

Jahresbericht 2004

Inhaltsverzeichnis

1. Struktur und Funktion niedermolekularer Lebensmittelinhaltsstoffe

- 1.1 Aroma und Geschmack (Genusswert) als Qualitätsparameter
 - 1.1.1 Selektion und Charakterisierung von "Aromahefen" zur Verbesserung des Weizenbrotaromas
 - 1.1.2 Untersuchungen zur Bildung des typischen kuhstallartigen Fehlparomas in weißem Pfeffer (*Piper nigrum* L.)
 - 1.1.3 Aromastoffe in rohem und gekochtem Schafffleisch
 - 1.1.4 Einfluss von hohem hydrostatischem Druck und erhöhter Temperatur auf die Bildung von Aromastoffen aus der *Maillard*-Reaktion
 - 1.1.5 Zum Vorkommen des intensiven Aromastoffes 3-Mercapto-2-methylpentanol in rohen und verarbeiteten *Allium*-Arten
 - 1.1.6 Charakterisierung adstringierend schmeckender Schlüsselsubstanzen in schwarzem Tee
 - 1.1.7 Struktur/Aktivitäts-Zusammenhänge für die geschmacksverstärkende Wirkung von Alapyridain
- 1.2 Techno-funktionelle Eigenschaften von Lebensmittelinhaltsstoffen
 - 1.2.1 Einfluss des Phosphorsäurederivates auf die funktionellen Eigenschaften von Phospholipiden
 - 1.2.2 Einfluss von Mehlerbesserungsmitteln auf die Konzentration von Dityrosin in Weizenmehl und Weizenteig
 - 1.2.3 Herstellung von Folien aus Weizenkleber nach Modifizierung durch Wärme und Hochdruckbehandlung

2. Entwicklung spezieller Analysenverfahren

- 2.1 Das "Buccal Odor Screening System" (BOSS) als neues analytisches Tool zur Charakterisierung oraler Aromastoffpersistenz in vivo
- 2.2 Simultane Bestimmung von Folsäure und Pantothenensäure in mit Vitaminen angereicherten Lebensmitteln durch Stabilisotopenverdünnungsanalysen
- 2.3 Stabilisotopenverdünnungsanalysen bestätigen den schnellen Abbau des Mykotoxins Patulin im menschlichen Organismus
- 2.4 Quantifizierung von Ochratoxin A in Lebensmitteln durch Stabilisotopenverdünnungsanalyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie
- 2.5 Entwicklung eines Extraktionsverfahrens für die quantitative Bestimmung von Gluten mittels ELISA

3. Struktur/Wirkungsbeziehungen bei Biopolymeren

- 3.1 Fraktionierung von Weizenmehl mit nicht-wässrigen Systemen: Optimierung der Methode und Bestimmung der Proteinzusammensetzung der Fraktionen
- 3.2 Identifizierung einer Ferulasäure-Tyrosin-Verknüpfung zwischen Arabinoxylanen und Getreideproteinen
- 3.3 Einfluss der atmosphärischen Kohlendioxid-Konzentration auf die quantitative Proteinzusammensetzung des Weizenkorns
- 3.4 Entwicklung und Charakterisierung von transgenem Weizen ohne α -Gliadine

- 3.5 Untersuchungen über die saure und enzymatische Desamidierung von Glutamin in α -Gliadinen
 - 3.6 Aufklärung der Bildungsmechanismen von Acrylamid
4. **Physiologie**
- 4.1 Identifizierung und funktionelle Expression von olfaktorischen Rezeptoren mit Spezifität für 2,3-Diethyl-5-methyl- und 2-Isopropyl-3-methoxypyrazin
 - 4.2 In vivo Untersuchungen zum Metabolismus des Monoterpens Pulegon in Menschen - Erklärung der Toxizitätsunterschiede von (S)-(-)- und (R)-(+)-Pulegon
 - 4.3 Aktivitäts-orientierte Identifizierung von N-Methylpyridinium, einer chemopräventiv wirksamen Verbindung im Kaffeegetränk
 - 4.4 Ernährungsabhängige Anreicherung von *Maillard*-Reaktionsprodukten in der Ratte
 - 4.5 Aus Brotkruste isolierte *Maillard*-Reaktionsprodukte binden an den Rezeptor für "Advanced Glycation End Products" (RAGE) in den Nieren, werden aber nach alimentärer Aufnahme sowohl von gesunden als auch von 5/6 nephrektomierten Ratten mit dem Urin ausgeschieden
 - 4.6 Genotoxizität und Mutagenität von Melanoidinen isoliert aus einem gerösteten Glucose-Glycin-Modell in humanen Lymphozyten, intestinalen Cacao-2-Zellen und in den Salmonella typhimurium-Stämmen TA98 und TA102
 - 4.7 Zöliakiespezifische immunologische und toxikologische Untersuchungen von HMW-Untereinheiten des Weizens
5. **Tabellenwerk zum Nährstoffgehalt von Lebensmitteln**
- 5.1 Vitamin- und Mineralstoffgehalt pflanzlicher Lebensmittel
 - 5.2 Update der Online-Version der SFK-Datenbank
-

Zusammenfassungen

- 1. **Struktur und Funktion niedermolekularer Lebensmittelinhaltsstoffe**
 - 1.1. **Aroma und Geschmack (Genusswert) als Qualitätsparameter**
 - 1.1.1. **Selektion und Charakterisierung von "Aromahefen" zur Verbesserung des Weizenbrotaromas**

Ausgangslage: Weizenbrot zeichnet sich durch eine hohe Qualität aus, die insbesondere auf das attraktive Aroma der Krume und Kruste zurückzuführen ist. Untersuchungen zu diesem wichtigen Qualitätskriterium haben gezeigt, dass unter den 300 flüchtigen Verbindungen von Weizenbrot nur eine geringe Anzahl von Verbindungen für das Krusten- und Krumenaroma verantwortlich ist. Als Quellen der Aromastoffe wurden zum einen das Weizenmehl, das bereits eine Reihe der wertgebenden Krumen- und Krustenaromastoffe enthält, sowie die Bäckerhefe und der Backprozess, durch die Aromastoffe aus geruchlosen Vorstufen durch enzymatische bzw. thermisch induzierte Reaktionen freigesetzt werden, erkannt. Bisher ist jedoch nur unzureichend geklärt, ob Hefestämme aufgrund spezifischer Stoffwechselleistung charakteristische Aromen in Weizenteigen bilden und sich der Einsatz solcher Teige bei der Brotherstellung auf das Aroma des Endproduktes Brot auswirkt.

Forschungsziel: Selektion von Hefestämmen, die zur Bildung charakteristischer Teigaromen befähigt sind, Identifizierung der für die Aromen verantwortlichen Aromastoffe und Untersuchung des Einflusses solcher Teige auf das Krumen- und Krustenaroma von Weizenbrot.

Ergebnis: In sensorischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Hefestämmen zur Bildung charakteristischer Weizenteigaromen befähigt sind. Am Beispiel zweier Teige, die mit Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) und *Dekkera bruxellensis* fermentiert wurden, wurde gezeigt, dass beide Hefen signifikant unterschiedliche Aromen generierten. Während die Bäckerhefe ein typisch hefeteigartiges Aroma produzierte, dominierte im *Dekkera*-Teig eine intensiv-fruchtige Note. Durch Anwendung der Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse, Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse und Berechnung der Aromawerte konnten die Unterschiede in den Teigaromen insbesondere auf die beiden fruchtig riechenden 2-Methylbuttersäure- und Methylpropansäureethylester zurückgeführt werden, die durch *Dekkera bruxellensis* in hohen Mengen gebildet wurden. In Backexperimenten wurde der Nachweis erbracht, dass die charakteristische Note des *Dekkera*-Teiges in die Weizenbrotkrume transferiert werden kann. Die Ergebnisse zeigen, dass es in Zukunft möglich ist, das Brotaroma durch den Einsatz von Teigen, die aufgrund der spezifischen Stoffwechselleistung selektionierter Hefen charakteristische Aromanoten aufweisen, gezielt beeinflusst und somit die Qualität von Weizenprodukten gesteigert werden kann.

1.1.2. Untersuchungen zur Bildung des typischen kuhstallartigen Fehlaromas in weißem Pfeffer (*Piper nigrum* L.)

Ausgangslage: Weißer Pfeffer zeigt häufig ein an Kuhstall erinnerndes, fäkalartiges Fehlaroma, das bei der Verwendung derartigen Pfeffers zur Lebensmittelherstellung auf das Endprodukt übergehen kann. Für dieses Fehlaroma werden 3-Methylindol (3MI) und 4-Methylphenol (4MP) verantwortlich gemacht. Bisher blieb jedoch unklar, ob 3MI und 4MP generell für das charakteristische Fehlaroma von weißem Pfeffer verantwortlich sind und ob ggf. weitere Verbindungen daran beteiligt sind. Außerdem war nicht bekannt, ob 3MI und 4MP nur in Ausnahmefällen in weißem Pfeffer auftreten oder ob sie typische Inhaltsstoffe darstellen, ob ihre Konzentrationen von der geographischen Herkunft abhängen und ab welchen Konzentrationen sie sensorisch wirksam werden. Auch war unklar, wie 3MI und 4MP entstehen, bzw. auf welchem Wege sie in den weißen Pfeffer gelangen.

Forschungsziel: 1) Screening aromaaktiver Verbindungen in weißem Pfeffer mit ausgeprägtem Fehlaroma, 2) Quantifizierung der Fehlaromastoffe, insbesondere 3MI und 4MP, in einer repräsentativen Zahl kommerzieller Proben unterschiedlicher Herkunft, 3) Bestimmung ihrer Durchbruchsschwellen, sowie 4) ihres Ursprungs.

Ergebnis: 3MI (fäkalisch, schweineartig) und 4MP (fäkalisch, pferdeartig) konnten als wesentliche Verursacher des charakteristischen kuhstallartigen Fehlaromas bestätigt werden. Darüber hinaus spielen 3-Methylphenol (3MP; phenolisch) und Buttersäure (BS; käsig) eine Rolle. 3MI, 4MP, 3MP und BS sind, unabhängig vom Ursprungsland, derzeit als typische Inhaltsstoffe von weißem Pfeffer zu betrachten. Ihre Konzentrationen zeigten im Allgemeinen nur geringe Schwankungsbreiten und lagen deutlich über ihren Durchbruchsschwellen. Eine Bildung von 3MI, 4MP, 3MP und BS bei der Lagerung von weißem Pfeffer konnte nicht nachgewiesen werden. Stattdessen beruht die häufig beobachtete Intensivierung des Fehlaromas bei der Lagerung offensichtlich auf einem Verlust wertgebender Aromastoffe, wodurch der Fehlgeruch stärker hervortritt. Die Gehalte von 3MI, 4MP, 3MP und BS in schwarzem und in frischem Pfeffer lagen deutlich unter denen in weißem Pfeffer, was darauf hindeutet, dass die fermentative Entfernung der äußeren Perikarpschichten der wesentliche Schritt für die Bildung von 3MI, 4MP, 3MP und BS sein könnte.

1.1.3. Aromastoffe in rohem und gekochtem Schafffleisch

Ausgangslage: Obwohl die Aufzucht der genügsamen Schafe z.B. zur Bewirtschaftung von Brachflächen wünschenswert wäre, ist die Akzeptanz von Schafffleisch aufgrund seines charakteristischen "Hammel"-Geruchs gering. Da Konzepte der molekularen Sensorik (AEDA, Odor Activity Values) bisher kaum bei der Erfassung wichtiger Aromastoffe im Schafffleischaroma angewendet wurden, sind Daten zu wichtigen Aromastoffen und insbesondere zur Ursache des tierartspezifischen Geruches sehr lückenhaft.

Forschungsziel: Durch Anwendung der Aromaextraktverdünnungsanalyse sowie quantitativer Messungen an rohem und gekochtem Schafffleisch sollte neben der Frage nach den wichtigen Aromastoffen in beiden Materialien geklärt werden, (i) welche Aromastoffe bei der Verarbeitung neu gebildet werden und (ii) welche bereits im rohen Fleisch vorliegen.

Ergebnis: Durch Anwendung der Aromaextraktverdünnungsanalyse auf Aromadestillate aus rohem und gekochtem Schafffleisch und anschließende Identifizierungsexperimente konnten 4-Ethyl-octansäure (hammelartig), trans-4,5-Epoxy-(E)-2-decenal (metallisch), (Z)-1,5-Octadien-3-on (geranienartig) und (E,E)-2,4-Decadienal (nach Frittierfett) als wichtigste Aromastoffe in gekochtem sowie auch bereits in rohem Fleisch identifiziert werden. Die durch quantitative Messungen bestätigten Ergebnisse zeigten erstmalig, dass wichtige Fleischaromastoffe bereits in rohem Fleisch vorliegen und nicht erst beim Kochen entstehen. Andere Aromastoffe, wie 2-Acetyl-1-pyrrolin und 4-Hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanon, gehen andererseits beim Kochprozess klar aus Precursoren hervor. Stabilisotopenassays zeigten überraschenderweise, dass 4-Ethyl-octansäure im nicht-erhitzten, intramuskulären Fett höher war als im Fettgewebe. Dieser Aromastoff, der als Verursacher des "Hammel"-Aromas angenommen wird, kann somit nicht durch Entfernung des Fettes vollständig vermieden werden. Der Kochprozess veränderte die Mengen der Säure kaum. Im ungekochten Fettgewebe waren dagegen 4,5-Epoxy-(E)-2-decenal und weitere Lipidabbauprodukte die wichtigsten Aromastoffe.

1.1.4. Einfluss von hohem hydrostatischem Druck und erhöhter Temperatur auf die Bildung von Aromastoffen aus der *Maillard*-Reaktion

Ausgangslage: Hohe hydrostatische Drücke bis zu 1000 MPa werden seit ca. 10 Jahren als Alternative zur Pasteurisation eingesetzt, um thermische Belastungen bei bestimmten Lebensmitteln, z.B. Fruchtsäften, zu vermeiden. Da bei vielen Lebensmitteln das charakteristische Aroma aber erst durch die thermische Behandlung entsteht, müssen geeignete Temperatur-Druckregime erarbeitet werden, um das typische Aroma der Lebensmittel trotz Druckbehandlung zu generieren. Daten zum Einfluss von Druck und Temperatur auf die Aromabildung liegen aber bisher in der Literatur nicht vor.

Forschungsziel: Die thermische Aromabildung aus der *Maillard*-Reaktion von Prolin und Glucose wurde an der DFA in den vergangenen Jahren intensiv untersucht. Ziel der im vergangenen Jahr durchgeführten Arbeiten war es, den Einfluss von Hochdruck und Temperatur auf das Aromastoffspektrum in diesem Modell zu untersuchen und erste Einblicke in veränderte Reaktionsabläufe zu gewinnen.

Ergebnis: Durch Anwendung der Aroma-Extraktionsanalyse auf Aromadestillate aus einer wässrigen, thermisch behandelten Prolin/Glucose Mischung (90 min, 100 °C) bestätigten unsere früheren Daten, wonach 2-Acetyl-1-pyrrolin (ACPY, röstig) und 2-Acetyltetrahydropyridin (ACTHP, röstig) als wichtigste Aromastoffe gebildet werden. Wurde die gleiche Reaktion unter Hochdruck (650 MPa) durchgeführt, so veränderte sich das Gesamtaroma signifikant von röstig nach karamellartig. Der Grund dafür war die stark reduzierte Bildung von ACPY und ACTHP, wohingegen u.a. die Karamellaromastoffe 2-Hydroxy-3,4-dimethylcyclopent-2-en-1-on und 2-Hydroxy-3-methylcyclopent-2-en-1-on bevorzugt gebildet wurden. Die Anwendung der

CAMOLA-Technik sowie quantitative Messungen an Zuckerspaltprodukten zeigten, dass unter Hochdruck die Bildung von transienten Intermediaten, wie 2-Oxopropanal begünstigt ist. Eine neuer, hochdruckinduzierter Bildungsweg zu 2-Hydroxy-3-methylcyclopent-2-en-1-on konnte vorgeschlagen werden.

1.1.5. Zum Vorkommen des intensiven Aromastoffes 3-Mercapto-2-methylpentanol in rohen und verarbeiteten *Allium*-Arten

Ausgangslage: Trotz der Vielzahl der in Zwiebeln identifizierten flüchtigen Verbindungen ist es kürzlich gelungen, das bis dahin unbekannte 3-Mercapto-2-methylpentanol als einen der wichtigsten, bis dahin unbekannte Aromastoffe in Küchenzwiebeln zu identifizieren. Der Verbindung wird auch eine positive physiologische Wirkung nachgesagt. Bis heute ist allerdings unbekannt, inwieweit die Verarbeitung von Zwiebeln die Konzentration der Verbindung beeinflusst und ob der Aromastoff auch in anderen *Allium*-Arten, z.B. Lauch, vorkommt.

Forschungsziel: Ziel der Untersuchungen war es daher, eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse zur Quantifizierung des Mercaptopentanol zu entwickeln und den Einfluss der Zwiebelzubereitung auf die Konzentrationen zu bestimmen. Die Daten sollten auch erste Einblicke in Parameter zur Bildung des Aromastoffes geben.

Ergebnis: Durch Synthese von zweifach deuteriertem 3-Mercapto-2-methylpentanol und Kombination der Analytik mit der Massenchromatographie konnte eine sensitive (LoD: 0,2 µg/kg) und selektive Methode zur Bestimmung des Aromastoffes entwickelt werden. Die Anwendung auf Küchenzwiebeln verschiedener Herkunft ergab Mengen von 8 bis 32 µg/kg in rohen Zwiebeln, wohingegen die Konzentrationen auf 34 bis 246 µg/kg anstiegen, wenn die geschnittenen Zwiebeln 30 min bei RT gelagert und dann gekocht wurden. In Extrakten, die durch simultane Destillation/Extraktion des Materials gewonnen wurden, konnten mit 1200 µg/kg die höchsten Mengen gefunden werden. In frittierten und im Ganzen gekochten Zwiebeln entstand der Aromastoff nicht. Es ist daher offensichtlich, dass nach der Zerkleinerung der Knolle enzymatische Vorgänge ablaufen, die zur Bildung einer Vorstufe führen, die schlussendlich thermisch in den Aromastoff zerfällt. In allen anderen *Allium*-Arten (Lauch, Schalotten etc.) konnte das Mercaptopentanol erstmals identifiziert und quantifiziert werden. Der Bildungsablauf war identisch. Knoblauch und Bärlauch enthielten den Aromastoff, dessen Schwellenwert zu 1,6 ng/L Wasser bestimmt wurde, nicht.

1.1.6. Charakterisierung adstringierend schmeckender Schlüsselsubstanzen in schwarzem Tee

Ausgangslage: Trotz zahlreicher Studien ist es bis heute nicht gelungen, die am typisch adstringierenden Geschmack von Teegetränken ursächlich beteiligten Schlüsselverbindungen auf molekularer Ebene zu definieren. Es wurden zwar Catechine sowie deren Oxidationsprodukte, die Theaflavine und Thearubigene, als Hauptgeschmacksstoffe in der Literatur diskutiert, jedoch erfolgte bislang keine Evaluierung der einzelnen Teeinhaltsstoffe bezüglich ihrer sensorischen Aktivität sowie deren Beitrag zum Gesamtgeschmack von Tee.

Forschungsziel: Ziel des Vorhabens war es anhand der kombinierten Anwendung von instrumenteller und sensorischer Analytik, die wichtigsten adstringierenden Geschmacksstoffe in schwarzen Teegetränken zu identifizieren und sensorisch zu charakterisieren.

Ergebnis: Die Anwendung der Geschmacksverdünnungsanalyse auf schwarze Teegetränke zeigte erstmals, dass nicht wie in der Literatur angenommen die hochmolekularen Thearubigene, Catechine und Theaflavine, sondern eine Reihe von insgesamt 14 Flavon-3-ol-

Glycosiden den Hauptbeitrag zum adstringierenden Geschmack von Tee leisten. Unter diesen Glykosiden gelang es zudem, das Apigenin-8-C-[-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-O-(-D-glucopyranosid)] erstmals in Tee zu identifizieren. In Abhängigkeit von der Struktur zeigten die Flavon-3-ol-Glycoside eine samtartige, den Mund belegende Adstringenz bei extrem niedrigen Schwellenwerten, die weit unter denen der Catechine oder der Theaflavine liegen. So wurde z.B. eine Schwelle von 0.001 µmol/L für das Quercetin-3-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-O-β-D-glucopyranosid] gefunden, die um den Faktor 190.000 bzw. 16.000 unterhalb der Schwelle von Epigallocatechingallat bzw. Theaflavin liegt.

1.1.7. Struktur/Aktivitäts-Zusammenhänge für die geschmacksverstärkende Wirkung von Alapyridain

Ausgangslage: Durch Anwendung der Geschmacksverdünnungsanalyse ist es kürzlich gelungen, das (+)-(S)-1-(1-Carboxyethyl)-5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-pyridinium-Salz als geschmacksmodulierende Verbindung in erhitzten Glucose/ Alanin-Lösungen sowie Rindfleischbouillon zu identifizieren. Sensorische Studien ergaben, dass dieses sog. Alapyridain in der Lage ist, die humane Sensitivität der Wahrnehmung von süßen, salzigen und umami-artigen Geschmacksstoffen signifikant zu erhöhen. Bislang war jedoch unklar, welche Strukturelemente im Molekül für die geschmacksverstärkende Wirkung des Alapyridains verantwortlich sind.

Forschungsziel: Ziel des Vorhabens war es anhand von synthetischen Alapyridain-Derivaten und systematischer sensorischer Studien erste Einblicke in essentielle Strukturelemente des Alapyridains zu erhalten.

Ergebnis: Um die für eine Geschmacksverstärkung notwendigen Strukturelemente zu identifizieren, wurde eine Reihe strukturverwandter Pyridiniumbetaine synthetisiert, gereinigt und deren physiologische Aktivitäten sensorisch evaluiert. Dabei zeigte sich, dass die Entfernung sowie eine Modifikation der Hydroxyl- bzw. der Hydroxymethyl-Gruppe im Alapyridain zu einem Verlust der geschmacksverstärkenden Aktivität führte. Somit konnte gezeigt werden, dass die 2-(Hydroxymethyl)-5-hydroxypyridin-Struktur für eine Geschmacksverstärkung entscheidend ist. Weder die Verlängerung bzw. die Entfernung der Alkylkette oder der Carboxy-Funktion im 1-(1-Carboxy-2-ethyl)-Rest noch die Einführung weiterer Carboxy-Funktionen führte zu einem aktiven Derivat. Jedoch die Substitution der Methyl-Gruppe durch eine Benzyl-Gruppe ergab eine Verbindung, die ähnliche geschmacksverstärkende Eigenschaften aufwies wie das Alapyridain. Die Einführung eines Moleküls Glycin zwischen dem 1-(1-Carboxy-2-phenylethyl)-Rest und dem Pyridin-Ring führt ebenso zu einer geschmacksverstärkenden Verbindung, womit gezeigt werden konnte, dass auch Dipeptid-Derivate aktiv sind.

1.2. Techno-funktionelle Eigenschaften von Lebensmittelinhaltsstoffen

1.2.1. Einfluss des Phosphorsäurederivates auf die funktionellen Eigenschaften von Phospholipiden

Ausgangslage: Phospholipide können aufgrund gemeinsamer Strukturmerkmale als Emulgatoren wirken und das Backverhalten von Weizenteigen beeinflussen. Die backtechnischen Wirkungen von Lecithin wie auch von angereicherten Lecithinfraktionen sind bekannt. Nicht bekannt sind jedoch die Aktivitäten isolierter Phospholipidklassen aus verschiedenen Quellen.

Forschungsziel: Die Abhängigkeit der backtechnischen Wirksamkeit von Phospholipiden vom Phosphorsäurederivat sollte systematisch untersucht werden.

Ergebnis: Reine Phospholipidklassen wurden durch präparative Dünnschichtchromatographie aus Rohlecithinen verschiedener Quellen (Soja, Raps, Sonnenblume, Ei) in Mengen isoliert, die für Backversuche und rheologische Tests ausreichend waren. Dabei zeigte sich erstmals, dass Phosphatidylinositol, dem bisher eine eher untergeordnete Bedeutung für die Backaktivität zugeschrieben wurde, als einzige Phospholipidklasse bei sehr kleinen Zusatzmengen zwischen 0,02 und 0,1 % eine gute Backaktivität aufweist. Alle anderen Phospholipidklassen waren in diesem Konzentrationsbereich noch nicht aktiv. Die reinen Phospholipidklassen wurden einzeln und in Kombination eingesetzt und ihre Wirkungen bestimmt. Dadurch wurde ermittelt, welche Phospholipidklassen bzw. welche Phospholipidmischungen besonders gute backtechnische Eigenschaften aufwiesen. Mit dem Gemisch Phosphatidylinositol/Phosphatidylethanolamin/Phosphatidsäure im Verhältnis 2/1/1 (m/m/m) wurde ein Phospholipidgemisch gefunden, das eine zum Backen optimale Zusammensetzung aufweist (Zunahme des Brotvolumens um bis zu 55 %). Auf dieser Grundlage wurden die Rohlecithine extraktiv aufgespalten, um Produkte mit verbesserten backtechnischen Eigenschaften zu erhalten.

1.2.2. Einfluss von Mehlverbesserungsmitteln auf die Konzentration von Dityrosin in Weizenmehl und Weizenteig

Ausgangslage: Neben Disulfidbindungen können auch Dityrosin-Crosslinks Getreideproteine kovalent vernetzen und so die funktionellen Eigenschaften von Teigen beeinflussen. Dityrosin-Crosslinks wurden in Getreideproteinen zwar nachgewiesen, quantitative Daten über Dityrosin in Mehlen und Teigen sowie Daten über den Einfluss von Mehlbehandlungsmitteln auf die Konzentration an Dityrosin liegen bisher jedoch nicht vor.

Forschungsziel: Es sollte eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Dityrosin in Weizenmehl und -teig entwickelt werden, um die Abhängigkeit der Dityrosin-Konzentration im Teig von der Anteigdauer und dem Zusatz von Mehlverbesserungsmitteln zu untersuchen.

Ergebnis: Als Standardsubstanzen für die quantitative Analyse wurden Dityrosin und [3,3'-¹³C₂]-Dityrosin mittels einer enzymatischen Reaktion synthetisiert und durch Ultrafiltration, Gelchromatographie und präparativer HPLC in reiner Form erhalten. Zur quantitativen Freisetzung von Dityrosin aus den Getreideproteinen wurden diese nach Zusatz des stabilisotopenmarkierten internen Standards mit einem Gemisch aus Propionsäure und Salzsäure hydrolysiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte durch Festphasenextraktion an C18-Kieselgel. Die aufgereinigten Hydrolysate wurden durch HPLC getrennt, und Dityrosin wurde durch Tandem-Massenspektrometrie detektiert und quantifiziert. Die Analysenmethode wurde validiert. Sie lieferte eine Nachweisgrenze von 80 ng/g und eine Bestimmungsgrenze von 270 ng/g. Der mittlere Variationskoeffizient lag bei 7,5 %. Mit der neuen Methode wurde die Konzentration von Dityrosin in Weizenmehl (cv. Flair) sowie in Weizenteig in Abhängigkeit von der Anteigdauer (1, 7, 20 min) und dem Zusatz von Mehlverbesserungsmitteln (Glucoseoxidase, Hexoseoxidase, Kaliumbromat, Wasserstoffperoxid) quantitativ erfasst. Es wurde gezeigt, dass beim Anteigen von Weizenmehl Dityrosin gebildet wurde. Mit steigender Knetzeit stieg die Dityrosinkonzentration etwa um den Faktor 2 an, nach 10 min blieb der Wert konstant. Die Enzyme Glucoseoxidase und Hexoseoxidase sowie Wasserstoffperoxid führten dosisabhängig zu einer Steigerung des Dityrosingehaltes, wobei insbesondere ein Zusatz von Glucose zusammen mit den Enzymen eine verstärkte Dityrosinbildung ergab, während nach Zusatz von Ascorbinsäure oder Kaliumbromat keine signifikante Erhöhung des Dityrosingehaltes zu verzeichnen war.

1.2.3. Herstellung von Folien aus Weizenkleber nach Modifizierung durch Wärme und Hochdruckbehandlung

Ausgangslage: Für Folien aus Weizenkleber besteht zunehmend Interesse, da sie aus einem nachwachsenden Rohstoff hergestellt werden, biologisch abbaubar und zum Verzehr geeignet sind. Vorausgegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Kleber durch Hochdruckbehandlung nachhaltig beeinflusst werden, deren Wirkung auf Bildung und Eigenschaften von Kleberfilmen wurde jedoch noch nicht untersucht.

Forschungsziel: Entwicklung einer Methode, die es erlaubt, aus kleinen Mengen Kleber Folien herzustellen und Untersuchung der Wirkung einer Wärme- und Druckbehandlung sowie von Zusätzen auf die Folieneigenschaften.

Ergebnis: In zahlreichen Vorversuchen wurde die Rezeptur für die Herstellung von Kleberfolien optimiert. Die besten Ergebnisse lieferte das Suspendieren des Trockenklebers in konzentrierter Ameisensäure unter Verwendung von Glycerin als Weichmacher, das Ausgießen auf eine glatte Oberfläche und das Trocknen bei niedriger Temperatur. Dadurch konnten fast transparente Folien produziert werden. In den Hauptversuchen wurde die Wirkung von Wärme, Druck und Zusätzen mit Hilfe von Dehnversuchen verfolgt, wobei die Reißfestigkeit und Dehnbarkeit die wichtigsten Qualitätsparameter waren. Durch Erwärmen des Klebers (z.B. auf 70 °C) wurde die Folie fester; ihrer Kohäsivität nahm ab und sie riss bei kürzerer Dehnung. Nach Druckbehandlung (200 MPa, 50 °C) waren die Folien deutlich weicher und dehnbarer. Bis 400 MPa waren sie darüber hinaus klebrig und hatten Parafilmcharakter. Bei 800 MPa ging der viskoelastische Charakter verloren und die Folie riss mit glattem Bruch. Aus Gliadin allein ließen sich keine Folien herstellen, Glutenin hingegen bildete fast reinelastische feste Folien. Auch sortenbedingte Unterschiede in den Klebereigenschaften beeinflussten den Charakter der Folien. Durch Zusatz von Reduktionsmitteln (z.B. Cystein, Natriumsulfit) bildete Kleber nach Druckbehandlung zwischen 300 und 400 MPa relativ weiche Folien mit außergewöhnlich elastischen Eigenschaften. Die Ergebnisse zeigten insgesamt, dass aus Weizenkleber durch Variation von Wärme, Druck und Zusätzen eine Vielzahl unterschiedlicher Folien hergestellt werden kann.

2. Entwicklung spezieller Analysenverfahren Das "Buccal Odor Screening System" (BOSS) als neues analytisches Tool zur Charakterisierung oraler Aromastoffpersistenz in vivo

Ausgangslage: Da die retronasale Wahrnehmung eine Schlüsselempfindung beim Genuss von Espresso darstellt, erfolgte kürzlich die Charakterisierung der für die unmittelbare Aromawahrnehmung beim Konsum von Espresso ausschlaggebenden Verbindungen. Diejenigen Substanzen, die jedoch gerade für den sehr langanhaltenden Nachgeschmack verantwortlich sind, blieben jedoch noch größtenteils unklar.

Forschungsziel: Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung derjenigen geruchsaktiven Verbindungen, die bei dem nach dem Konsum von Espresso verbleibenden "afterodor" eine besonders große Rolle spielen. Zweiten Schwerpunkt bildet die Aufklärung der Auswirkungen nichtflüchtiger Zusätze wie z.B. Milch auf die Persistenz aromarelevanter Espresso-Komponenten.

Ergebnis: Mittels eines neuen Analysenverfahrens, des Buccal Odor Screening Systems (BOSS) in Kombination mit gaschromatographisch-olfaktometrischen Methoden wurden diejenigen geruchsaktiven Verbindungen charakterisiert, die eine besonders hohe intraorale Persistenz aufweisen. Eine vergleichende, zeitaufgelöste Analyse dieser Substanzen nach Konsum von Espresso mit und ohne Milchzusatz ergab signifikante Persistenzunterschiede. Diesem

analytischen Ergebnis wurde eine zeitaufgelöste sensorische Bewertung von einzelnen Aromaqualitäten sowie der Gesamtaromaintensität des Espressogetränks mit und ohne Milchezusatz gegenübergestellt.

2.2. Simultane Bestimmung von Folsäure und Pantothensäure in mit Vitaminen angereicherten Lebensmitteln durch Stabilisotopenverdünnungsanalysen

Ausgangslage: Mit Vitaminen angereicherte Produkte sind seit längerem als funktionelle Lebensmittel auf dem Markt. Um Ernährungsempfehlungen zu befolgen, ist der Verbraucher auf sichere Gehaltsangaben angewiesen, die aber für die Pantothensäure und die Folsäure schwer zu überprüfen sind.

Forschungsziel: Es sollte daher eine universelle und simultane Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) für Pantothensäure und Folsäure entwickelt werden.

Ergebnis: Die von uns kürzlich publizierten SIVA für endogene Folate und für die Pantothensäure mittels HPLC-Tandem-Massenspektrometrie wurden soweit aufeinander abgestimmt, dass nach einer einstündigen Extraktion beide Vitamine simultan innerhalb eines 30minütigen HPLC-Laufes quantifiziert werden konnten. Das neue Verfahren erwies sich als hervorragend geeignet für die Analyse von supplementierten Lebensmitteln. Laborvergleichsuntersuchungen ergaben für die Folsäure eine gute Übereinstimmung mit dem Standardverfahren, einer mikrobiologischen Methode. In angereicherten Fruchtsäften, Molkeprodukten, Getreideprodukten, Süßwaren, Arzneimitteln, Mehl und Salz wurde für die Pantothensäure fast ausschließlich ein um 30 % höherer Gehalt als angegeben ermittelt. Im Falle der Folsäure wurden im Durchschnitt niedrigere Abweichungen im Vergleich zur Kennzeichnung festgestellt, es wurden aber auch Unterschreitungen des angegebenen Folsäuregehalts von bis zu 69 % festgestellt. Die Ursachen der Abweichungen liegen vermutlich zum einen darin, dass zum Ausgleich von Verlusten während der Herstellung und Lagerung überdosiert wird. Zum anderen ist eine zu hohe Folatangabe auf zum Teil falsche Folatangaben in Nährwerttabellen oder fehlerhafte Analysenmethoden (v. a. mikrobiologischer Art) zurückzuführen.

2.3. Stabilisotopenverdünnungsanalysen bestätigen den schnellen Abbau des Mykotoxins Patulin im menschlichen Organismus

Ausgangslage: Das Mykotoxin Patulin ist als akut toxisch, mutagen, immunotoxisch und teratogen bekannt. Studien zur Absorption des Toxins, insbesondere im menschlichen Organismus, fehlen bisher, da keine empfindliche und sichere Quantifizierung des Patulins in Blut möglich war.

Forschungsziel: Durch den Einsatz der kürzlich entwickelten Stabilisotopenverdünnungsanalyse soll die Absorption von Patulin beim Menschen sowie dessen Abbau im Blut untersucht werden.

Ergebnis: Nach dem Genuss eines 50 µg/L Patulin enthaltenden Apfelsaftes konnte im Blut der Versuchsperson kein Patulin über der Nachweisgrenze von 200 ng/L nachgewiesen werden. Weitere *in-vitro* Experimente ergaben, dass das Mykotoxin im Blut äußerst schnell abgebaut wird und nach 2 min nur noch 6,1 % von ursprünglich 100 µg Patulin in 9 mL Blut vorliegen. Es kann daher gefolgert werden, dass selbst hohe, natürlich vorliegende Patulinmengen aus der Nahrung im Verdauungstrakt und Blut abgebaut werden, bevor sie andere Gewebe erreichen.

2.4. Quantifizierung von Ochratoxin A in Lebensmitteln durch Stabilisotopenverdünnungsanalyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie

Ausgangslage: Das Mykotoxin Ochratoxin A (OTA), welches von verschiedenen Pilzen der Gattung *Penicillium* und *Aspergillus* gebildet wird, kann in einer Vielzahl von Lebensmitteln, wie z.B. Getreide und Getreideerzeugnissen, Kaffee und Trauben, nachgewiesen werden. Seit bekannt ist, dass OTA hepato- und nephrotoxisch wirkt und dieses mit der endemischen Balkan-Nephropathie in Zusammenhang gebracht wird, wurde der Gehalt an OTA in einigen Lebensmitteln durch die Europäische Union limitiert (Getreide 5 µg/kg, Getreideerzeugnisse 3 µg/kg und Rosinen 10 µg/kg). Die gebräuchlichste Methode zur OTA-Quantifizierung ist die HPLC, gekoppelt mit einem Fluoreszenzdetektor. In Ringstudien konnte aber gezeigt werden, dass diese Methode in Getreide- und Fleischprodukten niedrige Wiederfindungen und eine schlechte Reproduzierbarkeit aufweist.

Forschungsziel: Zur sicheren und empfindlichen Nachweis von OTA sollte eine Stabilisotopenverdünnungsanalyse entwickelt werden.

Ergebnis: Die Synthese des isotonenmarkierten Standards erfolgte aus nativem OTA, das mittels Säurehydrolyse in Ochratoxin (gespalten wurde, welches mit [²H₅]-L-Phenylalanin zum [²H₅]-OTA umgesetzt wurde. Mit Hilfe des [²H₅]-OTA als internen Standards konnte OTA durch LC-Tandem-MS nach Aufreinigung durch Immunaффinitätschromatographie in zertifiziertem Referenzmaterial mit einer Abweichung von 2 % quantifiziert werden. Bei einer Nachweisgrenze von 0,5 µg/kg erwies sich die neue Methode außerdem als empfindlich und gut anwendbar für alle Lebensmittel, in denen OTA bisher detektiert worden war.

2.5. Entwicklung eines Extraktionsverfahrens für die quantitative Bestimmung von Gluten mittels ELISA

Ausgangslage: Die Novellierung des Codex Alimentarius-Standards für glutenfreie Lebensmittel sieht für die quantitative Bestimmung zöliakieaktiver Prolamine (Gluten) aus Weizen, Roggen und Gerste eine immunochemische Methode (ELISA) vor. Dabei sollen die Prolamine aus den zu analysierenden Proteinen mit 60%igem Ethanol extrahiert werden. Eine Reihe von Untersuchungen hat jedoch gezeigt, dass die Extraktionsrate bei erhitzten Lebensmitteln stark reduziert ist und nur durch den Einsatz eines Reduktionsmittels erhöht werden kann. Reduzierende Bedingungen können jedoch die Effizienz von Antikörpern stark beeinträchtigen.

Forschungsziel: Entwicklung eines Extraktionsmittels und -verfahrens, das eine vollständige Extraktion zöliakieaktiver Prolamine auch aus erhitzten Produkten erlaubt, ohne die Wirkung des im ELISA eingesetzten Antikörpers einzuschränken.

Ergebnis: Zur Anwendung kann ein von Mendez et al. entwickelter Sandwich-Enzymimmunoassay mit dem Antikörper R5, der spezifisch mit den Prolaminen aus Weizen (Gliadine), Roggen (Secaline) und Gerste (Hordeine) reagiert. Mit Hilfe eines Gliadinstandards und von unterschiedlich wärmebehandelten Weizenteigen bzw. -brotten wurde getestet, welche Konzentration an Reduktionsmittel (2-Mercaptoethanol) und Desaggregationsmittel (Guanidin) für eine optimale Extraktion der Gliadine notwendig war, ohne den nachfolgenden ELISA zu beeinträchtigen. Die besten Ergebnisse lieferten in Kombination 250 mmol/L 2-Mercaptoethanol + 2 mol/L Guanidin (E2) bei 50 °C und 40 min Extraktionsdauer. Die Wiederfindung von Gliadin in Brot, das bei 230 °C verbacken worden war, betrug annähernd 100 % im Vergleich zum Ausgangsmehl, während die Extraktion mit 60%igem Ethanol (E1) nur zu einer Wiederfindung von ca. 30 % führte. Weitere vergleichende Untersuchungen wurden mit vierzehn Maisbroten durchgeführt, die mit verschiedenen Mengen an Gliadinstandard (0 - 156

mg/kg) versetzt worden waren. Der ELISA ergab für E1 eine Wiederfindung von 31 - 64 % und für E2 91 - 105 %. Die gleichen Unterschiede zwischen E1 und E2 ergaben sich bei der Analyse von hitzebehandelten Handelsprodukten, überwiegend glutenfreien Lebensmitteln. Sogar bei Rohmaterialien wie verunreinigtem Mais- oder Reismehl lagen die Gliadinwerte beim Einsatz von E2 um durchschnittlich 10 % höher, da im Gegensatz zu E1 auch gluteningebundene Gliadine bei der Extraktion erfasst wurden. Das entwickelte Extraktion/ELISA-Verfahren wurde in einem internationalen Ringversuch erfolgreich getestet und vor kurzem vom "Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling (CCMAS)" als Methode für die Glutenanalyse in Handelsprodukten anerkannt.

3. Struktur/Wirkungsbeziehungen bei Biopolymeren Fraktionierung von Weizenmehl mit nicht-wässrigen Systemen: Optimierung der Methode und Bestimmung der Proteinzusammensetzung der Fraktionen

Ausgangslage: Da bei der klassischen, wässrigen Fraktionierung von Weizenmehl die funktionellen Eigenschaften des nativen Mehles nicht erhalten werden, gibt es Ansätze, Mehl durch nicht-wässrige Lösungsmittel zu fraktionieren, um insbesondere die irreversiblen Veränderungen des Weizenklebers zu verhindern, die beim Kontakt mit Wasser entstehen. Dazu geeignet ist eine physikalische Trennung von Stärke und Protein in einem inerten Lösungsmittel auf Grund der Unterschiede in ihrer Dichte. Eine entsprechende Methode wurde von Hess bereits vor mehr als 50 Jahren entwickelt.

Forschungsziel: Ziel der Untersuchungen war es, die Fraktionierung von Weizenmehl mit nicht-wässrigen Lösungsmitteln zu optimieren und die erhaltenen Fraktionen hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung zu charakterisieren.

Ergebnis: Zunächst wurde das Weizenmehl in einer Kugelmühle fein zerkleinert. Zur Fraktionierung wurde ein Gemisch aus Toluol und Tetrachlorethen verwendet. Als Fraktionen wurden erhalten: Protein, Stärke, Restmehl und Lipid. Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden durch ein kombiniertes Extraktion/HPLC-Verfahren quantifiziert. Es wurde festgestellt, dass sich die in der Protein- und Stärkefraktion enthaltenen Proteine nur in der quantitativen Zusammensetzung unterschieden, qualitativ lagen keine wesentlichen Unterschiede vor. Es war eine deutliche Anreicherung der Glutenine zu Ungunsten der Albumine/Globuline und Gliadine in der Proteinfraction im Vergleich zum Ausgangsmehl erkennbar, während Restmehl und Stärkefraktion annähernd die gleichen Verhältnisse zwischen Albuminen/Globulinen, Gliadinen und Gluteninen zeigten. Lediglich in der Stärkefraktion war eine leichte Anreicherung der Albumine/Globuline bei gleichzeitiger Abnahme des Gluteningehalts festzustellen. Die in früheren Arbeiten postulierten Unterschiede zwischen Zwickelprotein (= Proteinfraction) und Haftprotein (= Protein in der Stärkefraktion) konnten damit nicht bestätigt werden.

3.2. Identifizierung einer Ferulasäure-Tyrosin-Verknüpfung zwischen Arabinoxylanen und Getreideproteinen

Ausgangslage: Arabinoxylane sind wichtige Strukturmerkmale der Zellwände von Getreide. Sie sind wichtig für die technologischen Eigenschaften von Getreidemehlen bei der Herstellung von Brot. Die Grundstruktur der Arabinoxylane ist bekannt, es gibt jedoch nur wenige Hinweise über Struktur-Wirkungsbeziehungen bei der Brotherstellung.

Forschungsziel: Es sollten Methoden zur Isolierung und Charakterisierung von Arabinoxylanen etabliert und deren Struktur-Wirkungsbeziehungen bei der Brotherstellung aufgeklärt werden.

Ergebnis: Da bereits nachgewiesen werden konnte, dass sich der Dimerisierungsgrad der Ferulasäure bzgl. der Bildung von Diferulasäure während der Brotzubereitung nicht signifikant ändert, muss die Bildung von höhermolekularen Arabinoxylanen während der Brotzubereitung auf andere Effekte zurückgeführt werden. Aus diesem Grund wurde 8-14C-(*E*)-Ferulasäure-(D-galactopyranos-6'-yl)ester als Radiotracer synthetisiert und zu Weizen- und Roggenmehl zugegeben, um die Reaktionswege der Ferulasäure während der Brotherstellung aufzuklären. Die gefriergetrockneten Brote wurden einer modifizierten Osborne-Fraktionierung unterworfen und mittels Szintillationszählung auf Radioaktivität untersucht. Der größte Teil der Aktivität verblieb in der wasserlöslichen Fraktion. Es konnte jedoch auch eine signifikante Anreicherung des Tracers in den Prolamin- und Glutelin-Fraktionen im Vergleich zur Kontrollmessung festgestellt werden. Mit Hilfe von HPLC/Szintillationsmessungen der Prolamin-Fraktionen konnte eine chemische Modifikation des Tracers nachgewiesen werden. Um die Struktur des veränderten Tracers aufzuklären, wurden die Brotfraktionen einer enzymatischen Totalhydrolyse unterzogen und die Hydrolysate mittels LC/ESI-MS weiter untersucht. Dabei wurde ein Deyhydroferulasäure-Tyrosin-Isomer nachgewiesen, dessen Struktur durch Vergleich mit einer synthetisierten Referenzverbindung bestätigt werden konnte. Die im Tracerexperiment entdeckte Ferulasäure-Aminosäure-Verbindung konnte per LC/MS-Untersuchungen auch in Weizen- und Roggenteigen und -brotten nachgewiesen werden, denen keine Ferulasäure zugesetzt wurde. Der größte Teil der Dehydroferulasäure-Tyrosin-Verbindung bildete sich beim Weizen während der Teigherstellung. Es wurde gezeigt, dass der Zusatz von L-Ascorbinsäure (100 mg/kg Mehl) bei der Weizenteigherstellung zu einer deutlich erhöhten Bildung der identifizierten Dehydroferulasäure-Tyrosin-Verbindung führte.

3.3. Einfluss der atmosphärischen Kohlendioxid-Konzentration auf die quantitative Proteinzusammensetzung des Weizenkorns

Ausgangslage: Die atmosphärische CO₂-Konzentration zeigt einen kontinuierlichen Aufwärtstrend mit weitreichenden Folgen für das globale Klima und damit auch für die Pflanzenwelt. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, inwieweit sich ein CO₂-Anstieg auf den Ertrag und die stoffliche Zusammensetzung der für die Welternährung wichtigsten Kulturpflanzen auswirkt.

Forschungsziel: Am Beispiel Weizen soll gezeigt werden, ob ein in wenigen Jahrzehnten erwarteter Anstieg der CO₂-Konzentration die quantitative Proteinzusammensetzung des Korns beeinflusst.

Ergebnis: Im Rahmen der Braunschweiger CO₂-Anreicherungsversuche und mit Hilfe eines Freiland-CO₂-Anreicherungssystems (FACE) wurde Winterweizen der Sorte "Batis" in sechs verschiedenen Kreisflächen angebaut. Zwei Kreisflächen (FACE) wurden mit erhöhter CO₂-Konzentration (ca. 550 µL/L) und zwei weitere (BLOW) mit normaler Umgebungsluft (ca. 370 µL/L) beaufschlagt. Die fünfte und sechste Kreisfläche (FELD) wurden unter Umgebungsluft ohne Gebläse gehalten und dienten der Kontrolle des Gebläseeffekts. Die Halbkreisflächen eines jeden Rings erhielten eine unterschiedliche N-Versorgung, entweder eine praxisübliche Menge (N100) oder knapp die Hälfte davon (N50). Die reifen Körner wurden durch Bestimmung des Rohproteingehaltes und die daraus gewonnenen Mehle (Type 550) durch erneute Bestimmung des Rohproteingehaltes und der extrahierbaren Proteine (Albumine/Globuline, Gliadine, Glutenine) charakterisiert. Die drei ermittelten Messreihen waren miteinander sehr hoch korreliert. Zwischen den BLOW- und FELD-Proben waren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Wie aus früheren Untersuchungen über N-Düngung zu erwarten war, gab es zwischen den N100- und N50-Düngungsstufen große Unterschiede, bei N50 lag das Gesamtprotein im Durchschnitt um 23 % niedriger. Die erhöhte CO₂-Konzentration hatte im Falle der N50-Düngung einen hochsignifikanten Effekt: Das Gesamtprotein wurde um 13 % verringert. Der Einfluss auf die N100-Proben war nicht eindeutig, da die Proben der zwei FACE-Kreisflächen unterschiedlich waren (14 % bzw. keine Abnahme des Gesamtproteins), im

Durchschnitt wurde das Gesamtprotein um 6 % verringert. Die HPLC-Analyse ergab, dass der CO₂-Anstieg vor allem eine Reduktion der Kleberproteine bewirkte, während die Albumine und Globuline kaum betroffen waren. Innerhalb der Kleberproteine wurde der Gliadinanteil stärker reduziert als der Gluteninanteil. Auch beim Anteil einzelner Gliadin- und Glutenintypen gab es Verschiebungen. Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die erwartete Erhöhung der CO₂-Konzentration vor allem die nachteilige Wirkung einer niedrigen N-Düngung auf den Klebergehalt von Weizen verschärft.

3.4. Entwicklung und Charakterisierung von transgenem Weizen ohne α -Gliadine

Ausgangslage: Die Gruppe der α -Gliadine ist innerhalb der Weizenproteine in Bezug auf Menge und Anzahl der Komponenten dominierend. Ihre Zöliakietoxizität ist seit 1970 bekannt. Züchterische Maßnahmen zur vollständigen Eliminierung von α -Gliadinen aus Weizen blieben erfolglos. Daher stellt sich die Frage, ob dies mit Hilfe neuester gentechnischer Methoden möglich ist, und wie dadurch der Phänotyp und die Fertilität der Pflanzen, die Proteinzusammensetzung der Körner und technologischen Eigenschaften der Teige beeinflusst werden.

Forschungsziel: Eliminierung der α -Gliadine aus Weizen durch gentechnische Maßnahmen und Untersuchung der Auswirkungen auf die quantitative Zusammensetzung der Mehlproteine und auf die rheologischen und backtechnischen Eigenschaften der Teige.

Ergebnis: Im molekularbiologischen Teil der Arbeiten kam die RNA-Interferenz (RNAi)-Methode zur Anwendung; Ausgangsmaterial war Weizen der Sorte "Florida". Anhand bekannter DNA-Sequenzen von α -Gliadinen wurde als Zielsequenz eine homologe 313 bp lange Teilsequenz ausgewählt, aus "Florida" isoliert und in drei, in ihrem Aufbau unterschiedliche RNAi-Transformationsvektoren kloniert, wobei die Zielsequenz in sense- und antisense-Orientierung inseriert wurde. Die Vektoren wurden in Skutellumzellen unreifer Weizenembryonen mit der biolistischen Transformationsmethode übertragen. Insgesamt wurden 174 unabhängige transgene Weizenpflanzen erhalten. Sie zeigten weder phänotypische Veränderungen noch eine eingeschränkte Fertilität. Die quantitative Analyse der Speicherproteine mittels eines früher entwickelten Extraktion/HPLC-Verfahrens gab Auskunft über den Erfolg der gentechnischen Maßnahmen. Mit zwei der drei stabil in das Weizengenom integrierten RNAi-Vektoren wurde eine deutliche Reduktion oder sogar Eliminierung der α -Gliadine erzielt. Die aus der HPLC abgeleiteten Daten zeigten, dass der Verlust der α -Gliadine durch den mengenmäßigen Anstieg der Albumine/Globuline, ω - und γ -Gliadine sowie der HMW-Untereinheiten ausgeglichen wurde. Eine transgene Linie mit stark reduziertem α -Gliadinanteil wurde im Gewächshaus vermehrt. Aus den Körnern dieser Linie und des Wildtyps "Florida" wurden Mehle hergestellt und in teig- und kleberrheologischen Untersuchungen sowie Backversuchen im Mikromaßstab verglichen. Die Ergebnisse zeigten ähnliche Teigeigenschaften, während die Kleberfestigkeit der transgenen Linie im Vergleich zum Wildtyp drastisch erhöht war. Das Gebäckvolumen war nur leicht erniedrigt; somit sind die α -Gliadine für die Backfähigkeit von Weizen nicht notwendig. Die Besonderheit des Weizens ohne α -Gliadine liegt vor allem darin, dass der aus Mehl ausgewaschene Kleber eine einzigartige Festigkeit aufweist.

3.5. Untersuchungen über die saure und enzymatische Desamidierung von Glutamin in α -Gliadinen

Ausgangslage: Untersuchungen an intestinalen T-Lymphozyten haben gezeigt, dass deren zöliakiespezifische Stimulation durch Gliadinpeptide initiiert oder verstärkt wird, nachdem bestimmte Glutaminreste der Peptide durch Transglutaminase aus Dünndarmgewebe (tTG) desamidiert worden sind. Der gleiche Effekt kann auch durch eine unspezifische Desamidierung

mittels Säure bei erhöhter Temperatur erzielt werden. In Folge dessen wurde spekuliert, dass das saure Magenmilieu oder chromatographische Verfahren unter sauren Bedingungen eine Desamidierung von Proteinen oder Peptiden hervorrufen. Experimentelle Beweise hierfür fehlen jedoch.

Forschungsziel: Mit Hilfe von Modellpeptiden aus α -Gliadin soll geklärt werden, ob Glutaminreste durch das Magenmilieu oder durch die sauren Bedingungen bei gängigen HPLC-Verfahren desamidiert werden. Darüber hinaus soll untersucht werden, welche der zahlreich vorkommenden Glutaminreste in α -Gliadinen durch tTG desamidiert werden.

Ergebnis: Für die Untersuchungen wurden die Peptide (2(64-66), (2(56-68), (2(58-88) und Varianten davon, die an bestimmten Positionen mit Glutaminsäure (E) an Stelle von Glutamin (Q) modifiziert wurden, synthetisiert und gereinigt. Zunächst wurde in vier verschiedenen Ansätzen die saure Desamidierung am Tripeptid PQL studiert. Ansatz A (2 mol/L HCl, 50 °C, 360 min) sollte die Positivkontrolle, Ansatz B (0,01 mol/L HCl, 37 °C, 240 min) das Magenmilieu, Ansatz C (Acetonitril/Trifluoressigsäure, pH 2,1, 50 °C, 60 min) die Bedingungen der RP-HPLC und Ansatz D (wie C, 14 °C, 360 min) die Lagerbedingungen nach HPLC-Trennung darstellen. Die potenzielle Umwandlung von PQL in PEL wurde durch RP-HPLC an C18-Kieselgel quantifiziert. Die Ergebnisse zeigten, dass PQL im Ansatz A nach 60 min etwa zur Hälfte und nach 360 min fast vollständig desamidiert wurde. In allen anderen Ansätzen (B, C, D) konnte in den untersuchten Zeiträumen keine signifikante Bildung von PEL beobachtet werden. Dies bedeutet, dass weder das saure Milieu im Magen noch gebräuchliche Methoden der HPLC eine nachweisbare Desamidierung von Glutaminresten verursachen. Die enzymatische Desamidierung durch tTG wurde mit Hilfe von Peptiden aus α -Gliadinen (Sequenzabschnitte 56 - 68 und 58 - 88) studiert, die sich in einer Reihe von Untersuchungen als T-Zellstimulantien erwiesen hatten. In einer ersten Versuchsreihe wurde Peptid (2(56-68) und mit E59, E63 und E65 modifizierte Varianten an der N-terminalen Aminogruppe fluoreszenzmarkiert und mit tTG umgesetzt. Die SDS-PAGE der Produkte zeigte, dass das native Peptid und die Varianten mit E59 und E63 desamidiert wurden und auch Komplexe mit tTG bildeten, während die Variante mit E65 unverändert blieb. In einer zweiten Versuchsreihe wurden diese Peptide mit fluoreszenzmarkiertem Cadaverin und tTG umgesetzt, wobei nur die Variante mit E65 nicht reagierte. Ein längeres Peptid (Sequenzabschnitt 58 - 88), in dem die Sequenz PQL dreimal vorkam, und dessen Varianten mit E65, E72 und E79 bestätigten, dass nur der in die Sequenz PQL eingebundene Glutaminrest mit tTG reagierte. Somit verlaufen Desamidierung und Komplexbildung von Gliadinpeptiden durch tTG sehr spezifisch und hängen von der Sequenzposition des Glutaminrestes ab.

3.6. Aufklärung der Bildungsmechanismen von Acrylamid

Ausgangslage: Nach der Identifizierung von Acrylamid (AA) in zahlreichen erhitzten - vor allem frittierten und gerösteten - Lebensmitteln wurden verschiedene Analysemethoden auf GC/MS- und LC/MS-Basis erstellt und validiert. Nach erfolgreicher Entwicklung einer Stabilisotopenanalyse in Kombination mit einer Derivatisierung von AA zur Erhöhung der Selektivität und Sensitivität wurde jetzt der Bildungsmechanismus von AA intensiv untersucht um Eingriffsmöglichkeiten zu finden, die es erlauben, innerhalb des Minimierungskonzeptes den AA-Gehalt in Lebensmitteln zu reduzieren. Zum einen kann dies durch Veränderung der Prozessparameter erfolgen, zum anderen aber auch durch Aufklärung von Zwischenprodukten und des Bildungsweges.

Forschungsziel: Darstellung möglicher Bildungswege von Acrylamid in Modellen und Lebensmitteln. Entwicklung eines Analyseverfahrens zur Identifizierung und Quantifizierung von 3-Aminopropionamid (3-APA) als sehr wirksamer Vorläufer in der AA-Bildung.

Ergebnis: Durch Modellversuche wurde das Vorläuferpotential zur AA-Bildung verschiedener Substanzen analysiert. Dabei zeigte sich 3-Aminopropionamid als die bislang potenteste

Verbindung, die jemals in der Literatur beschrieben wurde (AA-Ausbeute bis zu 63 Mol %). Zudem konnte entgegen aller bisher veröffentlichten Studien gezeigt werden, dass keine Carbonylkomponente zur Bildung von AA zwingend notwendig ist und eine AA-Bildung auch im wässrigen System auftritt. Mit Hilfe einer neu entwickelten Analytik zur Bestimmung von 3-APA wurde diese Substanz zum ersten Mal auch im Lebensmittel nachgewiesen. Mit Hilfe der LC/MS/MS-Technik unter Verwendung eines internen Standards konnten in Kartoffeln Gehalte bis zu 1750 µg/kg Frischgewicht gefunden werden. Die Entstehung von 3-APA aus Asparagin über einen enzymatischen Weg konnte sowohl in Modellen als auch am Beispiel Kartoffel sehr gut gezeigt werden. Somit konnte erstmals gezeigt werden, dass bei Anwesenheit von 3-APA in einem rohen Lebensmittel ein hohes AA-Bildungspotential durch späteres Erhitzen vorhanden ist.

4. Physiologielidentifizierung und funktionelle Expression von olfaktorischen Rezeptoren mit Spezifität für 2,3-Diethyl-5-methyl- und 2-Isopropyl-3-methoxy-pyrazin

Ausgangslage: Durch gezielte Synthese von mehr als 70 Alkylpyrazinen und Korrelation der Struktur mit den Geruchsschwellenwerten konnten durch frühere Arbeiten an der DFA 2,3-Diethyl-5-methyl- und 2-Isopropyl-3-methoxy-pyrazin als geruchsaktivste unter 76 Pyrazinen charakterisiert werden. Obwohl durch "Molecular Modeling" eine Rezeptorstruktur vorgeschlagen werden konnte, ist bisher nicht untersucht, ob solche Strukturen auch von olfaktorischen Rezeptoren in Tier bzw. Mensch detektiert werden.

Forschungsziel: Da seit kurzer Zeit Methoden zur Verfügung stehen, olfaktorische Rezeptoren durch molekularbiologische Verfahren zu identifizieren und funktionell zu exprimieren, sollten olfaktorische Rezeptoren von Maus und Mensch hinsichtlich der Selektivität für solche Alkylpyrazine getestet werden, wobei die Methodik des "Fluoreszenz-Imaging" (FLIPR) und "Calcium-Imaging" eingesetzt wurde.

Ergebnis: Durch Anwendung der sog. Fluoreszenz-Imaging-Technik mittels Reader (FLIPR) wurden in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung 96 olfaktorische Chimären der Maus in menschlichen Zelllinien exprimiert und auf Antwort gegen appliziertes 2,3-Diethyl-5-methylpyrazin getestet. Unter den getesteten Rezeptoren (OR) konnte bei einem OR eine Responsekurve erhalten werden. Durch Vergleich mit Maus- und Humangenomdatenbanken wurden zwei Maus- und zwei Humangene als die nächsten Homologen gefunden. Durch Klonierung der "coding regions" und funktionelle Expression in HEK 293/15-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese Rezeptoren intracelluläre Calciumsignale bei Application von 2,3-Diethyl-5-methyl- und 3-Isobutyl-2-methoxy-pyrazin induzieren. 15 weitere Geruchsstoffe zeigten kein Signal.

4.2. In vivo Untersuchungen zum Metabolismus des Monoterpens Pulegon in Menschen - Erklärung der Toxizitätsunterschiede von (S)-(-)- und (R)-(+)-Pulegon

Ausgangslage: Obwohl der Metabolismus von Pulegon an Tiermodellen gut untersucht ist, fehlen weitgehend Daten zum Humanmetabolismus, welche die Toxizitätsunterschiede von (S)-(-)- und (R)-(+)-Pulegon erklären könnten.

Forschungsziel: Aufklärung der Hauptmetaboliten von (S)-(-)- und (R)-(+)-Pulegon im Menschen.

Ergebnis: Die Hauptmetaboliten von Pulegon im Menschen wurden als 2-(2-Hydroxy-1-methylethyl)-5-methyl-cyclohexanon (8-Hydroxy-menthon), 3-Hydroxy-3-methyl-6-(1-methylethyl)-cyclohexanon (1-Hydroxy-menthon), 3-Methyl-6-(1-methylethyl)-cyclohexanol (Menthol) und E-2-(2-Hydroxy-1-methylethyliden)-5-methyl-cyclohexanon (10-Hydroxypulegon) identifiziert. Die Identifizierung erfolgte anhand von Massenspektren in Verbindung mit Synthesen und NMR-Experimenten. Menthofuran entpuppte sich hierbei als Artefakt, welches sich bei der Aufarbeitung aus dem Metaboliten 10-Hydroxypulegon und/oder anderen unbekanntem Vorläufern bildet. Die Toxizitätsunterschiede zwischen (S)-(-)- und (R)-(+)-Pulegon ergeben sich offensichtlich durch eine stark eingeschränkte Aktivität der an der Reduktion der Doppelbindung in (R)-(+)-Pulegon beteiligten Enzyme. Dies kann zur Weiteroxidation von 10-Hydroxypulegon führen, welches bei (R)-(+)-Pulegon stark erhöht im Urin gefunden wird. Daraus können bisher unbekannte reaktive Metabolite gebildet werden, welche für die beobachtete hepatotoxische und pneumotoxische Aktivität verantwortlich sind.

4.3. Aktivitäts-orientierte Identifizierung von N-Methylpyridinium, einer chemopräventiv wirksamen Verbindung im Kaffeegetränk

Ausgangslage: Die bisher bekannten physiologischen Wirkungen von Kaffeegetränk werden hauptsächlich auf die Gehalte an Coffein und phenolischen Verbindungen zurückgeführt. Die aus epidemiologischen Studien ersichtlichen Zusammenhänge zwischen einem vermehrten Kaffeekonsum und einem verminderten Risiko gegenüber bestimmten Krebserkrankungen lässt auf das Vorkommen von chemopräventiv-wirksamen Verbindungen im Kaffeegetränk schließen, obwohl für dieses Lebensmittel bisher noch keine Struktur-/Wirkungsbeziehung gezeigt wurden.

Forschungsziel: Identifizierung einer chemopräventiv-wirksamen Verbindung im Kaffeegetränk (KGT).

Ergebnis: Im Rahmen eines vom Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (Bonn) und der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschung (AIF-FV 12403 N) geförderten Projektes wurde ein entkoffeiniertes, haushaltsübliches KGT zunächst mit Petrolether versetzt und die entfettete Fraktion einer Ultrafiltration zur Auftrennung in einzelne Molekulargewichtsbereiche zugeführt. Hierbei zeigte sich, dass die polaren KGT-Bestandteile < 1 kDa die höchste AOX und gleichzeitig die deutlichste Modulierung der Aktivität eines chemopräventiv wirksamen Enzymes, der Glutathion-S-Transferase (GST) in Caco-2 Zellen ausübte. Zur Strukturidentifizierung wurden die polaren Bestandteile mittels HPLC in Fraktionen (F) aufgetrennt. Es zeigte sich, dass die in der HPLC-F 7 enthaltene Chlorogensäure das wirksamste Antioxidans war, während die Aktivität der GST in Caco-2 Zellen am deutlichsten durch F 1 gesteigert wurde. Mit Hilfe von LC/MS und NMR-Techniken und anschließender Synthese konnten in dieser F 1 N-Methylpyridinium Ionen (N-MP) identifiziert und im KGT quantifiziert werden. Anschließend wurde eine 15-tägige Fütterungsstudie an männlichen Wistar-Ratten (n = 8 pro Gruppe) durchgeführt, bei dem KGT (4,5 Gew-%) und N-MP (0,03 Gew-%) über das Futter verabreicht wurden. Verglichen mit Tieren, denen eine Standarddiät verabreicht worden war, führte die Aufnahme des KGT zu einer Zunahme der GST-Aktivität um 24 %. Ebenso zeigte sich nach Aufnahme beider Testsubstanzen eine Erhöhung der AOX im Plasma um 48 % (KGT) bzw. 61 % (NMP). Somit konnte erstmals eine in vitro und in vivo chemopräventiv-wirksame Verbindung im Kaffeegetränk nachgewiesen werden.

4.4. Ernährungsabhängige Anreicherung von Maillard-Reaktionsprodukten in der Ratte

Ausgangslage: N(-Carboxymethyl)lysin (CML) ist ein *Maillard*-Reaktionsprodukt, welches nicht nur bei der Erhitzung von Lebensmitteln entsteht, sondern auch im Organismus gebildet wird. Da eine Anreicherung von CML in verschiedenen Organen und Geweben mit der Progression verschiedener Erkrankungen, wie zum Beispiel Diabetes mellitus oder Atherosklerose, oder auch mit dem Alterungsprozess einhergeht, stellt sich die Frage, ob und wenn ja, in welchem Ausmaß, mit der Nahrung aufgenommenes CML zu der endogenen CML-Akkumulation beiträgt.

Forschungsziel: Aufklärung des endogenen Metabolismus von CML, das in Form einer typischen Lebensmittelmatrix aufgenommen wurde.

Ergebnis: Im Rahmen einer 14-tägigen Tierstudie an männlichen Wistar-Ratten wurde gezeigt, dass nach der täglichen Aufnahme von 110 mg bzw. 300 mg CML pro kg Körpergewicht 26 % bzw. 29 % der aufgenommenen CML-Menge mit dem Urin ausgeschieden werden. Mit den Faeces wurden 15 % bzw. 22 % der aufgenommenen CML-Menge ausgeschieden. Im Plasma führte die dreifache Dosissteigerung zu einem 13-fachen Anstieg der CML-Gehalte. Die höchsten absoluten CML-Gehalte wurden sowohl bei den Tieren der Kontrollgruppe, denen kein Casein-CML verabreicht worden war, als auch bei den Tieren der Gruppen, die die Casein-CML-haltige Diät erhalten hatten, in den Nieren festgestellt. Hierbei spiegelte die Akkumulation von CML in der Niere die Erhöhung der verabreichten Dosis wider. Somit konnte gezeigt werden, dass die alimentäre Aufnahme von proteingebundenem CML zu einer Anreicherung von CML im Plasma und in den Nieren führt, wobei den Nieren die wichtigste Bedeutung bei der Ausscheidung des aufgenommenen CML zukommt. Aufgrund des renal ausgeschiedenen Anteils von 26 % bzw. 29 % der aufgenommenen Menge sowie der Akkumulation in den Nieren muss die Absorption von caseingebundenem CML bei mindestens 30 % liegen.

- 4.5. Aus Brotkruste isolierte *Maillard*-Reaktionsprodukte binden an den Rezeptor für "Advanced Glycation End Products" (RAGE) in den Nieren, werden aber nach alimentärer Aufnahme sowohl von gesunden als auch von 5/6 nephrektomierten Ratten mit dem Urin ausgeschieden

Ausgangslage: In vorhergehenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass einzelne *Maillard*-Reaktionsprodukte, die z.B. mit gebräunten Lebensmitteln aufgenommen werden, in der Niere angereichert werden. Hieraus ergibt sich besonders für den niereninsuffizienten Organismus die Frage nach einer möglicherweise gesundheitsabträglichen Wirkung von hoch erhitzten und gebräunten Lebensmitteln, wie zum Beispiel Brotkruste. Weiterhin wurde für einzelne *Maillard*-Reaktionsprodukte, wie z.B. N(-Carboxymethyl)lysin (CML), gezeigt, dass der Rezeptor für "Advanced Glycation End Products" (RAGE), in Nierenzellen aktiviert wird. Diese Reaktion führt zur Freisetzung von Verbindungen, die zur Progression von Entzündungsreaktionen als mögliche Folgen bei Niereninsuffizienz beitragen. Ungeklärt war bisher, inwiefern die renale Metabolisierung von lebensmittelrelevanten *Maillard*-Reaktionsprodukten bei eingeschränkter Nierenfunktion beeinträchtigt ist, und inwiefern diese Verbindungen als RAGE-Liganden fungieren.

Forschungsziel: Aufklärung der renalen Ausscheidung von *Maillard*-Reaktionsprodukten aus Brotkruste bei normaler und eingeschränkter Nierenfunktion sowie die Bedeutung dieser Verbindungen als RAGE-Liganden.

Ergebnis: Studien in HEK-293-Nierenzellen ergaben, dass sowohl CML als auch chemisch charakterisierte *Maillard*-Reaktionsprodukte aus Brotkruste, wie Pronyl-Glycin, als RAGE-Liganden fungieren und nachgeschaltet einen Signaltransduktionsweg aktivieren, bei dem es zur Phosphorylierung einer p38-MAP-Kinase kommt. Diese Aktivierung war in Nierenzellen, in denen die cytoplasmatische Domäne des RAGE nicht exprimiert wird, signifikant verringert, so dass von einer RAGE-spezifischen Wirkung ausgegangen werden kann. Überprüft wurde diese

Wirkung in einer Tierstudie an männlichen Wistar-Ratten, denen entweder 5/6 der Nieren entfernt wurde (5/6 nephrektomiert: NX, n = 20) oder bei gleichbleibendem Operationsprinzip die intakten Nieren verblieben (CTRL, n = 20). Beide Gruppen wurden in je zwei Untergruppen randomisiert, denen entweder eine Kontrolldiät (Standardfutter mit 25 Gewichts-% Maisstärke) oder eine mit 25 Gewichts-% Brotkruste angereicherte Diät verabreicht wurde. Die durchschnittliche tägliche Aufnahme an CML und Pronyl-Glycin betrug 11 mg bzw. 1,1 mg pro kg Körpergewicht. Die Verabreichung der mit Brotkruste angereicherten Diät führte bei den Tieren der CTRL-Gruppe zu einer geringen, bei den nephrektomierten Tieren zu einer deutlich erhöhten Proteinurie als Kennzeichen einer geringfügig eingeschränkten Nierenfunktion. Die Bestimmungen der Gehalte an CML, Carboxyethyllysin (CEL) und Pentosidin in den Blut- und Organproben der mit der brotkrustenhaltigen Diät gefütterten Tiere mittels GC-MS ergaben im Vergleich zu den Ergebnissen der Tiere der Kontrollgruppe erhöhte Gehalte an CML und CEL in der Leber, jedoch erniedrigte Gehalte dieser Verbindungen in den Nieren. Zudem war die CML-Ausscheidung nach Verabreichung der Diät, die die Brotkruste enthielt, sowohl bei den Tieren der CTRL- als auch bei denen der NX-Gruppe erhöht. Zusammenfassend kann die Aufnahme von lebensmittelrelevanten *Maillard*-Reaktionsprodukten in nahrungstüblicher Dosierung zwar zu einer Aktivierung des zellulären RAGE-Rezeptors führen, die renale Ausscheidung ist jedoch sowohl im gesunden als auch in einem Organismus mit geringfügig eingeschränkter Nierenfunktion nicht vermindert. Die durch die Verabreichung der mit Brotkruste angereicherten Diät induzierte Proteinurie ist hingegen als Risikofaktor gegenüber Nierenfunktionsstörungen zu sehen, so dass hier die Durchführung weiterer Studien zur Aufklärung der verantwortlichen Mechanismen und zur Risikoabschätzung notwendig sind.

4.6. Genotoxizität und Mutagenität von Melanoidinen isoliert aus einem gerösteten Glucose-Glycin-Modell in humanen Lymphozyten, intestinalen Caco-2-Zellen und in den *Salmonella typhimurium*-Stämmen TA98 und TA102

Ausgangslage: Melanoidine werden als tief braun gefärbte *Maillard* Reaktionsprodukte bei der Erhitzung von Lebensmitteln gebildet und sind somit Bestandteile unserer täglichen Nahrung. Informationen hinsichtlich der genotoxischen, zytotoxischen und mutagenen Aktivität liegen aus wenigen Studien zwar für *Maillard*-Reaktionsprodukte vor, über Melanoidine standen jedoch bisher noch keine Daten zur Verfügung.

Forschungsziel: Beurteilung der genotoxischen, zytotoxischen und mutagenen Aktivität von Melanoidinen

Ergebnis: Die dosis- und zeitabhängigen Untersuchungen der mutagenen, zytotoxischen und genotoxischen Aktivität einer wasserlöslichen Fraktion (SOL A), der darin enthaltenen hochmolekularen (HMW; Molekulargewicht > 12.400 Da) sowie niedermolekularen (LMW; Molekulargewicht < 12.400 Da) Verbindungen, isoliert aus einem bei 125 °C gerösteten Glucose-Glycin-Modell, wurden in humanen Lymphozyten mittels Sister Chromatid Exchange (SCE), in humanen intestinalen Caco-2 Zellen mittels SCE, Proliferation sowie Vitalität und in den *Salmonella typhimurium*-Stämmen TA98 und TA102 mittels Ames-Test durchgeführt. In den humanen Lymphozyten führte die Exposition mit allen getesteten Melanoidinfraktionen in Konzentrationen von 0,05 % bis zu 1,0 % zu einem genotoxischen Anstieg der SCE-Bildung. In Caco-2-Zellen war die SCE-Bildung allein nach Exposition der LMW-Fraktion erhöht, während gleichzeitig eine zytotoxische Abnahme der zellulären Vitalität und Proliferation auftrat. Eine mutagene Aktivität für die einzelnen Melanoidinfraktionen wurde anhand des Ames-Tests in keinem der untersuchten Stämme festgestellt. Insgesamt wurde für die aus dem bei 125 °C gerösteten Glucose-Glycin-Modell isolierten Melanoidinfraktionen zwar eine genotoxische Aktivität in humanen Lymphozyten und, für die LMW-Fraktion, eine zytotoxische Aktivität in

humanen Intestinalzellen festgestellt, die hierbei effektiven Konzentrationsbereiche liegen jedoch bei weitem unter denen bekannter genotoxischer und zytotoxischer Verbindungen.

4.7. Zöliakiespezifische immunologische und toxikologische Untersuchungen von HMW-Untereinheiten des Weizens

Ausgangslage: Zahlreiche *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen haben gezeigt, dass die Gliadinfraktion insgesamt und auch alle darin enthaltenen Gliadintypen (α , γ , ω -Gliadine) für die zöliakietoxische Wirkung von Weizen verantwortlich sind. Die Gluteninfraktion wurde hingegen nur in einigen wenigen Untersuchungen getestet, wobei ihre Zöliakieaktivität widersprüchlich beurteilt wurde. Über die Aktivität der beiden Glutenintypen, der LMW- und der HMW-Untereinheiten, lagen lange Zeit keine Informationen vor. Eine 2003 erschienene Arbeit, die *in-vitro*-Untersuchungen an T-Lymphozyten von Zöliakiekranken beschrieb, gab erste Hinweise auf eine potenzielle Wirkung der HMW-Untereinheiten. Ein fundierter Beweis hierfür mittels *in-vivo*-Tests fehlt bisher.

Forschungsziel: Isolierung reiner HMW-Untereinheiten aus Weizenmehl und Klärung ihrer Zöliakietoxizität durch *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen.

Ergebnis: Aus Körnern der Weizensorte "Rektor" wurde mit Hilfe eines kombinierten Extraktion/Präzipitationsverfahrens eine Mischung von vier HMW-Untereinheiten (Nr. 5, 7, 9 und 10) gewonnen und durch präparative RP-HPLC an C8-Kieselgel gereinigt. Die Reinheitsprüfung durch analytische RP-HPLC, ELISA und SDS-PAGE ergab, dass das Präparat maximal 0,18 % Gliadine und LMW-Untereinheiten enthielt. Die HMW-Untereinheiten wurden für die Toxizitätstests mit trägergebundenem Pepsin und Trypsin nacheinander partiell hydrolysiert. Die *in-vivo*-Untersuchungen wurden an drei erwachsenen Zöliakiepatienten vorgenommen, die bereits an früheren Studien teilgenommen und auf ein Gliadinhydrolysat positiv und auf ein Caseinpeptid negativ reagiert hatten. Sie hatten sich vor der Untersuchung strikt glutenfrei ernährt und wiesen demnach eine intakte Dünndarmschleimhaut auf. Das Hydrolysat der HMW-Untereinheiten (je 500 mg) wurde in Wasser gelöst und in das Duodenum instilliert. Zu Beginn der Instillation und 2, 4 und 5 oder 6 h danach wurde mit einer multiplen Quinton-Kapsel Gewebe entnommen und anschließend mikroskopisch untersucht. Als Maß für die Toxizität dienten Veränderungen der Enterozytenhöhe, des Verhältnisses Villushöhe/Kryptentiefe und der Anzahl intraepitheler Lymphozyten. Bei allen Patienten war bereits nach 2 h in allen drei Parametern eine Wirkung zu beobachten, die nach 4, 5 oder 6 h ein hochsignifikantes Ausmaß erreichte. Damit wurde erstmals eine zöliakiespezifische Toxizität von HMW-Untereinheiten nachgewiesen. Die immunologischen Untersuchungen erfolgten an T-Lymphozyten, die nach Stimulation mit einem Glutenhydrolysat aus Darmgewebe von Zöliakiekranken isoliert worden waren. Aus Blut gewonnene Antigen-präsentierende Zellen wurden mit dem Hydrolysat der HMW-Untereinheiten vorinkubiert und dann mit radioaktiv markiertem Thymidin und den T-Zellen inkubiert. Ein Teil des Hydrolysats wurde nach Behandlung mit Gewebetransglutaminase untersucht. Als Maß für die Stimulationswirkung diente der Anstieg der Radioaktivität in den vermehrten T-Zellen im Vergleich zum Leerversuch. Die Untersuchung der T-Zelllinien von 14 Zöliakiekranken ergab mit der Positivkontrolle (Glutenhydrolysat) 13, mit dem unbehandelten HMW-Hydrolysat 7 und mit dem tTG-behandelten HMW-Hydrolysat 8 positive Resultate. Damit stand fest, dass nicht nur Gliadine, sondern auch HMW-Untereinheiten von Glutenin das Potenzial besitzen, die T-Lymphozyten zöliakiespezifisch zu stimulieren und die Darmschleimhaut *in-vivo* zu schädigen.

5. Tabellenwerk zum Nährstoffgehalt von Lebensmitteln Vitamin- und Mineralstoffgehalt pflanzlicher Lebensmittel

Ausgangslage: Pflanzliche Lebensmittel haben in der menschlichen Ernährung als Energie-Lieferanten in Form von Kohlenhydraten und Proteinen sowie von Ballaststoffen, Vitaminen und Mineralstoffen eine zentrale Bedeutung. Die von der DGE empfohlene Verzehrsmenge der Lebensmittelgruppe Obst und Gemüse wird in Deutschland im Durchschnitt nicht erreicht, und seitens der Industrie werden Nahrungsergänzungsmittel u.a. in Form von Vitamin- und Mineralstoffpräparaten als Alternative angeboten. Im Rahmen von Werbekampagnen und Produktinformationen wird der Eindruck erweckt, dass die im Handel verfügbaren pflanzlichen Lebensmittel im Vergleich zur Vergangenheit an Nährstoffen verarmt sind, so dass eine ausreichende Versorgung mit Vitaminen und Mineralstoffen durch eine ausgewogene Ernährung nicht mehr gewährleistet werden kann. Wissenschaftlich fundierte Untersuchungen liegen diesen Aussagen jedoch nicht zu Grunde.

Ergebnis: Die Aufnahme essentieller Mineralstoffe ist für Pflanzenwachstum und -vermehrung notwendig. Bei Mangel oder Überschuss dieser Nährstoffe kommt es zu charakteristischen, gut erkennbaren Veränderungen an der Pflanze. Mineralstoffe benötigen die Pflanzen als Strukturelemente der Zellwände, sie sind Bestandteile von Enzymen und Co-Faktoren und beteiligt an der Regulation des Wasserhaushalts. Vitamine werden von den Pflanzen selbst synthetisiert. Sie besitzen als Co-Enzyme, Antioxidantien und Bestandteile des Photosyntheseapparats Schlüsselfunktionen im pflanzlichen Stoffwechsel. Ein Mangel oder gar ein Fehlen dieser Substanzen würde den Pflanzenstoffwechsel stark beeinträchtigen bzw. zum Erliegen bringen. Wachstum und Vermehrung wären folglich, wenn überhaupt, nur stark eingeschränkt möglich.

Die Gehalte an Mineralstoffen und Vitaminen in Pflanzen werden von internen Faktoren, wie der Varietät des pflanzlichen Organismus und dem Reifegrad von Früchten und Gemüsen sowie durch externe Faktoren, dazu zählen die klimatischen Bedingungen, der (Boden als Nährstofflieferant der Pflanze, Düngung und Anbauform sowie die Transport- und Lagerungsbedingungen, beeinflusst. In zahlreichen wissenschaftlichen Studien ist der Einfluss der vorher beschriebenen Parameter auf die Vitamin- und Mineralstoffgehalte exemplarisch an verschiedenen Früchten und Gemüsen untersucht worden. Innerhalb unterschiedlicher pflanzlicher Varietäten lassen sich z.T. Schwankungen in den Vitamin- und Mineralstoffkonzentrationen um ein Vielfaches feststellen, alle anderen Parameter zeigen ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die in pflanzlichen Lebensmitteln vorliegenden Vitamin- und Mineralstoffgehalte. Bei einem Vergleich von Nährwertdaten unterschiedlicher Quellen ist die Darstellung der Daten, insbesondere bei Vitaminen bzgl. ihrer Vitaminaktivität und den Konzentrationen einzelner Derivate zu berücksichtigen. Ebenfalls sind die verwendete Analysenmethode sowie weitere qualitätssichernde Parameter für die Vergleichbarkeit und Beurteilung der vorliegenden Werte zu prüfen. Für eine fundierte wissenschaftliche Diskussion von Veränderungen in den Gehalten wertgebender Inhaltsstoffe ist somit eine Betrachtung von Schwankungsbereichen und deren beeinflussende Parameter notwendig.

Um einen Eindruck des zeitlichen Verlaufs der Konzentrationen von Vitaminen und Mineralstoffen in pflanzlichen Lebensmitteln zu vermitteln, sind Mineralstoff- und Vitamingehalte exemplarisch ausgewählter pflanzlicher Lebensmittel aus 10 internationalen Nährwerttabellen der letzten 50 Jahre zusammengestellt. Anhand dieser Daten lässt sich keine Tendenz zu sinkenden oder steigenden Nährstoffkonzentrationen der betrachteten Lebensmittel in dem angegebenen Zeitraum feststellen.

5.2. Update der Online-Version der SFK-Datenbank

Ausgangslage: Dem jeweiligen Wissensstand entsprechende Tabellen über die Zusammensetzung von Lebensmitteln sind für die Administration, Ernährungsberatung, Wirtschaft und Wissenschaft unentbehrlich.

Forschungsziel: Das von Souci, Fachmann und Kraut begründete Tabellenwerk ist durch Erfassung der gesamten einschlägigen Literatur mit Hilfe der PC-Datenbank SFKDB ständig auf dem aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand zu halten. Dies gilt auch für die davon abgeleitete kleine Lebensmitteltabelle. Das Spektrum der Inhaltsstoffe soll sich weiterhin verstärkt nach präventiv-medizinischen Gesichtspunkten ausrichten.

Ergebnis: Die kleine Nährwerttabelle "Der kleine Souci-Fachmann-Kraut: Lebensmitteltabelle für die Praxis" ist Ende Dezember 2003 erschienen. Das zweite Update der Onlineversion wurde nach einigen strukturellen Korrekturen der LINDAS-Datenbank im November 2004 publiziert. Inhaltlich ist die Datenbank u.a. um die Lebensmittel Dinkel und Dinkelmehl Type 630 ergänzt worden, Aminosäuredaten wurden im Getreidebereich umfangreich aktualisiert. Weiterhin sind Daten zu speziellen Kohlenhydraten hinzugefügt und Mineralstoffdaten erneuert worden. Die Arbeit an der 7. Auflage wurde fortgesetzt, speziell der Datenbestand der bioaktiven Substanzen wird erweitert. Ältere Daten sollen im Zuge der fortschreitenden Methodenentwicklung aktualisiert werden (z. B. Daten für Folsäure und Iod).