

Abschließender Sachbericht

Gluten-Away-Peptidasenpräparate zur Detoxifizierung zöliakieauslösender Lebensmittel

Leibniz-Einrichtung: Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie
Aktenzeichen: SAW-2011-DFA-1
Projektlaufzeit: 01.01.2011 bis 31.12.2013
Ansprechpartner: Prof. Dr. Peter Köhler

Ziel der Untersuchungen war es, Gluten in Lebensmitteln mit Hilfe von Peptidasen aus verschiedenen Quellen abzubauen und dabei die positiven Qualitätsmerkmale der Lebensmittel beizubehalten.

Zur Untersuchung des Abbaus von Gluten mit Hilfe glutenspezifischer Peptidasen wurden die folgenden Lebensmittel eingesetzt: Weizenstärke, Weizenkleie aus nativem und gekeimtem Getreide und Brottrunk. Zusätzlich wurden Roggensauerteig, eine Sauerteig-Starterkultur und Roggenmehl verwendet. Zur Behandlung von im Handel erhältlicher Weizenstärke wurden sowohl Peptidasen aus gekeimtem Getreide (Gerste, Weizen, Emmer) als auch AN-PEP eingesetzt. Alle weiteren Proben wurden ausschließlich mit wässrigen Lösungen von AN-PEP inkubiert. Zur Behandlung wurden die Proben nach Zusatz von Wasser mit verschiedenen Konzentrationen der Enzymlösungen bei definierten Bedingungen (pH 1 - 9, 4 - 90 °C, 10 min - 48 h) inkubiert, gefriergetrocknet und im Anschluss mittels eines kompetitiven ELISA mit dem R5-Antikörper auf verbliebenes Gluten untersucht. Um Gehalte von weniger als 20 mg Gluten pro kg abzusichern, wurde zusätzlich eine LC-MS Analyse (nach Verdau mit Chymotrypsin) durchgeführt. Auf diese Weise behandelte Lebensmittel wurden anschließend auf Veränderungen ihrer Zusammensetzung, sowie ihrer technologischen und sensorischen Eigenschaften, untersucht. Weizenstärke wurde auf in der Probe verbliebene Peptidase- und Amylaseaktivität geprüft, die thermischen Eigenschaften mittels dynamischer Differenzkalorimetrie und die Verkleisterungseigenschaften mittels Rotationsviskosimeter untersucht. Die Zusammensetzung von Weizenkleie wurde anhand der Gehalte an ernährungsphysiologisch wertvollen Ballaststoffen und Fولات analysiert, behandeltes Brottrunk mit dem unbehandelten Produkt anhand des sensorischen Profils verglichen. Mit AN-PEP inkubierte Roggenprodukte wurden zur Herstellung von glutenfreiem Brot eingesetzt. Dabei wurden das Brotvolumen, die Krumenfestigkeit und die sensorischen Eigenschaften als wertgebende Parameter untersucht.

Es wurde gezeigt, dass Enzyme aus gekeimtem Getreide eine genügend hohe Peptidasenaktivität aufweisen, um sowohl Gesamtgliadin als auch einzelne zöliakieaktive Peptide zu hydrolysieren. Diese Aktivität reicht jedoch nicht aus, um Gluten aus Lebensmitteln soweit zu entfernen, dass sie als glutenfrei bezeichnet werden dürfen. Dieses Ziel kann jedoch mit dem kommerziell erhältlichen AN-PEP erreicht werden. Getränke mit einem Glutengehalt von bis zu 223 mg/kg, Weizenstärke mit bis zu 2 000 mg/kg und sogar Weizenkleie mit einem Gehalt von über 100 000 mg Gluten/kg wurden durch AN-PEP in einem breiten Bereich von pH-Werten und Temperaturen detoxifiziert. Es zeigte sich, dass die Peptidasebehandlung keine nachteiligen Auswirkungen auf die Qualität der Produkte hatte. Davon ausgenommen waren die Verkleisterungseigenschaften der Weizenstärke. Die Peptidasebehandlung hatte keinerlei negative Auswirkungen auf die Eigenschaften der Weizenkleie, da die Gehalte wertvoller Nährstoffe (Ballaststoffe, Folate) nicht beeinflusst wurden. Kleie aus gekeimtem Getreide wies im Vergleich zu herkömmlicher Kleie einen erhöhten Gehalt an Ballaststoffen (1,5-fach) und insbesondere an Fولات (20-fach) auf und kann daher als glutenfreies Lebensmittel gesehen werden, das für Zöliakiebetreffende einen zusätzlichen Gesundheitswert bietet. Auch die sensorische Analyse von Brottrunk zeigte keine negativen Auswirkungen der Behandlung. Nach Optimierung der Rezeptur war es möglich, aus peptidasebehandeltem Roggenmehl und Eiweiß ein glutenfreies Brot auf Roggenbasis herzustellen. Die sensorischen Untersuchungen zeigten, dass die Qualität zwar hinter konventionellem Roggenbrot zurückblieb, im Vergleich zu einem glutenfreien Brot aus den zöliakieverträglichen Rohstoffen Buchweizen, Reis und Mais hinsichtlich Textur, Aroma und Geschmack jedoch deutlich besser bewertet wurde. Das Ziel des Vorhabens wurde erreicht.

Projekt Nr.: SAW-2011-DFA-1

Antragstellende Leibniz-Einrichtung: Deutsche Forschungsanstalt für
Lebensmittelchemie

Angewandte Förderlinie: 1 Qualitätssicherung

Thema des Vorhabens: Gluten-Away - Peptidasenpräparate zur Detoxifizierung
zöliakieauslösender Lebensmittel

Berichtszeitraum/Förderzeitraum insgesamt: 1.1.2011 - 31.12.2013/1.1.2011 -
31.12.2013

Projektprofil: Einzelantrag

Ausgangslage und Zielsetzung. Ziel der Untersuchungen war es, Gluten in
Lebensmitteln mit Hilfe von Peptidasen aus verschiedenen Quellen abzubauen und
dabei die positiven Qualitätsmerkmale der Lebensmittel beizubehalten.

Material und Methoden. Für die Untersuchungen wurden zunächst acht
verschiedene Getreidearten und -sorten (Dinkel, Einkorn, Emmer, Gerste, Hafer,
Mais, Roggen und Weizen) bei 15 und 25 °C für 7 Tage gekeimt, anschließend
geschrotet, gefriergetrocknet und zu Mehl und Kleie vermahlen. Die Kleie, in der die
Peptidasen angereichert waren, wurde anschließend auf ihre spezifische
Peptidasenaktivität gegenüber Gluten untersucht. Als Substrate wurden zu diesem
Zweck selbst isoliertes Gliadin der Weizensorte Cubus sowie die als zöliakieaktiv
bekannten Peptide PQQQLPYPQQQLPY aus α -Gliadin und
SQQQFPQQPFPQQP aus γ -Hordein eingesetzt. Mittels RP-HPLC und Messung
bei 210 nm, wurden die Aktivitäten über die Abnahme der Absorptionsflächen der
Substrate nach Inkubation als prozentualer Abbau berechnet. Die nach Keimung
aktivsten Getreidesorten wurden bezüglich ihrer Peptidasenaktivitäten anschließend
mit einem im Handel erhältlichen Präparat verglichen, einer Prolylendopeptidase aus
Aspergillus niger, („AN-PEP“). Dieses wird direkt in die Fermentationslösung des
Mikroorganismus abgeschieden und kann so preisgünstig in hohen Mengen und
hoher Reinheit gewonnen werden. Das Enzym hat sein pH-Optimum im sauren pH-
Bereich. Die Aktivität von AN-PEP wurde gegenüber den drei genannten Substraten
ermittelt.

Als Rohmaterialien zum Abbau von Gluten in Lebensmitteln wurden drei
verschiedene Weizenstärken (zwei selbst isoliert und eine im Handel erhältlich), drei

Weizenkleien (eine aus gekeimten und eine aus ungekeimten Weizenkörnern, eine im Handel erhältliche Probe), Brottrunk und Roggenprodukte (Mehl, verschieden lange fermentierte Sauerteige) eingesetzt. Diese wurden zunächst mit Hilfe eines kompetitiven ELISA mit dem R5-Antikörper auf ihre Glutengehalte untersucht. Anschließend wurden die Proben mit den Enzymen für Zeiträume zwischen 4 und 48 h bei pH-Werten zwischen 1,0 und 9,0 und Temperaturen zwischen 4 und 90 °C inkubiert. Danach wurde überprüft, wie viel Gluten abgebaut worden war.

Zuletzt wurden die Eigenschaften der durch die Enzymbehandlung glutenfrei gewordenen Produkte untersucht und deren Eigenschaften mit denen der Ausgangsprodukte verglichen. Dafür wurde Weizenstärke auf ihre thermischen und Verkleisterungseigenschaften untersucht, während bei Weizenkleie die Gehalte an Folsäure und Ballaststoffen ermittelt wurden. Glutenfreies Roggenbrot auf Basis behandelter Rohstoffe wurde mit glutenthaltigem Brot und Brot aus natürlicherweise glutenfreien Rohstoffen bezüglich seiner sensorischen und backtechnischen Eigenschaften untersucht und verglichen.

Ergebnisse und Diskussion. Die Kleien, die nach Keimung der Getreide Emmer (Sorte Osiris), Gerste (Sorte Marthe) und Weizen (Sorte Winnetou) erhalten wurden, wiesen gegenüber den Substraten Gliadin und PQPQLPYPQPQLPY die höchsten Peptidaseaktivitäten auf, allerdings waren diese im Vergleich zu AN-PEP deutlich niedriger. Die Peptidasepräparate aus gekeimtem Getreide wiesen bis zu 60 U/kg Getreide auf, während AN-PEP mit 7×10^6 U/kg Präparat eine um ein Vielfaches höhere Aktivität zeigte.

Die verwendeten Lebensmittel hatten teilweise sehr hohe Glutengehalte, in einer Weizenkleie wurden sogar Gehalte über 10 % (>100.000 mg/kg) gefunden.

Bei der Untersuchung des Abbaus von Gluten in Lebensmitteln durch die verwendeten Enzympräparate zeigte sich schnell, dass lediglich das im Handel erhältliche AN-PEP in der Lage war, Gluten weitgehend abzubauen. Enzyme aus gekeimtem Getreide reduzierten den Glutengehalt in einer Weizenstärke mit vergleichsweise niedrigen 175 mg Gluten/kg zwar deutlich, Konzentrationen unterhalb des gesetzlich festgelegten Grenzwertes wurden jedoch nicht erreicht. Deshalb wurde für alle weiteren Proben ausschließlich AN-PEP verwendet. Dieses wurde in verschiedenen Konzentrationen von bis zu 500 mg/mL eingesetzt und baute Gluten in Weizenstärken mit Gehalten von bis zu 2.000 mg Gluten/kg, in Weizenkleie mit Gehalten über 100.000 mg Gluten/kg, in Roggenprodukten mit Gehalten über 80.000 mg Gluten/kg und in Brottrunk mit ca. 80 mg Gluten/kg bis unter den Grenzwert von 20 mg/kg ab. Lediglich in einer Weizenkleie war es trotz 72-stündiger Inkubation mit AN-PEP Konzentrationen von bis zu 750 mg/mL nicht möglich, die Glutenkonzentration unter den Grenzwert abzusenken.

Die Untersuchung der Qualitätsmerkmale der behandelten Weizenstärken zeigte, dass in den Produkten weder Peptidase- noch Amylaseaktivität nachweisbar war. Somit reichte der durchgeführte Waschschrift aus, um das Enzym nach der Inkubation vollständig zu entfernen. Die Verkleisterungstemperatur der peptidasebehandelten Stärken war im Vergleich zu den Edukten leicht erhöht, während die Viskosität deutlich abnahm. Dieser Effekt war jedoch bei den über einen längeren Zeitraum (24 h) behandelten Stärken deutlich ausgeprägter als bei den kürzer inkubierten (4 h) und könnte durch kürzere Inkubationszeiten und höhere Enzymkonzentrationen verringert werden. In Weizenkleie wurden keine negativen Effekte der Behandlung mit AN-PEP festgestellt. Die Gehalte an Folsäure und Ballaststoffen waren bei behandelten und nicht behandelten Kleieproben nahezu gleich. Kleie aus gekeimten Weizenkörnern zeigte einen durch die Keimung deutlich erhöhten Gehalt an Ballaststoffen und vor allem an Folsäure (Steigerung um Faktor 10 auf über 400 µg/100g). Modellversuche zur Herstellung von glutenfreiem Brot aus peptidasebehandeltem Roggenmehl zeigten positive Ergebnisse. Obwohl noch sensorische Defizite im Vergleich zu einem glutenhaltigen Brot aus Weizen vorlagen, wurde das glutenfreie Roggenbrot im Vergleich zu einem Brot aus zöliakieverträglichem Buchweizen, Reis und Mais von einem Sensorikpanel besser bewertet.

Schlussfolgerung. Es wurde gezeigt, dass Kleie von gekeimtem Getreide eine genügend hohe Peptidasenaktivität aufweist, um sowohl Gesamtgliadin als auch einzelne zöliakieaktive Peptide zu hydrolysieren. Diese Aktivität reicht jedoch nicht aus, um Gluten aus Lebensmitteln soweit zu entfernen, dass sie als glutenfrei bezeichnet werden dürfen. Dieses Ziel kann jedoch mit dem kommerziell erhältlichen AN-PEP erreicht werden. AN-PEP baut Gluten in Weizenstärke, Weizenkleie, Roggenmehl, Sauerteigen und Brottrunk vollständig ab, ohne ihre positiven Eigenschaften zu verändern. Wird Kleie aus gekeimtem Getreide mit AN-PEP behandelt, kann daraus ein glutenfreies Produkt mit außerordentlich gutem Nährwert gewonnen werden. Glutenfreies Brot aus behandeltem Roggenmehl wird sensorisch positiver bewertet als glutenfreies Brot aus Zutaten, die von Natur aus glutenfrei sind. Die behandelten glutenfreien Produkte können als Rohmaterialien für die Produktion von glutenfreien Lebensmitteln hoher Qualität eingesetzt werden. Das Ziel des Vorhabens wurde erreicht.

Veröffentlichungen

1. „Studies on the gluten-specific peptidase activity of germinated grains from different cereal species and cultivars“, Schwalb T, Wieser H, Koehler P (2012) Eur Food Res Technol 235: 1161-1170
2. "Gluten-specific peptidase activity of different cereal species and cultivars induced by germination." Schwalb T, Wieser H, Köhler P (2011) Proceedings of the 25rd Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity 2011: 55-59.
3. "Keimungsinduzierte glutenspezifische Peptidasenaktivität verschiedener Getreidearten und -sorten." Schwalb T, Wieser H, Köhler P (2011) Jahresbericht der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie 2011: 108-111
4. "Enzymatischer Abbau von Gluten in Weizenstärke." Walter T, Wieser H, Köhler P (2013) Jahresbericht der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie 2013

Externe Veranstaltungen - Präsentationen

- 10/2013 "Studies on the Degradation of Gluten with Peptidases from Different Sources"
T. Walter, H. Wieser, P. Köhler
27th Meeting of Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity, Darmstadt
- 10/2013 "Studies on the Degradation of Gluten with Peptidases from Different Sources"
T. Walter, H. Wieser, P. Köhler
AACC International Annual Meeting 2013, Albuquerque, New Mexico, USA
- 03/2013 "Detoxification of Gluten-Containing Raw Materials by Proline-Specific Peptidases"
T. Schwalb, H. Wieser, P. Köhler
2. Frühjahrstagung des Weihenstephaner Instituts für Getreideforschung (WIG), Freising
- 02/2013 "Comparative Studies on the Degradation of Gluten with Peptidases From Different Sources"
T. Schwalb, H. Wieser, P. Köhler
Lebensmittelchemische Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Regionalverband Bayern, Arbeitstagung 2013, Oberschleißheim
- 12/2012 „Vergleichende Untersuchungen zum Abbau von Gluten mit Peptidasen aus verschiedenen Quellen“
T. Schwalb, H. Wieser, P. Köhler
Arbeitsgemeinschaft Getreideforschung, Ausschuss für Getreidechemie, Bielefeld
- 06/2012 „Keimungsinduzierte glutenspezifische Peptidasenaktivität verschiedener Getreidearten und -sorten“
T. Schwalb, V. Knorr, H. Wieser, P. Köhler
63. Tagung für Getreidechemie, Detmold
- 05/2012 „Gluten-Specific Peptidase Activity of Different Cereal Species and Cultivars Induced by Germination“
T. Schwalb, V. Knorr, H. Wieser, P. Köhler
11th European Young Cereal Scientists and Technologistst Workshop (EYCSTW), Barcelona, Spanien
- 03/2012 „Untersuchungen zum Nachweis von Gluten in Lebensmitteln für Zöliakie-Betroffene“
T. Schwalb, S. Berger, P. Köhler, H. Wieser
1. WIG-Tagung, Freising

- 11/2011 „Gluten-Specific Peptidase Activity of Different Cereal Species and Cultivars Induced by Germination”
T. Schwalb, V. Knorr, H. Wieser, P. Köhler
6th European Symposium on Enzymes in Grain Processing (ESEGP6),
Kopenhagen, Dänemark
- 09/2011 „Gluten-Specific Peptidase Activity of Different Cereal Species and Cultivars Induced by Germination”
T. Schwalb, H. Wieser, P. Köhler
25th Meeting of Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity, Stuttgart

Externe Veranstaltungen - Poster

- 06/2013 „Comparative studies on the degradation of gluten with peptidases from different sources“
T. Schwalb, V. Knorr, H. Wieser, P. Köhler
Third International Symposium on Gluten-Free Foods and Beverages, Wien,
Österreich
- 04/2013 „Comparative Studies on the Degradation of Gluten with Peptidases from Different Sources “
T. Schwalb, H. Wieser, P. Köhler
Institut für Getreideverarbeitung, 19. Internationale wissenschaftliche Tagung
„Potenziale pflanzlicher Proteine“, Nuthetal
- 09/2012 „Zöliakiespezifische Peptidasenaktivität von Spezialmalzen zur Herstellung von glutenfreiem Bier“
V. Knorr, T. Schwalb, H. Wieser, P. Köhler
41. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Münster
- 03/2012 „Zöliakie: Analytik und Technologie glutenfreier Lebensmittel“
T. Schwalb, V. Knorr, B. Gessendorfer, H. Wieser, P. Köhler
1. WIG-Tagung, Freising

Interne Veranstaltungen - Präsentationen

- 03/2013 “Detoxification of Gluten-Containing Raw Materials by Proline-Specific Peptidases”
T. Schwalb, H. Wieser, P. Köhler
Mitgliederversammlung des Vereins der Förderer des Hans-Dieter-Belitz-Institutes
für Mehl- und Eiweißforschung, Freising
- 03/2012 “Gluten-Specific Peptidase Activity of Different Cereal Species and Cultivars Induced by Germination”
T. Schwalb, V. Knorr, H. Wieser, P. Köhler
Mitgliederversammlung des Vereins der Förderer des Hans-Dieter-Belitz-Institutes
für Mehl- und Eiweißforschung, Freising
- 01/2012 “Gluten-Specific Peptidase Activity of Different Cereal Species and Cultivars Induced by Germination”
T. Schwalb, H. Wieser, P. Köhler
Wissenschaftlicher Beirat und Stiftungsrat der Deutschen Forschungsanstalt für
Lebensmittelchemie, Freising