

## DNA-Chip-basierter qualitativer Schnelltest zur Fischartendifferenzierung

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle(n):</b>	Max-Rubner-Institut (MRI) Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch, Kiel Prof. Dr. Jan Fritsche/Dr. Kristina Kappel  Universität Hamburg Hamburg School of Food Science Institut für Lebensmittelchemie Arbeitskreis Prof. Dr. Markus Fischer Prof. Dr. Markus Fischer/M.Sc. Joanna Fafinska
<b>Industriegruppen:</b>	Bundesverband der Deutschen Fischindustrie und des Fischgroßhandels e.V., Hamburg Fischwirtschaftliche Vereinigung Schleswig-Holstein e.V., Kiel  Projektkoordinator: Sven Schroeder Rassau Seafood GmbH, Hamburg
<b>Laufzeit:</b>	2016 – 2019
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 422.630,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Durch die Globalisierung der Warenströme ist die Anzahl an Fisch-, Krebs- und Weichtierarten auf den europäischen Märkten in den letzten Jahren ständig gestiegen. In Deutschland sind über 500 verschiedene Fischarten erhältlich, wobei 86 % des Bedarfs an Fischereierzeugnissen aus dem Ausland importiert werden. Der überwiegende Teil kommt dabei aus Nicht-EU-Ländern, die zum Teil über geringe Rückverfolgungsstandards verfügen, wie z.B. viele westafrikanische oder asiatische Länder.

Die Gesetzgebung fordert bei unverarbeiteten Fischereierzeugnissen (wie z.B. rohen, geräucherten oder gesalzenen ganzen Tieren, Filets oder Terteilen) nicht nur die Angabe der Handelsbezeichnung, sondern zusätzlich auch die genaue Kennzeichnung der Spezies mit dem wissenschaftlichen (lateinischen) Namen. Die fischverarbeitenden Betriebe und Händler sind in der Pflicht, die richtige Kennzeichnung ihrer Produkte sicherzustellen. Beziehen diese Betriebe jedoch bereits bearbeitete Rohwaren (z.B. Fischfilets) oder Spezies, die morphologisch nicht eindeutig zu bestimmen sind (z.B. bestimmte Thunfisch- oder Snapper-Arten), so ist eine visuelle Artbestimmung meist unmöglich. Fehlerhafte Kennzeichnungen können für

die betroffenen Unternehmen erhebliche wirtschaftliche Folgen, wie z.B. Bußgelder und beachtliche Imageschäden, nach sich ziehen. Außerdem werden durch gezielte Falschkennzeichnungen bzw. Täuschungen andere Unternehmen, die einwandfreie Produkte herstellen und vertreiben, im Wettbewerb benachteiligt. Schließlich wird durch Berichte über Falschkennzeichnungen in den Medien das Vertrauen der Verbraucher in die Qualität der Fischereierzeugnisse allgemein geschädigt, was zu erheblichen Einbußen für die gesamte Fischwirtschaft führen kann.

Etablierte analytische Techniken zur Speziesbestimmung, wie die isoelektrische Fokussierung wasserlöslicher Muskelproteine, die Sequenzierung von PCR-Produkten geeigneter DNA-Marker oder die *Real-time*-PCR, haben entweder den Nachteil einer geringen Spezifität, einer langen Analysedauer oder zielen nur auf eine bzw. sehr wenige Arten ab und sind nicht geeignet, direkt vor Ort angewandt zu werden. Es fehlen derzeit schnelle, einfach zu handhabende und kostengünstige Analysemethoden, die ohne aufwändige und teure Instrumente auch in kleineren Laboratorien als Routineuntersuchung durchgeführt werden können und mit denen die Spezies in unterschiedlichen Fischereierzeugnissen be-

stimmt werden können. Somit müssen Proben zur stichprobenartigen Speziesuntersuchung an hochspezialisierte Dienstleistungslaboratorien geschickt werden, was neben hohen Kosten, die gerade für kleine und mittelständische Unternehmen problematisch sind, zu längeren Analysezeiten und damit auch Lagerzeiten führt, die besonders im Fall von Frischfisch inakzeptabel sind.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung einer DNA-Microarray-basierten Analyse-methode mit integrierter isothermaler Amplifikationsreaktion für die Bestimmung von Fisch- und Garnelenarten als Alternative zum heutigen Goldstandard der konventionellen Sequenzierung von PCR-Produkten. Die Methode sollte einfach und schnell durchzuführen und auszuwerten sein und durch den Verzicht von technisch aufwändigen Geräten die Möglichkeit bieten, auch direkt in den fischverarbeitenden Unternehmen oder in den für die Qualitätskontrolle beauftragten Handelslaboratorien angewandt zu werden.

#### Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Projekts wurde eine Analytik etabliert, mit der exemplarisch elf Fischarten sowie zwei Garnelenarten innerhalb von maximal vier Stunden mit geringem technischem Aufwand und ohne wissenschaftliche Expertise bezüglich der Speziesauthentizität überprüft werden können. Bei der Auswahl der Zielarten wurden Spezies berücksichtigt, die aufgrund hoher Produktionsmengen eine wichtige Rolle für die Fischwirtschaft spielen, wie z.B. Alaska-Seelachs, Atlantischer Lachs, Atlantischer Hering, der Echte Bonito und der Atlantische Kabeljau. Mit der entwickelten Analytik können jedoch auch beliebte Plattfische (Seezunge und Scholle), Rotlachs, Pangasius sowie der indowestpazifische Red Snapper und der mit Ausbrüchen einer ernsten Fischvergiftung (Ciguatera) assoziierte Doppelfleckschnapper detektiert werden. Darüber hinaus weist das Verfahren die Weiße sowie die Schwarze Tiger-Garnele nach, die zu den wichtigsten Zucht-garnelen zählen.

Das entwickelte Verfahren zur Speziesidentifizierung umfasst folgende Schritte: (i) eine einfache und hygienische Gewebeentnahme mit Hilfe einer Kanüle mit stumpfer Spitze als Stanze, (ii) eine schnelle DNA-Extraktion mit einer kommerziell erhältlichen Lösung (Extracta DNA Prep for PCR-Tissue, Quanta Biosciences), (iii) die Amplifikation der genetischen Marker *cytb* und 16S rDNA bei Fischproben bzw. aus-

schließlich 16S rDNA (bei Garnelen) durch eine isothermale Amplifikationsreaktion (*recombinase polymerase amplification* (RPA) (TwistDx)), (iv) die Differenzierung der RPA-Amplikons mit Hilfe von Oligonukleotidsonden auf einem DNA-Chip am Boden eines Reaktionsgefäßes (ArrayTube2, Alere Technologies) und (v) eine automatische Auswertung inklusive eines Vergleichs der SONDENSIGNALE der Probe mit denen von Referenzindividuen durch eine hierarchische Clusteringanalyse mit Hilfe einer speziell entwickelten Web-basierten Software-Applikation. Als Laborequipment werden lediglich ein Pipettensatz, ein Thermo-schüttler, eine Minizentrifuge, ein kleines Durchlichtmessgerät zur Messung der SONDENSIGNALE sowie ein Computer oder Laptop mit Internetzugang zur Datenauswertung benötigt.

Die Spezifität des entworfenen SONDENSATZES von 185 Oligonukleotidsonden wurde durch den Test mit PCR-Produkten der dreizehn Zielarten sowie 56 nah verwandter Fischarten sowie mindestens 13 verwandter Krebstiere bestätigt. Im Rahmen einer Validierung der Gesamt-prozedur von der Probenahme bis zur Soft-waregestützten Datenauswertung konnte gezeigt werden, dass mit dieser Analytik nicht nur die Zielarten, sondern auch nah verwandte Spezies unabhängig von der Verarbeitung (frisch, mariniert, geräuchert, gekocht, gebraten, gedünstet, gefroren oder in Ethanol konser-iiert) spezifisch nachgewiesen werden können.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Die deutsche fischverarbeitende Industrie ist stark geprägt von kleinen und mittelständischen Unternehmen. Bedingt durch die Verknappung der Rohstoffe - viele Fischbestände sind durch Überfischung stark reduziert - herrscht auf den internationalen Märkten ein aggressiver Wettbewerbsdruck, der Substitutionen hochpreisiger Spezies durch günstiger gehandelte Arten begünstigt. Betriebsinterne Stichproben-untersuchungen bezüglich der Spezies der eingekauften Rohwaren, z.B. von bereits in den Herkunftsländern filetierten Fischen, sind somit unerlässlich für die Sicherstellung der richtigen Kennzeichnung und stellen eine Voraussetzung für die Gewährleistung der Qualität und Sicher-heit der zu vermarktenden Fischerzeugnisse dar. Gerade für kleine fischverarbeitende Unter-nehmen oder Händler ist die Inanspruchnahme von teuren laboranalytischen Techniken großer Servicelaboratorien jedoch problematisch.

