* 3: 35-43
- Stark R.W., 1924: Environmental factors affecting the protein and the oil content of soybeans and the iodine number of soybean oil. *Agron. J.* 16:636–645.
- Steele C.L., Gijzen M., Qutob D., Dixon A.R., 1999: Molecular Characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol. 367, No.1:146-150
- Subramanian S., Stacey G., Yu O., 2006: Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *The Plant Journal* 48: 261-273
- Subramanian S., Stacey G., Yu O., 2007: Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in Plant Science* Vol.12 No.7: 282-285
- Van Rhijn P.†, Vanderleyden J., 1995: The Rhizobium-Plant Symbiosis. *Microbiological reviews* Vol 59 No. 1: 124–142
- Vance C.P., 2008 in: Dilworth M. et al. (eds.), Nitrogen-fixing leguminous symbioses, p.293-320. Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht, NL
- Vollmann J., Fritz C.N., Wagentristl H., Ruckenbauer P., 2000: Environmental and genetic variation of soybean seed protein content under Central European

- growing conditions. Journal of the Science of Food and Agriculture 80:1300-1306
- Vollmann J., 2005: Möglichkeiten und Grenzen der Züchtung von Sojabohnen für mitteleuropäische Anbaubedingungen. Mitteilungen der Gesellschaft für Pflanzenbauwissenschaften 17: 150-151
- Wang H.J., Murphy P.A., 1994: Isoflavone composition of american and japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. J Agric Food Chem 42:1674–1677
- Yin X., Vyn J.T., 2005: Relationships of Isoflavone, Oil, and Protein in Seed with Yield of Soybean. Agron. J. 97:1314–1321
- Yoshida H., Kanei S., Tomiyama Y., Mizushima Y., 2005: Regional distribution in the fatty acids of triacylglycerols and phospholipids within soybean seeds. European Journal of Lipids and Technology. Vol.108 Issue 2: 149-158
- Yu O., Shi J., Hession A., Maxwell C., McGonigle B., Odell J., 2003: Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. Phytochemistry 63: 753–763
- Zeller F.J., 1999: Die Sojabohne (*Glycine max* (L.) Merr.): Nutzung, Genetik, Biotechnologie. Die Bodenkultur. Aust J Agric Res 50: 191-202

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.1: Aufbau und Habitus einer Sojapflanze; Quelle: Hicks (1978)	5
Abb.2: Sojabohnenblüte und ihre Teile; Quelle: Hicks (1978)	6
Abb.3: Generelle Merkmale von Lipochitin-Oligosacchariden	11
Abb.4: Proteingehalt verschiedener Lebensmittel	17
Abb.5: Schema der Flavonoidbiosynthese	20
Abb.6: Synthesewege der Isoflavonaglyca, Glycoside und Malonylglycoside aus Sojabohnensamen	22
Abb.7 Strukturelle Ähnlichkeit von Phytoestrogenen mit Estradiol	24
Abb.8: Die negative Korrelation zwischen Protein- und Ölgehalt der Sojabohnen	34
Abb.9: Die positive Korrelation zwischen TKG (g) und Proteingehalt	34
Abb.10: Korrelation von TKG (g) mit dem Ölgehalt	35
Abb.11: Box Plot Darstellung der signifikanten Sortenunterschiede im TKG	36
Abb.12: Box Plot Darstellung der signifikanten Sortenunterschiede im Ölgehalt	36
Abb.13: Verteilung der einzelnen Sorten aufgrund signifikanter Sortenunterschiede von TKG und Ölgehalt	37
Abb.14: HPLC-Chromatogramm und UV-Spektren der Standardsubstanzen in der Stammlösung bei 254 nm	54
Abb.15: HPLC-Chromatogramme der verschiedenen Sorten bei 254 nm	47
Abb.16: HPLC-Chromatogramme der verschiedenen Sorten bei 254 nm	48
Abb.17: Isoflavongehalte gesamt und nach Sorten	49
Abb. 18: HPLC-Chromatogramme der Sorte Kent bei 254 nm	52
Abb.19: Isoflavonprofile und Proteingehalte der verschiedenen Sorten	55
Tab.1: Hauptunterschiede zwischen determinierten und indeterminierten Knöllchen von fortgeschrittenen papilionoiden Leguminosen mit Wurzelhaarinfektion.....	9

