

## Entwicklung molekularbiologischer Methoden zur Ermittlung qualitätsbestimmender Parameter in Kakao und Schokoladen auf Basis der PCR

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b> (bis 30.09.2006)	Technische Universität München Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie Prof. Dr. Dr. A. Bacher/Prof. Dr. M. Fischer
<b>Forschungsstelle II:</b> (ab 01.10.2006)	Universität Hamburg Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie Abt. Lebensmittelchemie Prof. Dr. M. Fischer/Dr. I. Haase
<b>Industriegruppe:</b>	Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e.V., Bonn  Projektkoordinatoren: Prof. Dr. R. Matissek Lebensmittelchemisches Institut des Bundesverbandes d. Dt. Süßwarenindustrie e.V. (LCI), Köln Dr. B. Schartmann Lindt & Sprüngli GmbH, Aachen
<b>Laufzeit:</b>	2005 -2007
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 223.350,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Hersteller von Kakao und Schokoladenprodukten sind aus Gründen der Qualitätssicherung und des Verbraucherschutzes an einer Kakaoartendifferenzierung und einer Kontrolle des Schalenanteils interessiert. Nach allgemeiner Verkehrsauffassung darf in Kakao und Schokoladenprodukten nur die Kakaoart *T. cacao* als Zutat verwendet werden. Ein Schalenanteil wird bis maximal 5 % (bezogen auf die fettfreie Kakao-trockenmasse) als technisch unvermeidbar geduldet. Bislang gibt es jedoch keine zuverlässigen Methoden, diese Parameter zu bestimmen.

Ziel des Forschungsvorhabens war es deshalb, eine PCR-Methode zu entwickeln, die eine Unterscheidung der Kakaoarten *T. cacao* und *T. grandiflorum* in Kakao und Schokoladenprodukten ermöglicht. Ein weiteres Arbeitspaket befasste sich mit der Entwicklung einer real-time PCR-Methode zur Quantifizierung des Schalenanteils. Voraussetzung für beide Aufgabengebiete war die Etablierung einer Methode zur Isolierung von DNA aus Kakao und Schokoladenprodukten.

Isolierung von DNA aus Kakao und Schokoladenprodukten.

### Forschungsergebnis:

Im Rahmen des Vorhabens wurde eine Methode zur effizienten Isolierung von DNA aus Kakao und Schokoladen entwickelt. Als Grundlage diente ein handelsüblicher Kit, dessen Angaben bzgl. Einwaage, Puffervolumina und Inkubationszeiten für die Matrix Kakao/Schokolade optimiert wurden. Es konnten zwei PCR-basierte Methoden zur Unterscheidung der Kakaoarten *T. cacao* und *T. grandiflorum* entwickelt werden. Zum einen wurden auf Basis der Trypsin-Inhibitor-Gensequenzen artenspezifische Primerpaare entwickelt, die eine artenspezifische PCR ermöglichen. Zum anderen erfolgte die Artendifferenzierung nach einer artenunspezifischen Amplifikation des Vicilin-Gens durch die Verwendung von artspezifischen Restriktionsendonukleasen (PCR-RFLP).

Des Weiteren wurde versucht, eine Methode zur Quantifizierung des Schalenanteils in Kakao und Schokoladenprodukten zu entwickeln. Für die qualitative und quantitative Schalenbestimmung wurde ein DNA-Sequenzabschnitt herangezogen, der nur in der DNA von Kakaoschalen detektiert werden konnte. Die geplante absolute Quantifizierung mittels externer Kalibriergeraden konnte allerdings aufgrund schwankender PCR-Effizienzen zwischen den PCR-Ansätzen der Kalibriergeraden (keine Matrix) und der Probenansätze (Kakaomatrix) nicht durchgeführt werden. Weiterführende Versuche mit dem Ziel, den Schalenanteil über eine relative Quantifizierung zu ermitteln, wurden über zwei Lösungsansätze durchgeführt (Mimic-Fragment bzw. House-Keeping-Gen). Dabei zeigte sich die relative Quantifizierung über ein House-Keeping-Gen als der vielversprechendere Lösungsansatz. Im Rahmen der Projektlaufzeit, konnten diese Untersuchungen jedoch nicht abgeschlossen werden. Die Forschungsarbeiten werden jedoch auf Basis der Ergebnisse mit anderen öffentlichen Mitteln fortgeführt.

