

## Reinheitskontrolle von Marzipan mittels molekularbiologischer Methoden

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle:</b>	Universität Hamburg Department Chemie Institut für Lebensmittelchemie Prof. Dr. M. Fischer/Dr. I. Haase
<b>Industriegruppe:</b>	Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e.V. (BDSI), Bonn
	Projektkoordinator: Prof. Dr. R. Matissek, Lebensmittelchemisches Institut (LCI) des BDSI, Köln
<b>Laufzeit:</b>	2007 – 2010
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 253.300,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Hersteller von Marzipan sind aus Gründen der Qualitätssicherung und des Verbraucherschutzes an schnellen und in der Routine anwendbaren Methoden interessiert. Nach allgemeiner Verkehrsauffassung enthält Marzipan als Ölsaart ausschließlich Mandeln. Andere Saaten müssen deklariert werden. Im Falle eines unerwünschten Eintrags von Aprikosenkernen in Marzipanrohmasse werden nach Konvention 0,5 % toleriert.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung von molekularbiologischen Methoden (i. B. Polymerasekettenreaktion, PCR) für eine routinemäßige Reinheitskontrolle der Rohmassen und der Ausgangsmaterialien. Dabei lag der Schwerpunkt auf einer Differenzierung von Prunus-Arten und der Möglichkeit zur genauen Quantifizierung der möglichen Verunreinigungen in niedrigen Konzentrationen. Voraussetzung für das Erreichen der Forschungsziele war die Etablierung einer Methode zur Extraktion von DNA aus Samen bzw. den Zwischen- und Endprodukten.

### Forschungsergebnisse:

Als Probenmaterial wurden im freien Handel erhältliche Rohstoffe und von den Mitgliedern des

Projektbegleitenden Ausschusses zur Verfügung gestellte Samen, Rohmassen und Marzipan untersucht. Mit Hilfe eines Unguator-Rührsystems wurden Marzipanrohmassen gezielt dotiert, um Matrixkalibrierungen für die PCR-Nachweise durchzuführen.

Die Extraktion der DNA erfolgte nach verschiedenen Protokollen. Nach einem Screening von Literaturmethoden wurden in dem Projekt vier Aufarbeitungswege neu entwickelt. Die aus diesen Wegen erhaltenen DNA-Isolate wurden mit photometrischen, fluorimetrischen und elektrophoretischen Methoden charakterisiert, die Amplifikation der DNA überprüft und die Methoden anhand der Ergebnisse verglichen. Durch die Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Herstellung der Rohmassen zu einer Fragmentierung des DNA-Moleküls führt und die PCR beeinflusst werden kann. Entsprechend wurden die PCR-Methoden angepasst. Weiter konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen Ausbeute, Reinheit und PCR-Fähigkeit besteht und dass für die spezifischen PCRNachweise zuverlässige Ergebnisse zu erwarten sind. Die Entwicklung artspezifischer Primer und Nachweise konnte für die Pflanzenarten Aprikose, Pfirsich, Bohne, Erbse, Soja, Lupine, Cashew, Pistazie und Kichererbse erfolgen. Die Spezifität der Nachweise konnte in Kreuztests mittels Endpunkts-PCR als auch mittels realtime-PCR belegt werden.

Optimierungen der PCR-Methoden wurden durchgeführt. Die Optimierung der Annealingtemperatur erfolgte mit Hilfe einer Gradienten-PCR. Als weiterer Schritt wurde die Magnesiumchloridkonzentration durch Verwendung verschiedener Konzentrationen in den Ansätzen auf einen idealen Wert eingestellt. Abschließend wurden das Temperaturprogramm für die qualitative Nachweise vereinheitlicht und Duplex-PCR-Methoden entwickelt. Mittels real-time-PCR-Untersuchungen wurden ergänzend die optimale Konzentration für die Polymerasen, die Primer und SYBR Green I ermittelt. Als Weiterentwicklung der real-time-PCR-Nachweise wurden Taqman-Sonden zum Nachweis von Soja und Erbse verwendet. Die linearen Arbeitsbereiche liegen im gleichen Bereich wie für die SYBR Green I-Methoden, so dass auch die anderen Nachweise schnell durch Taqman-Sonden erweitert werden könnten.

Zur Entwicklung von PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)-CE (capillary electrophoresis)-Methoden wurden Primerpaare entwickelt, die für alle Arten den ITS1-Bereich der rDNA amplifizieren sollten. Des Weiteren wurden spezifische Restriktionsschnittstellen innerhalb dieses Bereiches gesucht. Für Bohne, Soja, Lupine und Erbse wurden in Kreuztests spezifische Fragmentmuster erhalten. Die Anwendbarkeit der Methode auf Rohmassen wurde anhand des Nachweises von Bohne mit Hilfe dotierter Rohmassen und definierter DNA-Isolatmischungen untersucht. Es sollte versucht werden, mit Hilfe der Experion-Kapillargelelektrophorese den Anteil quantitativ zu erfassen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Auswertungsmethoden untersucht und ein Interner Standard entwickelt. Mit Hilfe des Internen Standards konnte die Verunreinigung relativ genau bestimmt werden, während eine Auswertung über die von der Software angegebenen Flächen zu ungenaueren Ergebnissen führte. Die Ergebnisse zeigten, dass Verunreinigungen bis 10 % in Rohmassen nachgewiesen werden können. Durch einen weiteren Restriktionsverdau vor der PCR konnten in Vorversuchen auch Konzentrationen von ca. 5 % nachgewiesen werden.

In aufwendigen Validierungen wurden Verdünnungsreihen der nachzuweisenden DNA sowie dotierte Marzipanrohmassen und definierte DANN-Isolatmischungen mittels real-time-PCR vermessen. Für die Endpunktmethode wurden Nachweisgrenzen auf Agarosegelen abgeschätzt. Für die real-time-Messungen wurden

zusätzlich lineare Arbeitsbereiche ermittelt. In der Regel konnten die Verunreinigungen bis zu einer Konzentration von 0,1 % detektiert bzw. mittels real-time-PCR bestimmt werden. Damit sind die entwickelten Methoden für die Reinheitskontrolle geeignet. Am Modell der Aprikosenkernbestimmung wurden verschiedene Möglichkeiten zur Auswertung der real-time-Messungen untersucht und Quantifizierungsstrategien entwickelt.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Ein Großteil der Firmen der Süßwarenindustrie sind kleine und mittelständische Unternehmen. Allein in der Fachsparte Rohmassen finden sich in Deutschland 26 Firmen.

Eine Statistik über die Produktion von Süßwaren im Jahr 2009 zeigt trotz eines wirtschaftlich schwierigen Jahres einen Anstieg der Produktion von Rohmassen im Jahr 2009 um 0,4 %. Rohmassenherstellende und -verarbeitende Betriebe sind hauptsächlich auf dem deutschen Markt zu finden, während die Rohstoffe Mandeln und Aprikosen ausschließlich Importprodukte sind. So war für 2007 ein jährlicher Netto-Import von etwa 67 kt geschälter Mandeln, 1,5 kt bitterer Mandeln und 4,7 kt Aprikosenkernen (2006) zu verzeichnen.

Die im Rahmen des Vorhabens entwickelten Methoden ermöglichen den produzierenden Betrieben eine schnelle Kontrolle der Reinheit ihrer Rohwaren sowie der Zwischen- und Endprodukte. Somit können die Methoden zur Qualitätskontrolle der Marzipanrohmassen verwendet und mögliche Falschdeklarationen der Produkte verhindert werden. Die Methoden stellen damit auch einen Beitrag zum Verbraucherschutz dar. Des Weiteren sind die Ergebnisse und insbesondere die entwickelten Quantifizierungsstrategien nicht auf die behandelten Forschungsziele beschränkt, sondern können auch in anderen Branchen Anwendung finden.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2010.
2. Brüning, P., Haase, I., Matissek, R. und Fischer, M.: Marzipan: PCR-driven methods for authenticity control. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11910–11917 (2011).
3. Brüning, P., Focke, F., Haase, I. und Fischer, M.: Molecular Biology meets Food

Chemistry Eine Verbindung mit Zukunft.  
GIT Labor-Fachzeitschrift 3, 235-238  
(2010).

4. Brüning, P., Haase, I., Matissek, R. und Fischer, M.: Reinheitskontrolle von Marzipanrohmassen mittels molekularbiologischer Methoden. Rundsch. Fleischhyg. Lebensmittelüberwach. 2, 61-63 (2010).

#### Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hamburg  
Department Chemie  
Institut für Lebensmittelchemie  
Grindelallee 117, 20146 Hamburg  
Tel.: 040/42838 4359, Fax: 040/42838 4342  
E-Mail: markus.fischer@chemie.uni-hamburg.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn  
Tel.: 0228/372031, Fax: 0228/376150  
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via:

