

Erkennung technologischer und allergener Eigenschaften an Hand von Proteinspektren in Getreide

Recognition of technological and allergenic properties in spectra of cereal proteins

Atousa Motie^{1*} und Manfred Werteker¹

Abstract

Gliadins and glutenins of 162 wheat flour samples from VCU trials of the harvest 2008 and 144 from 2009 were investigated by HPLC. 54 protein fractions were analysed quantitatively and related to loaf volume, dough stability, extensogram data, Zeleny sedimentation value, swelling and falling number. Using 161 barley samples the method was extended to the calculation of technological parameters of malt. In barley albumins, globulins, hordeins and hordenins - at all 98 peaks - were brought into correlation with extract yield, extract difference, diastatic power, soluble nitrogen and Kolbach number. The method of multivariate data analysis and principal-component-regression was applied for the creation of mathematical models for the prediction of the above mentioned technological parameters from protein spectra. The method was shown to be suitable for the prediction of selected technological parameters. Positive and negative influences of protein fractions on technological parameters were estimated by B coefficients. For the sedimentation value, dough energy, and loaf volume good correlations in the range of $R^2=0.7$ to 0.8 were obtained between calculated and analysed results. The identification of T-cell stimulating epitops from $\alpha 20$ -gliadine in HPLC-fractions of proteins by ELISA could be performed successfully in this project.

Keywords

Allergenic properties, cereals, *Hordeum vulgare*, HPLC, storage proteins, technological quality, *Triticum aestivum*

Einleitung

Ziel der Untersuchungen war die Entwicklung von auf den Ergebnissen von HPLC-Trennungen von Speicherproteinen beruhenden Methoden zur Analyse der technologischen und ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Getreide.

Der technologische Teil der Studie sollte vor allem dem Ziel einer Hilfestellung für den Züchtungsfortgang durch molekulare Marker dienen, wie dies bereits in zahlreichen Studien angedacht wurde (PENA et al. 2002). Bisher durchgeführte Studien über die Zusammenhänge zwischen Proteinspektren und Qualitätsparametern beruhten vor allem auf

elektrophoretischen Untersuchungen (BALDSHIEV et al. 1997, SAPIERSTEIN et al. 1998, MIR et al. 1999, AMMAR et al. 2000). Die elektrophoretischen Muster werden dabei nur qualitativ ausgewertet. Quantitative Untersuchungen über die vorhandene Menge einer Proteinfraction bzw. über das Verhältnis verschiedener Proteinkomponenten zueinander wurden bisher in weit geringerem Maße publiziert und beruhen meist auf der Anwendung chromatographischer Methoden (BURNOUF und BIETZ 1984). Der Beitrag einer quantitativen Auswertung zur Vorhersage von Qualitätseigenschaften und zur Aufklärung von Einflüssen bestimmter Proteine auf das technologische Verhalten von Getreide ist dem gemäß weit weniger erforscht. Neben der Zuverlässigkeit der Methode zur Vorhersage unterschiedlicher technologischer Qualitätskriterien waren vor allem Zusammenhänge zwischen dem Auftreten verschiedener Peaks in den Chromatogrammen und der verstärkten oder verminderten Ausprägung technologischer Merkmale zu finden und zu prüfen. Besonderes Interesse verdienen in diesem Zusammenhang immer wieder berichtete Widersprüche zwischen den Ergebnissen indirekter Qualitätsmerkmale und den Resultaten von Backversuchen (ROGERS et al. 2001).

Während die technologischen Untersuchungen, abgesehen von den angewandten statistischen Verfahren, auf wohl bekannten und im eigenen Labor erprobten und akkreditierten Methoden beruhten, wurde im Bereich der Untersuchung auf Glutenunverträglichkeit wissenschaftliches und experimentelles Neuland betreten. Zunächst zeigte sich, dass Test-Kits zur Identifizierung pathogener Epitope nicht verfügbar waren (SPAENIJ-DEKKING 2004, MITEA et al. 2008).

Die bis vor kurzem ausschließlich erhältlichen ELISA-Test-Kits beruhen auf monoklonalen Antikörpern gegen die Epitope QQQFP, QQQFP, LQPFP und QLPPF (SKERITT und HILL 1990). Wie Vergleiche mit einer Auswahl an hinsichtlich ihrer Pathogenität untersuchten Peptiden aus Gliadinfraktionen (WIESER und KÖHLER 2008) zeigten, sind die angeführten Epitope sowohl in pathogenen als auch in nicht pathogenen Peptiden in gleichem Maße vorhanden. Durch Anwendung eines gegen ein T-Zellen stimulierendes Peptid aus $\alpha 20$ -Gliadin spezifischen ELISA konnte eines der potentiell pathogenen Epitope mit der Aminosäuresequenz FRPQQPYP im Getreideproteom nachgewiesen und einzelnen Proteinfractionen zugeordnet werden.

¹ Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit, Spargelfeldstraße 191, A-1220 WIEN

* Ansprechpartner: Manfred WERTEKER, manfred.werteker@ages.at



Material und Methoden

Zur Untersuchung gelangten sämtliche im Rahmen der amtlichen Sortenwertprüfung zu Mahl- und Backversuchen herangezogene Weizenproben der Ernten 2008 und 2009. Insgesamt wurden aus der Ernte 2008 162 und aus der Ernte 2009 144 Weizenproben untersucht. Die Untersuchungen bezüglich der Brau- und Mälzungseignung der Gersten beruhten auf einer Auswertung von 161 Kleinmälzungsversuchen der Ernte 2009.

Die Proteinanalysen wurden nach WIESER et al. (1998) durchgeführt und umfassten die Auftrennung der Proteine mittels modifizierter Osborne-Fraktionierung in Albumine+Globuline, Gliadine und Glutenine und anschließende Untersuchung dieser Fraktionen durch RP-HPLC. Insgesamt wurden 54 Peaks der Proteintrennungen von Weizenproben und 98 Peaks aus den Gerstenchromatogrammen in die Untersuchungen mit einbezogen.

Die technologischen Eigenschaften wurden nach den entsprechenden ICC-Standards (International Association for Cereal Science and Technology, Wien) ermittelt. Die Mahl- und Backversuche wurden nach den Vorschriften des Institutes für Sortenwesen der AGES durchgeführt.

Rechenmodelle wurden auf der Basis der multivariaten Datenanalyse und der Principal Component Regression mit dem Programm Unscrambler, Vers. 9.6 (Camo Software AS, Oslo) erstellt. Technologisch wichtige Fraktionen wurden an Hand der B-Koeffizienten selektiert. Der Einfluss einer Proteinfraktion, d.h. eines Peaks wurde dann als signifikant eingestuft, wenn der zugehörige B-Koeffizient in allen drei aus Teilmengen erstellten Rechenmodellen das gleiche Vorzeichen hatte. Bei Weizen war überdies erforderlich, dass in beiden Versuchsjahren das gleiche Vorzeichen zu beobachten war.

Die vorhandenen Chromatogrammdaten und Referenzwerte wurden nicht nur zur Erstellung von Kalibrationen verwendet. Das verwendete Programm sieht auch Algorithmen zur Validierung vor. In diesem Falle wurden nicht alle vorhandenen Daten, sondern nur 4/5 zur Berechnung der Kalibration herangezogen. Ein weiteres Fünftel wurde mit der so erstellten Kalibration berechnet und die Korrelation zwischen errechneten und analysierten Daten berechnet. Dieser Prozess wird fünfmal wiederholt, wobei jedes Mal ein anderes Fünftel aus dem Kalibrationsdatensatz ausgeschlossen wird.

Pathogene Epitope wurden im Eluat der HPLC-Trennungen mit Hilfe des pathogenspezifischen ELISA nachgewiesen.

Ergebnisse

Die Rechenmodelle zeigten, dass von den teigrheologischen Parametern die Teigenergie am besten vorhersagbar war. Bereits durch die erste Hauptkomponente konnten etwa 60% der Variabilität erklärt werden. Zwischen Kalibrierung und Validierung ergaben sich dabei nur geringe Differenzen und zwischen berechneten und analysierten Werten wurde bei Anwendung des zur Validierung vorgesehenen Rechenchemas eine Korrelation von $R^2=0,73$ erreicht. Auch für die Dehnlänge konnten zuverlässige Rechenmodelle erstellt werden. Die erste Hauptkomponente konnte etwa 50% der

Variabilität der Dehnlänge erklären. Die Korrelation zwischen berechneten und analysierten Werten betrug $R^2=0,69$.

Deutlich schwächer war hingegen das Modell für den Dehnwiderstand. Hier konnte die erste Hauptkomponente im Validierungsmodus nur knapp mehr als 10% der Variabilität erklären. Mit etwa 8 Hauptkomponenten konnten schließlich etwa 50% erklärt werden. Die zugehörige Korrelation zwischen berechneten und gefundenen Werten lag bei $R^2=0,55$. Die Differenz zwischen der durch Kalibration und der durch Validierung erklärten Variabilität war erheblich höher als bei den Modellen für Teigenergie und Dehnlänge.

Beim Gebäckvolumen konnten mit der ersten Hauptkomponente bei geringem Unterschied zwischen Kalibrierung und Validierung etwa 35% der Variabilität erklärt werden. Zur Erreichung von ca. 45% erklärter Variabilität waren jedoch 10 Hauptkomponenten erforderlich, wobei auch die Differenz zwischen Kalibrierung und Validierung erheblich zunahm.

Die Ergebnisse, insbesondere die erhöhten Differenzen der erklärten Variabilität zwischen Kalibrierung und Validierung zeigen, dass Parameter wie Dehnwiderstand und Gebäckvolumen offenbar auch durch Ursachen beeinflusst werden, die nicht unmittelbar mit dem Proteinspektrum in Zusammenhang stehen. Trotzdem konnte das Gebäckvolumen von Proben, die bei der AGES verbacken wurden, die aber nicht Teil der Kalibrierung waren, relativ zuverlässig vorhergesagt werden ($R^2=0,8363$). Die verwendete Kalibrierung wurde in diesem Falle aus Proben des gleichen Jahrganges erstellt, dem auch die untersuchten Proben entstammten. Proben der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft wurden ebenfalls chromatographisch untersucht. Die daraus berechneten Gebäckvolumina korrelierten jedoch mit den freundlicher Weise zur Verfügung gestellten Backergebnissen in wesentlich geringerem Maße ($R^2=0,5903$). Dieser Unterschied kann sowohl darauf zurückgeführt werden, dass die untersuchten Sorten nicht Teil des der Kalibrierung zugrunde liegenden Sortenspektrums war als auch, dass die Methodik der Backversuche verschieden ist. Ergebnisse der beiden bei der AGES untersuchten Jahrgänge ergaben bei Berechnung durch das jeweilige Modell des anderen Jahrganges ebenfalls schwächere Korrelationen. Daraus ist der Schluss zu ziehen, dass ein erheblicher Jahrgangs- und Umwelteinfluss auf das Zustandekommen der technologischen Eigenschaften besteht.

An Hand der B-Koeffizienten konnten die Einflüsse einzelner Peaks auf verschiedene Parameter geschätzt werden. Positiven Einfluss auf das Gebäckvolumen hat demnach ein Peak im Bereich der α -Gliadine mit einer Laufzeit von 19,06 Minuten. Vor allem aber waren zwei der Hauptpeaks aus der Fraktion der HMW-Glutenine positiv mit dem Gebäckvolumen korreliert. Ebenso zeigten zwei große Peaks der LMW-Glutenine eine positive Beziehung zum Gebäckvolumen. Ein Teil dieser Peaks war auch positiv mit der Teigenergie korreliert. Es zeigte sich jedoch, dass diese durch weitere Peaks der LMW-Glutenine, $\omega 5$ -, α -, γ - und $\omega 6$ -Gliadine positiv sowie von einem α -Gliadin Peak negativ beeinflusst wurde. Im Bereich der γ -Gliadine wurden vor allem Peaks mit negativem Einfluss auf den Dehnwiderstand gefunden. Der α -Gliadinpeak und ein LMW-Gluteninpeak

mit positivem Einfluss auf das Gebäckvolumen hatten auch positiven Einfluss auf den Dehnwiderstand, während zwei LMW-Gluteninpeaks mit negativem Einfluss identifiziert werden konnten. Peaks mit Einfluss auf den Dehnwiderstand hatten in den meisten Fällen einen entgegengesetzt gerichteten Einfluss auf die Dehnlänge.

Das T-Zellen stimulierende Epitop konnte in dem für Gebäckvolumen und Dehnwiderstand relevanten α -Gliadin-Peak sowie in einem ω 1,2-Gliadin und einem ebenfalls technologisch wichtigen HMW-Glutenin-Peak nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen der Proteinspektren von Braugersten zeigten, dass vor allem in der Albumin/Globulin-Fraktion Peaks mit positivem Einfluss auf die enzymatische Kraft des Malzes zu finden sind. Hordeine und Hordenine haben geringen bzw. eher negativen Einfluss auf Parameter wie Extraktausbeute und Diastatische Kraft. So konnten eher schwächere Modelle für die Extraktausbeute aus der Albumin- und Globulinfraktion (erklärte Variabilität Kalibrierung: 65%, $R^2=0,53$; Validierung 55%; Kalibrierung: $R^2=0,48$; 5 PC) und ein ausschließlich auf der Albumin- und Globulinfraktion beruhendes Modell für die Diastatische Kraft (erklärte Variabilität Kalibrierung: 62%, $R^2=0,61$; Validierung: 45%, $R^2=0,53$; 8 PC) berechnet werden. In den Hordeinen wurden zwei Peaks gefunden, die das möglicherweise pathogene α -Gliadin-Epitop enthielten.

Danksagung

Dem Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft wird für die Finanzierung des Projektes der Dank der Verfasser ausgesprochen.

Literatur

AMMAR K, KRONSTAD WE, MORRIS CF, 2000: Breadmaking quality of selected durum wheat genotypes and its relationship with high molecular weight glutenin subunits allelic variation and gluten protein polymeric composition. *Cereal Chem* 77: 230-236.

- BALDSHIEV D, BUTEBA A, HANDRECK B, 1997: Untersuchungen der Beziehungen zwischen den Eiweissfraktionen und den technologischen Eigenschaften des Weizens. *Mühle Mischfuttertech* 134: 433-436.
- BURNOUF T, BIETZ JA, 1984: Reversed-phase high performance liquid chromatography of reduced glutenin, a disulfide bonded protein of wheat endosperm. *J Chromatography* 299: 185-199.
- MIR AN, ARABI MIE, AL-SAFADI B, 1999: High molecular weight glutenin subunits composition of Syrian grown bread wheat and its relationships with gluten strength. *J Genet Breed* 53: 237-245.
- MITEA C, KOOY-WINKELAAR Y, VAN VEELLEN P, DE RU A, DRIJFHOUT JW, KONING F, DEKKING L, 2008: Fine specificity of monoclonal antibodies against celiac disease-inducing peptides in the gluteome. *Am J Clin Nutr* 88: 1057-1066.
- PENA RJ, TRETOWAN R, PFEIFFER WH, VAN GINKEL M, 2002: Quality (end-use) improvement in wheat: compositional, genetic, and environmental factors. *J Crop Prod* 5: 1-37.
- ROGERS WJ, SAYERS EJ, RU KL, 2001: Deficiency of individual high molecular weight glutenin subunits affords flexibility in breeding strategies for bread-making quality in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 117: 99-109.
- SAPIERSTEIN HD, FU BX, 1998: Intercultivar variation in the quantity of monomeric proteins, soluble and insoluble glutenin and residue protein in wheat flour and relationships to breadmaking quality. *Cereal Chem* 75: 500-507.
- SKERITT JH, HILL AS, 1990: Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. *J Agric Food Chem* 38: 1771-1778.
- SPAENJI-DEKKING EHA, KOOY-WINKELAAR EMC, NIEUWENHUIZEN WF, DRIJFHOUT JW, KONING F, 2004: A novel and sensitive method for the detection of T cell stimulatory epitopes of α/β - and γ -gliadin. *Gut* 53: 1267-1273.
- WIESER H, KÖHLER P, 2008: The biochemical basis of celiac disease. *Cereal Chem* 85: 1-13.
- WIESER H, ANTES S, SEILMEIER W, 1998: Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance-liquid-chromatography. *Cereal Chem* 75: 644-650.