

Entwicklung einfacher massenspektrometrischer Methoden für den quantitativen Nachweis von Kakaoschalenanteilen in Kakaoprodukten für die Routineanalytik

Koordinierung:	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
Forschungsstellen:	<p>Universität Hamburg Hamburg School of Food Science Institut für Lebensmittelchemie AK Prof. Fischer Prof. Dr. Markus Fischer/Dipl. LM-Chem. Nicolas Cain</p> <p>Universität Tübingen Lehrstuhl für Angewandte Bioinformatik Prof. Dr. Oliver Kohlbacher</p>
Industriegruppen:	<p>Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e.V. (BDSI), Bonn Stiftung der Deutschen Kakao- und Schokoladenwirtschaft, Bonn</p> <p>Projektkoordinator: Prof. Dr. Reinhard Matissek Lebensmittelchemisches Institut (LCI) des Bundesverbandes der Dt. Süßwarenindustrie e. V., Köln</p>
Laufzeit:	2016 - 2018
Zuwendungssumme:	€ 221.650,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

Ausgangssituation:

Als Kakao werden die vom Fruchtfleisch befreiten Samen des Kakaobaums (*Theobroma cacao*) bezeichnet, die als essentieller Bestandteil in Schokoladenprodukten eingesetzt werden. Für die industrielle Weiterverarbeitung der Kakaobohnen zu Halb- oder Fertigerzeugnissen auf Kakaobasis muss die Samenschale nach der Fermentation und Röstung vom Kern abgetrennt werden. Die vollständige Beseitigung ist allerdings aus technologischen Gründen nicht immer möglich. Je nach Anbaugelände, Sorte und Verarbeitung der Bohnen können diese daher einen Schalenanteil von bis zu 11 - 17 % aufweisen. Hohe Schalenanteile sind jedoch in vielerlei Hinsicht als qualitätsmin-

dernd einzustufen, insbesondere wegen der Gefahr des Eintrags von gesundheitsgefährdenden Substanzen (z. B. Mykotoxinen). Darüber hinaus können hieraus ein erhöhter Verschleiß von Maschinenteilen durch Abrieb sowie nachteilige sensorische Eigenschaften resultieren. Die unbewusste oder bewusste Streckung der Kakaomasse mit Kakaoschalen führt demnach zu wirtschaftlich nachteiligen Aspekten, da daraus entstandene Produkte als qualitativ minderwertig einzustufen sind.

Mit Inkrafttreten der Richtlinie 2000/36/EG im Jahr 2004 ist der bisherige Grenzwert für Schalenanteile und Keimlinge in Kakaoprodukten von 5 % weggefallen. In Anlehnung an die alte Gesetzgebung sowie den international vorge-

gebenen Lebensmittelstandards für Kakao-masse durch die Codex-Alimentarius-Kommis-sion hat sich jedoch in der kakaoverarbeiten- den Branche ein Grenzwert von max. 5 % an Schalenanteilen und Keimlingen etabliert, wel- cher technologisch nicht zu vermeiden ist und folglich der allgemeinen Verkehrsauffassung entspricht. Bei Überschreitung dieses Wertes kann der Einsatz von gestreckter Ware bzw. die Verarbeitung minderwertiger Bohnen oder eine fehlerhafte Prozessführung vermutet wer- den.

Da in zunehmendem Maße die Kakaobohnen bereits direkt in den Anbauländern oder von Zwischenhändlern zu Halbfabrikaten, wie Ka-kaomasse, Kakaopulver und Kakaobutter, ver- arbeitet werden, müssen die Hersteller der Endprodukte in der Lage sein, entsprechende Spezifikationen innerhalb der globalen Be- schaffungskette zu überprüfen. Hersteller, die Kakaomassen selbst produzieren, benötigen Methoden zur Qualitätssicherung, um den Verarbeitungsprozess entsprechend überwa- chen und ggf. optimieren zu können. In der Vergangenheit wurden bereits verschiedenste analytische Ansätze verfolgt, die z. T. jedoch zu ungenau, zu unspezifisch oder zu wenig repro- duzierbar sind, um entsprechende Spezifikati- onen überprüfen zu können.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Ent- wicklung einer Metabolomics-Methode (LC- MS) zur Bestimmung des Kakaoschalenanteils in Kakaoprodukten. Hierzu sollten zunächst Schlüsselmetabolite der Kakaobohne und der Kakaoschale identifiziert werden, die mit dem Schalenanteil in verschiedenen Kakaoproduk- ten korrelieren. Durch ein Screening von Ka- kaobohnen aus verschiedenen Anbaugebieten, unterschiedlicher Sorten, Erntezeitpunkten und Verarbeitungsgraden mittels hochauflösender non-targeted LC-MS/(MS)-Applikationen und der anschließenden Identifizierung und Quanti- fizierung von Schlüsselmetaboliten unter An- wendung bioinformatischer Auswertungsver- fahren sollten einfache targeted-Methoden auf Basis geeigneter Markersubstanzen entwickelt werden, anhand derer Unternehmen Kaka- oschalenanteile in Kakaoprodukten schnell und kostengünstig analysieren können.

Forschungsergebnis:

Für die Identifizierung der Schlüsselmetabolite wurden drei LC-ESI-QTOF-Applikationen ent- wickelt. Eine umfangreiche Optimierung der

Methoden umfasste die Probenvorbereitung, die Extraktion sowie das flüssigchromatogra- phische und massenspektrometrische System. Bei der Entwicklung der Methoden wurde ne- ben der Erfassung möglichst vieler Metabolite auch eine möglichst kurze Analysendauer an- gestrebt, um einen hohen Probendurchsatz zu gewährleisten. Die optimierten Applikationen wurden für die separate Analyse des polaren und unpolaren Metaboloms der Kakaoschale und des Kakaokerns eingesetzt. Durch den Einsatz unterschiedlicher multivariater Daten- analyseverfahren wurden das Metabolom der Kakaoschale mit dem Metabolom des Kaka- okerns verglichen und Metabolite identifiziert, die ausschließlich oder in deutlich höherer Konzentration in der Kakaoschale enthalten sind. Die Eignung der identifizierten Metabolite für eine valide Kakaoschalenbestimmung wur- de anhand unterschiedlicher Bewertungskrite- rien überprüft und bewertet. Hierbei wurden die Metabolite auf Temperaturstabilität und auf Konzentrationsunabhängigkeit gegenüber Herkunft, Fermentation, Erntejahr und Sorten- einfluss überprüft. In Zusammenarbeit der beiden Forschungsstellen wurde aus den Er- gebnissen eine Liste potentieller Markersub- stanzen erstellt. Hierbei wurde festgestellt, dass unter den gewählten Auswahlkriterien nur Substanzen aus den unpolare-positiven Proben als Marker nutzbar sind. Nach Identifi- zierung und Validierung der Substanzen konn- te mit Hilfe einer linearen Regression der Zu- sammenhang zwischen Intensität und Kon- zentration bestätigt werden, welcher für die quantitative Methode erforderlich ist.

Es konnten insgesamt 18 Metabolite identi- fiziert und charakterisiert werden, anhand derer ein Kakaoschalennachweis in Kakaoprodukten durchgeführt werden kann. Die identifizierten Marker sind fünf unterschiedlichen Stoffklas- sen zuzuordnen: Fettsäuretryptamide, 5-Hy- droxy-Fettsäuretryptamide (Serotonin-Deriva- te), α -Tocopherol-Derivate, Triacylglycerole und Ceramid-Derivate. Anhand der identifizier- ten Metabolite wurde eine targeted-Methode für ein LC-ESI-QQQ-System entwickelt und nach den Vorgaben der „Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry“ der US Food and Drug Administration (FDA) und der Deut- schen Norm 32645 validiert. Durch die Analyse einer Kakaoschalen-Kalibrierreihe (Kakaoscha- lenanteil 0-10 %) wurde die Anwendbarkeit und Leistungsfähigkeit der entwickelten tar- geted-Methode zur Bestimmung des Kaka- oschalenanteiles überprüft.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Im Jahr 2015 produzierte die deutsche Schokoladenindustrie ca. 1,02 Mio. t Schokoladenwaren mit einem Wert von ca. 6,71 Mrd. €. Die Branche besteht überwiegend aus kleinen und mittelständischen kakaoverarbeitenden Unternehmen und ist mit ca. 50.000 Beschäftigten ein wichtiger Wirtschaftszweig der deutschen Lebensmittelindustrie.