#### Wirtschaftliche Bedeutung:

Kakao ist vom Volumen her ein sehr bedeutendes Handelsprodukt. Die deutsche Schokoladenindustrie produziert jährlich in ca. 120 mittelständischen Unternehmen 600.000 Tonnen Kakaoverzeugnisse im Wert von 3 Mrd. €. Die Kakaoverarbeitung erfolgt dabei zunehmend im Erzeugerland. Schokoladenhersteller greifen auf diese im Ausland hergestellte Kakaomasse zurück und müssen sich aus Qualitätsgründen auf die vorgegebenen Spezifikationen (Kakaoart, Schalenanteil) verlassen können. Die entwickelten Methoden stellen einen wichtigen Baustein zur Kontrolle der Einhaltung dieser Spezifikationen dar. Durch die Europäisierung sind allerdings einige gesetzliche Regelungen, wie beispielsweise eine Höchstmenge für den Schalenanteil und die Definition der Kakaoart, weggefallen. Nach Wirksamwerden der neuen europäischen Regelung liegt es in der Eigenverantwortlichkeit der kakaoverarbeitenden Industrie, Produkte mit einer eindeutig definierten Spezifikation auf den Markt zu bringen. Der Verbraucher erwartet beim Kauf von Kakao- und Schokoladenprodukten eine reproduzierbar hohe Qualität, für die der Hersteller Sorge zu tragen hat. Die Ergebnisse werden dazu beitragen, dies zu gewährleisten. Ferner wird es für die Schokola-

denindustrie sehr attraktiv sein, ihr Marketing auf wissenschaftliche Basis zu stellen und den geschmacklich interessanten Bestandteil Kakao unter Verwendung innovativer Methoden charakterisieren zu können.

Die Ergebnisse aus dem Forschungsvorhaben werden auch Dienstleistern auf dem Gebiet der Qualitätskontrolle zu Gute kommen, da wertbestimmende Qualitätsfaktoren in Kakao- und Schokoladenprodukten zukünftig wissenschaftlich fundiert beurteilt und entsprechend kontrolliert werden können.

#### Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2008.
2. Haase, I. und Fischer, M.: Differenzierung von *Theobroma cacao* und *Theobroma grandiflorum* mittels PCR. J. Verbr. Lebensm. 2, 422-428 (2007).
3. Haase, I. und Fischer, M.: Qualitätsbestimmende Parameter in Kakao und Schokoladenprodukten: Bestimmung des Schalenanteils. Lebensmittelchem. 61 (3), 61 (2007).
4. Haase I. und Fischer, M.: Qualitätsbestimmende Parameter in Kakao und Schokoladenprodukten: Unterscheidung der Kakaoarten *Theobroma cacao* und *Theobroma grandiflorum*. Lebensmittelchem. 61 (3), 61 (2007).
5. Haase I. und Fischer, M.: Molekularbiologische Methoden zur Qualitätsanalyse von Lebensmitteln. Tagungsband 65. FEI-Jahrestagung 2007, 15-25 (2008).

#### Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hamburg  
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie  
Abt. Lebensmittelchemie  
Grindelallee 117, 20146 Hamburg  
Tel.: 040/42838-4357 , 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

Der Schlussbericht ist für die interessierte Öffentlichkeit bei den Forschungsstellen abzurufen.

Das Forschungsvorhaben AiF 14387 N wurde im „Programm zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)“ vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (via AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert.