

## Evaluierung chemisch-analytischer und molekularbiologischer Methoden zur Differenzierung von hochwertigem Arriba Edelkakao und Konsumkakao (CCN51)

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA), Freising-Weihenstephan Prof. Dr. Dr. Peter Schieberle/Dr. Martin Steinhaus
<b>Forschungsstelle II:</b>	Universität Hamburg Hamburg School of Food Science Institut für Lebensmittelchemie Prof. Dr. Markus Fischer/Dr. Ilka Haase
<b>Industriegruppen:</b>	Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e. V. (BDSI), Bonn Stiftung der Deutschen Kakao- und Schokoladenwirtschaft, Bonn
	Projektkoordinator: Dr. Bernd Schartmann Chocoladenfabriken Lindt & Sprüngli GmbH, Aachen
<b>Laufzeit:</b>	2010 – 2013
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 305.450,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Der Welthandel differenziert heute Kakaosorten nach ihrem Aroma in Edelkakao und Konsumkakao. Aus dem teureren aromatischen Edelkakao, der nur etwa 5 % der Welternte ausmacht, werden vor allem hochwertige Schokoladenerzeugnisse mit hohem Kakaoanteil hergestellt, deren Marktpräsenz in den letzten Jahren in Deutschland deutlich zunahm. Bedeutendster Erzeuger von Edelkakao ist Ecuador, das etwa 50 % der Welternte liefert. In Ecuador wird jedoch neben dem als "Nacional" bezeichneten Edelkakao auch der Kakao-Klon CCN 51 verbreitet angebaut, der wegen seines Ertrags und seiner Krankheitsresistenz bei den dortigen Bauern beliebt ist, jedoch ein minderwertiges Aroma liefert. Vor diesem Hintergrund kommt es zunehmend zu Verfälschungen von Nacional-Kakao durch Beimischungen von CCN-51. Deshalb war es das Ziel des Forschungsvorhabens, verschiedene analytische Ansätze hinsichtlich ihres Potenzials zur objektiven Unterscheidung von Nacional-Kakao und Kakao der Sorte CCN-51 zu evaluieren. Diese Ansätze waren 1) die Analyse der für den Aromaunterschied verantwortlichen

Schlüsselaromastoffe, 2) die Analyse des kompletten flüchtigen Metaboloms und 3) die molekularbiologische Analytik.

### Forschungsergebnis:

Im Rahmen der Analyse der für den Aromaunterschied verantwortlichen Schlüsselaromastoffe erfolgte zunächst ein Screening der flüchtigen Fraktion typischer Nacional- und CCN-51-Röstkakao-Proben nach aromaaktiven Verbindungen durch eine vergleichende Aromaextraktverdünnungsanalyse. Dabei wurden in drei Proben Nacional und zwei Proben CCN-51 insgesamt 43 Aromastoffe im FD-Faktorbereich zwischen 8 und 2048 detektiert, von denen 41 identifiziert werden konnten. Auf der Basis der FD-Faktoren konnten bereits Unterschiede zwischen Nacional und CCN-51 erkannt werden. Zur Objektivierung der Unterschiede wurden ausgewählte Verbindungen durch Stabilisotopenverdünnungsassays quantitativ bestimmt. In Übereinstimmung mit den sensorischen Profilen ergaben sich dabei deutliche Unterschiede zwischen Nacional und CCN-51. Bei der quantitativen deskriptiven Ana-

