

Authentizitätsnachweis bei Lebensmitteln - Routine und Herausforderung

Autor(en): **Eugster, Albert**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene =
Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **95 (2004)**

Heft 6

PDF erstellt am: **15.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-981842>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Authentizitätsnachweis bei Lebensmitteln – Routine und Herausforderung*

Albert Eugster, Kantonales Laboratorium Aargau, Aarau

Einleitung

Seit einigen Jahren werden am Kantonalen Laboratorium Aargau proteinchemische und DNA-analytische Untersuchungsmethoden eingesetzt, um die Authentizität von Lebensmitteln nachzuweisen. Im Folgenden werden die verwendeten Techniken und deren Einsatzgebiete an Beispielen aufgezeigt.

Proteinchemische Untersuchungsmethoden

Für proteinchemische Untersuchungen wird meist die PAGIEF (Polyacrylamidgel-Isoelektrische Fokussierung) angewendet; hauptsächlich dient sie zur Tierartbestimmung von Speisefischen. Das Potential dieser Methode durch die zum Teil sehr unterschiedlichen, charakteristischen Proteinmuster zeigt Abbildung 1. Folgende Fischarten wurden damit bis zum heutigen Zeitpunkt untersucht:

Ordnung Lachsartige (<i>Salmoniformes</i>):	Atlantischer Lachs (<i>Salmo salar</i>) Pazifische Lachse (<i>Oncorhynchus sp.</i>) Felchen (<i>Coregonus sp.</i>)
Ordnung Plattfische (<i>Pleuronectiformes</i>):	Seezunge (<i>Solea solea</i>)
Ordnung Dorschartige (<i>Gadiformes</i>):	Dorsch (<i>Gadus morhua</i>) Pazifischer Polardorsch (<i>Theragra chalcogramma</i>) Seelachs (<i>Pollachius virens</i>) Seehecht (<i>Merluccius merluccius</i>) Schellfisch (<i>Melanogrammus aeglefinus</i>)
Ordnung Barschartige (<i>Perciformes</i>):	Egli (<i>Perca fluviatilis</i>) Zander (<i>Stizostedion lucioperca</i>)
Ordnung Hechtartige (<i>Esociformes</i>):	Hecht (<i>Esox lucius</i>)
Ordnung Welsartige (<i>Siluriformes</i>):	Pangasius (<i>Pangasius sp.</i>)

* Vortrag gehalten an der Jahresversammlung der SGLUC vom 9./10. September 2004

Fischart-Bestimmung mittels PAGIEF

Polyacrylamidgel-Isoelektrische Fokussierung

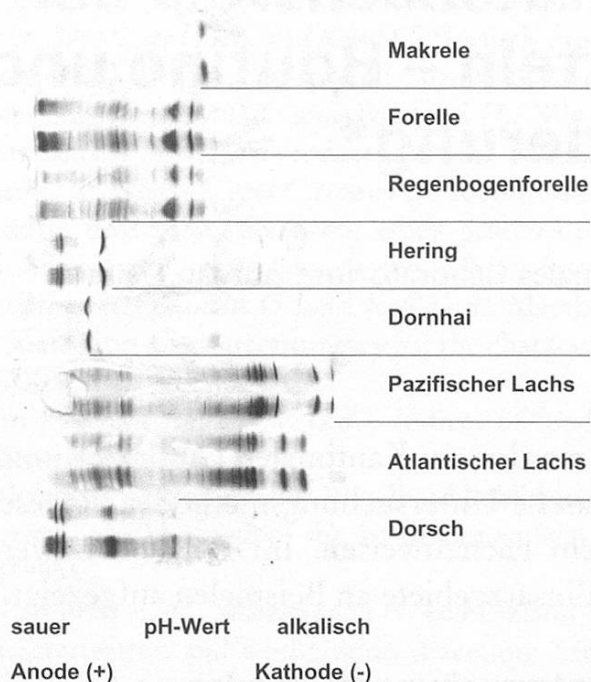


Abbildung 1 Proteinmuster diverser Speisefischextrakte (unverdünnt und 4fach verdünnt), pH-Bereich des Gels 3,5 bis 9,5

Die häufigsten Falschdeklarationen betrafen den atlantischen Lachs sowie die Seezunge. Erfreulicherweise waren Fischprodukte von der Art Fischstäbchen aus Fischen der Ordnung «Dorschartige» bezüglich der Fischart immer richtig deklariert. Begrenzend für einen erfolversprechenden Einsatz der PAGIEF ist eine erfolgte Hitzebehandlung der Proben, da bei erhöhter Wärmebelastung die Löslichkeit der Proteine infolge Denaturierungsprozessen abnimmt, siehe Abbildung 2. Die PAGIEF dient mit ihrer einfachen Probenvorbereitung (Extraktion der wasserlöslichen, sarkoplasmatischen Proteine) als Screening-Methode. Abbildung 3 zeigt die Analyse einer kleinen Probenserie von Atlantischen Lachsen, die Fischart der verdächtigen Probe wurde mittels DNA-Sequenzierung ermittelt. Eine andere Anwendung der beschriebenen Methode war die Untersuchung von Hackfleisch, lassen sich doch damit das ungefähre Verhältnis Rind-/Schweinefleischanteil sowie ein allfälliger Zusatz von Geflügel (z.B. Huhn, Trute) bestimmen.

DNA-analytische Untersuchungsmethoden

DNA-analytische Untersuchungsmethoden werden meist sowohl zur Tierartbestimmung in tierischen Lebensmitteln als auch für GVO-Untersuchungen an pflanzlichem Material eingesetzt. Für die Tierartbestimmung bei Fleisch und Fleisch-

Einfluss der Verarbeitungstemperatur

Atlantischer Lachs *Salmo salar*

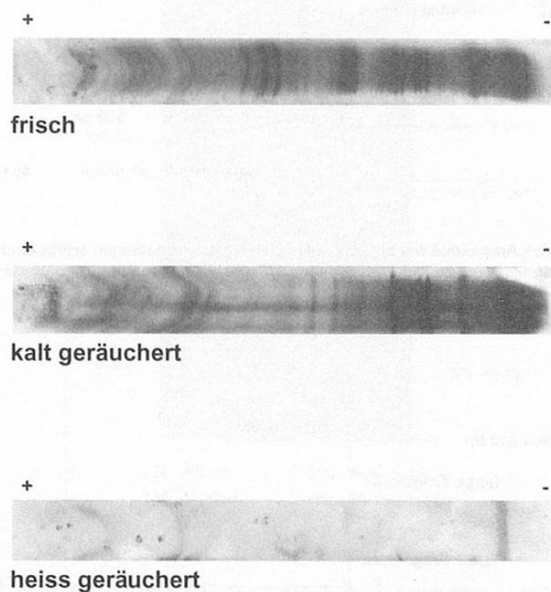


Abbildung 2 Proteinmuster von Lachsen verschiedener Verarbeitungstemperatur

Atlantische Lachse *Salmo salar*

Dezember 2003

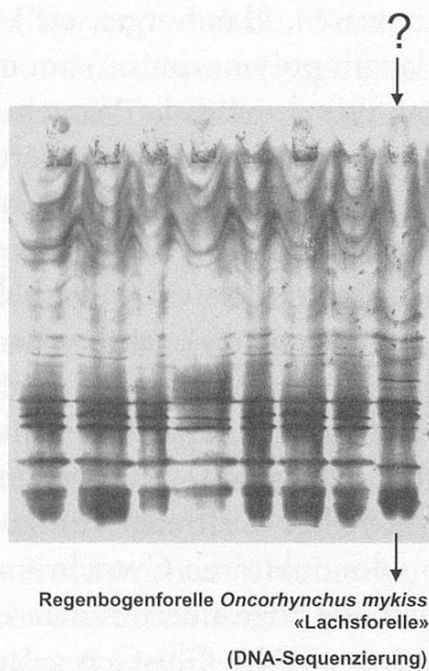


Abbildung 3 Proteinmuster von Lachsproben

PCR-RFLP des mitochondrialen Cytochrom b-Gens

PCR - restriction fragment length polymorphism

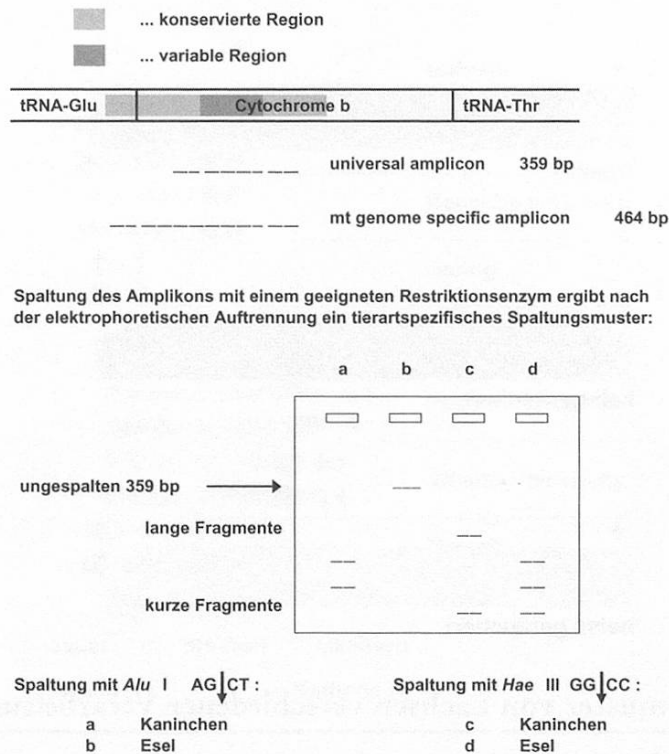


Abbildung 4 Prinzip der Funktionsweise der PCR-RFLP

waren (unverarbeitetes Fleisch, aber auch Fleischanteile in Mischungen, z.B. Fleischerzeugnisse wie Wurstwaren, Hamburger, etc.) gelangt oft die PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) am mitochondrialen Cytochrom b-Gen zur Anwendung. Das Prinzip und die Vorgehensweise zeigt Abbildung 4. Mit einem universellen Primerpaar, das in konservierten DNA-Regionen bindet, lässt sich ein 359 Basenpaar (bp) langes DNA-Fragment mittels PCR vervielfachen («amplifizieren»). In einem zweiten Schritt (RFLP) werden die erhaltenen DNA-Fragmente mit verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt, die an sehr spezifischen Basenfolgen («Erkennungssequenz»), falls vorhanden, die DNA spalten. Die Kombination der elektrophoretisch aufgetrennten Spaltungsmuster, erzeugt durch die Spaltung mit mehreren Restriktionsenzymen verschiedener Erkennungssequenz, lassen auf bestimmte Tierarten schliessen (1). Ein Nachteil dieser Methode mit dem 359 bp-Amplikon ist das zeitweilige Auftreten von zusätzlichen Gel-Banden aufgrund der Co-Amplifikation des nukleären Cytochrom b-Pseudogens. Aus diesem Grund wurde später die Methode abgeändert, indem der erste Primer in das dem Cytochrom b-Gen vorgelagerte t-RNA-Glu-Gen gelegt wurde. Dadurch entsteht ein PCR-Produkt von 464 bp Amplikonlänge (2). Damit verschwanden zwar die störenden Pseudogen-Banden, aber diese Methode ist nun nicht mehr für den Nach-

PCR-RFLP (mt Cyt b, 464 bp, *Tru9 I*)

«Jagdwurst»

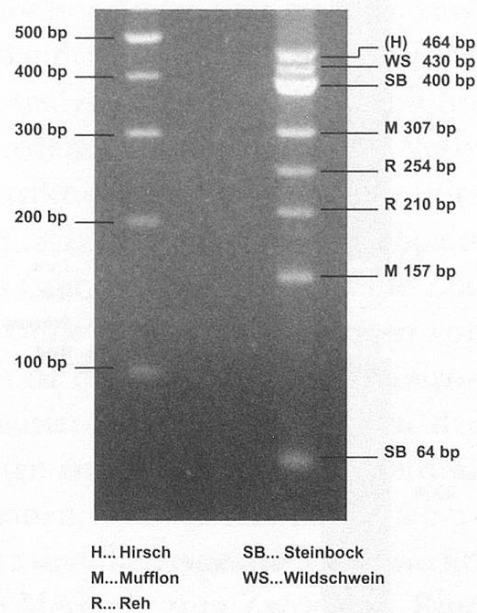


Abbildung 5 PCR-RFLP einer Jagdwurst mit bekannter Zusammensetzung

weis von Geflügel anwendbar, da Vogel-DNA mit dem verwendeten Primerpaar kein PCR-Produkt ergibt. Aus diesem Grund werden an unserem Labor bei der Untersuchung von Proben unbekannter Zusammensetzung beide Methoden angewendet. Die Aussage über die Tierarten der verwendeten Fleischanteile ist qualitativer Natur. Abbildung 5 zeigt das Spaltungsmuster einer Jagdwurst (Rohpökelfleisch), die Fleisch fünf verschiedener Tierarten enthält: Hirsch (ungespalten), Mufflon, Reh, Steinbock und (Wild-)Schwein. Mit dieser Methode können vor allem grobe Täuschungen, wie am Beispiel einer mit Trutenfleisch gefüllten Backware gezeigt, aufgedeckt werden. Diese im Jahr 2003 erhobene Probe enthielt neben dem deklarierten Trutenfleisch auch Anteile von nicht deklariertem Rind- und Schweinefleisch. In einer im Folgejahr erhobenen gleichen Probe bestand der Fleischanteil nur noch aus Schweinefleisch, siehe Abbildung 6. Die das Produkt vertreibende Firma strich darauf dieses Produkt aus ihrem Sortiment; ob diese Massnahme eine Folge der Interventionen unseres Labors war, entzieht sich unserer Kenntnis. Abbildung 7 weist auf zwei weitere Anwendungen der PCR-RFLP hin. Zum ersten zeigt die Untersuchung von 3 Milligramm gekochtem Lammfleisch aus einer Personalkantine, dass es sich beim Fleischgericht tatsächlich um die Tierart Schaf (Lamm) gehandelt hatte. Die Probe wurde von einem Konsumenten überbracht, der überzeugt war, dass in der Kantinenküche Fleisch einer anderen Tierart verwendet wurde. Dieses Beispiel zeigt, dass selbst von denaturiertem Fleisch sehr wenig Probenmaterial zur Untersuchung ausreichen. Beim zweiten Beispiel handelt es sich um eine ungewöhnliche Anwendung dieser Methode. Sie stellt die Tierartbestimmung eines salmonellen-

PCR-RFLP von Backware mit Trutenfleisch

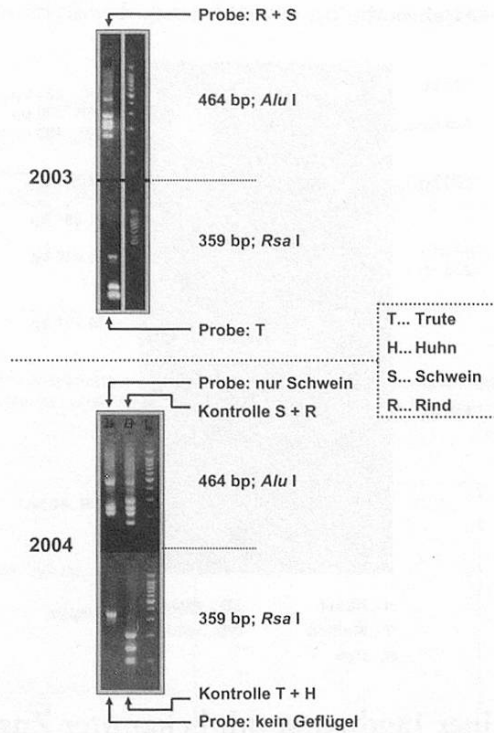
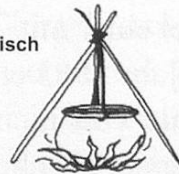


Abbildung 6 PCR-RFLP einer Backware mit Trutenfleisch, erste Beprobung (2003) und Nachkontrolle (2004)

Applikationsbeispiele der PCR-RFLP

1) Lamm-Eintopf

Probe: 3 Milligramm gekochtes Fleisch
Fragestellung: Lamm?



2) Kot

Probe: Kot, Umgebungsprobe ab Hof
Fragestellung: Hoftier oder Fuchs?



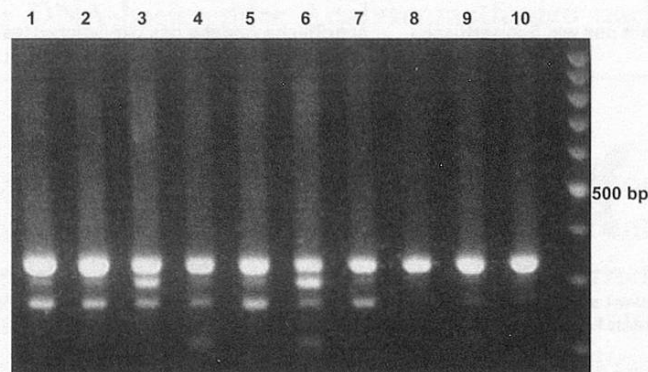
Abbildung 7 Beispiele eher ungewöhnlicher Proben, die mittels PCR-RFLP analysiert wurden

positiven Tierkotes dar, welche bei Abklärungen im Zusammenhang mit einem Salmonellenfall bei Rindern auf einem Bauernhof durchgeführt wurde. So konnte der Fuchs als Erzeuger des untersuchten Kotes ausgemacht werden.

In der Absicht, eine Not zur Tugend zu machen, versuchten wir, das Auftreten der unerwünschten Gel-Banden bei der PCR-RFLP-Methode mit dem 359 bp-Amplikon sinnvoll einem analytischen Nutzen zuzuführen. Ein Schlachthof stellte uns Fleischproben verschiedener Rinderrassen zur Verfügung. Die RFLP-Muster aus der Spaltung mit Restriktionsenzymen, die die mitochondriale Rinder-DNA nicht zu spalten vermögen, zeigen unterschiedliche Spaltungsmuster des nukleären Cytochrom b-Pseudogens (siehe Abbildung 8). Eine Zuordnung dieser Muster zu den Rinderrassen ist aber ohne weitere Abklärungen vor allem aus zwei Gründen nicht möglich: Zum ersten ist der Vererbungsmechanismus der nukleären Pseudogene, vor allem das Verhalten bei Rückkreuzungen der Rassen, nicht genügend untersucht und zum zweiten ist auch die Rassenzuordnung unserer Fleischproben nicht über alle Zweifel erhaben. So ist in Abbildung 8 bei den Bahnen 2, 4 und 5 die Rassenangabe des Metzgers und diejenige der Tierverkehrsdatenbank (TVD) widersprüchlich. Eine geeignete Methode zum Zweck der Rinderrassen-Unterscheidung wäre aus lebensmittelrechtlichen Gründen (Täuschungsnachweis) wünschenswert,

Rinderrassen-Identifikation??

mittels PCR-RFLP des Cyt b - Pseudogens,
Spaltung der 359bp-Amplikons mit *Rsa I* und *Dde I*



- 1 Metzger: Angus w.
- 2 Metzger: Galloway w.
(TVD: Rotfleck, Vater Holstein, Mutter unbekannt)
- 3 TVD: Angus m., Eltern Angus
- 4 TVD: Angus w., Mutter Angus, Vater unbekannt
- 5 Metzger: Charolais
TVD: «Kreuzung rot» w., Vater Limousin, Mutter Rotfleck
- 6 Metzger: Charolais
TVD: Braunvieh w., Vater Blonde d'Aquitaine, Mutter Braunvieh
- 7 Metzger: Schottisches Hochlandrind
- 8 TVD: Braunvieh w., Eltern Braunvieh
- 9 TVD: Rotfleck w., Eltern Rotfleck
- 10 TVD: Braunvieh m., Mutter Braunvieh, Vater unbekannt

Abbildung 8 Versuch einer neuartigen Anwendung der PCR-RFLP von Pseudogenen

da im Handel Fleisch spezieller Rinderrassen (z.B. Schottisches Hochlandrind, Angus etc.) immer öfter angeboten wird.

Die DNA-Sequenzierung als Methode für die Tierartbestimmung führte bei Fischen unbekannter Spezies wiederholt zum Erfolg, die erfolgreiche Durchführung ist jedoch abhängig davon, dass von den analysierten Fischarten DNA-Datensätze der gesuchten Gene bzw. Genabschnitten verfügbar sind (z.B. Datenbanken im Internet). Abbildung 9 illustriert den Fall eines Zollimportes von 500 kg Fisch in Scheiben. Vom Bundesamt für Veterinärwesen wurden wir angefragt, ob mit der DNA-Sequenzierung zu ermitteln sei, um welche Fischart es sich dabei handelt. Die Probe war widersprüchlich mit drei verschiedenen Fischarten deklariert: Thunfisch (*Thunnus sp.*), Blue Marlin (*Makaira nigricans* aus der Familie der Schwertfische) und Schwertfisch (*Xiphias gladius*). Unsere Antwort auf die Anfrage wird detailliert wiedergegeben. Die erfolgte DNA-Sequenzierung machte deutlich, dass es sich bei der untersuchten Probe um Schwertfisch handelte. Dieser Fall zeigt, wie sehr das zu erwartende Analysenergebnis von der Art der Probe abhängt und nicht mit einer ja/nein-Antwort ausgedrückt werden kann.

DNA-Sequenzierung am Beispiel Fisch (Zollprobe 2003)

Zollbehörde wollte Klarheit bezüglich der mehrdeutig deklarierten Fischart:

«Thunfisch»	Deklaration aussen auf Verpackung
«Blue Marlin»	Deklaration in der Verpackung
«sieht aus wie Schwertfisch»	schriftliche Angabe des Grenztierarztes



Antwort vom KL AG, ob die Fischart mittels DNA-Sequenzierung ermittelt werden kann:

tatsächliche Fischart:	erwartete Aussage des KL:
1. Blue Marlin	eindeutig Blue Marlin
2. Schwertfisch	eindeutig Schwertfisch
3. weit verbreiteter Thunfisch	eindeutige Zuordnung der Thunfischart
4. «seltener» Thunfisch	Zuordnung als Thunfisch unsicher
5. anderer Fisch	?

Abbildung 9 Antwort auf eine Anfrage, ob wir die Fischart einer Probe mittels DNA-Sequenzierung bestimmen können

Verunreinigungen tierischer Herkunft in Getreide und Getreideprodukten



Abbildung 10 Mittels DNA-basierender Analysenmethoden nachgewiesene Tierarten in Getreide und -produkten

Werden pflanzliche Lebensmittel auf das Vorhandensein von tierischen Bestandteilen untersucht, so fällt auch dies unter die Rubrik «Authentizitätsnachweis». So geschehen mit Getreideprodukten (Weizenmehl und -körner), in denen mit am Kantonalen Laboratorium Aargau optimierten DNA-Untersuchungsmethoden (PCR-RFLP und anschließende Sequenzierung der DNA-Fragmente) Bestandteile von Kleinnagern und Insekten nachgewiesen wurden, siehe Abbildung 10 (3, 4). Es sei hier bemerkt, dass der Nachweis der Tiere in den gemahlten Getreideprodukten ohne vorgängige Anreicherung der tierischen Bestandteile erfolgte.

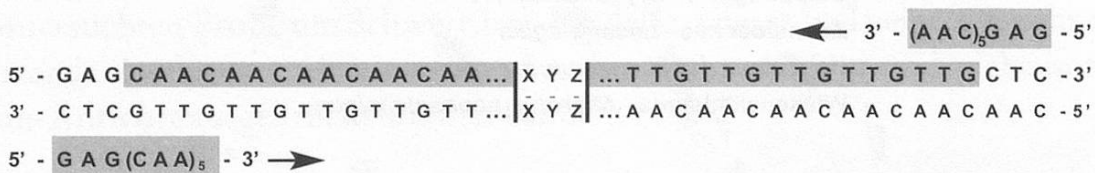
Im Zusammenhang mit der Acrylamid-Problematik in Rösti und Pommes frites gehen unsere Bemühungen in Zukunft in Richtung Sortenunterscheidung von Kartoffeln. Während ganze, ungeschälte Kartoffeln vom Fachmann in der Regel von Auge einer bestimmten Sorte zugeordnet werden können, lassen sich bei verarbeiteten Rohprodukten die genetischen Unterschiede in den DNA-Mikrosatelliten zwischen Kartoffelsorten mittels ISSR-PCR (Inter-simple sequence repeat-PCR) aufspüren. In einer PCR-Reaktion mit nur einem Primer werden die Abschnitte

zwischen Wiederholungseinheiten (auch SSR «simple sequence repeat», STR «short tandem repeats» oder SSTR «simple sequence tandem repeats» genannt) amplifiziert. Die verwendeten Primer sind am 5'-Ende verankert; in der Literatur sind aber auch 3'-verankerte sowie nicht verankerte Primer beschrieben. Bei der Verwendung von verankerten Primer werden als «Anker» oft Basengemische anstelle selektiver Basen verwendet. Die erhaltenen Bandenmuster sind charakteristisch für die analysierten Kartoffelsorten, siehe Abbildung 11 (5).

ISSR-PCR

Inter-simple sequence repeat - PCR

mittels 5'-verankerten Primern



Kartoffelsorten:

- 1 Charlotte, Bauer A
- 2 Charlotte, Bauer B
- 3 Nicola
- 4 Agria
- 5 Urgenta

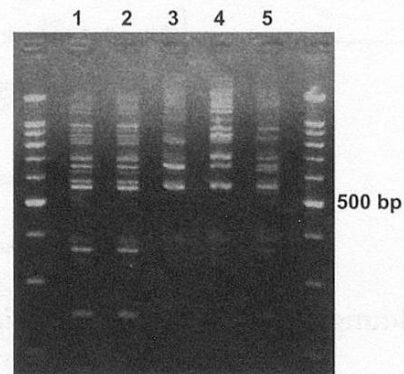


Abbildung 11 Unterscheidung von Kartoffelsorten mittels ISSR-PCR

Ausblick

In Zukunft werden wir vermehrt Real-Time PCR-Methoden einführen mit dem Ziel, Tierartenanteile in Fleischwaren zu quantifizieren. Dies dient zur Absicherung von Analysenbefunden im Rahmen des Vollzugs bei Problemen mit falsch deklarierten Tierarten. Das gleiche Ziel verfolgen wir mit der Entwicklung von tierartspezifischen PCR-RFLP-Systemen für hocherhitzte (z.B. sterilisierte) Fleischwaren. Weiter zielen unsere zukünftigen Bemühungen in Richtung Sortenunterscheidung resp. -identifizierung von pflanzlichen Lebensmitteln.

Zusammenfassung

Seit einigen Jahren werden am Kantonalen Laboratorium Aargau proteinchemische und DNA-analytische Untersuchungsmethoden eingesetzt, um die Authentizität von Lebensmitteln nachzuweisen. Für die Tierartbestimmung von Speise-

fischen wird meist die PAGIEF als Screening-Methode angewendet. Für die Tierartbestimmung von Fleischwaren gelangt oft die PCR-RFLP am mitochondrialen Cytochrom b-Gen zur Anwendung. Die Aussage über die Tierarten der verwendeten Fleischanteile ist qualitativer Natur; vor allem grobe Täuschungen können mit dieser Methode aufgedeckt werden. Zur Unterscheidung von Rinderrassen führte die PCR-RFLP am nukleären Cytochrom b-Pseudogen nicht zum Ziel. In Getreide und Getreideprodukten konnten mit einer hauseigenen DNA-Methode tierische Bestandteile von Insekten und Kleinnagern nachgewiesen werden. Pflanzensorten lassen sich mit Hilfe der ISSR-PCR unterscheiden, wie am Beispiel von Kartoffeln gezeigt wird.

Résumé

Depuis quelques années, des méthodes analytiques moléculaires (protéines et ADN) ont été mises en place au Laboratoire Cantonal d'Argovie dans le but de vérifier l'authenticité de denrées alimentaires. Pour les identifications d'espèces de poissons, c'est la PAGIEF qui est surtout utilisée comme méthode de screening, alors que l'analyse PCR-RFLP du gène cytochrome b mitochondrial est mise en œuvre pour l'identification d'espèces dans les viandes et produits à base de viande. La détermination des espèces animales présentes dans l'échantillon est de nature qualitative, permettant avant tout de découvrir des tromperies manifestes. Cependant, l'identification des races bovines par analyse PCR-RFLP du pseudogène cytochrome b nucléaire n'a pas abouti. Une méthode d'analyse d'ADN maison a été développée pour la détection de traces d'insectes et de petits rongeurs dans les céréales et produits à base de céréales. Des variétés de plantes peuvent être, quant à elles, différenciées en utilisant la PCR-ISSR comme l'illustre l'exemple des pommes de terre.

Summary "Testing foods for authenticity – routine and challenge"

In the past years, molecular and proteochemical methods have been established at the Cantonal Laboratory of Aargovia in order to test foods for authenticity. Species of food fish is mostly investigated by means of PAGIEF as screening method, whereas PCR-RFLP on mitochondrial cytochrome b gene is performed mainly for detecting animal species in meat and meat products. These analyses provide, in a qualitative manner, evidence for the presence or absence of the target animal species in composed meat samples; in the first instance, substantial deceptions can be revealed by these methods. Differentiation of meat samples at the level of cattle breeds could, however, not be accomplished by PCR-RFLP on the nuclear pseudo cytochrome b gene. In cereals and cereal products, fragments of insects and small rodents could be detected by means of an in-house DNA method. Cultivars of plants, for their part, can be identified using ISSR-PCR as is illustrated considering potatoes as example.

Key words

Isoelectric focusing, PCR-RFLP, ISSR-PCR, species identification, potato variety differentiation

Literatur

- 1 Meyer R., Höfelein C., Lütby J. and Candrian U.: Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism analysis: A simple method for species identification in food. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **78**, 1542–1551 (1995)
- 2 Wolf C., Rentsch J. and Hübner P.: PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1350–1355 (1999)
- 3 Eugster A.: Verunreinigungen tierischer Herkunft in Getreide und Getreideprodukten: I. Problemstellung und Beitrag zur Tierartbestimmung mittels PCR. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **94**, 181–191 (2003)
- 4 Eugster A.: Verunreinigungen tierischer Herkunft in Getreide und Getreideprodukten: II. Anwendung einer DNA-analytischen Methode zur Tierartbestimmung an echten Proben. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **95**, 99–109 (2004)
- 5 Bornet B., Goraguer F., Joly G. and Branchard M.: Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome* **45**, 481–484 (2002)

Korrespondenzadresse: Albert Eugster, Kantonales Laboratorium Aargau, Obere Vorstadt 14, CH-5000 Aarau, E-Mail: albert.eugster@ag.ch