Tab.2: Übersicht der Inhaltsstoffe von Sojabohnen	15
Tab.3: Aminosäurezusammensetzung von Sojabohnenschrot	18
Tab 4: Liste der verwendeten Referenzsubstanzen	28
Tab. 5: Laufmittelgradient	30
Tab.6: LSMean-Werte des TKG, Öl- und Proteingehaltes der verschiedenen Sorten.....	38
Tab.7: Verschiedene Bodenarten und Mittelwerte von TKG, Öl- und Proteingehalt der geernteten Sojabohnen	39
Tab.8: LSMEAN- Werte von TKG, Protein- und Ölgehalt, nach vorjähriger Brache oder Anbau verschiedener Vorfrüchte.....	40
Tab.9: Die Mittelwerte der Variablen ohne Anbau einer Zwischenfrucht, und nach Anbau verschiedener Zwischenfrüchte	40
Tab.10: Die ermittelte Nodulanzahl der Pflanzenwurzeln und Mittelwerte der Primärinhaltsstoffe und TKG.....	41
Tab.11: Peakflächen der Isoflavonstandards und korrelierende Substanzkonzentrationen	44
Tab.12: Mittelwerte des Gesamt-Isoflavongehaltes nach Sorten	46
Tab.13: Isoflavongehalte der Sojabohnenproben gesamt und nach Sorten	50
Tab.14: Isoflavonverteilung in ober- und unterirdischen Pflanzenteilen	54

9. Zusammenfassung

Das Ziel der Arbeit war, besseres Verständnis über das komplexe Zusammenspiel der Einflussfaktoren wie Anbaugebiet bzw. Bodenbeschaffenheit und Klima sowie Sortenwahl auf die Primär- und Sekundärstoffproduktion von *Glycine max* zu erlangen. Dazu wurde Öl-, Protein- und Isoflavongehalt, sowie das Tausendkorngewicht von im Burgenland kultivierten Sojabohnensamen vergleichend analysiert. Öl- und Proteingehalt wurden durch Nahinfrarot-Spektroskopie, das Tausendkorngewicht durch Abzählen und Bestimmung des Gewichts der Samen ermittelt. Mit den erhaltenen Daten wurde mittels Statistikprogramm SAS eine vergleichende Analyse der Einflussfaktoren Sojabohnenvarietäten, Anbaugebiete und Kulturführungsmaßnahmen durchgeführt. Die Sortenwahl erwies sich als hoch signifikant bezüglich des Ölgehaltes sowie des Tausendkorngewichtes. Die Werte des Tausendkorngewichtes der einzelnen Sorten schwankten in einem Bereich von 170 – 213 g. Die Schwankungen von Öl- und Proteingehalten der einzelnen Sorten lagen zwischen 196 – 216,3 g/kg bzw. zwischen 406,8 – 414,3 g/kg, bezogen auf die Trockenmasse. Die qualitative und quantitative Analyse der Isoflavone wurde per HPLC durchgeführt. In reifen Samen dominierten mengenmäßig die Glycoside Daidzin und Genistin, wobei die Konzentrationen sortenbedingt deutlich verschieden waren. Die Isoflavonaglyca Daidzein und Glycitein konnten in keiner der Sorten detektiert werden, und Genistein war in allen Sorten nur in sehr geringen Mengen nachweisbar. Die bisherigen Analysen erlauben keine Aussage zu einer sortenspezifischen Ausbildung des Isoflavonprofils in den reifen Samen. Ebenso ergaben die vergleichenden Untersuchungen keine Hinweise auf eine mögliche Korrelation zwischen Proteingehalt und Isoflavonproduktion. In Bezug auf Organspezifität erwies sich der Isoflavongehalt in Samen als am höchsten, gefolgt von Wurzeln mit mittlerem Isoflavongehalt und geringem Gehalt in oberirdischen Teilen jüngerer Pflanzen. Diese Verteilung könnte in Zusammenhang mit der Bedeutung der Isoflavone im Nodulationsprozess stehen. Für die Beurteilung der Qualität von Sojabohnensamen in Bezug auf Primärstoffe erwies sich lediglich die Sortenwahl

als wesentlicher Faktor. Die anderen untersuchten Faktoren ließen jedenfalls keinen Einfluss auf die Produktion von Primär- und Sekundärstoffen erkennen.

Abstract

The aim of this study was to gain a better understanding of the complex relationships between culture variety and different factors such as soil conditions, cultivation area and climatic conditions, by analyzing their influence on production of primary and secondary metabolites of *Glycine max*. Therefore, a comparative analysis of oil-, protein- and isoflavone content as well as determination of weight (thousand seeds) was carried out. The soybean seeds were cultivated in Burgenland. Analysis of protein- and oil content was conducted by near- infrared spectroscopy. To determine the weight of thousand seeds, the seeds were both, counted and weighted. A comparative analysis of the influencing factors variety, cultivation area and cultural management was done by use of the statistical program SAS. The selection of culture variety was highly significant regarding oil content and seed weight. The weight of thousand seeds ranged from 170 g to 213 g. The values of oil- and protein content of different varieties were in the range of 196 – 216,3 g/kg and 406,8 – 414,3 g/kg, respectively. The quantitative and qualitative analysis of isoflavones was performed by HPLC. In mature seeds, the glycosides daidzin and genistin dominated quantitatively, but their quantities were not identical in the analyzed varieties. Only small amounts of the aglycone genistein were present in all varieties, whereas the isoflavon aglycones daidzein and glycitein could not be detected. The analysis performed does not allow a clear statement about variety-specific formation of isoflavone profiles in mature seeds. On basis of comparative analyses, no correlation was obvious between protein content and isoflavone production. Concerning the organ-specificity of isoflavone accumulation, highest amounts of isoflavones were found in mature seeds, followed by roots and aerial parts of younger plants. This distribution pattern may correlate to the role of these compounds in the nodulation process. Concerning assessment of quality of seeds in terms of primary metabolites, only selection of culture variety showed relevant significance. The other analyzed

factors could not be shown to influence production of primary and secondary metabolites in the seeds.

10. Anhang

Proben Nr.	Sorte	TKG (g)	Protein (g/kg Tg)	Öl (g/kg Tg)	Knöllchen- besatz*	Boden** art	Zwischen- frucht	Vorfrucht	Ort
1	Kent	178	393,6	206,2	1	sL	keine	Mais	D. kaltenbrunn
2	Kent	159	370,0	231,0	1	sL	keine	Mais	D. kaltenbrunn
3	Kent	210	413,9	199,5	2	sL	keine	Mais	D. kaltenbrunn
4	Kent	213	421,3	195,5	2	sL	keine	Mais	D. kaltenbrunn
5	Kent	201	417,1	203,5	1	sL	keine	Mais	D. kaltenbrunn
7	Cordoba	201	415,8	194,8	2	sL	keine	Mais	Limbach
8	Cordoba	160	390,1	204,6	1	sL	keine	Mais	Limbach
9	Cordoba	232	418,5	192,3	2	sL	keine	Mais	Limbach
10	Cordoba	214	429,6	180,0	2	sL	keine	Mais	Limbach
11	Cordoba	227	435,8	185,0	2	sL	keine	Mais	Limbach
12	Cordoba	234	431,4	176,3	2	sL	keine	Mais	Limbach
13	Cordoba	201	347,0	222,1	2	sL	keine	Mais	Limbach
14	Cordoba	204	379,9	197,8	2	sL	keine	Mais	Limbach
15	Cordoba	205	388,3	202,5	2	sL	keine	Mais	Limbach
16	Cordoba	196	430,5	179,5	1	sL	keine	Mais	Limbach
17	Cordoba	219	411,0	199,7	2	LT	keine	Mais	Limbach
18	Cardiff	198	426,7	195,2	1	sL	keine	Mais	D. kaltenbrunn
19	Cardiff	186	419,1	192,4	1	sL	keine	Mais	D. kaltenbrunn
20	Cardiff	181	416,0	198,7	1	k.A.	keine	Mais	D. kaltenbrunn
21	Cardiff	200	422,6	196,0	1	sL	keine	Mais	D. kaltenbrunn
22	Cardiff	197	417,9	200,9	1	sL	keine	Mais	D. kaltenbrunn
23	Kent	176	397,9	216,1	1	sL	keine	Mais	D. kaltenbrunn
24	Kent	184	407,2	214,4	2	sL	keine	Mais	D. kaltenbrunn
25	Kent	201	421,0	201,6	2	sL	keine	Mais	D. kaltenbrunn
26	Kent	178	412,9	201,1	1	L	keine	Mais	D. kaltenbrunn
27	Kent	201	428,4	206,3	2	L	keine	Mais	D. kaltenbrunn
28	Kent	178	411,3	210,1	1	k.A.	keine	Mais	D. kaltenbrunn
29	Kent	185	410,9	203,5	2	sL	keine	Mais	D. kaltenbrunn

30	Kent	183	405,7	199,6	2	LT	keine	Mais	D. Kaltenbrunn
31	Kent	210	411,5	197,8	3	L / sL	keine	Mais	D. Kaltenbrunn
32	Kent	161	396,8	205,7	2	L	keine	Mais	D. Kaltenbrunn
33	Kent	167	388,1	218,5	1	L	keine	Mais/Weizen	D. Kaltenbrunn
34	Kent	197	422,2	190,8	1	sL	keine	Mais/Weizen	Henndorf
35	Kent	187	417,7	191,3	1	L	keine	Mais/Weizen	Henndorf
36	Kent	175	406,7	202,3	2	L	keine	Mais/Weizen	Henndorf
37	Kent	203	429,6	194,5	2	sL	keine	Mais/Weizen	Henndorf
38	Kent	188	422,9	201,1	2	sL	keine	Mais/Weizen	Henndorf
39	Kent	223	432,8	194,7	1	k.A.	keine	Soja/Mais	Loipersdorf
40	Kent	209	430,5	207,2	3	k.A.	keine	Soja/Mais	Loipersdorf
51	Kent	166	377,0	215,3	2	sL	keine	Mais	Rax
52	Kent	159	361,2	229,3	2	sL	keine	Mais	Rax
53	Kent	177	372,0	215,7	2	sL	keine	Mais	Henndorf
54	Kent	166	362,2	221,3	2	sL	keine	Mais	Henndorf
55	Kent	157	356,2	239,1	2	LT	keine	Mais	Rax
56	Kent	200	409,5	215,1	3	LT/sL	keine	Mais	Rax
57	Kent	176	421,3	192,0	2	L	keine	Mais	Jennersdorf
58	Kent	176	419,1	190,7	2	L	keine	Mais	Jennersdorf
59	Kent	192	419,9	204,6	3	L	keine	Mais	Jennersdorf
60	Kent	195	411,4	201,0	3	L	keine	Mais	Jennersdorf
61	Kent	193	408,4	200,3	3	L	keine	Mais	Jennersdorf
62	Kent	190	415,7	193,3	2	L	keine	Mais	Jennersdorf
63	Kent	186	412,5	207,1	2	L	keine	Mais	Jennersdorf
64	Kent	181	408,9	209,1	2	k.A.	keine	Mais	Jennersdorf
65	Kent	190	421,4	201,4	3	sL	keine	Mais	Jennersdorf
66	Kent	172	408,6	206,8	3	sL	keine	Mais	Jennersdorf
67	Kent	178	418,6	192,9	3	k.A.	keine	Mais	Jennersdorf
68	Kent	135	403,1	206,7	2	sL	keine	Wintergerste	Rosendorf
69	Kent	141	411,2	201,7	1	sL/L	keine	Wintergerste	Rosendorf
70	Kent	184	411,7	205,9	1	sL/L	keine	Wintergerste	Rosendorf
71	Kent	191	414,3	205,5	1	sL/L	keine	Wintergerste	Rosendorf
72	Kent	172	396,9	210,6	1	sL	keine	Wintergerste	Rosendorf

73	Kent	156	406,1	207,6	1	sL	keine	Wintergerste	Rosendorf
74	Kent	182	406,6	202,5	2	sL	keine	Wintergerste	Krobotek
75	Kent	201	421,0	196,5	2	sL	keine	Wintergerste	Rosendorf
76	Kent	174	385,4	225,7	2	L	keine	Wintergerste	Krobotek
77	Kent	172	372,3	231,0	2	sL/ sLS	keine		Grieselstein
78	Kent	167	363,7	226,9	1	sL	keine		Grieselstein
79	Kent	186	397,7	213,4	3	sL/ sLS	keine		Grieselstein
80	Kent	196	416,8	214,4	1	sL/ sLS	keine		Grieselstein
81	Idefix	162	385,2	232,4	1	sL	keine		Tauka
82	Kent	187	425,0	202,8	1	sL/ sLS	keine		Tauka
83	Idefix	180	412,1	206,7	1	IS	keine		Tauka
84	Idefix	173	417,5	207,6	2	sL/ sLS	keine		Tauka
85	Idefix	159	401,2	215,1	1	sL/ sLS	keine		Tauka
86	Idefix	159	395,3	207,5	1	IS	keine		Tauka
87	Cardiff	214	421,7	195,2	2	sL/ sLS	Senf	Weizen	Oberrabnitz
88	Cardiff	201	419,2	191,2	1	sL/ sLS	Senf	Weizen	Oberrabnitz
92	Essor	201	370,9	238,1	2	LT	Phac./Buchw.	Winterweizen	Unterpullendorf
93	Essor	199	383,4	237,0	1	LT	Phac./Buchw.	Winterweizen	Unterpullendorf
94	Essor	206	410,1	213,2	2	k.A.	Phac./Buchw.	Winterweizen	Unterpullendorf
95	Kent	185	418,2	216,3	1	k.A.	Erbse	Winterweizen	Großwarasdorf
96	Kent	183	423,8	205,1	1	k.A.	Erbse	Winterweizen	Großwarasdorf
98	Essor	218	420,1	210,9	1	LT	keine	Winterweizen	Raiding
99	Essor	230	422,9	210,4	1	LT	keine	Winterweizen	Raiding
100	Essor	210	416,4	204,3	1	k.A.	keine	Winterweizen	Großwarasdorf
101	Essor	211	414,8	206,1	1	k.A.	keine	Winterweizen	Großwarasdorf
102	Essor	190	411,0	217,4	1	IS	keine	Winterweizen	Großwarasdorf
103	Essor	226	411,0	218,6	1	k.A.	keine	Winterweizen	Großwarasdorf
104	Cardiff	178	387,8	214,0	1	sL-L	keine	Brache	Oberpullendorf
105	Cardiff	181	379,6	224,8	1	sL-L	keine	Brache	Oberpullendorf
106	Cardiff	199	384,0	214,6	1	sL-L	keine	Brache	Oberpullendorf
107	Cardiff	177	392,5	224,8	1	sL-L	keine	Brache	Oberpullendorf
108	Cardiff	188	389,5	209,1	1	sL-L	keine	Brache	Oberpullendorf
109	Cardiff	192	397,4	195,8	1	sL-L	keine	Brache	Oberpullendorf

110	Cardiff	196	415,5	209,7	1	sL-L	keine	Brache	Oberpullendorf
111	Cardiff	169	418,2	208,2	2	LT	Senf	Winterweizen	Kroat. Gersdorf
112	Cardiff	157	419,9	211,5	2	LT	Senf	Winterweizen	Kroat. Gersdorf
113	Kent	173	420,0	187,8	1	LT	Senf	Winterweizen	Kroat. Gersdorf
114	Gallec	185	419,4	190,1	1	L	Senf	Gas-Gerste	Kroat. Gersdorf
115	Gallec	213	435,6	191,4	1	L	Senf	Gas-Gerste	Kroat. Gersdorf
119	Kent	153	408,7	207,8	1	L	Senf	Sommergerste	Kroat. Gersdorf
120	Cardiff	148	395,2	227,6	1	L	Senf	Winterweizen	Kroat. Gersdorf
121	Cardiff	161	405,6	219,7	2	L	Senf	Winterweizen	Kroat. Gersdorf
122	Kent	160	411,7	205,6	1	L	Senf	Winterweizen	Kroat. Gersdorf
123	Cardiff	220	421,4	208,8	1	sL	Öpul	Weizen	Raiding
124	Cardiff	215	435,5	193,4	1	sL	Öpul	Weizen	Raiding
125	Cardiff	207	434,3	204,3	1	LT	Öpul	Weizen	Raiding
126	Cardiff	184	405,1	211,9	1	LT	Öpul	Weizen	Raiding
127	Cardiff	198	427,8	200,1	1	k.A.	Öpul	Weizen	Raiding
128	Cardiff	186	419,6	206,8	1	k.A.	Öpul	Weizen	Raiding
129	Essor	186	382,6	228,2	1	sL	Erbse	keine	Raiding
130	Cardiff	180	383,8	223,6	1	sL	Erbse	keine	Raiding
131	Cardiff	225	430,8	195,1	1	sL	Erbse	keine	Raiding
132	Cardiff	223	442,1	200,5	1	sL	Erbse	keine	Raiding
133	Kent	197	445	199	1	k.A.	k.A.	Roggen/Weizen	Raiding
MW		189	408	206					
min		135	347	176					
max		234	445	239					

*Boniturskala Knöllchen: 0-10 = 1; 10-20 = 2; 20-30 = 3

**Bodenarten: vorherrschend im Oberboden

L / sL: Lehm, sandiger Lehm

IS: lehmiger Sand

LT: lehmiger Ton

sL, sLS: sandiger Lehm, stark lehmiger Sand

Abkürzungen: k.A. keine Angabe; Phac. -
Phacelia; Buchw. - Buchweizen

Probe	Sorte	Einwaage (g)	Gesamt- volumen(ml)	Daidzin A [mAU*s]	µg/g Tg.	Glycitin A [mAU*s]	µg/g Tg.	Genistin A [mAU*s]	µg/g Tg.	Genistein A [mAU*s]	µg/g Tg.
Nr.											
2	Kent	0,201	5	691,8	911,4	59,9	96,9	966,9	1091,5	11,1	7,2
27	Kent	0,2025	5	824,1	1081,8	86,4	149,6	1081,6	1215,3	11,7	7,6
55	Kent	0,2003	5	1059,4	1412,0	181,7	346,4	1383,5	1579,9	17,8	12,2
39	Kent	0,2007	5	809,6	1071,9	82,9	143,9	1160,2	1317,5	11,0	7,2
119	Kent	0,2033	5	1119,6	1471,5	134,1	245,3	1547,0	1743,8	17,8	12,0
113	Kent	0,2028	5	836,1	1096,2	85,4	147,5	1538,5	1738,4	11,2	7,2
95	Kent	0,2004	5	944,6	1256,1	85,5	149,4	1283,8	1463,2	11,6	7,7
133	Kent	0,2011	5	1331,3	1772,9	131,1	241,8	1881,5	2150,5	11,9	7,8
133 II	Kent	0,2024	5	1276,8	1688,6	125,1	228,2	1792,9	2034,7	13,1	8,6
133 III	Kent	0,2027	5	1460,4	1931,6	145,8	269,7	2061,7	2340,6	13,6	9,0
103	Essor	0,2037	5	970,5	1270,2	86,8	149,6	1580,3	1778,6	10,2	6,5
103 II	Essor	0,2017	5	722,3	949,2	56,9	90,4	1199,8	1356,7	n.d.	n.d.
103 III	Essor	0,2026	5	875,5	1150,0	79,4	135,4	1448,0	1636,0	10,0	6,4
99	Essor	0,2016	5	629,8	825,4	53,3	83,1	971,9	1094,0	11,5	7,5
92	Essor	0,202	5	975,2	1287,2	112,5	202,9	1699,8	1931,4	12,8	8,4
94	Essor	0,2044	5	875,9	1140,4	77,3	130,0	1403,3	1570,7	n.d.	n.d.
1A	Essor	0,1997	5	709,7	941,6	86,7	152,4	1310,1	1499,0	10,6	7,0
20	Cardiff	0,2007	5	615,4	809,6	76,2	130,3	1050,5	1190,2	n.d.	n.d.
18	Cardiff	0,2022	5	622,2	812,7	70,6	117,9	1094,3	1231,7	n.d.	n.d.
105	Cardiff	0,2036	5	1066,2	1398,2	108,4	193,1	2487,4	2817,4	28,0	19,3
105 g.t.	Cardiff	0,2009	5	639,9	841,9	34,7	45,5	1472,5	1678,4	59,3	42,5
132	Cardiff	0,2011	5	751,3	991,1	65,5	108,1	1369,2	1557,0	16,3	11,1
132 g.t.	Cardiff	0,2056	5	679,1	874,4	27,1	29,3	1209,8	1342,3	40,1	27,8
2A	Cardiff	0,2008	5	817,8	1082,4	105,6	190,2	1386,0	1578,8	11,8	7,7
13	Cordoba	0,2	5	765,0	1015,2	59,6	96,7	1057,1	1202,0	14,1	9,4
13 g.t.	Cordoba	0,2009	5	946,0	1254,9	69,4	116,3	1451,3	1653,7	55,0	39,3
11	Cordoba	0,2	5	345,2	446,2	32,4	40,9	416,5	455,8	n.d.	n.d.