lyse waren vor allen die Noten "malzig" und "blumig, honigartig" in Nacional höher bewertet worden als in CCN-51, der insgesamt als flacher im Aroma beurteilt wurde. Entsprechend wurden auch jeweils höhere Konzentrationen der Verbindungen Phenylacetaldehyd (Honig, blumig), Linalool (Bergamotte), 2 Phenylethanol (Honig, blumig), 2 Phenylethylacetat (Honig, blumig), Ethyl(phenylacetat) (Honig, blumig), 2-Methylbutanal (malzig) und 3-Methylbutanal (malzig) in Nacional im Vergleich zu CCN-51 gemessen. Quantitative Bestimmungen bei den entsprechenden Rohkakaos zeigten, dass signifikante Unterschiede in den Konzentrationen dieser Verbindungen bereits auf der Ebene der ungerösteten Kakaobohnen vorlagen. Weitere Quantifizierungen erfolgten unter simulierten Verzehrsbedingungen, wobei eine Wasserbehandlung der gerösteten Kakaobohnen die Freisetzung von Streckerprodukten aus den als Prekursoren wirkenden 3-Oxazolinen, die bei der Röstung gebildet werden, bewirkte. Auch hier zeigten sich tendenziell höhere Gehalte der untersuchten Aromastoffe in Nacional. Analoge Versuche mit Rohkakao zeigten ebenfalls eine Konzentrationszunahme der Streckerprodukte durch eine Wasserbehandlung. Die Unterschiede zwischen Nacional und CCN-51 blieben dabei erhalten bzw. wurden z. T. sogar noch signifikanter. Welche Prekursoren für die Aromastofffreisetzung aus Rohkakao mit Wasser verantwortlich sind, ist noch ungeklärt.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die Untersuchungen auf einen größeren Probenumfang ausgedehnt. Die Quantifizierungen erfolgten schließlich bei 16 Nacional-Kakaos sowie 6 CCN-51-Proben und dabei sowohl auf der Ebene der Roh- sowie der Röstkakaos, jeweils mit und ohne vorherige Wasserbehandlung. Die Ergebnisse zeigten im Mittel eindeutig höhere Konzentrationen der betrachteten Aromastoffe in Nacional als in CCN-51, jedoch waren die Schwankungsbreiten bei den Nacionalproben hoch. Bei einer Beschränkung der Probenauswahl auf diejenigen Nacional-Proben, die aufgrund der Probenhistorie nachweislich reinsortig waren und sensorisch ein charakteristisches Aromaprofil mit ausgeprägten blumig-honigartigen und malzigen Noten aufwiesen, zeigten sich jedoch klare Unterschiede zu den CCN-51-Proben. Die beste Differenzierung erlaubte die Konzentration an Phenylacetaldehyd in Rohkakao nach Freisetzung aus seinen wasserlabilen Precursoren. Diese kann als geeigneter analytischer Parameter für eine Anwendung im Sinne des Projektziels angesehen werden. Eine Quanti-

fizierung auf der Ebene des Rohkakaos hat zudem den Vorteil, dass keine zusätzliche Variation durch die Röstparameter Einfluss auf das Ergebnis hat. Eine Differenzierung auf breiterer Basis gelang durch die Einbeziehung weiterer Verbindungen, z. B. durch Addition der Aromawerte (Konzentration/Geruchsschwellenwert) von 2-Phenylethanol, 2-Phenylethylacetat, Ethyl(phenylacetat), sowie von Phenylacetaldehyd nach Freisetzung aus seinen wasserlabilen Precursoren zu einem Summenwert, der als "Edelkakaoaromaindex" zwar keine sichere Sortendifferenzierung zwischen Nacional und CCN-51 erlaubt, sehr wohl aber eine Differenzierung zwischen hochwertigen Fine Flavor Kakaos des Typs Nacional einerseits und CCN-51 sowie ggf. verschnittenen und/oder aromaschwachen Nacional-Proben andererseits. Durch den Bezug zu den sensorischen Eigenschaften des Kakaos und damit der Schokolade ist dieser Ansatz im Rahmen einer industriellen Wareneingangskontrolle unter Umständen jedoch sogar zielführender.

Im Rahmen der Analyse des kompletten flüchtigen Metaboloms wurde zunächst eine Methode zur semiquantitativen Erfassung möglichst vieler flüchtiger Verbindungen in Rohkakao auf der Basis von GC×GC-TOF-MS-Analysen entwickelt. Dazu wurden die volatilen Komponenten unter Zusatz von  $d_8$ -Naphthalin durch Lösungsmittel-extraktion und SAFE-Desillation isoliert und anschließend aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde zur GC×GC-TOF-MS-Analyse eingesetzt. Nach Optimierung der Parameter Säulenbelegung, Filmdicke, Säulenlängen, Ofentemperaturgradienten und Modulationszeit konnten etwa 400 flüchtige Verbindungen in den Rohkakao-proben semiquantitativ erfasst werden. Durch chemometrische Auswertung der Peakflächen dieser 400 Peaks je Probe wurden Substanzen identifiziert, die im Mittel deutliche Unterschiede zwischen Nacional und CCN-51 aufwiesen. Bei Betrachtung der Einzelwerte zeigte sich jedoch jeweils eine breite Streuung innerhalb der Gruppen, die die Methode für eine eindeutige Zuordnung einer unbekannt Probe wenig aussichtsreich erscheinen ließ.