Für die Herstellung qualitativ hochwertiger Endprodukte bei Verwendung ausgesuchter Rohstoffe und Halbfabrikate sind leistungsfähige Analysemethoden zur Wareneingangskontrolle und zur Qualitätssicherung notwendig; der Kakaoschalen-Gehalt zählt zu diesen Qualitätsparametern. Die Entwicklung entsprechender Methoden ist insbesondere für kleinere und mittelständische Unternehmen (KMU) essentiell, die sich mit hochwertigen Produkten am Markt behaupten müssen.

Bisher war es der kakaoverarbeitenden Industrie nicht möglich, die Spezifikationsangaben zum Kakaoschalengehalt bei Kakaomassen mit einer ausreichend validen Nachweismethode zu überprüfen. Im Rahmen dieses Projektes wurde eine Methode entwickelt, die 18 Kakaoschalen-Schlüsselmetabolite simultan erfasst und in der Lage ist, anhand einer multiparametrischen Herangehensweise eine valide Aussage über den Kakaoschalengehalt in Kakaorohprodukten zu treffen. Durch die entwickelte Methode wird daher vor allem die Wettbewerbsfähigkeit von KMU gestärkt, da die Möglichkeit des Kakaoschalen-Nachweises als Qualitätsattribut für die produzierten Produkte angesehen werden kann und fundamental für die Herstellung qualitativ hochwertiger und wettbewerbsfähiger Produkte ist.

Durch den Wegfall der gesetzlichen Regelungen liegt es in der Eigenverantwortung der Unternehmen, Rohstoffe und Halbfabrikate mit geeigneten Spezifikationen und hohen Qualitäten einzusetzen, um Produkte zu erzeugen, die der Verbrauchererwartung entsprechen. Maßnahmen zur Kostenreduzierung (z.B. durch die Vermeidung von Fehlchargen oder durch einen geringeren Verschleiß der Produktionsanlagen) und der Steigerung der Produktqualität helfen, die Wettbewerbsfähigkeit von KMU zu stärken.

Die Ergebnisse des Vorhabens werden auch Dienstleistern (Handelslaboratorien) auf dem Gebiet der Qualitätskontrolle zugutekommen,

da wertbestimmende Qualitätsfaktoren in Kakao- und Schokoladenprodukten zukünftig wissenschaftlich fundierter beurteilt und entsprechend kontrolliert werden können. Die verbesserte Qualitätskontrolle wird darüber hinaus dazu beitragen, den Handel vor der Einfuhr qualitativ unzureichender oder ungenau spezifizierter Ware und den damit verbundenen finanziellen Risiken zu schützen. Durch die Bekanntmachung und die Implementierung einer validen Nachweismethode kann es bereits zu einer Reduzierung der absichtlichen Streckung von Kakaoprodukten mit Kakaoschale kommen.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2018.
2. Cain, N., Marji, C., von Wuthenau, K., Segelke, T. & Fischer, M.: Food Targeting: Determination of the Cocoa Shell Content (*Theobroma cacao* L.) in Cocoa Products by LC-QqQ-MS/MS. *Metabol.* 10 (3), 91 (2020).
3. Cain, N., Alka, O., Segelke, T., von Wuthenau, K., Marji, C., Kohlbacher, O. & Fischer, M.: Food Metabolomics: Kakaoschalennachweis. *Cer. Technol.* 1, 12-21 (2019).
4. Cain, N., Alka, O., Segelke, T., von Wuthenau, K., Kohlbacher, O. & Fischer, M.: Food Fingerprinting: Mass spectrometric determination of the cocoa shell content (*Theobroma cacao* L.) in cocoa products by HPLC-QTOF-MS *Food Chemistry. Food Chem.* 298, 125013 (2019).
5. Cain, N., Segelke, T., Stahl, A., Frerichs, H. & Fischer, M.: Metabolic Fingerprinting: Kakaoschalennachweis in Kakaoprodukten. *FOOD-LAB 2*, 18-22 (2017).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hamburg
Hamburg School of Food Science
Institut für Lebensmittelchemie
AK Prof. Fischer
Grindelallee 117, 20146 Hamburg
Tel.: +49 40 42838-4359
Fax: +49 40 42838-4342
E-Mail: markus.fischer@chemie.uni-hamburg.de

Universität Tübingen
Lehrstuhl für Angewandte Bioinformatik
Sand 14, 72076 Tübingen
Tel.: +49 7071 29-70457
Fax: +49 7071 29-5152
E-Mail: oliver.kohlbacher@uni-tuebingen.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

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

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.