

Bericht

über die

16. Durum- und Teigwaren-Tagung

1994

Vorträge, gehalten anlässlich der Tagung der
Arbeitsgemeinschaft Getreideforschung e.V.
vom 4. - 5. Mai 1994

Veröffentlichungen der Arbeitsgemeinschaft
Getreideforschung e.V., Detmold, Band 253

Granum-Verlag, Detmold
1994

Bestimmung von Weichweizen in Teigwaren: vierjährige Ergebnisse einer EU-Studie

J.C. Autran, Montpellier (Frankreich)

1. Einleitung

Teigwaren sind ein wichtiges Lebensmittel in Europa, besonders in Italien (25,8 kg/Kopf/Jahr), Frankreich (6,6 kg), Großbritannien (4,8 kg), Deutschland (4,5 kg) und Spanien (4,3 kg). Die besten Teigwaren hinsichtlich Nährwert, Kochpotential und gesamtensorischer Qualität werden aus Durumweizengrieß hergestellt. Wegen der Qualitätsunterschiede und auch der Binnenmarkt-Vorschriften der Europäischen Union seit Januar 1973, nach denen ein freier Austausch von Teigwaren aus Durumweizen oder Mischungen mit anderen Weizen zwischen den verschiedenen Ländern erlaubt ist, muß der Verbraucher durch eine leicht verständliche Kennzeichnung erkennen können, aus welchen Rohstoffen die Teigwaren hergestellt wurden.

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von Methoden zur Erkennung und quantitativen Bestimmung von Weichweizen in Durumteigwaren eingesetzt. Diese Methoden basierten auf der quantitativen Sterolbestimmung (b-Sitosterolpalmitat) (6,11,16), der elektrophoretischen (7,22,23) oder immunochemischen (5,20,21) Bestimmung der Albumine oder CM-Proteine: Diese Proteine sind in chloroform-methanol-Mischungen (8) löslich oder enzym-spezifisch (Peroxidasen) (14) für das Genom D des Weichweizens. Die Methoden auf der Basis der Sterolbestimmungen durch Präzipitation oder gas-chromatographisch (12) und in jüngeren Jahren auch die Dünnschichtchromatographie und Densitometrie (28) oder die RP-HPLC (24) Methode wurden wegen des Mangels an Spezifität oft nicht mehr angewandt, vor allem dann, wenn die verwendeten Durumweizensorten mit Weichweizen innerhalb der Züchtungsprogramme gekreuzt worden waren. Durch die Einführung von hohen und sehr hohen Trocknungstemperaturen bei der Teigwarenherstellung und auch die Entwicklung von anderen hitzebehandelten Teigwaren (z.B. vorgekochte Teigwaren, Couscous) verloren alle Methoden auf der Basis der Albumine (offizielle italienische Methode 1980) oder Enzyme (sehr hitzeempfindliche Substanzen) (offizielle französische Methode) an Bedeutung und wurden kaum noch angewandt.

Somit war es, wie es bereits in einem früheren Bericht mitgeteilt wurde (3), dringend notwendig, eine oder mehrere neue Methoden zu entwickeln, um den Anteil Weichweizen in Durumteigwaren zu erfassen, auch unter Berücksichtigung der neuen Trocknungstechnik mit sehr hohen Temperaturen. Die Europäische Kommission hat daher innerhalb ihres BCR-Programms (DG XII) ein vierjähriges Forschungsprogramm (1990-1993) finanziert, um die vorhandenen Analysenverfahren zu untersuchen und Vergleichsmessungen durchzuführen. In dieser Arbeit wird der Wissensstand dieser Studie dargestellt, an der sich Laboratorien aus mehreren westeuropäischen Ländern beteiligten.

Diese neuen Methoden berücksichtigen Substanzen, die spezifisch für das Genom D des Weichweizens sind. Im Gegensatz zu den früheren angewandten Methoden müssen sie hitzeresistente Bestandteile berücksichtigen, um den Anteil Weichweizen in hochtemperaturgetrockneten Teigwaren erfassen zu können. Wenn man die Preisunterschiede zwischen Weichweizen und Durumweizen berücksichtigt, so benötigt man dringend Methoden, die geringe Zusätze von Weichweizen (0-5%) in Durumteigwaren erfassen können. Diese Methoden müssen unabhängig von dem genetischen Ursprung des verwendeten Weichweizens und Durumweizens und auch der angewandten Trocknungstechnik sein.

2. Zielsetzung der BCR-Studie

Am Anfang dieser vierjährigen Forschungsarbeit wurden folgende Forderungen gestellt:

- Entwicklung einer oder mehrerer Methoden zur Bestimmung und Quantifizierung von Weichweizen in hochtemperaturgetrockneten Teigwaren
- Erkennung von Weichweizenbestandteilen bei Zusätzen von 0-5% in Durumteigwaren
- Unabhängigkeit der Methode von bestimmten Trocknungsparametern.
- Unabhängigkeit der Methode von genetischen Variationen der Weichweizentypen.

3. Überblick über die geprüften Methoden

Folgende Methoden wurden von verschiedenen europäischen Spezialinstituten untersucht:

3.1. Elektrophorese und Quantifizierung von 1 D- ω -Gliadinfraktionen

(Dr. Autran, Laboratoire de Technologie des Céréales INRA, Montpellier, Frankreich),

3.2. Umkehrphasen Hochdruckflüssigchromatographie der γ -Gliadinfraktionen (RP-HPLC)

(Prof. Griffin, Life Science, Nottingham Polytechnic, Nottingham, Großbritannien),

3.3. Immunbestimmung der für Weichweizen spezifischen Albumine (Mb 0.28)

(Mr. Violle, Laboratoire de Technologie des Céréales INRA, Montpellier, Frankreich und Prof. Paraf, Laboratoire d'Immunologie INRA, Tours, Frankreich),

3.4. Bestimmung der spezifischen Albumine ("A", "B" und "C") des Weichweizens

(Prof. Resmini, Universität Mailand, Italien),

3.5. Durumweizenimmuntest auf Friabilin

(Mr. Bony, Rhône-Poulenc Diagnostic, Glasgow, Großbritannien und Lyons, Frankreich und Prof. Stimson, University of Strathclyde, Großbritannien).

4. Grundlagen der Methoden

4.1. Elektrophorese und Quantifizierung von 1 D- ω -Gliadinfraktionen

Diese Methode beruht auf der ω -Gliadinfraktion, die zu den am meisten hitzeresistenten Proteinen des Weizenkornes zählt (diese Fraktion ist schwefelfrei und daher nicht in der Lage, S-S-Bindungen durch Hitzeeinwirkung einzugehen). Nach der elektrophoretischen Fraktionierung mit einem konventionellen Polyacrylamidgel werden die sich langsam bewegenden Triplet-Banden, die von den Genen auf dem 1D-Genom kodiert sind, für die Bestimmung des Weichweizenanteiles verwendet. Die 1D- ω -Gliadin-Banden werden entweder mit Hilfe eines Densitometers quantitativ bestimmt oder nur visuell durch einen Vergleich mit mehreren Standardmischungen bewertet. Um mögliche Differenzen zu vermeiden, die durch den unterschiedlichen Denaturierungsgrad in Abhängigkeit von den Trocknungstemperaturen entstehen können, und um diese Untersuchungen nur auf die einzige ω -Gliadinfraktion zu begrenzen, werden alle Proben für 15 Minuten gekocht, bevor man die Gliadine extrahiert.

4.2. Umkehrphasen-Hochdruckflüssigchromatographie der γ -Gliadinfraktionen

Bei dieser Methode beruht die Bestimmung des Weichweizenanteils auf einer anderen Gliadinfraktion, die durch Umkehrphasen-Hochdruckflüssigchromatographie identifiziert wird. Diese spezielle Chromatographie der Hexaploiden- und Durumweizengliadine zeigt, daß Peaks mit Retentionszeiten zwischen 47 und 49 Minuten eine Fraktion repräsentieren, die auch zu der Gruppe der γ -Gliadine gehört; es sind auch D-Genom-spezifische Proteine. Die gesamte Peakfläche, die von dem Elutionsprofil bei 206 nm berechnet wird, bildet die Basis für die Bestimmung des Weichweizenanteils in Teigwaren. Außerdem wurden Antiseren hergestellt, indem man γ -Gliadin verwendete, das bei Retentionszeiten von 47 bis 49 Minuten mittels der Umkehrphasen-Hochdruckflüssigchromatographie isoliert wurde; so kann die Bestimmung des Weichweizens auch alternativ auf immunchemischer Weise durchgeführt werden (17,18).

4.3. Immunbestimmung der für Weichweizen spezifischen Albumine (Mb 0.28)

Zwei Albumine, die für Weichweizen spezifisch sind, und zu der Gruppe der α -Amylase-Inhibitoren gehören, wurden gereinigt. Monoklonale Antikörper wurden hergestellt und als Mb 0.28 bezeichnet. Unter diesen Antikörpern wurden einige gefunden, die mit der nativen Form des Proteins reagieren, während einige andere nur mit der denaturierten Eiweißform reagieren. Mit großem Aufwand wurde ein Antikörper isoliert, der eine Antigenbindungsstelle aufweist und der sowohl mit der nativen als auch der denaturierten Eiweißform reagiert. Dieser Antikörper hat das Potential, um die spezifischen Albumine in nativer und denaturierter Form zu erkennen und kann somit auch Weichweizen in Teigwaren, unabhängig von der Hitzebehandlung, schnell und einfach erfassen, und zwar in Form eines Sandwich-ELISA-Testes. Das Albumin Mb 0.28 hat eine sehr konstante Konzentration in verschiedenen Weichweizensorten.

4.4. Bestimmung der spezifischen Albumine

Drei elektrophoretische Albuminfraktionen ("A", "B", "C") wurden durch isoelektrische Fokussierung als spezifische Weichweizen identifiziert. Man fand außerdem eine

durumspezifische Fraktion ("D1") (23). Obwohl diese Albuminfraktionen während der Teigwarentrocknung mit erhöhten Temperaturen denaturiert werden, sind sie immer noch zum Teil extrahierbar, wenn man ein effizientes Lösungsmittel auswählt. Da die Denaturierungsrate für "A"-, "B"-, "C"- und "D1"-Proteine unter den Trocknungsbedingungen etwa gleich ist, kann man das Verhältnis $(A+B+C)/D1$ für die Bestimmung des Weichweizenanteils in Teigwaren benutzen. Das gilt auch für Teigwaren, die bei sehr hoher Temperatur getrocknet wurden. Das Prinzip dieser Methode wurde auch von Stroh (30), Gavin (9) und Seibel (25,26,27) verwendet.

4.5. Durumweizenimmuntest auf Friabilin

Monoklonale Antikörper wurden gegen gereinigtes Friabilin eingesetzt. Ein 14.7-K-Basis-Protein wird auf den 5D Chromosom des hexaploiden Weizens kodiert, welches verantwortlich gemacht wird für die Härte bzw. weiche Struktur des Weizenmehles. Ein spezifisch monoklonaler Antikörper, kodiert als F7F, scheint spezifisch auf die C-endständige S-S-Brücke des Friabilins zu reagieren. Durumweizen enthalten kein Friabilin. Zwei Methoden wurden entwickelt: ein semiquantitativer Tauchstabtest und ein ELISA-Test (15).

5. Untersuchungsergebnisse der geprüften Methode

5.1. Einfluß der Trocknungstemperatur auf die quantitative Weichweizenbestimmung mit den verschiedenen Methoden

Jede geeignete Methode muß unabhängig von der angewandten Trocknungstemperatur einsetzbar sein, da die Trocknungstemperaturen bei der Untersuchung von unbekanntem Mustern nicht bekannt sind und auch die Trocknungsbedingungen während des Herstellungsprozesses variieren können. Wenn das nicht möglich ist, müssen alternative Methoden zur nachträglichen Bestimmung der Trocknungsbedingungen für das jeweilige zu untersuchende Muster entwickelt werden. Die Methoden wurden an Teigwaren getestet, die von der Firma Barilla hergestellt und bei Temperaturen von 60°C, 78°C/92°C und 100°C getrocknet wurden. Mit der isoelektrischen Fokussierung nach Resmini konnte Weichweizen in Teigwaren, die bei Temperaturen ab 100°C getrocknet wurden, nicht bestimmt werden. Daher hat man sich nach dem Juni 1991 mit dieser Methode nicht weiter beschäftigt. Die Immunbestimmung nach Paraf und Violle war in der Lage, den Weichweizenanteil mit Hilfe des Albumins Mb 0.28 bei allen Trocknungstemperaturen zu erfassen. Standard-Weichweizen-Kurven waren jedoch zwischen Teigwaren mit verschiedenen Trocknungstemperaturen nicht vergleichbar. Diese gleiche Kritik gilt auch für die andere Methode, z.B. die Elektrophorese und Quantifizierung der 1D- γ -Gliadinfraktionen, die HPLC der γ -Gliadine und den Immuntest auf Friabilin. Im allgemeinen nahm die Empfindlichkeit jeder Methode mit ansteigender Trocknungstemperatur ab. Die empfindlichste Methode bei diesen Vergleichsuntersuchungen waren die Immunbestimmung auf das Mb 0.28 Albumin und der Immuntest auf Friabilin; mit beiden Methoden konnte man Verfälschungen mit Weichweizen bis 3 % in Teigwaren feststellen, die bei 100°C getrocknet waren.

Mit der elektrophoretischen Methode versuchte man den Einfluß der Trocknungstemperatur dadurch auszuschalten, indem man die Teigwaren für 15 Minuten vor der Untersuchung kochte. Diese Handhabung war jedoch nur teilweise erfolgreich, da die Hintergrundabsorption

der bei 100°C getrockneten Teigwaren die Quantifizierung sehr schwierig gestaltete (Erfassung von höheren x-1D Gehalten bei der densitometrischen Messung).

In gleicher Weise lieferte bei der RP-HPLC Methode auf γ -Gliadine die gesamte Peakfläche des Chromatogramms, die aus einer bestimmten Menge Teigwaren extrahiert worden war, eine gewisse Identifizierung der thermischen Geschichte der Teigware, da die Trocknungstemperaturen direkt mit der gesamten Peakfläche des Chromatogramms korrelierten. Die RP-HPLC Erkennung der x-Gliadine war auch in hochtemperaturgetrockneten Teigwaren möglich. Die Ergebnisse waren mit den γ -Gliadinen vergleichbar. Ein großer Vorteil der RP-HPLC besteht darin, daß man sowohl die ω - als auch die γ -Gliadine zur Erkennung von Weichweizen in Durumteigwaren verwenden kann.

5.2. Spezifität und genetische Variationen

Im Juni 1991 wurde gefunden, daß die Spezifität der monoklonalen Antikörper, die sich auf das Albumin Mb 0.28 in Weichweizen bezieht, nicht nur in Weichweizensorten, sondern auch in einigen Durumweizensorten vorkommen kann. So fand man bei den Barilla-Mustern, die aus italienischen Durumweizensorten hergestellt worden waren, auch eine Reaktion mit monoklonalen Antikörpern auf der Basis von Mb 0.28 Protein. Obgleich es möglich sein muß, andere monoklonale Antikörper gegen Mb 0.28 Protein zu finden, die nicht mit Durumweizensorten reagieren, so wurde doch die Eignung von Mb 0.28 Protein als spezifischer Nachweis für Weichweizen in Durumweizenteigwaren in Frage gestellt.

Ein vergleichbares Problem kann auch bei dem Immuntest auf Friabilin eintreten. Der Gehalt an Friabilin ist in den meisten Weichweizen nahezu konstant. Es ist aber auch bekannt, daß einige Weichweizensorten deutlich niedrigere Gehalte dieser Protein-Fraktion enthalten. In neueren Untersuchungen über Lipid-Proteine (Marion, INRA-Nantes, Frankreich) konnte nachgewiesen werden, daß in einigen Sommerweizensorten von Weichweizen die drei elektrophoretischen Komponenten des Friabilins fehlen. Auch der Gehalt an ω -Gliadin und das weichweizenspezifische γ -Gliadin, das bei der RP-HPLC Methode bestimmt wird, variieren in verschiedenen Weichweizensorten, so daß eine quantitative Bestimmung mit diesen Methoden nicht in jedem Fall möglich ist.

Die immunchemische Bestimmung auf der Basis von γ -Gliadinen (M. Griffin) ist bis jetzt noch nicht abschließend untersucht worden. Antikörper gegenüber γ -Gliadinen, die aus hochtemperaturgetrockneten Teigwaren (100°C) extrahiert wurden, sind sehr vielversprechend. Die polyclonalen Antiseren reagieren nach einer Reinigung gegen Durumgliadine in allen Barilla-Proben, die mit Temperaturen über 60°C, 78/92°C und 100°C getrocknet wurden. Diese Methode hat jedoch in der vorliegenden Form die gleichen Probleme wie die RP-HPLC Methode, da die Genauigkeit mit steigenden Trocknungstemperaturen abnimmt und sie auch auf genetische Variationen im Weichweizen reagiert.

5.3. Interlaboratoriumsversuche

Mit drei Methoden (der Elektrophorese der x-Gliadine, der RP-HPLC Methode auf γ -Gliadine und dem Immuntest auf Friabilin) wurden zwei Interlaboratoriumsversuche durchgeführt. Beim ersten Versuch wurden die Barilla-Muster ausgetauscht, die jeweils für die Erarbeitung der

Standardkurven für jede Methode verwendet wurden. Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten, daß in den Bereichen 3 % - 5 % - 12 % - 15 % und 25 % Zusatz von Weichweizen sämtliche Methoden reproduzierbar waren und zu richtigen Ergebnissen führten, wenn die Teigwaren mit dem gleichen Weizen hergestellt wurden, wie bei der Aufstellung der Standardkurven. Unter diesen Umständen konnte die Sortenvariation nicht mit erfaßt werden.

In 1992 wurde ein zweiter Versuch durchgeführt, um insbesondere den Weichweizenzusatz im Bereich von 0-10 % zu erfassen. Hierbei wurden unbekannte Teigwaren mit geringen Zusätzen von Weichweizen untersucht, die bei Trocknungstemperaturen von 92+80°C und 100°C hergestellt worden waren. Zunächst wurden 10 unbekannte Proben (bezeichnet mit 1-10) von Dr. Landi im April 1992 zu sämtlichen Teilnehmern geschickt und im September 1992 folgten nochmals drei Muster (bezeichnet mit R, X und Y).

Tabelle 1: Untersuchungsergebnisse der drei Methoden im 1992 Interlaboratoriumstest (% Weichweizen)

1) Proben (April 1992) mit einer Trocknungstemperatur von 92+80°C (1) oder 100°C (2)

Methode:	Wirklicher Prozent-satz an Weichweizen (a)	A-PAGE ω -Gliadin (b)	RP-HPLC γ -Gliadine (c)	Rhône-Poulenc Rhône Poulenc (d)	Elisa Kit LGC (e)
Proben Nummer:					
1 (2)	3-4	1-2	6.2	2-3	2
2 (1)	1-2	0-1	2.5	1-2	3
3 (1)	9-10	4-5	8.4	7-8	13
4 (2)	0-1	2-3	4.0	0	0
5 (2)	4-5	1-3	6.6	4	2
6 (1)	6-7	3-4	6.1	7	10
7 (2)	9-10	3-4	7.8	6-7	4
8 (2)	1-2	2-3	< 3.0	1	1
9 (1)	0-1	0-1	0	0	1
10 (1)	4-5	1-2	4.8	5.6	7

2) Proben (September 1992) mit einer Trocknungstemperatur von 110°C)

Methode:	Wirklicher Prozent-satz an Weichweizen (a)	A-PAGE ω -Gliadin (b)	RP-HPLC γ -Gliadine (c)	Rhône-Poulenc Rhône Poulenc (d)	Elisa Kit LGC (e)
Proben Nummer:					
R	0	2	0	0	-
X	1.5	1-2	3	1-2	-
Y	4.5	2-3	4-6	3-4	-

(a) Ergebnisse von Dr. Landi (Barilla, Italien)

(b) Elektrophorese der ω -Gliadine: Laboratoire de Technologie des Céréales INRA, Montpellier, France (Dr. J.C. Autran)

(c) RP-HPLC der Gliadine: The Nottingham Trent University, Großbritannien (Prof. M. Griffin)

(d) Rhône-Poulenc Diagnostics Elisa Kit: analyses carried out by Rhône Poulenc, Glasgow, Großbritannien (Prof. W. Stimson and Mr. M. Bony)

