

Einsatz von Protein- und Metabolit-Profilings-Methoden zur Unterscheidung von ökologischem und konventionellem Weizen

Bonte, A.¹, Kessler, N.², Nattkemper, T.³, Goesmann, A.⁴, Thonar, C.⁵, Mäder, P.⁶, Niehaus, K.⁷ und Langenkämper, G.⁸

Keywords: Biomarker, Metabolomics, Profiling-Methoden, Proteomics, Weizen

Abstract

The interest in methods to proof organic food authenticity increases with the steadily rising popularity of food labelled organic. Profiling techniques enable the detection of a wide range of substances in biological samples. Together with bioinformatics tools these techniques are useful for biomarker searching, e. g. in plant extracts. Metabolomic and proteomic profiling techniques were used to screen organic and conventional wheat, originating from the DOK field trial in Switzerland. Up to 11 wheat varieties from three harvest years were analysed. We were able to detect a number of metabolites and proteins with significant differences between samples of conventional and organic grown wheat of the variety "Runal". Results viewed across all 11 varieties indicated a higher influence of both the variety and the seasonal effects than the cultivation form. Nevertheless, PCA performed on metabolite data for the individual varieties and for individual growing seasons revealed a clustering according to the cultivation forms. Further research is necessary to assess, whether these methods can be applied to distinguish organic and conventional wheat from agricultural practice.

Einleitung und Zielsetzung

Vor dem Hintergrund von zunehmend anonymisiertem, globalisiertem Lebensmittelhandel und einer Reihe von Lebensmittelskandalen in den letzten Jahren werden vielfältige Anstrengungen unternommen, Methoden zur analytischen Rückverfolgbarkeit sowie zum Nachweis der Authentizität zu entwickeln und zu verbessern (Carcea *et al.*, 2009). Ziel der Arbeiten hier war, die Profiling-Methoden Metabolomics und Proteomics einzusetzen und weiter zu entwickeln, um ökologisch und konventionell angebauten Weizen unterscheiden zu können. Ein wesentliches Charakteristikum der Pro-

¹ Max Rubner-Institut, Schützenberg 12, 32756, Detmold, Deutschland, anja.bonte@mri.bund.de, www.mri.bund.de und Universität Bielefeld (siehe 7)

² Universität Bielefeld, Arbeitsgruppe Computational Genomics & Arbeitsgruppe Biodata Mining, 33594 Bielefeld, Deutschland, nkessler@cebitec.uni-bielefeld.de, www.uni-bielefeld.de

³ Universität Bielefeld, Arbeitsgruppe Biodata Mining, Postfach 100131, 33501 Bielefeld, Deutschland, tim.nattkemper@uni-bielefeld.de, http://ani.cebitec.uni-bielefeld.de

⁴ Universität Bielefeld, Arbeitsgruppe Computational Genomics & Bioinformatics Resource Facility, Center for Biotechnology, 33594, Bielefeld, Deutschland, agoesman@cebitec.uni-bielefeld.de, http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/comics

⁵ FiBL, Ackerstrasse, 5070 Frick, Schweiz, cecile.thonar@fibl.org, http://www.fibl.org/

⁶ FiBL, Ackerstrasse, 5070 Frick, Schweiz, paul.maeder@fibl.org, http://www.fibl.org/

⁷ Universität Bielefeld, Abteilung für Proteom- und Metabolomforschung, 33594, Bielefeld, Deutschland, kniehaus@cebitec.uni-bielefeld.de, http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/

⁸ Max Rubner-Institut, Schützenberg 12, 32756, Detmold, Deutschland, ge-org.langenkaemper@mri.bund.de, www.mri.bund.de

filig-Methoden besteht darin, dass in einem Analysengang die Konzentrationen einer großen Zahl von Substanzen weitgehend ohne „parteiische“ Vorauswahl bestimmt werden. Somit erhöht sich bei Einsatz der Profiling-Methoden die Chance, Biomarker zu identifizieren, die zwischen ökologisch und konventionell angebauten Pflanzen unterscheiden können.

Methoden

Der Fokus der Arbeiten lag auf Winterweizen, der aus dem schweizerischen DOK Feldversuch stammt (Mäder *et al.* 2002). Eingesetzt wurde Weizen aus biodynamischer und konventioneller Anbauweise mit rein mineralischer Düngung mit jeweils vier Feldreplikaten. Zehn verschiedene Weizensorten, die sich hinsichtlich der geographischen Herkunft, des Zulassungsjahrs (von 1840 bis zur Gegenwart) und der Züchtungsart (konventionell oder ökologisch) unterscheiden (Hildermann *et al.* 2009) wurden mindestens von einem Anbaujahr und die Weizensorte Runal wurde über drei Anbaujahre des DOK Versuchs untersucht. Von allen Weizenproben wurden Metabolit-Profile für Stoffwechselprodukte des Primärstoffwechsels erstellt. Dazu wurden die Proben mit Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) untersucht wie von Zörb *et al.* (2006) beschrieben. Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der Softwareplattform MeltDB (Neuweger *et al.* 2008). Das Weizenproteom, d. h. die Proteinausstattung des Weizens, wurde mit 2D-Gelelektrophorese und einer massenspektrometrischen Methode (MALDI-TOF-MS) nach Zörb *et al.* (2009) analysiert.

Ergebnisse und Diskussion

Mit Hilfe des Protein-Profiling wurden in Weizen aus zwei Erntejahren 732 bzw. 845 Proteine detektiert. Die Bildanalyse auf differenziell auftretende Proteine ergab für ein Anbaujahr insgesamt 14 Proteine, die signifikant verschiedene Konzentrationen in ökologischem und konventionellem Weizen aufwiesen. Die Proteinidentifizierung lieferte bei 278 von 658 Proteinspots positive Ergebnisse. Unter den 14 signifikant differenziell auftretenden Proteinen wurden bisher drei Proteine identifiziert, die typische Weizenspeicherproteine darstellen. Die Bildanalyse der zweidimensionalen Gele auf differenziell auftretende Proteine ergab für das zweite Anbaujahr drei Proteine, die signifikant verschiedene Konzentrationen in Weizen aus den verschiedenen Anbausystemen aufwiesen. Im Vergleich beider Anbaujahre war kein sicherer Biomarker zu finden. Eine Ursache für dieses heterogene Ergebnis könnte sein, dass jahreszeitliche Einflüsse einen relativ größeren Einfluss auf die Proteinkonzentration haben als die Anbaumethode. Zur Absicherung der Ergebnisse werden die Arbeiten mit Weizen eines dritten Anbaujahrs und mit den verschiedenen Weizensorten fortgesetzt.

Das Metabolit-Profiling wurde mit Weizen aus insgesamt drei Anbaujahren unter Einbeziehung von 11 verschiedenen Sorten unter Einsatz einer GC-MS Methode durchgeführt. Über alle Weizensorten und Anbaujahre hinweg wurden 16 Metabolite gefunden, die signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den Anbauarten zeigten. Die Registrierung der kultivierungsartbedingten Änderungen des Metaboloms wurde erschwert durch deutliche sortenabhängige und wachstumsperiodenabhängige Schwankungen im Metabolom. Dennoch konnte unter diesen Bedingungen aufgezeigt werden, dass einige Metabolite mit signifikanten Unterschieden zwischen den Anbauarten in der Regel über alle Sorten erhöhte bzw. niedrigere Werte aufweisen. In einer weiterführenden, statistischen Datenauswertung, der Hauptkomponentenanalyse (PCA), wurden die Datenpools der Metabolite aus individuellen Anbaujahren eindeutig in die verschiedenen Anbauarten getrennt. Ein Beispiel Ergebnis einer PCA ist in Ab-

bildung 1 dargestellt. Diese Ergebnisse lassen die Ausbildung definierter, wiederkehrender Muster im Metabolom von Weizenproben aus ökologischer und konventioneller Produktion vermuten.

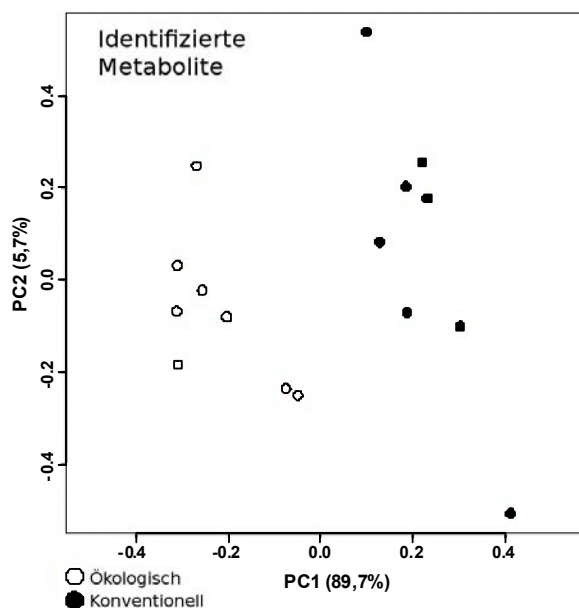


Abbildung 1: In einer Hauptkomponentenanalyse der Metabolit-Profile differenzieren Weizen nach der Anbauform.

Schlussfolgerungen

Protein- und Metabolit-Profilierung-Methoden detektierten Unterschiede zwischen ökologisch und konventionell angebautem Weizen aus dem DOK Feldversuch. Für beide Methoden wurde gefunden, dass Einflüsse der jeweiligen Wachstumsperiode einen relativ großen Effekt auf die Ergebnisse haben. Mit Blick auf die Anwendbarkeit der Methoden zur Unterscheidung von Weizen aus der landwirtschaftlichen Praxis sind weitere Forschungsarbeiten notwendig: zum einen muss der Einfluss verschiedener Anbaustandorte ermittelt werden und zum anderen muss geklärt werden, ob es notwendig ist, in jeder Wachstumsperiode zunächst ein „Referenzprofil“ mit ökologischen und konventionellen Weizen zu erstellen, anhand dessen unbekannte Proben differenziert werden können. Hinsichtlich des methodischen Aufwands ist für diese weiterführenden Arbeiten das Metabolit-Profilierung wesentlich praktikabler als das Protein-Profilierung.

Danksagung

Die Arbeiten wurden gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (Projektnummer 08OE023). Die Bereitstellung und Nutzung der Technologieplattform Bioinformatik wurde gefördert durch das BMBF im Rahmen des Förderprogramms GenoMik-Transfer (Projektnummer 0315599A und 0315599B). Nikolas Kessler dankt dem CLIB-Graduate Cluster Industrial Biotechnology für die Förderung.

Literatur

- Carcea M., Brereton P., Hsu R., Kelly S., Marmioli N., Melini F., Soukoulis C., Wenping, D. (2009): Food authenticity assessment: ensuring compliance with food legislation and traceability requirements. *Qual Assur Saf.Crop.* 1:93-100.
- Hildermann I., Thommen A., Dubois D., Boller T., Wiemken A., Mäder P. (2009): Yield and baking quality of winter wheat cultivars in different farming systems of the DOK long-term trials. *J. Sci. Food Agric.* 89:2477-2491.
- Mäder P., Fließbach A., Dubois D., Gunst L., Fried P., Niggli, U. (2002): Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* 296:1694-1697.
- Neuweiger H., Albaum S.P., Dondrup M., Persicke M., Watt T., Niehaus K., Stoye J., Goesmann A. (2008): MeltDB: a software platform for the analysis and integration of metabolomics experiment data. *Bioinformatics* 24:2726-2732.
- Zörb C., Betsche T., Langenkämper G. (2009): Search for diagnostic proteins to prove authenticity of organic wheat grains (*Triticum aestivum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 57:2932-2937.
- 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.