

Biochemische Charakterisierung von ökologisch und konventionell erzeugtem Weizen aus dem DOK-Versuch: Profiling Techniken und Analytik von Einzelverbindungen

Biochemical characterisation of organic and conventionally produced wheat originating from the DOK-trail: profiling techniques and analysis of individual components

GEORG LANGENKÄMPER¹, ANDREAS BRUDER², THOMAS BETSCHE¹ UND CHRISTIAN ZÖRB^{1,3}

¹Institut für Biochemie von Getreide und Kartoffeln der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Schützenberg 12, 32756 Detmold

²Institut für Getreide-, Kartoffel- und Stärketechnologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Schützenberg 12, 32756 Detmold

³Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Hermann-Rodewald-Str. 2, 24118 Kiel (derzeitige Anschrift)

E-Mail: Georg.Langenkaemper@bfel.de

Abstract

Wheat of the DOK-field trail (Switzerland) was comprehensively characterised in order to detect possible biochemical differences between wheat originating from organic and conventional farming systems. Directed at this goal, we used the ‘profiling techniques’ metabolomics and proteomics, complemented by traditional analytical methods for detection of individual components. Results of analyses of individual components and metabolite-profiles showed minor differences in DOK-wheat of the different farming systems. Protein-profiles, obtained with two dimensional gel-electrophoresis, revealed significant differences in the expression of a small number of proteins in organic and conventional wheat from harvests of two growing seasons. It is concluded that organically and conventionally produced DOK-wheat is of equal quality with respect to nutritional value. It is further concluded that the results obtained with protein-profiles represent an indication for a signature to differentiate organic and conventional DOK-wheat.

Keywords: metabolomics, organic farming, profiling, proteomics, signature, wheat

Zusammenfassung

Weizen aus dem DOK-Feldversuch (Schweiz) wurde umfassend hinsichtlich möglicher biochemischer Unterschiede zwischen ökologischen und konventionellen Anbauformen charakterisiert. Dazu wurden die „Profiling Techniken“ Metabolomics und Proteomics, ergänzt durch traditionelle Analytik von Einzelverbindungen, eingesetzt. Die Ergebnisse der Analytik von Einzelverbindungen und von Metabolit-Profilen zeigten lediglich geringfügige Unterschiede im DOK-Weizen aus unterschiedlichen Anbauformen. Im Protein-Profil, aufgenommen mit Hilfe von zweidimensionaler Gel-Elektrophorese, konnten signifikante

Unterschiede für die Expression einiger Proteine in ökologischem und konventionellem Weizen zweier Anbaujahre detektiert werden. Aus diesen Ergebnissen wird gefolgert, dass ökologisch und konventionell erzeugte DOK-Weizen ernährungsphysiologisch gleich wertvoll sind. Die weitere Schlussfolgerung der Ergebnisse ist, dass auf Ebene der Proteine viel versprechende Hinweise auf eine Signatur zur Unterscheidung von ökologischem und konventionellem DOK-Weizen gefunden wurden.

Schlüsselwörter: Herkunftsnachweis, Metabolomics, Ökologischer Landbau, Profiling, Proteomics, Weizen

1 Einleitung

Positive Auswirkungen des ökologischen Landbaus auf Agro-Ökosysteme, besonders die Biodiversität und die Bodenfruchtbarkeit, sind durch wissenschaftliche Daten gut belegt (Mäder et al., 2002). Zudem äußern viele Verbraucher die Meinung, dass ökologische Lebensmittel sicherer und gesünder sind als konventionelle (Bourn and Prescott, 2002; Kuhnert et al., 2003).

Diese Verbrauchermeinung ist ein Grund für den wachsenden Erfolg von Produkten aus dem ökologischen Landbau. Ein wissenschaftlicher Nachweis, dass ökologische Lebensmittel eine ernährungsphysiologisch bessere Qualität haben, ist allerdings schwierig zu erbringen. Eine umfangreiche Literaturstudie aus dem Jahr 2003 stellt fest, dass Unterschiede hinsichtlich verschiedener Inhaltsstoffe auftreten, wegen widersprüchlicher Ergebnisse jedoch keine eindeutigen Folgerungen abgeleitet werden können (Tauscher et al., 2003). Eine der möglichen Ursachen für diese widersprüchlichen Ergebnisse wurde im analysierten Probenmaterial gesehen, das vielfältigen Einflüssen ausgesetzt ist, die nicht im Zusammenhang mit ökologischem oder konventionellem Landbau stehen. Aus diesem Grund wurde für die hier vorgestellte Arbeit auf Probenmaterial aus dem DOK-Feldversuch zurückgegriffen. Der DOK-Feldversuch umfasst verschiedene ökologische und konventionelle Anbausysteme und wird seit 1978 kontinuierlich in der Nähe von Basel (Schweiz) durchgeführt (Mäder et al., 2006). Der Anbau identischer Sorten und gleicher Fruchtfolgen, gleiche klimatische Bedingungen und der homogene Bodentyp gewährleisten, dass die Bedingungen für die ökologischen und konventionellen Anbausysteme weitestgehend gleich sind. Lediglich Form und Menge der Düngung und die Pflanzenschutzmaßnahmen sind spezifisch für die jeweiligen Anbausysteme (Mäder et al., 2002; Mäder et al., 2006). Weizen des DOK-Feldversuchs eignet sich daher hervorragend, um Vergleichsstudien verschiedener landwirtschaftlicher Systeme durchzuführen.

Ziel der Arbeiten war, den DOK-Weizen umfassend hinsichtlich möglicher biochemischer Unterschiede zwischen ökologischen und konventionellen Anbauformen zu charakterisieren. Dazu wurde einerseits traditionelle Analytik von Einzelverbindungen eingesetzt. Andererseits wurden „**Profiling Techniken**“ verwendet.

Unter Profiling Techniken versteht man eine Reihe von methodischen Konzepten, die es erlauben, zum Beispiel den pflanzlichen Stoffwechsel umfassend zu analysieren. Diese Techniken werden seit einigen Jahren eingesetzt, u. a. um die Effekte und Wirkungen von Stress, Hormonen oder Arzneimitteln auf Organismen aufzuklären. Grundsätzlich ermöglichen Profiling Techniken die Erfassung der gesamten Bandbreite des Stoffwechsels auf den Ebenen der mRNA, der Proteine und auch der Stoffwechselmetabolite. Der

betrachteten Stoffklasse entsprechend werden die Methoden mit den Begriffen Transcriptomics, Proteomics und Metabolomics umschrieben.

Im Folgenden werden Ergebnisse von Profiling Analysen und der Analytik von Einzelverbindungen an DOK-Weizenproben berichtet.

2 Material und Methoden

Weizenkörner (*Triticum aestivum* L.) vom DOK-Feldversuch der Ernten 2003, 2005 (cv. Titlis) und 2006 (cv. Runal) wurden eingesetzt. Der DOK-Feldversuch wird seit 1978 in der Nähe von Basel vom Forschungsinstitut für biologischen Landbau, Frick (Schweiz) und der Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon, Zürich (Schweiz), durchgeführt. Für eine detaillierte Beschreibung des Feldversuchs wird auf die Publikation von Mäder et al. (2002) hingewiesen. Weizen von zwei ökologischen Anbausystemen, die als bio-organisch und bio-dynamisch bezeichnet werden, wurden verwendet. Konventioneller Weizen des DOK-Feldversuchs stammte aus zwei integrierten Anbausystemen, in denen entweder nur mineralischer Dünger oder mineralischer und organischer Dünger eingesetzt wurden. Für Stickstoff, Phosphor und Kalium war die Düngung in den ökologischen Anbausystemen zwischen 34 und 51 % niedriger als in den konventionellen Systemen (Mäder et al., 2002). Fruchtfolgen, Sorten und Bodenbearbeitung waren in allen Anbausystemen identisch.

Analytik von Stickstoff, Phosphat, löslicher und Gesamt-Oxaläure, Phytinsäure, Fruktan, löslicher und unlöslicher Ballaststoffe und der antioxidativen Kapazität erfolgte wie in Langenkämper et al. (2006b) beschrieben. Elementkonzentrationen für Mg, Fe, Zn, Cd, Pb, und Ni, Glutathion-Reduktaseaktivität und die Konzentration von Glutathion wurden bestimmt (Langenkämper et al., 2006a). Stärke und resistente Stärke wurden durch enzymatischen Abbau (AOAC Methoden 996.11 und 2002-02) unter Einsatz kommerzieller Kits (Megazyme, Irland) bestimmt.

In methanolischen Extrakten von Weizenproben wurden mit Hilfe von Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) Metaboliten-Profile aufgenommen (Zörb et al., 2006). Durch Anwendung von zweidimensionaler Gel-Elektrophorese (2D GE), im Wesentlichen wie bei Zörb et al. (2004) beschrieben, wurden Protein-Profile erstellt. Die Auswertung der 2D-Gele erfolgte über eine Spezialsoftware (Delta2D, Decodon), die die jeweiligen technischen Replikate einer Variante zu virtuellen 2D-Mittelwertgelen verarbeitet und auf der Basis dieser 2D-Mittelwertgele dann einen Vergleich der Konzentration jedes einzelnen Proteins ermöglicht. Über die Einführung statistischer Kriterien und Filter wurden nur solche Proteine ausgewertet, die reproduzierbar in verschiedenen Gelen detektierbar waren (95%-Niveau). Ein weiterer Filter wurde so gesetzt, dass Proteinkonzentrationen aus konventioneller und ökologischer Anbauform nur dann als verändert angesehen wurden, wenn ein mindestens zweifacher Konzentrationsunterschied zwischen ihnen vorlag. Die Proteinidentifizierung erfolgte über Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS).

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Test nach Tukey mit Hilfe des SAS Programms (SAS Institute Inc., Cary, USA) durchgeführt. Signifikanz wurde auf dem 5 % Niveau getestet. Für jedes der verschiedenen Anbausysteme wurden Proben von mindestens drei unabhängigen Versuchspartnern untersucht.

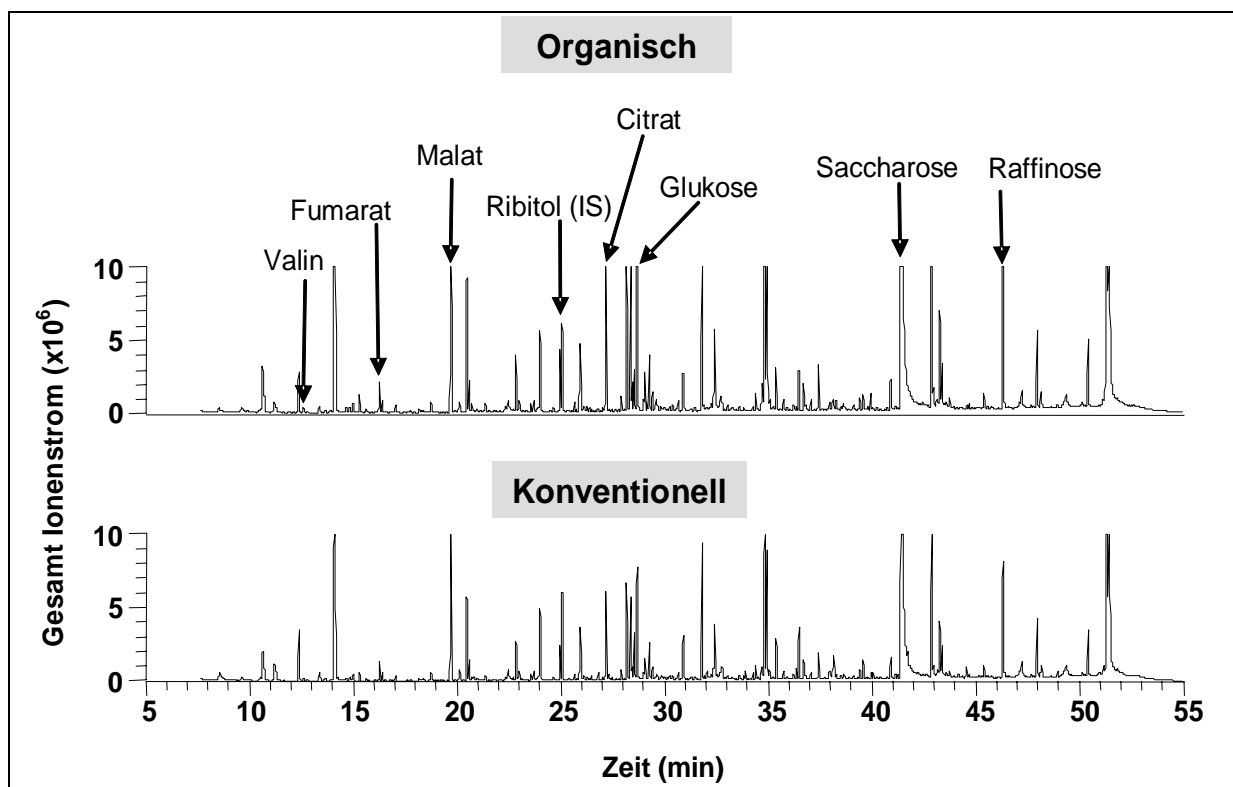
3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Analytik von Einzelverbindungen

In den DOK-Weizenproben wurden die Konzentrationen von Inhaltsstoffen, u. a. Proteine (ermittelt über Kjeldahl N), Phenole, Phytinsäure, Oxalsäure, Ballaststoffe (Langenkämper et al., 2006b), oxidative Substanzen und Mineralstoffe (Langenkämper et al., 2006a), Stärke und resistente Stärke (Bruder et al., in Vorbereitung) bestimmt. Für die große Mehrzahl der untersuchten Parameter wurden keine signifikant verschiedenen Konzentrationen für Weizen aus ökologischem oder konventionellem Anbau gefunden. Ein Unterschied bestand im Rohproteingehalt (Kjeldahl N), der im ökologischen Weizen geringfügig, aber signifikant niedriger war.

3.2 Metaboliten-Profile

Ein Schwerpunkt der Arbeiten lag auf der Erstellung eines Profils der Inhaltsstoffe oder Metabolite des Weizens aus den verschiedenen Anbausystemen. Aus Weizenschrotten wurden methanolische Extrakte hergestellt, die mittels GC-MS analysiert wurden. Beispielhaft sind zwei Gesamtionen-Chromatogramme von Weizen aus ökologischem und konventionellem Anbau in Abbildung 1 dargestellt.



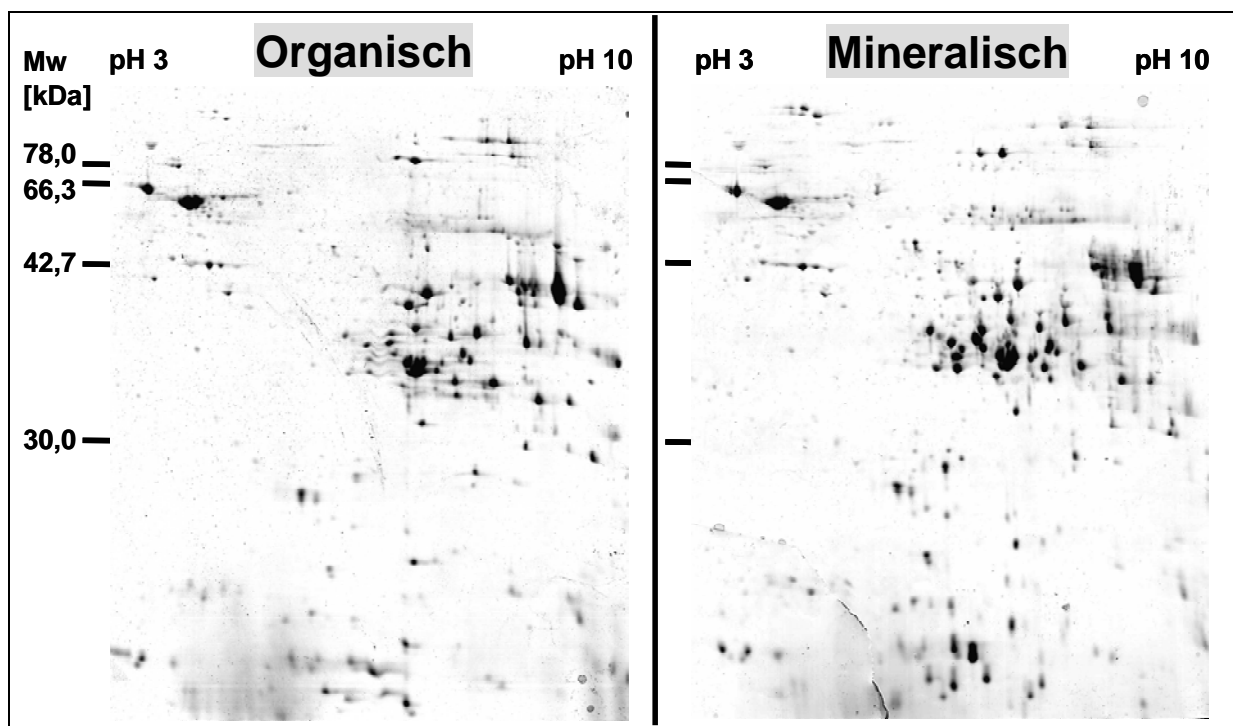
Organisch (bio-organisch), Konventionell (mineralisch-organisch). Eine Auswahl identifizierter Substanzen ist gezeigt. Ribitol wurde als interner Standard zugesetzt. Abbildung verändert nach Zörb et al. (2006).

Abbildung 1. Metaboliten-Profilung: Gesamtionenchromatogramm methanolischer Extrakte von Weizenkörnern aus ökologischem und konventionellem Anbau mit Hilfe kombinierter Gaschromatographie-Massenspektrometrie.

Mit GC-MS Analysen wurde ein Profil von 52 Inhaltsstoffen erstellt, u. a. Aminosäuren, Zucker, Zuckeralkohole und organische Säuren. Lediglich bei den acht Inhaltsstoffen α -Alanin, β -Alanin, Valin, Myo-Inositol, Glycerat, Hydroxyglutarat, Harnstoff und Panthotensäure wurden statistisch signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den Weizen der verschiedenen Anbauformen festgestellt. Die Konzentrationsunterschiede dieser acht Inhaltsstoffe zwischen den verschiedenen Anbauformen betragen bis zu 50%. Eine Hauptkomponentenanalyse der Ergebnisse hat aber gezeigt, dass die Unterschiede in den Metabolitkonzentrationen nicht zur Differenzierung zwischen ökologischem und konventionellem Weizen genutzt werden konnten. Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden im Detail veröffentlicht (Zörb et al., 2006).

3.3 Protein-Profil

Mittels 2D GE wurde ein Protein-Profil (Proteomics) von ökologisch und konventionell erzeugtem Weizen erstellt (Zörb et al., in Vorbereitung). 2D-Gele aus dem ökologischen und konventionellen Anbau sind in Abbildung 2 als Beispiel gezeigt.



Molekulargewicht, vertikal; pH-Wert, horizontal. Gezeigt sind zwei Einzelgele.

Abbildung 2. Protein-Profiling: Zweidimensionale Auftrennung von Weizenkornproteinen durch kombinierte isoelektrische Fokussierungen und SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.

Insgesamt wurden auf allen 2D-Gelen über 1000 Proteine detektiert. Die quantitative Auswertung der Färbungsintensitäten ergab, dass einige dieser Proteine in zwei Anbauperioden signifikant unterschiedlich in den Weizenkörnern der verschiedenen Anbauformen vorlagen. Dieses Ergebnis deutet auf einen viel versprechenden Ansatz für eine Signatur, anhand derer die DOK-Weizenmuster aus ökologischem und konventionellem Anbau unterschieden werden können. In einem nächsten Schritt soll untersucht werden, ob diese Signatur gleichfalls in Weizenproben, die aus dem kommerziellen Anbau stammen, gefunden werden können.

4 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der Analytik von Einzelverbindungen und von Metabolit-Profilen zeigten geringfügige Unterschiede im DOK-Weizen aus unterschiedlichen Anbauformen. Im Protein-Profil konnten signifikante Unterschiede für die Expression einiger Proteine in ökologischem und konventionellem Weizen zweier Anbaujahre detektiert werden. Aus diesen Ergebnissen wird die Schlussfolgerung gezogen, dass ökologisch und konventionell erzeugte Weizen ernährungsphysiologisch gleich wertvoll sind. Es ist aber klar, dass selbst die verwendeten Ansätze zur Erstellung von Profilen nur einen Ausschnitt aus der Fülle an Inhaltsstoffen erfassen, wenn auch einen vergleichsweise sehr großen. Die weitere Schlussfolgerung der Ergebnisse ist, dass auf Ebene der Proteine viel versprechende Hinweise auf eine Signatur zur Unterscheidung von ökologischem und konventionellem DOK-Weizen gefunden wurden.

Danksagung

Wir danken dem Forschungsinstitut für ökologischen Landbau, Schweiz, und der Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon, Schweiz, für die Bereitstellung des DOK-Weizens. Besonderer Dank gilt Dr. Paul Mäder und Dr. Urs Niggli für die Diskussionen zu verschiedenen Aspekten des DOK Versuchs. Für die zuverlässige Durchführung der Analysen danken wir Annette Meyer-Wieneke, Elfriede Schieseck, Monika Null-Greulich, Birgit Nierle, Manuela Krome, Christine Heistermann, Alexander Wächter und Dagmar Oeldemann. Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung durch die BLE im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau, Projekt Nr. 02OE069, wodurch die vorgestellten Forschungsarbeiten ermöglicht wurden.

5 Literatur

- Bourn D, Prescott J (2002) A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42: 1-34
- Kuhnert H, Feindt P H, Wragge S, Beusmann V (2003) Nachfrage nach Öko-Lebensmitteln: Ergebnisse einer repräsentativen Verbraucherstudie. In: 7. Wissenschaftstagung zum Ökologischen Landbau, Ökologischer Landbau der Zukunft, Universität für Bodenkultur Wien, Institut für Ökologischen Landbau, Wien. S. 653-654
- Langenkämper G, Zörb C, Seifert M, Betsche T (2006a) Mineralstoffkonzentration und Antioxidantien in Weizen aus ökologischem und konventionellem Anbau. *Getreidetechnologie* 60: 295-300
- Langenkämper G, Zörb C, Seifert M, Mäder P, Fretzdorff B, Betsche T (2006b) Nutritional quality of organic and conventional wheat. *J. Appl. Bot. Food Qual.* 80: 150-154
- Mäder P, Fließbach A, Dubois D, Gunst L, Fried P, Niggli U (2002) Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* 296: 1694-1697
- Mäder P, Fließbach A, Dubois D, Gunst L, Jossi W, Widmer F, Oberson A, Frossard E, Oehl F, Wiemken A, Gattinger A, Niggli U (2006) The DOK experiment (Switzerland). In: Long Term Field Experiments in Organic Farming. ISOFAR Scientific Series No. 1. Raupp J, Pekrun C, Oltmanns M and Köpke U (Hrsg.). Verlag Dr. Köster, Berlin. S. 41-58
- Tauscher B, Brack G, Flachowsky G, Henning M, Köpke U, Meier-Ploeger A, Münzing K, Niggli U, Pabst K, Rahmann G, Willhöft C, Mayer-Miebach E (2003) Bewertung von Lebensmitteln verschiedener Produktionsverfahren - Statusbericht. Schriftenreihe des

Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, Reihe A: Angewandte Wissenschaft Heft 499. Landwirtschaftsverlag, Münster. 166 S.

Zörb C, Langenkämper G, Betsche T, Niehaus K, Barsch A (2006) Metabolite profiling of wheat grains (*Triticum aestivum* L.) from organic and conventional agriculture. J. Agric. Food Chem. 54: 8301-8306

Zörb C, Schmitt S, Neeb A, Karl S, Linder M, Schubert S (2004) The biochemical reaction of maize (*Zea mays* L.) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaptation. Plant Sci. 167: 91-100