

Gestreckten Fleischwaren auf der Spur: Neue, sensible Nachweisverfahren für Fremdweiweiß

Dr. K. Dolch, Dr. B. Kranz, Dr. C. Stader
Dr. S. Münch, Dr. S. Andréé, W. Jira, Dr. F. Schwägele,

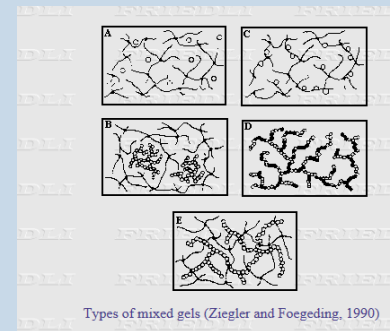
[Dr. D. A. Brüggemann](#)

Institut für Sicherheit und Qualität bei Fleisch

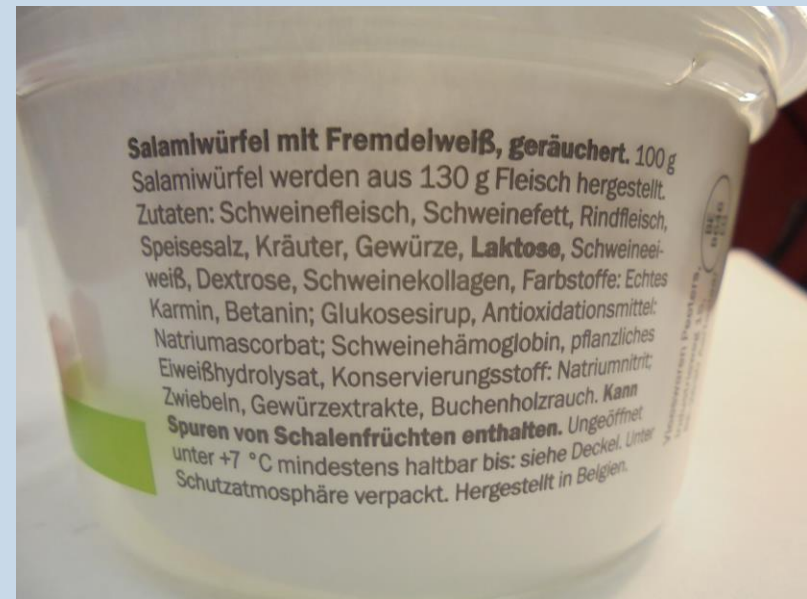
*Wenn das rauskommt, was da rein
kommt,*

dann kommt er rein und nicht mehr raus!

Problembereich: Einsatz von Fremdeiweiß in Wurstwaren



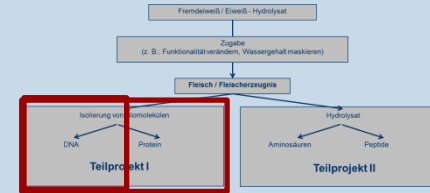
Types of mixed gels (Ziegler and Foegeding, 1990)



Hydrolysate in Frischfleisch: Geflügel



Teilprojekt I: Mögliche Fremdeiweißquellen

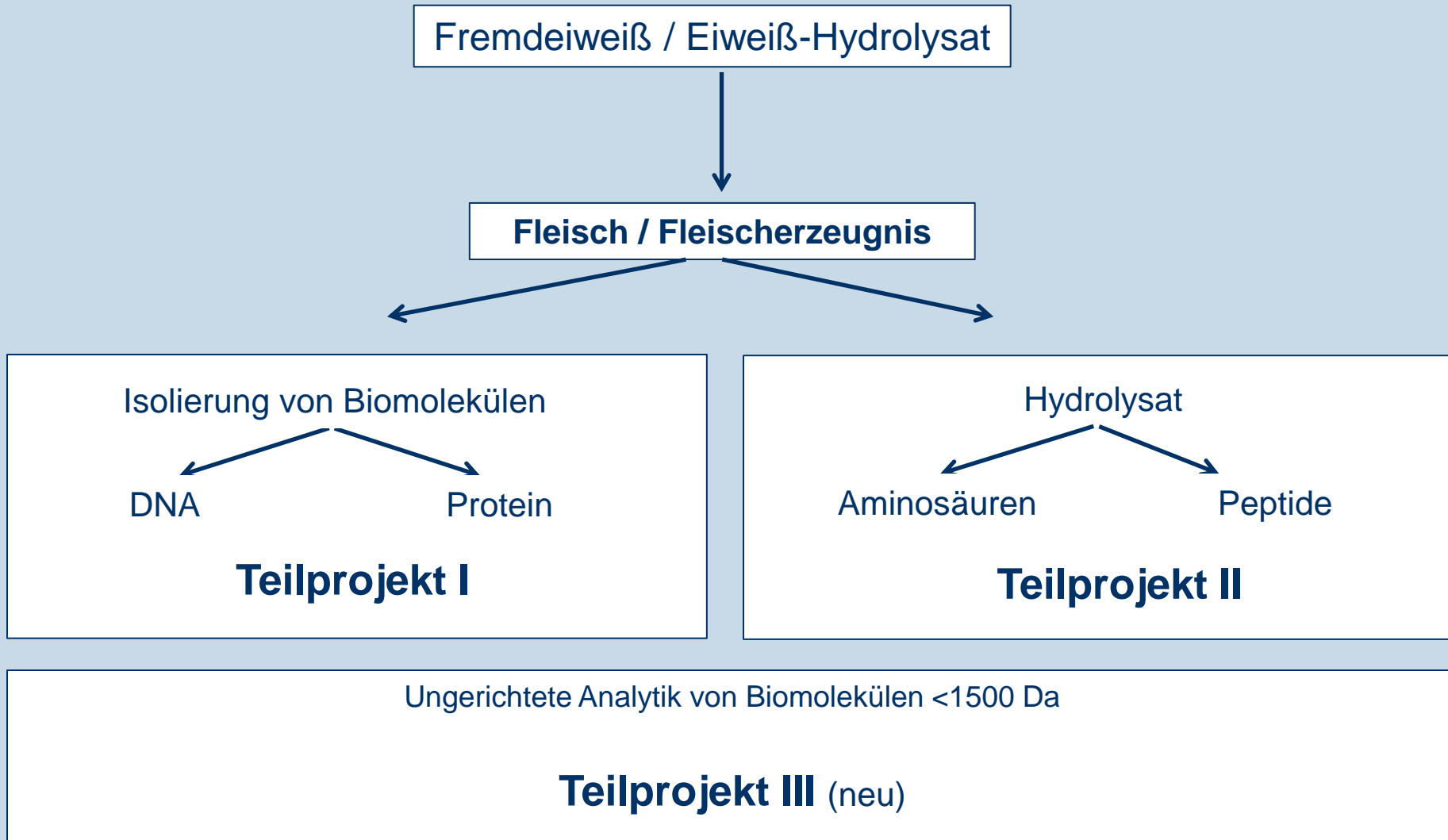


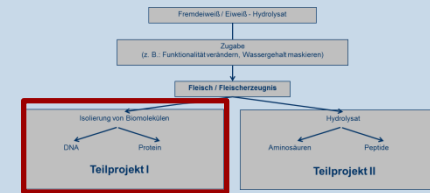
Priorität	Fremdeiweiß	Produktionszahlen in Tt	Gehalt Rohprotein [%]
A	Erbisen	129 (D2013)	25,7
	Gerste	10.344 (D2013)	10,6
	Gerste	9.670 (D2013)	2,0
		31 (D2013)	36 - 48
		4.387 (D2013)	9,2
	Kaps	5.784 (D2013)	
	Soja	1795 (E1996)	
	Weizen	25.019 (D2013)	
		k. A.	
		k. A.	
B	Eiweiss	824 / 12,4 Mrd Eier (D2012)	
	Eiklar		
	Fisch	22 / Fischmehl (D2009)	
	Gelatine	80 (Gelita; ca. 25 % Marktanteil)	
	Weizen	31.000 Milch (D2013),	
		373 / Molkepulver (D2012)	
	(Bier)Hefe (getrocknet)	116 / 65 (Melasse) (D2013)	
	Ackerbohne	60 (D2013)	
	Algen	k. A.	
	Hafer	628 (D2013)	
	120 (E1996)		
	69 (E1996)		
	k. A.		
	470.000 (weltweit, 2012)		
	4.689 (D2013)		
	27.687 (D2012)		
	20.000 (weltweit, 2013)		
	90.900 (weltweit, 2015)		
	39.360 (weltweit, 2015)		
	k. A.		
	379 (D2009)		
	k. A.		
	k. A.		
	k. A.		
	2.200 (EU, Olivenöl)		
	Quinoa	k. A.	14,8
		k. A.	15
		k. A.	80
		k. A.	10 - 74
	nagelerte	k. A.	k. A.
	Bakterien	k. A.	68
	Quorn	k. A.	14,5
C	Roggen		