(e) Rhône-Poulenc Diagnostics Elisa Kit: analyses carried out independently by Laboratory of Government Chemists, Middlesex, Großbritannien (Dr. I. Lumley)

An diesen Mustern wurden die bereits erwähnten drei Methoden getestet. Im Fall der Immunbestimmung wurden die Untersuchungen durch Rhône-Poulenc und, unabhängig davon, von Dr. I. Lumley (Laboratory of Government Chemists, Middlesex, UK) durchgeführt. Die Ergebnisse (%-Anteil von Weichweizen) der vier Untersuchungen sind in Tabelle 1 zusammengestellt worden (Tab. 1). Die Ergebnisse des zweiten Versuchs zeigten beachtliche Unterschiede zwischen den Methoden. Die ungenauesten Ergebnisse wurden bei den Teigwaren erhalten, die bei 110°C getrocknet worden waren:

- Obgleich im allgemeinen die Resultate im Trend richtig lagen und somit das wirkliche Bild widerspiegelten, tendierten die elektrophoretischen Methoden zur Quantifizierung von ω -Gliadin zu niedrigeren Weichweizenzugaben als die tatsächlichen Zugaben; hierdurch wurde die semi-quantitative Charakteristik dieser Methode bestätigt.
- Die RP-HPCL Methode ergab bei 8 Proben von 10 Proben das richtige Ergebnis; bei zwei Proben waren die Ergebnisse falsch (Muster 1 und 4).
- Die immunochemische Methode auf der Basis von Friabilin lieferte die besten Ergebnisse in den Rhône-Poulenc Laboratorien. Sämtliche Ergebnisse wichen nicht mehr als 1% vom Referenzwert ab. Nur bei Probe 7 wurde ein etwas geringerer Wert ermittelt. Wenn jedoch diese Analysen vom Laboratory of Government Chemists, Middlesex, Großbritannien, durchgeführt wurden, ergaben sich mehr Differenzen, obgleich im allgemeinen der richtige Trend bei den Ergebnissen feststellbar war.

5.4. Vergleich der Methoden im Laboratory of Government Chemists

Beim letzten Zusammentreffen der BCR Teigwaren-Arbeitsgruppe wurde vereinbart, daß das Laboratory of Government Chemists den Anteil von Weichweizen in 10 industriell hergestellten Teigwarenproben bestimmen soll und hierbei die drei von der Arbeitsgruppe ausgesuchten analytischen Methoden anwenden sollte. Diese Versuche wurden im Dezember 1993 und Januar 1994 durchgeführt.

5.4.1. Muster-Information

Die zehn Versuchsmuster wurden nach dem Zufallsprinzip von 1 bis 10 gekennzeichnet. Es waren Teigwaren, die von der Firma Barilla hergestellt wurden, verschiedene Anteile von Weichweizen enthielten und mit Trocknungstemperaturen von 92/80°C bzw. 100°C hergestellt worden waren.

5.4.2. Probenvorbereitung

Jede Probe wurde mit einem Starmix zerkleinert und in einem Plastikbehältnis bei Raumtemperatur aufbewahrt.

5.4.3. Analysenmethoden

Folgende Analysenmethoden wurden angewandt:

- Elektrophorese der α -Gliadine, basierend auf der Methode Autran,

- RP-HPLC der γ -Gliadine, basierend auf der Methode von Griffin und Barnwell,
- ELISA Durumweizenimmuntest des Proteins Friabilin, markiert durch Rhône-Poulenc Diagnostics.

Von jeder Probe wurde mit jeder Methode eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Kalibrierung der Methoden erfolgte anhand von Standardmustern, die von Barilla für die Arbeitsgruppe hergestellt worden waren. Die Untersuchenden waren über die Zusammensetzung der Proben nicht informiert.

5.4.4. Ergebnisse der Untersuchungen

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt worden.

5.4.5. Zusätzliche Informationen

5.4.5.1. Elektrophorese der α -Gliadine

Die drei mitgeteilten Ergebnisse wurden von getrennten Probenextrakten erhalten und an verschiedenen Tagen elektrophoretisch getrennt. Die Trocknungstemperatur der unbekanntem Teigwarenproben wurde aufgrund des elektrophoretischen Profils densitometrisch geschätzt und die entsprechenden Barilla-Standardproben für die Versuchskalibrierung verwendet. Für jeden Versuch wurden frische Standards hergestellt und die Probenextrakte mit demselben Gel elektrophoretisch getrennt. Acht und zehn Wiederholungen von einem Extrakt der Probe 7 wurden auf zwei Gelen elektrophoretisch getrennt, um die Reproduzierbarkeit der Peakhöhe durch die Laser-Densitometrie festzustellen. Der Variationskoeffizient betrug $\pm 7\%$.

5.4.5.2. RP-HPLC der ϵ -Gliadine

Die drei mitgeteilten Resultate wurden von verschiedenen Probenextrakten erhalten, und die chromatographische Bestimmung erfolgte an verschiedenen Tagen. Die Trocknungstemperatur der unbekanntem Teigwarenproben wurde aus der gesamten chromatographischen Peakfläche und den korrespondierenden Barilla-Standardmustern geschätzt, die für diese Versuche zur Kalibrierung zur Verfügung standen.

Die Präzipitation der Proteine verursachte bei einigen Probenextrakten analytische Probleme. Die Präzipitation der Proteine ist jedoch nur dann ein Problem, wenn die Extraktionsvorschrift nicht unterbrochen wird oder die Proben für eine zu lange Zeit aufbewahrt werden (z.B. 10 Stunden und mehr). Es konnte aufgezeigt werden, daß diese Methode bei einigen Proben ein "Null"-Resultat liefert, obwohl in den Proben Weichweizen enthalten war, z.B. bei den Proben 5, 7 und 10. Dieser Umstand kann durch die Proteinpräzipitation verursacht worden sein und durch den Verlust der chromatographischen Erfassung des niedrigen Gliadin-Peaks. Somit sind weitere Untersuchungen erforderlich.

5.4.5.3. Immuntest von Friabilin

Jedes mitgeteilte ELISA-Ergebnis ist der Mittelwert von 5 Messungen, die von 5 aliquoten Teilen jedes Musters erhalten wurden, die auf der Mikrotiter-Platte untersucht wurden. Die

Trocknungstemperatur der Teigware wurde aus den elektrophoretischen und HPLC Profilen geschätzt und den korrespondierenden Barilla-Standardmustern, die für diese Versuche für die Kalibrierung verwendet wurden.

Tabelle 2: Untersuchungsergebnisse von drei Methoden (Dezember 1993 - Januar 1994) im Laboratory of Government Chemists (Dr. I. Lumley)

1) Elektrophorese der ω -Gliadine

Barilla-Proben-Nr.	Ergebnisse %	Mittelwert %	Variation %	Tatsächlicher Anteil %	Trocknungstemperatur °C
1	6,5,3	5	3-6	3-4	100
2	2,1,1	1	1-2	1-2	92+80
3	10,12,9	10	9-12	9-10	92+80
4	0,0,0	0	0	0-1	100
5	0,4,4	3	0-4	4-5	100
6	7,6,7	7	6-7	6-7	92+80
7	11,8,4	8	4-11	9-10	100
8	3,3,0	2	0-3	1-2	100
9	1,3,0	1	0-3	0-1	92+80
10	3,5,8	5	3-8	4-5	92+80

2) RP-HPLC der γ -Gliadine

Barilla-Proben-Nr.	Ergebnisse %	Mittelwert %	Variation %	Tatsächlicher Anteil %	Trocknungstemperatur °C
1	3,3,0	2	0-3	3-4	100
2	0,0,0	0	0	1-2	92+80
3	11,12,12	12	11-12	9-10	92+80
4	0,0,0	0	0	0-1	100
5	5,4,0	3	0-5	4-5	100
6	7,8,8	8	7-8	6-7	92+80
7	7,4,0	4	0-7	9-10	100
8	0,0,0	0	0	1-2	100
9	0,0,0	0	0	0-1	92+80
10	5,4,0	3	0-5	4-5	92+80

3) Immuntest des Friabilin

Barilla-Proben-Nr.	Ergebnisse %	Mittelwert %	Variation %	Tatsächlicher Anteil %	Trocknungstemperatur °C
1	5,3,4	4	3-5	3-4	100
2	3,2,0	2	0-3	1-2	92+80
3	16,13,16	15	13-16	9-10	92+80
4	1,0,1	1	0-1	0-1	100
5	7,3,5	5	3-7	4-5	100
6	12,11,12	12	11-12	6-7	92+80
7	16,10,10	12	10-16	9-10	100
8	3,3,1	2	1-3	1-2	100
9	1,0,4	2	0-4	0-1	92+80
10	9,10,9	9	9-10	4-5	92+80

6. Schlußfolgerungen

Dieser Endbericht ist das Ergebnis sämtlicher Anstrengungen der Arbeitsgruppe, um neue Methoden für die Bestimmung von Weichweizen in Teigwaren zu entwickeln, die bei hohen Trocknungstemperaturen in der Teigwarenindustrie hergestellt werden.

Drei Methoden können als "brauchbar" eingestuft werden, wie der letzte Vergleich beweist. Auf der Basis dieser Ergebnisse (Tab. 2 - Mittelwert von Dreifachuntersuchungen) lieferte die Elektrophorese der α -Gliadine vielversprechende Ergebnisse mit keinem größeren Fehler im Vergleich zu den tatsächlichen Werten. Die RP-HPLC der γ -Gliadine lieferte Ergebnisse, die den allgemeinen Trend in der Probenzusammensetzung widerspiegelt, jedoch mit einigen zu niedrigen Werten im Anteil des vorhandenen Weichweizens, insbesondere bei Teigwaren, die bei 100°C getrocknet waren. Der Immuntest auf Friabilin war die sicherste Methode bei niedrigen Weichweizenanteilen in Teigwaren; er lieferte jedoch signifikante Abweichungen bei hohen Weichweizenkonzentrationen.

Wenn man jedoch Teigwarenproben mit unbekanntem Trocknungsbedingungen und auch unbekannter Rohstoffzusammensetzung untersuchen möchte, gibt es zur Zeit keine Methode, die für die Europäische Union als eine Referenzmethode vorgeschlagen werden kann. Jede Methode hat ihre eigenen Probleme im Hinblick auf bestimmte Ungenauigkeiten, wenn man den Anteil von Weichweizen in Durumteigwaren exakt erfassen möchte (Tab. 2).

Diese Methoden können akzeptiert werden, wenn man sie in Kombination einsetzt, da auf diese Weise einige Probleme, die mit der thermischen Geschichte der Proben und/oder ihrer genetischen Variation zusammenhängen, eliminiert werden. Auf der anderen Seite könnte man für die Zukunft zwei Methoden, die auf zwei genetisch verschiedenen Proteinmarkern basieren, gemeinsam einsetzen. Abweichend von anderen jüngeren Studien (27), können diese Methoden nur für Teigwarenproben empfohlen werden, die bei diesen Temperaturen getrocknet wurden und keine anderen Zusätze enthalten, wie Eiweiß, Sojaprotein, Milchprotein oder Spinat. Da die immunochemische Methode von Albumin Mb 0.28 weniger sensitiv bei anderen Proteinen ist, da sie auf einem Sandwich-ELISA basiert, leidet der Immuntest auf Friabilin große Probleme, wenn Ei-Albumin in der Teigware anwesend ist. Der Einfluß von wasserlöslichen Zutaten auf die RP-HPLC und die elektrophoretische Bestimmung kann vernachlässigt werden, da diese Methoden auf alkohollöslichem Protein basieren. Aber auch hier ist weitere Forschung notwendig.

Die schlußendliche Empfehlung kann nur sein, die Forschungsarbeiten fortzusetzen und zwar auf der Basis von verbesserten biochemischen Methoden oder auf der Basis von neuen Prinzipien, z.B. NIR und NIT (19,29). Um die Zielsetzung der möglichst exakten Bestimmung von Weichweizen in Teigwaren zu ermöglichen.

Tabelle 3: Bewertung der verschiedenen Methoden

Analysenmethode	Spezifität/ Weichweizen	unabhängig von der Sorte	unabhängig von 92°C von einer Trocknungstemperatur von 100°C	Methodengenauigkeit bei sehr geringen Anteil von Weichweizen	Bewertung der Methode
Elektrophorese der α -Gliadine	++				++
HPLC- γ -Gliadine	++		++		++
Immuno/Albumin 0.28	+	+	+	+/+	++
IEF-Albumine	++	++	+	++	++
Durumtest/Friabilin	++	+/+	+	++	++

(+ + + = sehr gut; + = gut; + = befriedigend)

7. Zusammenfassung

Im Zusammenhang mit der für den Binnenmarkt notwendigen Kennzeichnung von Teigwaren ist eine möglichst exakte Bestimmung zur Erfassung von Weichweizen in Teigwaren notwendig. Innerhalb einer BCR-Studie wurden fünf verschiedene Methoden hinsichtlich der Genauigkeit überprüft. Drei Methoden können als "brauchbar" eingestuft werden: Elektrophorese der ω -Gliadine, RP-HPLC der γ -Gliadine und Immuntest von Friabilin. Wenn man jedoch Teigwarenproben mit unbekanntem Trocknungsbedingungen und auch unbekannter Rohstoffzusammensetzung untersuchen möchte, gibt es zur Zeit keine Methode, die für die Europäische Union als eine Referenzmethode vorgeschlagen werden kann.

Literatur

- N.N.: Méthode officielle de détermination de la teneur en blé tendre dans les pâtes alimentaires et des semoules. - Journal Officiel de la République Française, 1975, 15. Jan.
- N.N.: Metodi ufficiali di analisi dei cereali: Riconoscimento e dosaggio degli sfarinati di frumento tenero negli sfarinati di frumento duro e nelle paste alimentari mediante focalizzazione ionica. - Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana, 1980, 5. Jan.
- Autran, J.-C., und J. Bonicel: Bestimmung von Weichweizen in hochtemperaturgetrockneten Teigwaren: Bestandsaufnahme und zukünftige Perspektiven. - Getreide Mehl und Brot 46 (1992) 7, S. 219-221
- Burgoon, A.C., H.S. Ikeda und S.N. Tanner: A method for detecting adulteration in durum wheat pasta by polyacrylamide gel electrophoresis. - Cereal Chemistry 62 (1985) 1, S. 72-74
- Cantagalli, P., S.E. Piazza und S. Sordi-Galli: Il controllo della genuinità delle semole di frumento duro e delle paste alimentari mediante analisi immunologica. - Tecnica molitoria 20 (1969) 3, S. 79-84
- Custot, F., R. Mezonnet und M. Caley: Différenciation des produits au blé dur et au blé tendre, semoules et pâtes alimentaires (Etude comparée des méthodes Metweef et Brogioni). - Ann. Fals. Exp. Chim. 59 (1966) 672, S. 300-316
- Feillet, P., und K. Kobrehel: Recherche et dosage des produits de blé tendre dans les pâtes alimentaires. par électrophorèse des protéines solubles. - Ann. Technol. agric. 21 (1972) S. 17-24
- Garcia-Olmedo, F. und R. Garcia-Faure: A new method for the estimation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) in pasta products. - Lebensm.-Wiss. u. Technol. 2 (1969) S. 94-96
- Gavin, M.: Weichweizennachweis im Hoch- (HT-) und Höchst- (HHT-) Temperatur getrockneten Teigwaren. - Getreide Mehl und Brot 43 (1989) 3, S. 76-78
- Greenwell, P. und J.D. Schofield: A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. - Cereal Chemistry 63 (1986) 4, S. 379-380
- Guilbot, A.: Untersuchungen über Sterolester im Getreide und ihre Bedeutung für die Unterscheidung von Durum- und Vulgare-Weizen. - Aktuelle Probleme über Durum und Teigwaren. Berichte auf der Durum- und Teigwaren-Tagung 1959 (1959) S. 101-114
- Hsieh, C.C., C.A. Watson und C.E. McDonald: Identification of campesteryl palmitate and sitosterol palmitate in wheat flour. - Journal of Food Science 45 (1980) S. 523-525
- Kobrehel, K., D. Agaga und J.C. Autran: Possibilité de détection de la présence de blés tendres dans les pâtes alimentaires ayant subi des traitements thermiques à haute température. - Ann. Fals. Exp. Chim. 78 (1985) S. 109-117
- Kobrehel, K. und P. Feillet: Détection et dosage des blés tendres dans les pâtes alimentaires. - Ann. Fals. Exp. Chim. 69 (1976) S. 47-55
- Mackay, E.L. und W. Stimson: Determination of adulteration of durum wheat with anti-friabilin monoclonal antibodies. - Eur. Pat. Appl. EP 540,432 (Cl.G01N33/569), 05 May 1993, GB Appl. 91/22,755,26 Oct. 1991; 12p.
- Matweef, M.: Détection des farines de blé tendre dans les semoules et les pâtes alimentaires. - C.R. Acad. Agric. Fr., 39 (1952) S. 658-663
- McCarthy, P.K., I.D. Lumley und M. Griffin: Discrimination between hexaploid and durum using anti-gliadin anti-sera. - In: Food Saf. Qual. Assur.: Appl. Immunoassay Syst., Pros., 1st, 1991. Ed.: M.R.A. Morgan, C.J. Smith und P.A. Williams. - London: Elsevier (1992) S. 411-416
- McCarthy, P.K., B.F. Scanlon, I.D. Lumley und M. Griffin: Detection and qualification of adulteration of durum wheat flour by flour from common wheat using reverse phase HPLC. - J. Sci. Food Agric. 50 (1990) S. 211-226
- McDonald, C., M. Sarwar, C. Bruns und G. Hareland: Bread wheat adulteration in durum wheat pasta. Detection by near-infrared (NIR) methods. 78th Annual Meeting A.A.C.C., Miami Beach, 3.7.10. 1993. - Cereal Foods World 38 (1993) S. 631 (Abstract)
- Piazza, S.E. und P. Cantagalli: Immunochemical analysis on soluble proteins of wheat. - Cereal Chemistry 46 (1969) 6, S. 642-646
- Piazza, S.E., G. Riparbelli, S. Sordi, P. Cantagalli, F. Pocchiari und V. Silano: Immunochemical characterization of specific albumins of bread wheat. - Cereal Chemistry 49 (1972) 1, S. 72-78
- Resmini, P.: Un nuovo metodo per identificare e dosare gli sfarinati di grano tenero presenti in quelli di grano duro e nelle paste alimentari. - Tecnica Molitoria 19 (1968) S. 145-168
- Resmini, P. und G. de Bernardi: Un metodo elettroforetico rapido per il riconoscimento ed il dosaggio di grano tenero mel grano duro, negli sfarinati e nelle paste alimentari. - Tecnica Molitoria 27 (1976) 10, S. 97-109
- M. Sarwar und C.E. McDonald: Detection of bread wheat farina adulterant in durum wheat semolina and pasta dried at low, high and ultra-high temperatures. - Cereal Chemistry 70 (1993) 4, S. 405-411
- Seibel, W.: Bestimmung von Weichweizen in Hartweizengrieß und Teigwaren. 1. Teil: Untersuchungsmethodik. - Getreide Mehl und Brot 44 (1990) 12, S. 363-366
- Seibel, W.: Bestimmung von Weichweizen in Hartweizengrieß und Teigwaren. 2. Teil: Praktische Anwendung. - Getreide Mehl und Brot 45 (1991) 1, S. 27-31
- Seibel, W.: Bestimmung von Weichweizen in Hartweizengrieß und Teigwaren. 3. Teil: Einsatz der isoelektrischen Fokussierung bei Teigwaren mit pflanzlichen und tierischen Zusätzen. - Getreide Mehl und Brot 47 (1993) 1, S. 57-58
- Seibel, W.: Bestimmung von Weichweizen in Hartweizengrieß und Teigwaren. 4. Teil: Nachweis mittels Dünnschichtchromatographie in hochtemperatur-getrockneten Teigwaren. - Getreide Mehl und Brot 47 (1993) 6, S. 40-44
- Seiler, W., und E. Walder-Trenka: Weizenqualität gleich Teigwarenqualität und Weichweizennachweis in Teigwaren mittels FT-NIR-Spektrometer, System NIRVIS. - Bericht über die Durum- und Teigwaren-Tagung 15, 1992 (1992) S. 47-67
- Stroh, R.: Neue Erfahrungen bei der elektrophoretischen Bestimmung von Weichweizen in Hartweizen-Mahlprodukten und Teigwaren. - Getreide Mehl und Brot 40 (1986) 11, S. 323-325