

Entwicklung einer nicht-immunchemischen Methode zur quantitativen Bestimmung von Gluten in Weizenstärke

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstelle:	Kurt-Hess-Institut für Mehl- und Eiweißforschung, Garching Prof. Dr. Dr. P. Schieberle/Dr. H. Wieser
Industriegruppe:	Verein der Förderer des Kurt-Hess-Institutes für Mehl- und Eiweißforschung e.V., Garching Fachverband der Stärke-Industrie e.V, Bonn
	Projektkoordinator: Dr. G. Kröner, Hermann Kröner GmbH, Ibbenbüren
Laufzeit:	1999 - 2001
Zuwendungssumme:	€ 223.260,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Zöliakiekranken dürfen ein Leben lang nur glutenfreie Kost zu sich nehmen. Weizenstärke ist als Bestandteil diätetischer glutenfreier Lebensmittel erwünscht, da sie ihre Qualität erhöht, aber nur dann erlaubt, wenn der Glutengehalt unter 200 ppm (Codex-Alimentarius-Entwurf 2000) liegt. Die für die quantitative Glutenbestimmung bisher entwickelten immunchemischen Methoden sind zu wenig empfindlich oder spezifisch, die Ergebnisse nicht ausreichend reproduzierbar und die Testkits im Handel nur teilweise erhältlich und teuer. Sie führen in Abhängigkeit vom eingesetzten Testsystem zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen und damit zu einer starken Verunsicherung von Produzenten und Konsumenten. Ziel des Vorhabens war es daher, eine spezifische, empfindliche und relativ einfache nicht-immunchemische Methode für die Quantifizierung von Gliadin bzw. Gluten in Weizenstärke und evtl. auch in anderen Rohstoffen zu entwickeln.

Forschungsergebnis:

Die im Rahmen des Projektes durchgeführten Arbeiten beschäftigten sich mit der Herstellung und Charakterisierung verschiedener Gliadinstandards, der Extraktion der Gliadine bzw. von Gluten aus Weizenstärke und deren Quantifizie-

rung sowie der Analyse verschiedener Stärkeproben und anderer Rohstoffe. Vier sortenreine Gliadinpräparate wurden als Standards hergestellt und mit einem europäischen (PWG-) Standard verglichen; alle Präparate waren homogen sowie in 60 %igem Ethanol gut löslich und hatten einen hohen Gliadinegehalt. Für die Extraktion der Gliadine aus Weizenstärke (1 g) wurden die Vorgaben des Codex-Entwurfs (Verhältnis Probe: Ethanol = 1:10) eingehalten und die übrigen Bedingungen optimiert. Unter den getesteten Quantifizierungsmethoden erwies sich die Streulichtmessung (Nephelometrie) von gefällttem Gliadin zwar als einfach, empfindlich und gut reproduzierbar, die Kalibriergerade war jedoch sortenabhängig und die Stärkeextrakte enthielten Komponenten, die die Gliadinbestimmung störten. Letzteres traf auch auf die Reversed-Phase(RP)-HPLC zu, so dass beide Methoden nicht ohne aufwändige Vorextraktion anwendbar waren. Im Gegensatz dazu gewährleistet die Gelpermeations(GP)-HPLC in Kombination mit einer UV-Detektion eine gut reproduzierbare Quantifizierung von aus Stärke extrahiertem Gliadin mit einer Nachweisgrenze von ca. 0,5 µg. Dies entspricht einer Gliadinkonzentration von 25 ppm bzw. ca. 3 ppm nach Extraktkonzentrierung (Codex-Grenzwert: 100 ppm). Mittels GP-HPLC ist es auch möglich, nach Reduktion der Disulfidbindungen Gesamtgluten (Gliadin + Glutenin) zu bestimmen. Unter Anwendung der entwickelten Methode wurden 23 Stärkeproben

verschiedener Hersteller auf ihren Gliadinegehalt analysiert. Unter Einbeziehung einer Standardkalibriergeraden wurden Gliadinkonzentrationen von 15 bis 574 ppm (Variationskoeffizient der Doppelbestimmung $< \pm 6 \%$) ermittelt. Die Bestimmung von Gesamtgluten ergab, dass das Mengenverhältnis Gluten/Gliadin in den Stärken sehr unterschiedlich war. Die ermittelten Werte zeigten außerdem, dass der Rohproteingehalt ($N \times 5,7$) keine zuverlässige Abschätzung des Gliadin- bzw. Glutengehaltes erlaubt. Mit der entwickelten Methode können auch andere Rohstoffe wie Apfelfaser, Buchweizengrütze, Gewürztrieb, Hirse-, Kastanien- und Reismehl, nicht jedoch Maismehl und Magermilchpulver untersucht werden.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Die Ergebnisse des Vorhabens haben insbesondere für die Stärkeindustrie und die Hersteller glutenfreier Kost eine wirtschaftliche Bedeutung. Sie besteht darin, dass eine analytische Methode entwickelt worden ist, die auf nicht-immunchemischer Basis eine zuverlässige quantitative Bestimmung von Gliadin und Gluten in Weizenstärke erlaubt. Gegenüber den bisher angewandten immunochemischen Methoden hat diese Methode den Vorteil, dass alle in Gliadin bzw. Gluten vorkommenden Proteintypen gleichwertig quantitativ erfasst werden, so dass z. B. Sorteneinflüsse keine Rolle spielen. Erstmals kann damit auch der Glutengehalt bestimmt werden. Die Nachweisgrenze liegt weit unter dem im Codex-Entwurf empfohlenen Grenzwert und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist im Gegensatz zu immunochemischen Methoden so gut, dass in der Regel eine Doppelbestimmung ausreicht. Aufgrund von drei Spezifikitätskriterien (Alkohollöslichkeit, Molekulargewicht, UV-Absorption der Gliadine bzw. Glutenproteine) kann eine Reihe weiterer für die Herstellung glutenfreier Lebensmittel relevanter Rohstoffe untersucht werden. Die für die Anwendung der Methode benötigte Ausrüstung ist in den meisten analytischen Labors vorhanden, die Trennsäule ist relativ preiswert und kann über einen langen Zeitraum betrieben werden. Wird ein automatischer Probengeber benutzt, können die Analysen auch nachts und am Wochenende ohne Personaleinsatz durchgeführt werden. Die Analysenkosten dürften insgesamt wesentlich niedriger liegen als diejenigen der immunochemischen Methoden. Die entwickelte Methode trägt damit zur Verbesserung der Qualitätssicherung, zu Kosteneinsparungen durch geringeren Analy-

senaufwand sowie Vermeidung von Fehlproduktionen bei und bietet somit Wettbewerbsvorteile. Es ist zu erwarten, dass die entwickelte Methode schnell in die Praxis (Stärkefabriken, Betriebe zur Herstellung glutenfreier Lebensmittel, Handelslabors) transferiert und dort umgesetzt wird.

Die Ergebnisse des Vorhabens haben aber auch insofern Bedeutung, als sie in zwei wichtigen Fragen Klarheit schaffen: Es konnte gezeigt werden, dass der Rohproteingehalt von Stärke in den meisten Fällen eine sichere Abschätzung des Gliadin- bzw. Glutengehaltes nicht erlaubt. Soll Stärke zur Herstellung glutenfreier Lebensmittel verwendet werden, muss sie auf ihren Gliadin- bzw. Glutengehalt geprüft werden. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die im Codex-Entwurf festgelegte Berechnung von Gluten ($2 \times$ Gliadin) willkürlich ist, da das Mengenverhältnis Gluten/Gliadin in Abhängigkeit vom Probenmaterial schwankt.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2002.
2. Engel, W. und Wieser, H.: Entwicklung einer nephelometrischen Methode zur Bestimmung kleiner Mengen Gliadin. Bericht Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching 213-218 (2000).
3. Wieser, H., Novalin, S. und van Eckert, R.: Preparation and characterization of a European reference gliadin. Bericht Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, 202-207 (2001).
4. Wieser, H. und Antes, S.: Development of a non-immunochemical method for the quantitative determination of gluten in wheat starch. Proc. 16th Meet. Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (ISBN 3-928921-73-8), 19-23 (2001).
5. Seilmeier, W., Antes, S. und Wieser, H.: Entwicklung einer gelchromatographischen Methode zur Bestimmung von Gliadin und Gluten in Weizenstärke. Bericht Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, 151-153 (2002).
6. Wieser, H. und Seilmeier, W.: Determination of gliadin and gluten in wheat starch by means of alcohol extraction and gel permeation chromatography. Proc. 17th Meeting Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity (ed. M. Stern), Verlag Wissen. Skripten, Zwickau, 53-57 (2003).

Weiteres Informationsmaterial:

Kurt-Hess-Institut für Mehl- und Eiweißforschung
e.V.

Lichtenbergstr. 4, 85748 Garching
Tel. 089/289-14170, Fax 089/289-14183
E-Mail peter.schieberle@lrz.tum.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