Stoffe, die Allergien oder Unverträglichkeiten auslösen können

Gliederung des MRI Projektes





Teilprojekt I: Nachweis von Fremdeiweiß

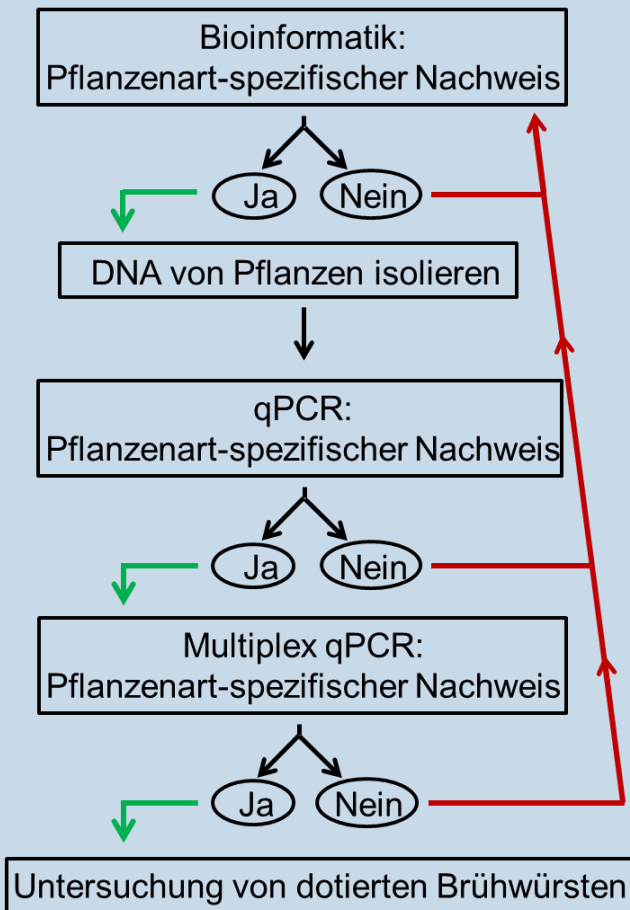
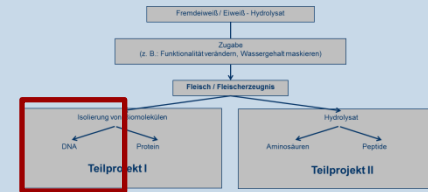
pflanzlich