Die im Rahmen des Projekts entwickelte und etablierte Analytik kann aufgrund des niedrigen

apparativen Aufwands auch in kleinen Dienstleistungsunternehmen durchgeführt werden und benötigt aufgrund der automatisierten Ergebnisauswertung keine wissenschaftliche Expertise des zuständigen Personals, so dass die Kosten im Vergleich zur herkömmlichen Analytik deutlich reduziert werden können. Fischverarbeitende Unternehmen mit unternehmenseigenen Laboratorien können das Verfahren zudem auch vor Ort durchführen und sparen damit zusätzlich Zeit, die sonst für den Versand oder Transport des Probenmaterials aufgewandt werden muss. Darüber hinaus können durch die Zeitersparnis Rohwaren schneller verarbeitet und Erzeugnisse schneller vermarktet werden, was z.B. auch zu einer geringeren Belastung der Lagerkapazitäten führt. Insgesamt dient die Entwicklung einer schnellen, einfachen und kostengünstigen Methode zur Authentizitätsprüfung von Rohwaren der Sicherheit und Qualität der Lebensmittel und schützt die verarbeitende Industrie und die Händler vor Betrug durch Zulieferer, Bußgeldern und Imageschäden und stärkt das Vertrauen der Verbraucherinnen und Verbraucher. Eine Weiterentwicklung des etablierten Verfahrens bis zur Marktreife sowie die Ausweitung zur Detektion weiterer Fisch-, Krebs- oder Weichtierarten ist zu erwarten.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2019.
2. Kappel, K., Fafińska, J., Fischer, M. & Fritsche, J.: A DNA microarray for the authentication of giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and whiteleg shrimp (*Penaeus (Litopenaeus) vannamei*): a proof-of-principle. *Anal. Bioanal. Chem.* <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03440-2> (2021).
3. Kappel, K., Eschbach, E., Fischer, M., & Fritsche, J.: Design of a user-friendly and rapid DNA microarray assay for the authentication of ten important food fish species. *Food Chem.* 311, 125884 (2020).

4. Kappel, K., Fafińska, J., Schröder, U., Fischer, M., & Fritsche, J.: Tierartenbestimmung bei Fischereierzeugnissen. In M. Keller (Ed.), *Handbuch Fisch, Krebs- und Weichtiere*, Vol. 12/2019, Kap. 2.6, Hamburg, Behr's Verlag (2019).
5. Kappel, K., Fritsche, J., Eschbach, E., Schott, I., Kamenjas, K., Weißer, K. & Fischer, M.: Differenzierung per DNA-Chip-Entwicklung eines qualitativen Schnelltests für die Überprüfung verschiedener Fisch- und Garnelenarten. *Dt. Lebensm. Rundsch.* 114, 286-290 (2018).

#### Weiteres Informationsmaterial:

Max-Rubner-Institut (MRI)  
Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel  
Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch  
Hermann-Weigmann-Straße 1, 24103 Kiel  
Tel.: +49 431 609-2250  
Fax: +49 431 609-2300  
E-Mail: [jan.fritsche@mri.bund.de](mailto:jan.fritsche@mri.bund.de)

Universität Hamburg  
Hamburg School of Food Science  
Institut für Lebensmittelchemie  
Arbeitskreis Prof. Dr. Markus Fischer  
Grindelallee 117, 20146 Hamburg  
Tel.: +49 40 42838-4359  
Fax: +49 40 42838-4342  
E-Mail: [markus.fischer@chemie.uni-hamburg.de](mailto:markus.fischer@chemie.uni-hamburg.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](mailto:fei@fei-bonn.de)

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

Gefördert durch:



aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages



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.