Für die molekularbiologischen Arbeiten standen 20 verschiedene Blattproben, über 50 Rohkakao-proben sowie Kakaobohnen aus zwei frischen Kakaofrüchten (CCN 51 Typ I und II, Costa Rica) zur Verfügung. Es wurden im Rahmen der Projektlaufzeit drei verschiedene Ansätze zur Sequenzierung des kompletten Chloroplastengenoms verfolgt. Über die klassische Vorgehensweise mit einer Isolierung der Chloroplasten aus Kakaoblättern und anschließender Isolierung der

Chloroplasten-DNA (Ansatz 1) konnte aufgrund der störstoffreichen Kakaoblattmatrix keine DNA in ausreichender Menge und Qualität für die anschließende Sequenzierung erhalten werden. Auch eine Affinitätsanreicherung von Chloroplasten-DNA aus Gesamt-DNA (Ansatz 2) führte nicht zum Erfolg, da die Anreicherungs-faktoren nicht ausreichend waren, um qualitativ hochwertige Chloroplasten-DNA anzureichern. Im Jahr 2012 wurde eine Next-Generation-Sequencing-Methode veröffentlicht, die eine Sequenzierung des Chloroplastengenoms aus der Gesamt-DNA ermöglicht. Diese Methode konnte erfolgreich auf die im Projekt bearbeitete Fragestellung adaptiert werden (Ansatz 3) und führte zur Sequenzierung von 10 kompletten Kakao-Chloroplastengenomen (3 Arriba Genome, 4 CCN-51 Genome, 1 ICS-95 Genom, 1 IMC-67 Genom, 1 Canelo Genom) im Rahmen des Projekts. Sequenzvergleiche führten zur Identifikation mehrerer Einzelbasenaustausche (SNPs), die anschließend eingehender untersucht wurden (s. u.).

Parallel wurde eine partielle Sequenzierung des Chloroplastengenoms durchgeführt. In der sog. Inverted Repeat Region konnte ein Sequenzabschnitt identifiziert werden, der einen (TAAAG)*n*-Repeat aufweist. Die Anzahl *n* der Wiederholungen sind, bis auf einige wenige Ausnahmen bei CCN-51 (14 mal) und Arriba (6 mal), unterschiedlich. Eine auf Basis dieses Unterschiedes entwickelte PCR-Methode ermöglicht den Nachweis von CCN-51 über die Detektion von unterschiedlich langen PCR Fragmenten (Arriba: 111 bp, CCN 51: 151 bp). Die Detektion kann in der Routineanalytik, je nach Ausstattung mittels Agarosegelelektrophorese, Kapillargelelektrophorese oder DHPLC erfolgen. Eine Quantifizierung ist mit dieser Methode nicht möglich.

Die bei der Sequenzierung identifizierten SNPs wurden eingehend untersucht. Dabei stellte sich ein SNP an Position 43631 des Alignments als besonders geeignet für die Entwicklung einer CCN-51 Nachweismethode heraus. Dieser SNP führt zur Anwesenheit einer Restriktionsschnittstelle des Enzyms AseI in der Sequenz von CCN-51, die bei Arriba nicht vorhanden ist. Bei einer entwickelten PCR-RFLP-Methode kann so über das Fragmentmuster zwischen CCN-51 (fragmentiert) und Arriba (nicht fragmentiert) unterschieden werden. Die Detektion kann hier, analog wie oben beschrieben, über Agarosegelelektrophorese, Kapillargelelektrophorese oder DHPLC erfolgen. Eine Quantifizierung des CCN-51-Anteils in Mischungen über Peakflächenverhältnisse bei der Auswertung über die Kapillar-