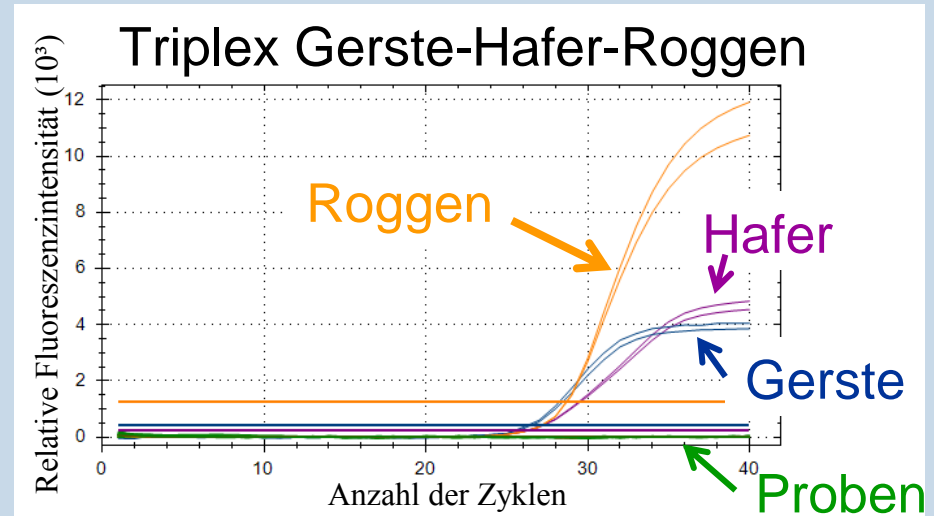
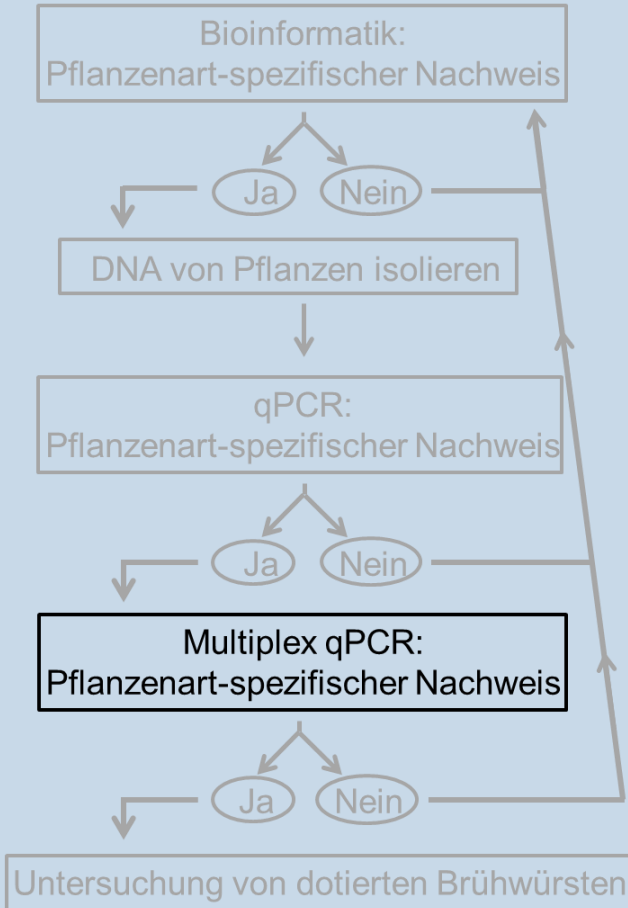
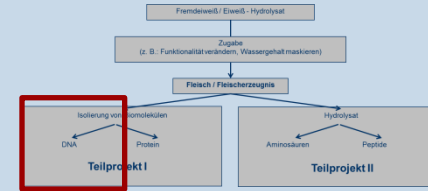
tierisch



