

## Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von Weizenanteilen in Dinkelprodukten

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Hans-Dieter-Belitz-Institut für Mehl- und Eiweißforschung (hdbi), Freising-Weihenstephan Prof. Dr. Dr. P. Schieberle/Prof. Dr. P. Köhler
<b>Forschungsstelle II:</b>	Universität Hamburg Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie Abt. Lebensmittelchemie Prof. Dr. M. Fischer/Dr. A. Paschke/Dr. I. Haase
<b>Industriegruppen:</b>	Verband Deutscher Mühlen e.V., Bonn Verein der Förderer des Hans-Dieter-Belitz-Institutes für Mehl- und Eiweißforschung e.V. (hdbi), Freising-Weihenstephan
	Projektkoordinator: K. Schmitz, Karl Künkele zur Schapfenmühle GmbH & Co. KG, Ulm
<b>Laufzeit:</b>	2008 – 2010
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 347.600,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Aus Dinkel hergestellte Produkte, insbesondere Backwaren, erfreuen sich beim Verbraucher zunehmender Beliebtheit. Als Gründe werden Schmackhaftigkeit, gute Bekömmlichkeit und eine bessere Verträglichkeit bei Weizenallergie genannt. Dementsprechend werden Dinkelprodukte vom Handel ausgelobt und werden im Vergleich zu gleichartigen Weizen- und Roggenprodukten zu teilweise deutlich höheren Preisen verkauft. In diesem Zusammenhang stellt sich für die verarbeitenden Betriebe und die Verbraucher die Frage, mit welchem Weizenanteil in Dinkelprodukten, hervorgerufen durch Zuzusatzung, zu rechnen ist. Der Wissensstand zur Beantwortung dieser Frage ist jedoch gering und anerkannte Methoden zur quantitativen Bestimmung von Weizenanteilen in Dinkel fehlten bislang.

Hersteller von Dinkelprodukten sind aus Gründen der Qualitätssicherung und des Verbraucherschutzes an schnellen und in der Routine anwendbaren Methoden interessiert. Nach den Leitsätzen für Brot und Kleingebäck dürfen

Dinkelbrote und -brötchen maximal 10 % andere Getreidearten enthalten.

Ziel des Forschungsvorhabens war es, Methoden zu entwickeln, die die quantitative Bestimmung von Weizenanteilen in Dinkelprodukten auf Protein- und DNA-Basis erlauben. Die Methoden beinhalten im ersten Schritt die Entwicklung einer zuverlässigen Extraktionsmethode von DNA bzw. Proteinen aus Weizen- und Dinkelmehlen. Identifizierte weizentypische Proteine bzw. DNA-Abschnitte sollten genutzt werden, um eine Weizenquantifizierung auf Proteinbasis (ELISA), Peptidbasis (LC-MS) und DNA-Basis (PCR) zu ermöglichen. Die erarbeiteten Methoden waren zu validieren und an Modellmischungen und Dinkelprodukten zu erproben.

### Forschungsergebnis:

Als Probenmaterial wurden über 50 Dinkelsorten, 10 Weizensorten, 3 Hartweizensorten sowie Emmer- und Einkornproben in die Untersuchungen einbezogen. Weiterhin dienten 30

verschiedene Handelsproben von Dinkelmehlen und Dinkel-Backmischungen als Untersuchungsmaterial.

Mittels einer Extraktion/HPLC-Methode wurden die Proteine von 15 Weizen- und 55 Dinkelsorten sukzessive extrahiert und quantifiziert (mod. Osborne-Fraktionierung). Beide Getreidearten enthielten annähernd die gleichen Mengen an Albuminen und Globulinen, während der Anteil an Gliadinen bei Dinkel deutlich höher war als bei Weizen. Bei der Gluteninfraktion war das Verhältnis umgekehrt. Das daraus berechnete Gliadin/Glutenin-Verhältnis lag bei Dinkel deutlich höher als bei Weizen. Anhand der HPLC-Muster der reduzierten Gliadinfraktion wurden die 55 Dinkelsorten in fünf Gruppen eingeteilt, wobei Gruppe I dinkeltypische und die Gruppe V weizenähnliche Dinkelsorten enthielt. Die Einteilung erfolgte anhand von Markern, die nur in Dinkel und nicht in Weizen vorkamen. Während die Gruppen I und II jeweils drei dinkeltypische Marker zeigten, waren bei den Gruppen III und IV nur noch zwei Marker erkennbar, und bei den Dinkelsorten der Gruppe V lag nur noch ein Marker vor.

Als weizentypische Proteine wurden mittels RP-HPLC und SDS-PAGE die Fraktion der  $\omega$ b-Gliadine identifiziert (D-Typ LMW-Gluteninuntereinheiten). Diese weisen aufgrund einer Punktmutation im Gegensatz zu den strukturell sehr ähnlichen  $\omega$ 5-Gliadinen einen Cysteinrest auf und kommen daher in der Glutenin-Fraktion vor. Cysteinpeptide aus den  $\omega$ b-Gliadinen von Weizen wurden spezifisch mittels kovalenter Chromatographie an Thiopropylsepharose angereichert und mittels HPLC isoliert. Ihre Aminosäuresequenz wurde durch Edman-Abbau und LC/MS/MS aufgeklärt. Die Cysteinpeptide dienten als Grundlage zur Entwicklung einer LC/MS/MS-Stabilisotopenverdünnungsanalyse zum Nachweis von Weizenanteilen in Dinkelprodukten. Die Methode wurde mit Weizen-/Dinkel-Mischungen kalibriert und ermöglichte die quantitative Bestimmung von Weizenbeimischungen in handelsüblichen Dinkelmehlen bis zu einem Weizenanteil von unter 1 %.

Die Extraktion der DNA erfolgte nach acht verschiedenen Protokollen. Die aus diesen Wegen erhaltenen DNA-Isolate wurden mit photometrischen, fluorimetrischen und elektrophoretischen Methoden charakterisiert, die Amplifikation der DNA überprüft und die Methoden anhand der Ergebnisse verglichen. Die Methode mit den bes-

ten Ergebnissen wurde als Standardextraktionsmethode etabliert.

Die Entwicklung einer Weizen-spezifischen Real-time-PCR (Taqman-Sonden-System) ermöglichte Aussagen über den Weizengehalt in Dinkelmehlen. Optimierungen der PCR-Methode wurden durchgeführt. Nach Optimierung war ein Weizengehalt von bis unter 1 % sicher nachweisbar. Validierungen wurden sowohl mit dotierten Dinkelmehlen als auch mit Proben aus dem Handel durchgeführt. Damit ist die entwickelte Methode für die Reinheitskontrolle von Dinkelmehlen geeignet.

Bei der Entwicklung einer PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)-CE (capillary electrophoresis)-Methode konnten sowohl der auftretende PCR-Bias als auch bei der Reaktion entstehende Heteroduplexe näher untersucht werden. Die Einbeziehung beider Faktoren zeigte sich für die quantitative Auswertung als unerlässlich. Unter Berücksichtigung beider Faktoren kann die PCR-RFLP aber ebenfalls für den Nachweis und eine Abschätzung von Weizenanteilen eingesetzt werden.

Nach Extraktion der Proteine erfolgte die Analyse mittels 2D-Gelelektrophorese. Es wurde ein Bereich der Gele identifiziert, auf dem fast ausschließlich Proteinspots des Weizens sichtbar waren. Mittels MALDI-ToF-Analysen wurden die Proteinspots den Serpinen zugeordnet. Serpine kommen jedoch auch in Dinkel vor. Die Auftrennung dieser überwiegend gleichen Proteine mittels 2D-Elektrophorese ist aller Wahrscheinlichkeit auf Isoformen oder posttranslationale Modifikationen zurückzuführen, die sowohl die Molekülmasse als auch die Gesamtladung des Proteins verändern können. Eine Entwicklung eines Weizen-spezifischen ELISAs war anhand dieses Ergebnisses nicht möglich, könnte aber anhand der identifizierten Cysteinpeptide aus den  $\omega$ b-Gliadinen realisiert werden.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Mit einem Verbrauch von mehr als 80 kg pro Kopf und Jahr gehören Brot und Kleingebäck zu den wichtigsten Grundnahrungsmitteln in Deutschland. Hergestellt werden diese Produkte ganz überwiegend aus Weizen. Trotz seiner backtechnisch geringeren Qualität steigt in den letzten Jahren jedoch der Anteil an Dinkel als Rohstoff für Backwaren. Die Anbaufläche in Deutschland wird auf 30.000 ha geschätzt. Din-



kelprodukte erzielen im Vergleich zu Produkten aus Weichweizen einen deutlich höheren Preis, von dem sowohl die Mühlen als auch das Backgewerbe als Verarbeiter von Dinkel profitieren. Methoden zum Nachweis von Weizenanteilen in Dinkel sind daher einerseits im Interesse des Verbrauchers, da dieser vor Täuschung geschützt wird. Andererseits bieten solche Methoden den Mühlen und der Backindustrie die Möglichkeit, die Qualität ihrer Rohstoffe zu überprüfen.

Die Backwarenindustrie in Deutschland wird von kleinen und mittleren Betrieben dominiert. Den mehr als 15.000 handwerklichen Bäckereien stehen etwa 50 mittelständische und 4 große Betriebe gegenüber. Mit ihren mehr als 130.000 Beschäftigten setzt die Backbranche jährlich etwa 15 Mrd. € um. Insbesondere in Süddeutschland spielen Backwaren aus Dinkel eine wichtige Rolle und werden fast ausschließlich von handwerklichen Bäckereien, d. h. kleinen und mittleren Unternehmen, hergestellt. Von den Ergebnissen des Projektes werden daher insbesondere solche Betriebe profitieren, die Dinkelbackwaren in ihrem Sortiment haben.

Im Verband Deutscher Mühlen sind ungefähr 650 Unternehmen organisiert. Davon vermahlen 318 Betriebe mehr als 500 t pro Jahr, der Rest von mehr als 330 Betrieben liegt in der Vermahlungsmenge darunter und ist damit mittel- und kleinständisch. Im Wirtschaftsjahr 2008/2009 wurde mit etwa 6.000 Beschäftigten ein Umsatz von knapp 2 Mrd. € erwirtschaftet. Auch in dieser Branche werden insbesondere kleine und mittlere Betriebe, die Spezialprodukte herstellen, von den Ergebnissen profitieren.

Weizenanteilen in Dinkelprodukten. GIT Labor 9, 596-598 (2011).

5. Koenig, A., Wieser, H. und Koehler, P.: Analytical discrimination between wheat and spelt by means of typical proteins and peptides. *Cer. Technol.* 65, 40-47 (2011).
6. Mayer, F., Haase, I., Raschdorf, L., Paschke-Kratzin, A. und Fischer, M.: Unterscheidung von Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Dinkel (*Triticum spelta* L.) über das Fettsäuremuster. *Getreidetechnol.* 3, 100-105 (2011).
7. Koenig, A., Wieser, H. und Koehler, P.: Distinguishing wheat and spelt using typical protein markers. In: Proc. 10<sup>th</sup> Intern. Gluten Work. Paris (G. Branlard, ed.) Verlag INRA (ISBN 978-2-738012-81-4, 142-145 (2010).
8. Haase, I., Mayer, F. und Fischer, M.: How much wheat is in spelt flour? *brot+backwaren* 4, 8-9 (2010) resp. *baking+bisquits* 3, 8-10 (2010).
9. Koenig, A., Wieser, H. und Köhler, P.: Distinction of spelt and wheat by means of specific proteins. *Cer. Foods Wrld. Suppl.* 55 (4), A 55 (2010).
10. König, A., Wieser, H. und Köhler, P.: Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von Weizenanteilen in Dinkelprodukten. *Lebensmittelchem.* 64, 161-162 (2010).
11. König, A., Wieser, H. und Köhler, P.: Unterscheidung von Weizen und Dinkel anhand typischer Proteinmarker. *Lebensmittelchem.* 63, 142 (2009).
12. König, A., Wieser, H. und Köhler, P.: Distinguishing wheat and spelt using typical protein markers. *Gluten proteins 2009*, 142-145 (2009).

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2010.
2. Mayer, F., Haase, I., Graubner, A., Heising, F., Paschke-Kratzin, A. und Fischer, M.: The use of polymorphisms in the  $\gamma$ -gliadin gene of spelt and wheat as tool for authenticity control. *J. Agric. Food Chem.* 60, 1350-1357 (2012).
3. König, A., Wieser, H. und Köhler, P.: Unterscheidung von Weizen und Dinkel anhand typischer Proteinmarker. *Lebensmittelchem.* 65, 101 (2011).
4. König, A., Wozny, K., Schuster, A., Wieser, H. und Köhler, P.: Wie viel Weizen enthält Dinkel? Untersuchungen zum Nachweis von

#### Weiteres Informationsmaterial:

Hans-Dieter-Belitz-Institut für Mehl- und Eiweißforschung e.V. (hdbi)  
Lise-Meitner-Straße 34, 85354 Freising-Weiherstephan  
Tel.: 08161/71-2932, Fax: 08161/71-2970  
E-Mail: peter.schieberle@lrz.tum.de

Universität Hamburg  
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie  
Abt. Lebensmittelchemie  
Grindelallee 117, 20146 Hamburg  
Tel.: 040/42838-4357, Fax: 040/42838-4342  
E-Mail: markus.fischer@chemie.uni-hamburg.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150  
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via:

