

Elektrophoretische Bestimmung des Gliadins zur Erkennung von Weizenmischungen

Dr. A. Bourdet und Dr. J. C. Autran, Paris/Frankreich

Seit mehreren Jahren hat die Mühlenindustrie ein großes Interesse an den Sorten, die sie verarbeitet. Die indirekten Kriterien, aus denen der Müller das Qualitätsniveau seines Ausgangsproduktes beurteilt, erweisen sich manchmal als ungenügend, wenn nicht sogar unbrauchbar, seitdem auf dem Markt die neuen Weizensorten erschienen, die schwierig zu verarbeiten bzw. zur Brotherstellung ungeeignet sind.

Aus Furcht vor einer weiteren Entwicklung dieser Sorten, beurteilt die Müllerei z. Z. trotz ständiger Fluktuation im Hinblick auf agro-klimatische Faktoren den Sortengesichtspunkt als das einzige Mittel, um das vorhandene technologische Qualitätsniveau aufrechtzuerhalten und dadurch zwi-

schen backfähigem und Futterweizen zu unterscheiden. Im Augenblick basieren die Beziehungen zwischen Herstellern, Händlern und Müllern allein auf der Deklaration der gelieferten Weizenpartie. Diese Deklarationen, auf denen natürlich auch Preisunterschiede beruhen, sollen kontrollierbar sein, damit die Angaben auch garantiert sind. Das Problem erscheint auch deshalb so wichtig, weil seit Beginn der Ausweitung auf dem Europäischen Markt die Liste derjenigen Sorten, die in Frankreich im Handel sind, erst seit dieser Zeit im französischen Katalog auf ca. 80 Sorten limitiert ist. Dieser Sortenkatalog kann sich jedoch auf alle anderen Sorten der Gemeinschaft ausdehnen (ca. 150 bis 160 Sorten).

Die Erkennung der Sorten ist kein neues Problem und verschiedenste Techniken werden und wurden, teils auf die Pflanze oder auf das Korn bezogen, angewendet.

Zur Identifizierung während des Wachstums ist sicherlich die objektivste Methode die, welche auf bestimmten botanischen Unterschieden beruht (Pflanzenwuchs, Aussehen der Blätter, Farbe der Staubbeutel). Sie erfordert aber vom Durchführenden eine sichere und erhebliche Erfahrung.

Im Gewächshaus kann man ebenso physiologische Kriterien zu Hilfe nehmen wie die Ansprechbarkeit der Pflanze auf bestimmte Fungizide. Versuche mit gekeimten Weizen stützen sich auf einige Besonderheiten wie z. B. die Form der ersten beiden Blätter oder die Färbung des Kolleroptils bei künstlichem Licht, die von farblos bis purpur reicht.

Direkt anwendbare Verfahren beim Korn sind bestimmte morphologische und physikalische Charakteristika, wie Länge und Breite des Korns, Länge des Scutellums und der Bürste, Farbe (rot oder weiß), Textur (mehlig oder glasig), Härte und 1000-Korngewicht.

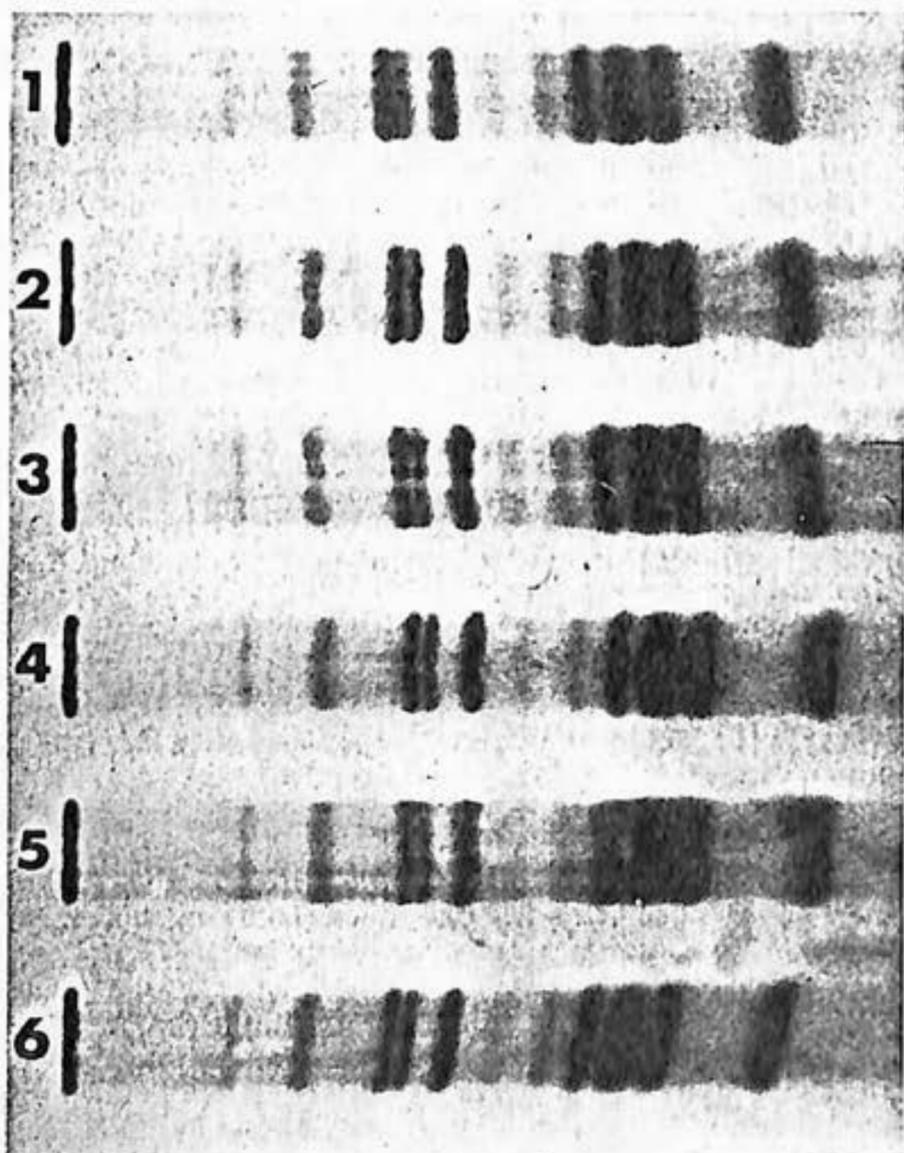
Die Färbung des Korns mit Phenolsäure, die eine Unterscheidung in vier Klassen erlaubt, nämlich nach der beobachteten Färbung zwischen schwarz, dunkelbraun, braun und hellbraun, ist besonders nützlich im Hinblick auf die Erkennung einheitlicher Sorten. In unterschiedlichem Maße sind alle diese Methoden langwierig und schwierig durchzuführen. Einige dieser Methoden, besonders die morphologischen und physikalischen Eigenschaftsbestimmungen sind stark von den Umwelteinflüssen (agro-klimatische Bedingungen, Anbaumaßnahmen etc.) abhängig.

Im übrigen lassen sich damit jedoch nur verschiedene Sortenklassen unterscheiden, und deshalb sind sie nur in sehr beschränktem Maße spezifisch. Es ist offensichtlich, daß mit den vier Klassen, die der Phenoltest z. B. unterscheidet, eine individuelle Unterscheidung der 80 französischen Sorten nicht möglich ist. Noch viel weniger kann man damit die Sorten in Mischungen, wie sie im Handel verstärkt auftreten, unterscheiden. Der Mangel dieser Tests an Spezifität führt immer nur zu Vermutungen und niemals zur Sicherheit.

Die Unterscheidung der Sorten ist ein schwer zu lösendes Problem, welches eine hohe Spezifität der Kriterien bei völliger Unabhängigkeit von Umwelteinflüssen erfordert. Die Lösung dieses Problems konnte nur unter Zuhilfenahme der Bestandteile des Korns mit charakteristischen physikalisch-chemischen Eigenschaften gefunden werden, die genetisch unveränderlich sind. Aufgrund ihrer chemischen und strukturellen Vielfalt, die den Erbanlagen unterworfen ist, erscheinen die Proteine durch ihre gleichsam unbegrenzte Anzahl von Kombinationsmöglichkeiten als am günstigsten zur Feststellung genetischer Eigenschaften geeignet.

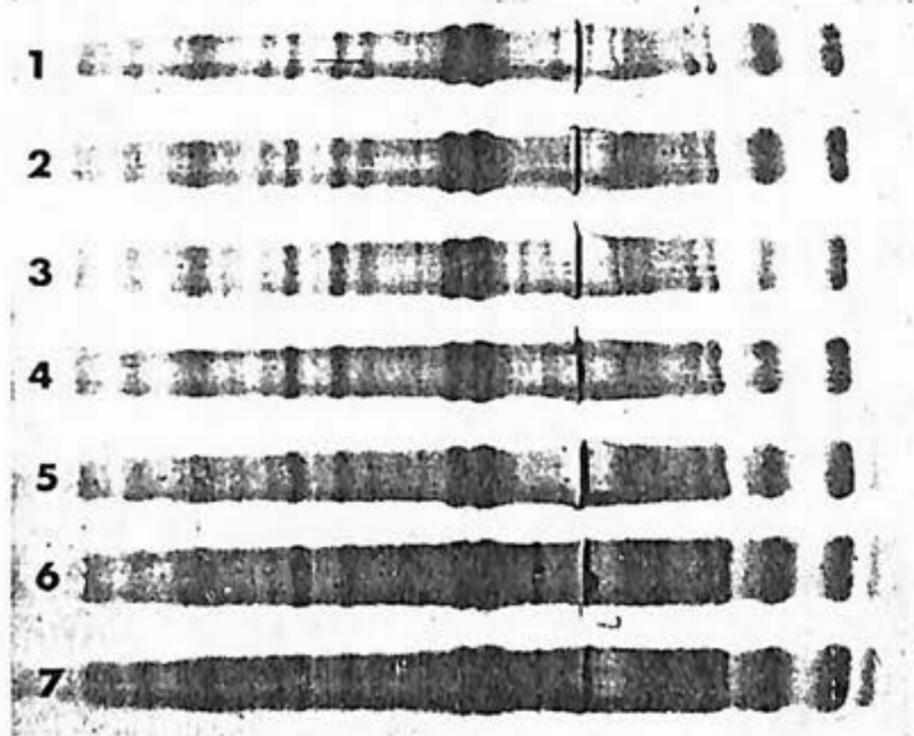
Die Literatur der letzten 10 bis 15 Jahre hat eine große Anzahl von Arbeiten hervorgebracht, die sich mit der genetischen Spezifität oder Charakteristik von Proteinen bei der Vegetation besonders bei Cerealien und Weizen befaßt. Unsere eigene Erfahrung im Laufe dieser Zeit hat gezeigt, daß die unterschiedlichen Kornproteine nicht alle das gleiche Maß genetischer Spezifität aufweisen. Der Vergleich der aus den Keimen isolierten Histone von verschiedenen Weichweizensorten nach deren elektrophoretischer Fraktionierung zeigt sehr große Ähnlichkeit der Elektropherogramme (Autran, Bourdet 71) (Abb. 1).

Man findet auch keine signifikanten Unterschiede, wenn man die Histone verschiedener Hartweizen damit vergleicht. Ähnliche Feststellungen wurden bei anderen Arten von Tri-

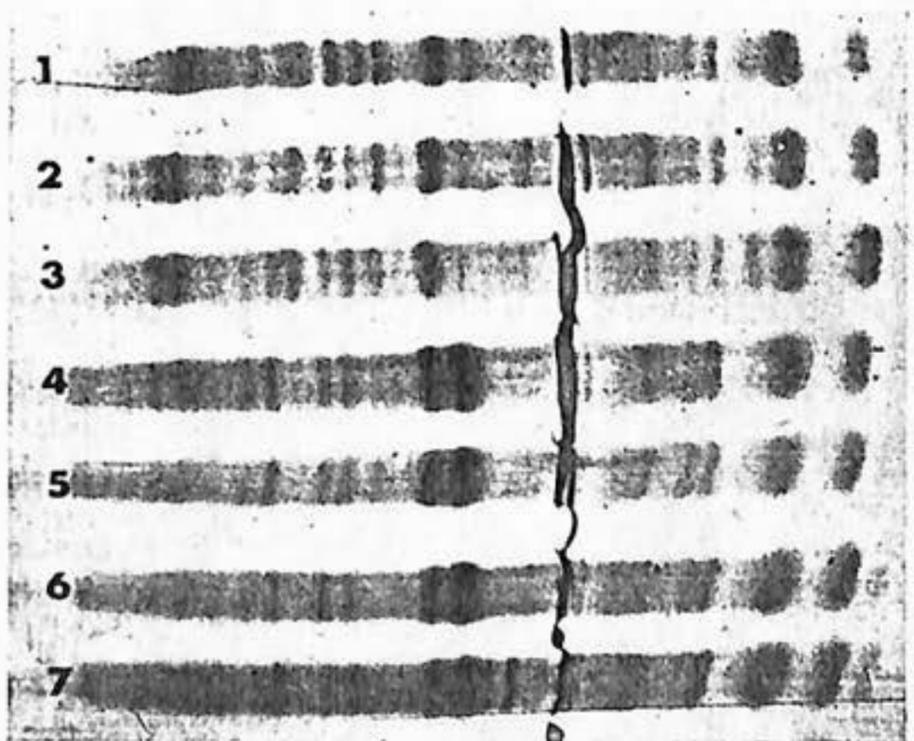


T. aestivum Joss (1), Capelle (2), Capitoie (3), Progress (4), Atys (5), Magda'ena (6).

Abb. 1: Elektropherogramme der Histone von Weizenkeimen (Polyacrylamidgel pH 3, 2)



T. aestivum Mironowska (1), Thatcher (2), Fertidi (3), Bezostaia (4), Antonov'ska (5), Leonardo (6), San Pasquale (7).



T. durum Bonaerense (1), Tag. Balcarce (2), Tag. Buck (3).
T. aestivum Buck Quequen (4), Atlantico (2), Pergamino (3), Vilela Sol (4).

Abb. 2: Elektropherogramme von Albuminen und Globulinen von Weich- und Hartweizen (Stärkekegel pH 8, 9)

tium (*T. compactum*) und bei *Aegylops*, *Hordeum* und *Secale* getroffen, so daß bewiesen ist, daß diese Proteine genetisch unspezifisch sind (Autran 1973).

Die löslichen Albumine und Globuline zeigen ebenfalls keine sortenspezifischen Unterschiede. Verschiedene Weichweizensorten führen zu völlig identischen Elektrophogrammen (Feillet und Bourdet, 1967). Dieselbe Ähnlichkeit läßt sich beim Vergleich verschiedener Hartweizen beobachten. Andererseits zeigen die Elektrophogramme von Weich- und Hartweizen Unterschiede in der Zusammensetzung der beiden Arten *T. aestivum* und *T. durum* (Abb. 2). Auf dieser Unterschiedsgrundlage haben einige Autoren die Elektrophorese von löslichen Proteinen vorgeschlagen, um Weichweizen in Hartweizenmischungen zu bestimmen, die zur Grieß- bzw. Teigwarenherstellung bestimmt sind. Die genetische Spezifität der Proteine vom Typ Albumin und Globulin beim Weizen zeigt sich also allein auf der Ebene der Arten (*T. aestivum* und *T. durum*).

Das Studium bestimmter Enzymproteine hat verschiedene Spezifitätsebenen bezüglich der Sorten gezeigt. Die elektrophoretische Fraktionierung der Esterasen aus verschiedenen Sorten führt zu identischen Diagrammen. Die sauren Peroxydasen lassen 7 verschiedene Typen erkennen (Kobrehel und Coll, 1974), die alpha-Amylasen 5 Typen (Joudrier, 1974), Abb. 3).

Die Verwendung bestimmter funktioneller Proteine als genetische Markierungspunkte bietet also wie beim Phenolsäuretest eine sehr ungenügend spezifische Möglichkeit zur individuellen Erkennung einer Weizensorte.

Im gegenwärtigen Zeitpunkt unserer Erkenntnisse bieten die Gliadine des Kornes allein eine ausreichend spezifische Identifikationsmöglichkeit.

Unsere ersten Versuche zur elektrophoretischen Fraktionierung der Gliadine gehen auf Arbeiten um 1960 zurück. Wir benutzten damals die Papierelektrophorese, mit der es nur unzureichend gelang, aufgrund von 3 bis 4 Proteinbanden eine Unterscheidung zu treffen. Das Papier wurde

jedoch schnell durch Stärkegel ersetzt, das 1955 von Smithies zur Trennung von Serumproteinen vorgeschlagen wurde. Die Anwendung der Methode vom Smithies auf Weizengliadine erschien von nun an interessant, wie auch die ersten Arbeiten von englischen und amerikanischen Autoren gezeigt haben (Coulson und Sim, 1961), (Elton und Ewart, 1962) und (Woychick und Coll, 1951).

Unsere erste Arbeit (Bourdet und Coll, 1963) über „Das elektrophoretische Verhalten der Prolamine des Weizens bei der Stärkegelelektrophorese“ wurde 1963 vorgelegt, ungefähr zur selben Zeit, als die Australier (Lee und Wrigley, 1963) ihrerseits die Ergebnisse ihrer ersten Versuche mit Elektrophorese auf Polyacrylamidgelen veröffentlichten.

Es mußte endgültig bewiesen werden, daß die Elektrophogramme der Proteine der Gliadine bei jeder Sorte konstant bleiben und weder durch agro-klimatische Umstände (Anbauort und Anbaujahr) noch durch die Anbaumethoden (Stickstoffdüngung, Dichte der Saat, Fungizidbehandlung usw.) beeinflusst werden. Ebenso bleiben die Gliadindigramme völlig identisch, unabhängig vom histologischen Ursprung der Proteine aus den verschiedenen Kornbereichen (Keim, Schale, Endosperm) (Bourdet und Autran, 1974).

Die Ergebnisse der verschiedenen amerikanischen, englischen, russischen und holländischen Arbeitsteams der letzten 10 Jahre mit im übrigen unterschiedlichen Lösungsmitteln waren hauptsächlich für die Grundlagenforschung und nicht für die anwendungsorientierte Forschung nützlich. Man stellte fest, daß die Gliadindigramme qualitative Unterschiede von einer Sorte zur anderen ausweisen, aber man stieß auf die Schwierigkeit, eine praxisorientierte Anwendung zu finden.

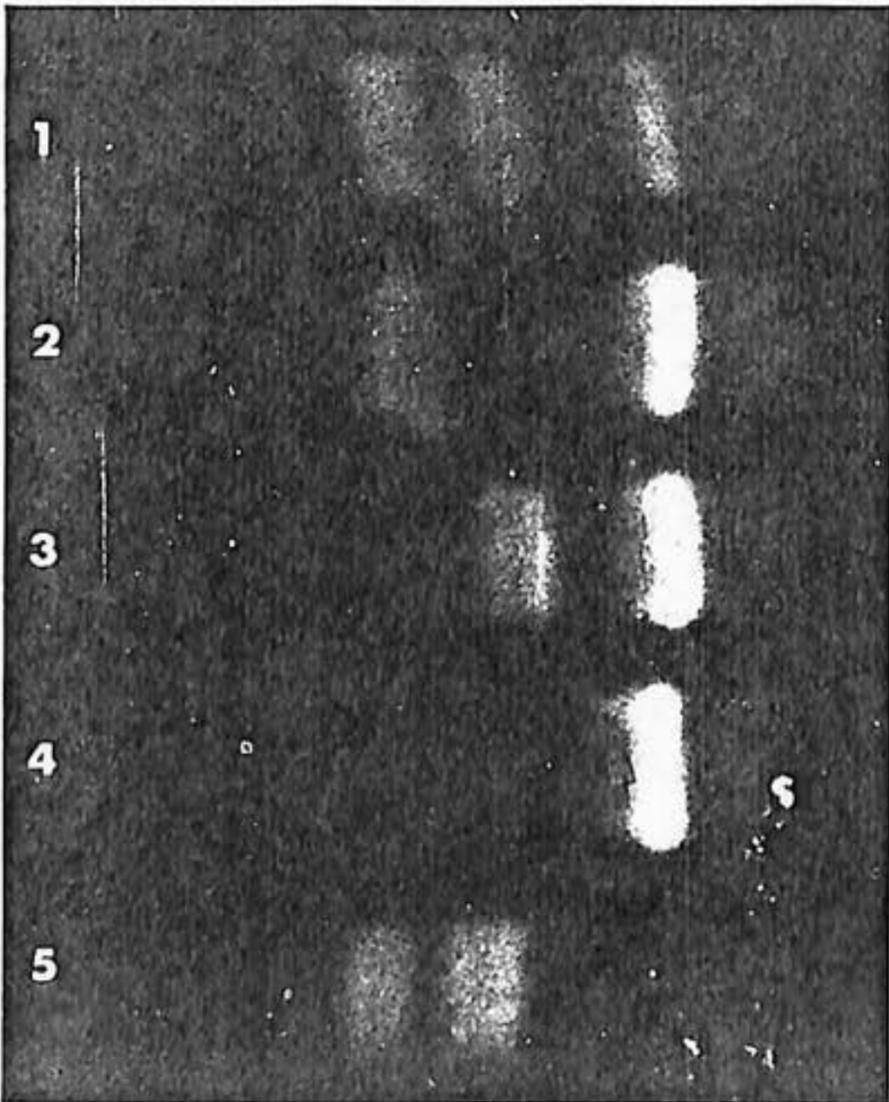
Seit 1971 bemühte sich Autran um ein solches Verfahren. Als erstes untersuchte er die verschiedenen Versuchsparameter, um eine genaue Arbeitsvorschrift zu erarbeiten, die eine exakte Reproduzierbarkeit der Methode gewährleistete. Danach legte er eine qualitative Sammlung der Gliadinbanden an, die sich aus sehr unterschiedlichen Sorten zusammensetzte (mehr als 400 verschiedene Einzelmuster). So sind es 43 Komponenten, die durch ihre unterschiedliche Beweglichkeit signifikant sind. Die qualitativen Ergebnisse wurden danach quantitativ densitometrisch untersucht, um die relative Konzentration jeder dieser Einzelbanden festzulegen. Man fand für jede Sorte einen bestimmten Diagrammtyp, der näher durch die Mobilität und die relativen Konzentrationen der Komponenten bestimmt ist. Weiterhin mußte das Diagramm vereinfacht werden durch Aufstellung einer quantitativen Tabelle, wie sie durch Dedio und Coll (1969) für die pflanzlichen Polyphenole angeregt wurde.

Endlich, nachdem man nun die signifikanten Unterschiede beobachtet hatte, wurde ein Bestimmungsschlüssel entwickelt. Dieser beruht auf einem Artenatlas, der eine zweifelsfreie Wiederfindung der Sorte durch einfaches visuelles Studium der einzelnen erhaltenen Diagramme erlaubt. Diese chemotaxonomische Tabelle ist für die Gesamtheit der französischen Hart- und Weichweizensorten (89 Sorten) (Autran, Bourdet, 1975a) erstellt worden, ebenso wie für die Hauptsorten der Gemeinschaft (ca. 80) (Autran, 1975).

Ca. 95 % der bisher untersuchten Sorten zeigen signifikant unterschiedliche Elektrophogramme und können mittels eines Vergleichsgliadins identifiziert werden. Nur einige seltene Sorten, die genetisch sehr verwandt sind, können nicht wiedererkannt werden.

Schließlich läßt sich die Methode mittelbar bei allen angebauten Weizensorten anwenden, wenn es sich um Weichweizen für die Bäckerei und um Hartweizen für die Teigwarenherstellung handelt (Abb. 4 u. 5).

So wie diese Methode z. Z. beschrieben wird, erlaubt die Elektrophorese der Gliadine, wenn es sich um eine einheitliche Partie handelt, entweder die Deklaration zu bestätigen oder eine unbekannte Sorte zu erkennen. Man kann



T. aestivum Typ I (1), Typ II (2), Typ III (3).
Mischung aus *T. durum* und *T. aestivum* Typ IV (4).
T. aestivum Typ V (5).

Abb. 3: Polymorphismus der β -Amylaseisoenzyme bei Weich- und Hartweizen (Polyacrylamidgel pH 3, 2)

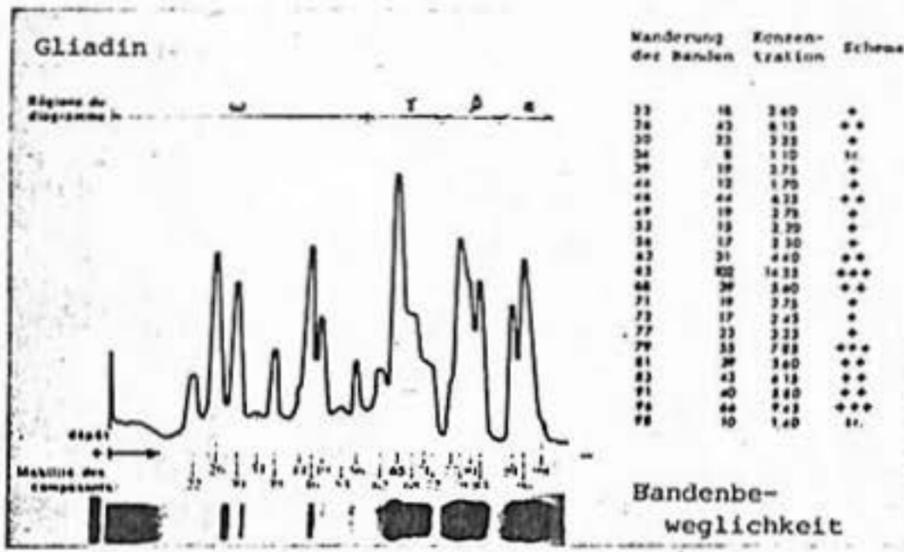


Abb. 4: Densitometrie des Gliadinelektropherogrammes und Schematisierung des Diagrammtypes — Sorte Capitole

von einem aliquoten Teil geschroteter Körner oder von dem entsprechenden Mehl ausgehen. Liegt eine Mischung unbekannter Sorten vor, wie es oft bei gelagerten Partien nach der Ernte der Fall ist, so ist es möglich, ein repräsentatives kleines Muster Korn für Korn zu untersuchen und so die Zusammensetzung und das Mengenverhältnis der verschiedenen Sorten zu ermitteln.

Die Genauigkeit dieser Verfahren ist um so besser, je größer die Anzahl der untersuchten Einzelkörner ist. Um das mit 95 %iger Sicherheit zu erreichen und dabei wenigstens ein Korn der am geringsten vertretenen Sorte in der Mischung (5 bis 6 %-Grenze) zu erfassen, muß man 50 einzelne Körner untersuchen.

Im Augenblick benötigt man zur Untersuchung 24 bis 36 Stunden. Man kann in dieser Zeit bis zu 48 Proben untersuchen, wenn es sich um reine Sorten handelt. Liegen Mischungen vor, kann man in der gleichen Zeit eine Probe von 48 Körnern und 6 Proben von je 8 Körnern untersuchen, je nach gewünschter Genauigkeit.

Die Ausrüstung kostet ca. 10 000,— NF und die Personalkosten richten sich nach Anzahl und Häufigkeit der Untersuchungen.

Zur Zeit sind nur die Arbeiten der australischen Arbeitsgruppen CSIRO in North Ryde auf dem gleichen praktischen Level wie unsere eigenen und beginnen, Allgemeingut zu werden (Wrigley und Baxter, 1974).

Im Augenblick arbeiten wir daran, die Dauer der Untersuchungen auf $\frac{1}{20}$ der gegenwärtigen Zeit zu reduzieren. Gleichzeitig werden Möglichkeiten erprobt, das Verfahren zu automatisieren.

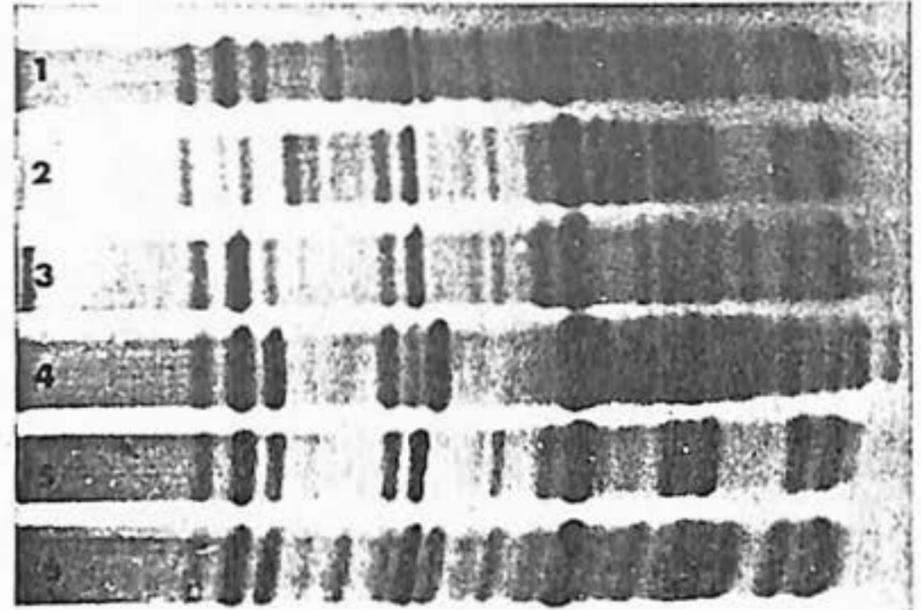
Man muß aber unterstreichen, daß sogar diese Methode und die technischen Möglichkeiten es noch nicht erlauben, die Sorten sofort im Augenblick der Anlieferung zu untersuchen. Diese Methode kann also im Hinblick auf eine Kontrolle „nachher“ gesehen werden. In dem Maße, in dem man weiterhin zu einer direkten Sortenkontrolle während des Anbaus kommen wird, kann man vermuten, daß die Elektrophorese der Gliadine genügend verbreitet sein wird, damit beim Ankauf eine Untersuchung nach Brot- und Futterweizen erfolgen kann.

Die heutige Tagung beweist genügend, daß das Problem der Sortenerkennung jetzt die nationalen Verbände überschreitet und im Ganzen die Müller und die Europäische Gemeinschaft betrifft.

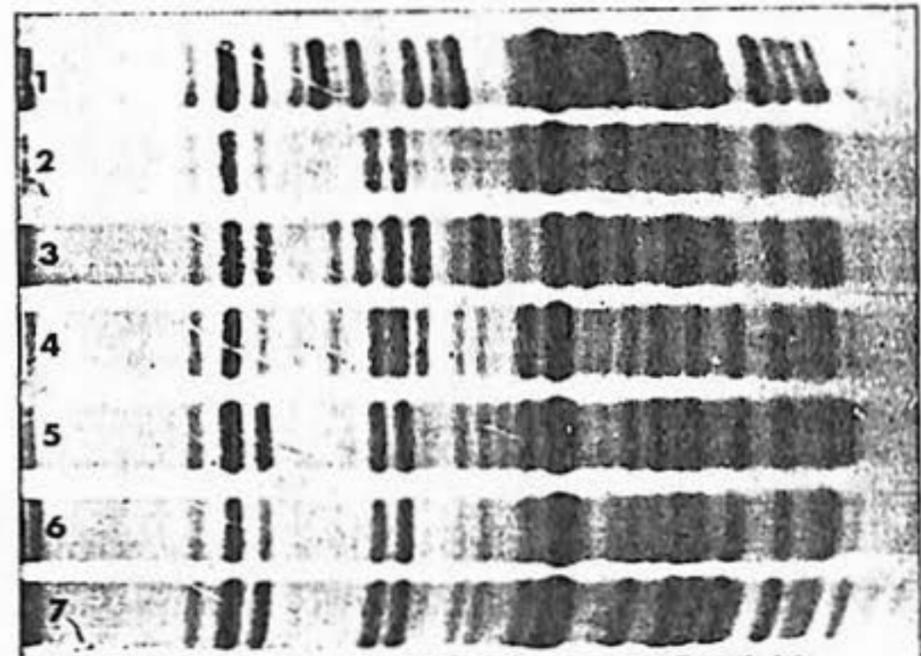
Vor beinahe 20 Jahren hat die Medizin mit der Elektrophorese der Proteine Fortschritte gemacht, um die Veränderungen verschiedener biologischer Milieus, die durch verschiedene Krankheiten hervorgerufen wurden, besser zu erkennen und zu bekämpfen.

Die Schwierigkeiten beim Weizenprotein, das als Reserprotein die höchste Sortenspezifität besitzt, aber unlöslich ist, erklärt zweifellos die Verzögerung, die der Getreidechemiker gegenüber den Klinikern beklagen muß.

Das analytische Werkzeug, über das wir von nun an verfügen, kann nun auch zur Bekämpfung einer Gefahr be-



Weichweizen (Frankreich) Joss (1), Magali (2), M. Huntsman (3), Rex (4), Talent (5), Top (6).



Weichweizen (Europa) (D) Domus (1), (S) Holme (2), (D) Lapis (3), (F) Joss (4), (GB) M. Settler (5), (S) Seba (6), (D) Uranus (7).



Weichweizen Capitole (1).
Hartweizen Bidi 17 (2), Monferrier (3), Lakota (4), Durtal (5), Agathe (6).

Abb. 5: Elektropherogramm von Gliadinen verschiedener Weich- und Hartweizensorten (Stärkekegel pH 3, 2)

nutzt werden, nämlich der, daß auf dem Markt nichtbackfähige Sorten als backfähige gehandelt werden.

Es ist anerkannt, daß die Fortschritte der modernen Wissenschaft zum großen Teil vom praktischen Fortschritt in der Entwicklung neuer Techniken und von der Perfektionierung der Ausrüstungen abhängen. Man kann also hoffen, daß nach dem Vorbild der Medizin die verschiedenen Bereiche, die sich mit dem Qualitätsproblem des Weizens und besonders der Müllerei beschäftigen, die Möglichkeiten, die nun durch die Elektrophorese eröffnet wurden, nutzbringend anwenden können.

Literatur

1. **Autran, J. C.:** Les désoxyribonucléoprotéines et les histones du grain de blé. Aspects physico-chimique et physiologique. Thèse Doctorat es Sc. Univers. Paris VI — juin 1973
2. **Autran J. C.:** Identification des principales variétés communautaires de blé tendre par électrophorèse des gliadines du grain. — Bull. Anc. El. E. F. M. 46 (1975) 270, 316—324
3. **Autran, J. C. et A. Bourdet:** Constitution électrophoretique des histones de germes de différents types de blé. — C. R. Acad. Sc. Paris, 272 (1971) 2732 bis 2735
4. **Autran, J. C. et A. Bourdet:** L'identification des variétés de blé: établissement d'un tableau général de détermination fondé sur le diagramme électrophorétique des gliadines du grain. — Ann. Amélior. Plantes 25 (1975 a), 3, 277—301
5. **Autran, J. C. et A. Bourdet:** Nouvelles possibilités de contrôle variétal qualitatif et quantitatif dans les lots de blés commerciaux. — C. R. Acad. Agric 11 juin (sous presse) — Techn. Ind. Céréol. 150 (1975 b) 7—13
6. **Bourdet, A., P. Feillet et F. Mettavant:** Sur le comportement électrophorétique des prolamines du blé en gel d'amidon. — C. R. Acad. Sc. Paris, 256 (1963) 4517—4520
7. **Bourdet, A. et J. C. Autran:** Proteins and nucleic acids in the wheat grain, its milled products and germ. — IVE Intern. Congress Food Sc. Technol. S-1C-Madrid (1974)
8. **Coulson, C. B. et A. Sim:** Starch gel electrophoresis of isolated wheat gluten. — Biochem. J. 80 (1961) 46—47
9. **Dedio, W., P. J. Kaltsikes et E. N. Larter:** Numerical chemotaxonomy in the genus *Secale*. — Canad. J. Bot 47 (1969) 1175—1180
10. **Elton, G. A. H. et J. A. D. Ewart:** Starch gel électrophoresis of cereal proteins. — J. Sc. Food Agric 13 (1962) 1, 62—72
11. **Feillet, P. et A. Bourdet:** Composition protéique et caractéristiques génétiques des blés. — Bull. Soc. Chim. Biol. 49 (1967) 10, 1273—1283
12. **Joudrier, P.:** Spécificité génétique de la β -amylase chez *Triticum aestivum*: existence de cinq types variétaux de zymogrammes. — C. R. Acad. Sc. Paris 278 (1974) 1777—1780
13. **Kobrehel, K., S. Vicedo et P. Feillet:** Variabilité de la composition en peroxydases et en phosphatases acides des blés et espèces voisines. — Symposium Franco Soviétique — Montpellier (1974) 30—34
14. **Lee, J. W. et C. W. Wrigley:** The protein composition of gluten extracted from different wheats. — Austr. J. Exptl — Agr. Anim. Husb, 3 (1963) 9, 85—88
15. **Woychick, J. H., J. A. Boundy et R. J. Dimler:** Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. — Arch. Biochem. Biophys. 94 (1961) 477—482
16. **Wrigley, C. W. et R. J. Baxter:** Identification of Australian wheat cultivars by laboratory procedures: grain samples containing a mixture of cultivars. — Austral. J. Exp. Agric. Husb. 14 (1974) 805—810