gelelektrophorese ist denkbar. Erste Versuche konnten noch in der Projektlaufzeit durchgeführt werden. Weitere Untersuchungen sind hierzu aber auch nach Projektende geplant.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Die deutsche Kakao- und Schokoladenindustrie verarbeitete 2012 rund 418 t Kakao im Wert von 932 Mio €. Sie ist eine der wichtigsten Teilbranchen der deutschen Süßwarenindustrie, die bei einem jährlichen Umsatz von über 12 Mrd. € in etwa 200 Mitgliedsunternehmen und 250 Betrieben etwa 50.000 Mitarbeiter beschäftigt. Eine zunehmende Bedeutung haben auf dem deutschen Schokoladenmarkt Edelkakaoprodukte mit hohem Kakaoanteil, die sich derzeit großer Beliebtheit erfreuen und für die der Verbraucher auch bereit ist, höhere Preise zu bezahlen. Nachdem Ecuador der größte Erzeuger von Edelkakao ist, stellen gerade beabsichtigte Vermischungen sowie unbeabsichtigte Kontaminationen von hochwertigem Nacional-Kakao mit CCN-51 eine Herausforderung für die Wareneingangskontrolle der deutschen Schokoladenhersteller dar. Dabei geht es einerseits darum, die sensorische Qualität der Produkte durch Einsatz von entsprechend hochwertigem Kakao sicherzustellen, andererseits folgen die Hersteller gerne dem Trend, Herkunftsland, Provenienz, Plantage und/oder die eingesetzte Kakaosorte werbewirksam auf der Packung auszuloben und sind damit auch gezwungen, diese Angaben zu verifizieren. Beides ist mit den im Projekt entwickelten Methoden möglich. Dadurch kann die hohe Qualität deutscher Edelkakaoprodukte sichergestellt und gegen die Konkurrenz von Billigprodukten geschützt werden.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht (2013).
2. Herrmann, L., Felbinger, C., Haase, I., Rudolph, B., Biermann, B. und Fischer, M.: Food Fingerprinting: Characterization of the Ecuadorean Type CCN-51 of *Theobroma cacao* L. Using Microsatellite Markers. *J. Agric. Food Chem.* 63, 4538-4544 (2015).
3. Herrmann, L., Blauhut, M., Barz, N., Haase, I., Hünninger, T. und Fischer, M.: Edler Genuss – Das Chloroplastengenom im Fokus der Authentizitätsüberprüfung von Lebensmitteln am Beispiel des ecuadorianischen Edelkakaos. *Lab. & more* 3, 60-65 (2014).
4. Herrmann, L., Blauhut, M., Barz, N., Haase, I., Hünninger, T. und Fischer, M.: DNA-

basierte Authentizitätsüberprüfung des Edelkakaos aus Ecuador. Dt. Lebensmittel-Rundsch. 5, 210-214 (2014).

5. Humin, J., Steinhaus, M. und Schieberle, P.: Evaluierung chemisch-analytischer Methoden zur Differenzierung von hochwertigem Edelkacao und Konsumkacao (CCN-51) aus Ecuador. Lebensmittelchem. 67, 62-63 (2013).
6. Herrmann, L., Haase, I. und Fischer, M.: Differenzierung der Kakaosorten CCN 51 und Arriba anhand von Sequenzunterschieden in ihrer Plastiden-DNA. Lebensmittelchem. 67, 77 (2013).
7. Fischer, M, Werner, P., Hermann, L., Hünninger, T. und Hackl, T.: Food Profiling – Von der Hightech-Forschung bis zur Anwendung im Unternehmen. Food-Lab 5-6, 10-14 (2013).

#### Weiteres Informationsmaterial:

Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie (DFA)

Lise-Meitner-Straße 34, 85354 Freising

Tel.: + 49 8161 71-2932

Fax: + 49 8161 71-2970

E-Mail: peter.schieberle@lrz.tum.de

Universität Hamburg

Hamburg School of Food Science

Institut für Lebensmittelchemie

Grindelallee 117, 20146 Hamburg

Tel.: + 49 40 4283843-57

Fax: + 49 40 4283843-42

E-Mail: markus.fischer@uni-hamburg.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)

Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn

Tel.: + 49 228 3079699-0

Fax: + 49 228 3079669-9

E-Mail: fei@fei-bonn.de

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

gefördert durch/via:

