

Massenspektrometrischer Nachweis von Weizenprotein in Fleischerzeugnissen

HIRSCHFELD¹, S., SPEER¹, K., SCHWÄGELE, F., JIRA, W.

Weizen ist eine der 14 Allergie auslösenden Lebensmittelzutaten, die in der Europäischen Union nach Richtlinie 2007/68/EG der Kennzeichnungspflicht unterliegen. Die Weizenallergie tritt häufig bei Bäckern auf, die durch ständigen Kontakt mit dem feinen Mehlstaub und dessen Inhalation eine Allergie entwickeln können. Das „Bäcker-Asthma“ zählt zu den bedeutendsten Erkrankungen, die zur Berufsunfähigkeit führen. Darüber hinaus kann die Aufnahme von „Kleberproteinen“ des Weizens, dem sogenannten Gluten, zu einer Immunreaktion des Körpers führen, woraus eine lebenslange und bisher nicht therapierbare Glutenunverträglichkeit, die Zöliakie, hervorgeht. Zöliakie-Patienten sind daher auf glutenfreie Produkte angewiesen. Laut Verordnung (EG) Nr. 41/2009 darf ein Lebensmittel als „glutenfrei“ bezeichnet werden, wenn der Glutengehalt höchstens 20 mg/kg beträgt.

Der Eintrag von Weizen in Fleischerzeugnisse kann auf zwei verschiedenen Wegen geschehen: zum einen bewusst aus technologischen bzw. ökonomischen Gründen (Fremdeiweiß), da Weizenmehl einerseits ein hohes Wasserbindungsvermögen besitzt und andererseits eine kostengünstige Proteinquelle darstellt, oder zum anderen unbewusst als Kontamination aus Gewürzmischungen oder anderen Zusatz- und Prozesshilfsstoffen. Potenziell betroffen können alle zubereiteten, marinierten, gewürzten oder panierten Fleischstücke sowie Fleischerzeugnisse sein.

Bislang werden zum Nachweis von Gluten in der Regel immunologische Nachweisverfahren eingesetzt, die jedoch sehr teuer und zudem für eine simultane Bestimmung verschiedener Allergene bzw. Fremdeiweiße nicht geeignet sind. Im Rahmen der vorgestellten Arbeit sollte eine schnelle Methode zum Nachweis von Weizenproteinen in Fleischerzeugnissen mittels einer Kopplung von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) entwickelt werden, die Potenzial zu einer Weiterentwicklung zur simultanen Bestimmung verschiedener Allergene bzw. Fremdeiweiße besitzt.

Zur Ermittlung charakteristischer Weizen-Markerpeptide wurde zunächst reines Weizenmehl entfettet, das extrahierte Protein mit Trypsin verdaut und das resultierende Peptidgemisch mittels hochauflösender HPLC-MS/MS vermessen. Die erhaltenen Messdaten in Form von Peaklisten wurden an die Online-Version der MASCOT-Datenbank

¹ Techn. Universität Dresden, Fachbereich Spezielle Lebensmittelchemie und Lebensmittelproduktion

(www.matrixscience.com) geschickt. Dabei wurde eine fehlende Trypsinspaltstelle akzeptiert, eine Peptidmassentoleranz von 0,05 Dalton gewählt und als Aminosäuremodifikation „Carbamidomethyl“ festgelegt. Hierbei wurden charakteristische, aus Gliadinen (in Ethanol löslicher Teil des Glutens) resultierende Weizen-Markerpeptide und ihre spezifischen Fragment-Ionen ermittelt.

Für die Entwicklung einer HPLC-MS/MS-Methode zum Nachweis von Weizenprotein in Fleischerzeugnissen wurde aufgrund der sehr hohen Homogenität die Modellmatrix Brühwurst gewählt. Es wurden zunächst Brühwurstkonserven mit 0, 1, 6, 32, 160, 800 und 4000 mg/kg Gluten hergestellt, die jeweils als Kessel-, Voll- und Tropenkonserven erhitzt wurden, um auch Auswirkungen der thermischen Prozessierung auf die Nachweisbarkeit von Weizenprotein untersuchen zu können. Die homogenisierten Brühwürste wurden mittels beschleunigter Lösemittlextraktion (PLE) mit Aceton entfettet und entwässert und anschließend fein gemahlen. Als effektivstes Extraktionsmittel hat sich ein Gemisch aus Ethanol und Tris-HCl-Puffer bei einer Extraktionszeit von 3 Stunden bewährt. Nach Entfernung des Ethanolanteils wurde mit Dithiothreitol (DTT) und Iodacetamid (IA) umgesetzt und mit Trypsin für mehrere Stunden bei 37 °C verdaut.

Erste Ergebnisse belegen, dass Gluten mit dieser Methode anhand charakteristischer Markerpeptide in Brühwurstkonserven mit 160 mg/kg Gluten nachweisbar ist. Für das sensitivste Markerpeptid wurden Signal-Rausch-Verhältnisse von etwa 150:1 reproduzierbar erreicht. Durch weitere Optimierung des Analysenverfahrens soll die Nachweisgrenze der Methode deutlich unter 20 mg/kg gesenkt werden.