114	Gallec	0,2017	5	532,1	693,7	48,2	72,7	1442,1	1636,5	13,0	8,6
115	Gallec	0,2	5	768,3	1019,7	91,9	162,8	1931,0	2220,0	13,1	8,7
81	Idefix	0,2027	5	1014,4	1335,2	117,5	212,4	1448,0	1635,2	12,7	8,3
84	Idefix	0,2016	5	827,7	1091,5	100,2	178,5	1290,2	1461,8	9,5	6,1
11A	Brillmayer	0,2036	5	329,3	417,2	54,8	85,3	577,6	632,1	18,3	12,3
12A	Brillmayer	0,2027	5	834,7	1094,8	150,4	278,9	1190,5	1339,3	26,8	18,5
13A	Brillmayer	0,2	5	334,1	431,2	42,4	61,5	513,1	568,3	22,6	15,7
14A	Brillmayer	0,2059	5	526,3	671,8	104,0	182,3	715,4	781,0	29,4	20,1
15A	Apache	0,202	5	751,9	987,5	202,0	384,6	1095,9	1234,8	38,0	26,7
	Alma Ata	0,2025	5	882,0	1159,3	47,8	71,7	1522,0	1722,0	12,5	8,2
	Lotus	0,2	5	397,9	517,7	63,7	105,1	591,4	659,6	n.d.	n.d.
				MW	1027,7	MW	144,5	MW	1421,9	MW	13,0
				min	417,2	min	14,8	min	455,8	min	5,6
				max	1931,6	max	384,6	max	2817,4	max	42,5
Abkürzungen: A - Fläche; Tg. - Trockengewicht; MW - Mittelwert											

11. Danksagung

Ich danke meinen Eltern, die mir mein Studium erst ermöglicht haben. Gerda, die mir ihren grünen Daumen und die Liebe zu allen Pflanzen vererbt hat. Walter, der nie aufgehört hat an mich zu glauben.

Ich möchte mich bei meiner Schwester Andrea für ihre Hilfe, die guten Ratschläge und ihre unerschöpfliche Geduld bedanken.

Weiters gilt mein Dank an Univ. Prof. Dr. Karin Vetschera, für die Ermöglichung der Sekundärstoffanalysen und geduldige Unterstützung bei der Schreibearbeit.

Ich bedanke mich herzlichst bei Jo, der mir im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Bei Univ. Prof. Dr. Johann Vollmann möchte ich mich für seine Hilfe, seine Freundlichkeit, die vielen guten Tips und die lustigen Hot-Tofu-Essen bedanken.

Roman Tumpold möchte ich für seine Hilfe bei den Primärstoffanalysen danken.

Ich möchte mich auch bei allen meinen Freunden und Kollegen am Institut bedanken, Bibi, Sigi, Tshering, Chilli, Celine, Andi, Markus, Sonja, Stefan, und Adriane, für die vielen lustigen Kaffeepausen, die gute Laboratmosphäre, und Hilfe und Anregungen bei allen aufkommenden Fragen.

Bernd Draba danke ich für seine Hilfe bei der Ernte.

Ich bedanke mich bei Dagmar, fürs Ultimatum; bei Gregor für Tips und Tricks; bei Nati für ihr immer offenes Ohr, bei Rubi und Benni für Asyl, Spaß und das Gefühl Willkommen zu sein.

Der Firma Mona Naturprodukte GmbH danke ich für die Ausschreibung und finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt Franz, für die Erntehilfe und die vielen Ideen und Anregungen.

12. Curriculum Vitae

Personal information

First name / Surname(s)	Scheffknecht Christine Maria		
Address	Rotkreuzstrasse 26, A-6890 Lustenau, Austria		
Telephone(s)	+43 (0) 5577/ 853 73	Mobile:	+43 (0) 680/ 23 47 554
E-mail	sonneundstine@yahoo.com		
Nationality	Austrian		
Date of birth	17.05.1982		
Gender	Female		

Work experience

Dates	June 2007 – September 2009		
Occupation or position held	Sideline		
Main activities and responsibilities	Plant care and gardening		
Name and address of employer	Renate Zechmeister, Bahnhofstrasse 3, A- 2020 Hollabrunn, Austria		
Type of business or sector	Private garden		
Dates	July 2006 – September 2006		
Occupation or position held	Internship		
Main activities and responsibilities	Classification of herbarium specimens in collection and database, new organisation of the zoological collection, amplification of botanical distribution maps, organisation and realisation of didactic- and experience days for children, online-research, concept setup		
Name and address of employer	INATURA, Erlebnis Naturschau, Jahngasse 9, A- 6850 Dornbirn, Austria		
Type of business or sector	Museum, nature theme parc, children activities		
Dates	July 2005 – September 2005		

Occupation or position held	Holiday job
Main activities and responsibilities	manual work, sorting of found pieces
Name and address of employer	VIAS Vienna Institute for Archaeological Science, Franz-Kleingasse 1, A- 1190 Wien, Austria
Type of business or sector	Archaeological excavation site
Education and training	
Dates	October 2002 – to October 2010
Title of qualification awarded	Mag. rer. nat. (Master of Natural Sciences)
Principal subjects/occupational skills covered	Botany - Phytochemistry Diploma thesis: Comparative analysis of selected primary- and secondary metabolites of different varieties from the species <i>Glycine max</i> (in German)
Name and type of organisation providing education and training	Universität Wien (University of Vienna), Austria
Level in national or international classification	ISCED 5
Dates	September 1997 – September 2002
Title of qualification awarded	Higher School Certificate
Principal subjects/occupational skills covered	Biology Transverse flute
Name and type of organisation providing education and training	BRG – Bundesoberstufenrealgymnasium Dornbirn Schoren (academic high school), Austria
Level in national or international classification	ISCED 3
Personal skills and competences	
Mother tongue(s)	German

Other language(s)

Self-assessment

European level (*)

English

Spanish

French

Understanding				Speaking				Writing	
Listening		Reading		Spoken interaction		Spoken production			
C2	Proficient User	C2	Proficient User	C1	Proficient User	C1	Proficient User	C2	Proficient User
B2	Independent User	B1	Independent User	B2	Independent User	B2	Independent User	B1	Independent User
A2	Basic User	B1	Independent User	A2	Basic User	A2	Basic User	A2	Basic User

(*) Common European Framework of Reference for Languages