Teilprojekt I: Indirekter Nachweis mittels qPCR

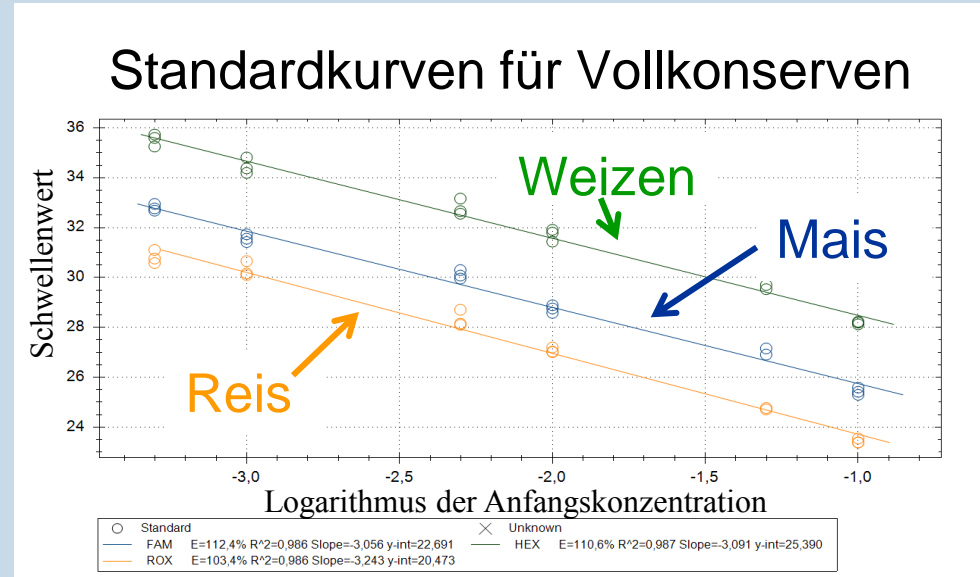
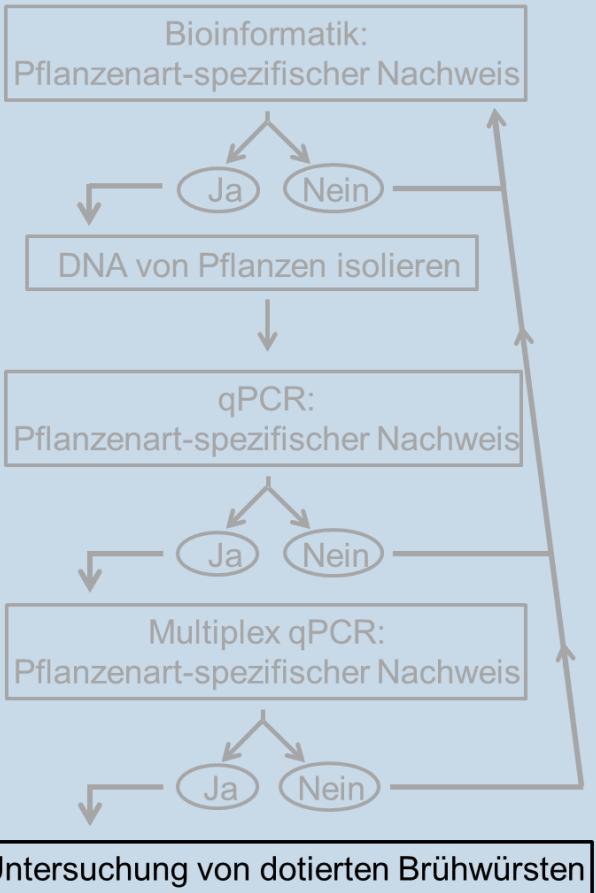
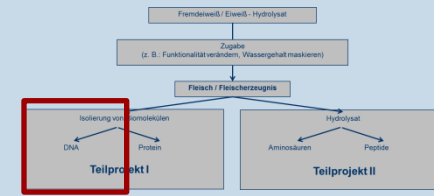


Teilprojekt I: Etablierung einer triplex qPCR



- Keine Kreuz-Reaktivität
- Spezifität

Teilprojekt I: Untersuchung dotierter Brühwürste



→ Quantifizierungsgrenze:
0,0005% (= 5 ppm) Fremdeiweiß

Herausforderungen

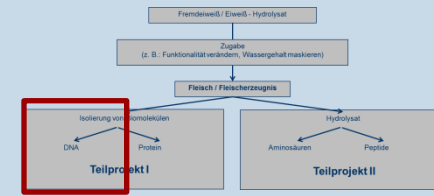
Teilprojekt I: Fazit und Ausblick

Fazit:

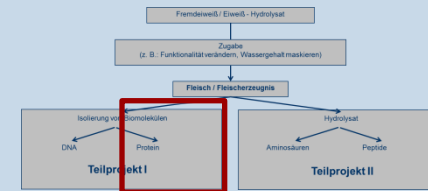
- Zwei Triplex qPCR Systeme (Gerste-Hafer-Roggen und Weizen-Mais-Reis)

Ausblick:

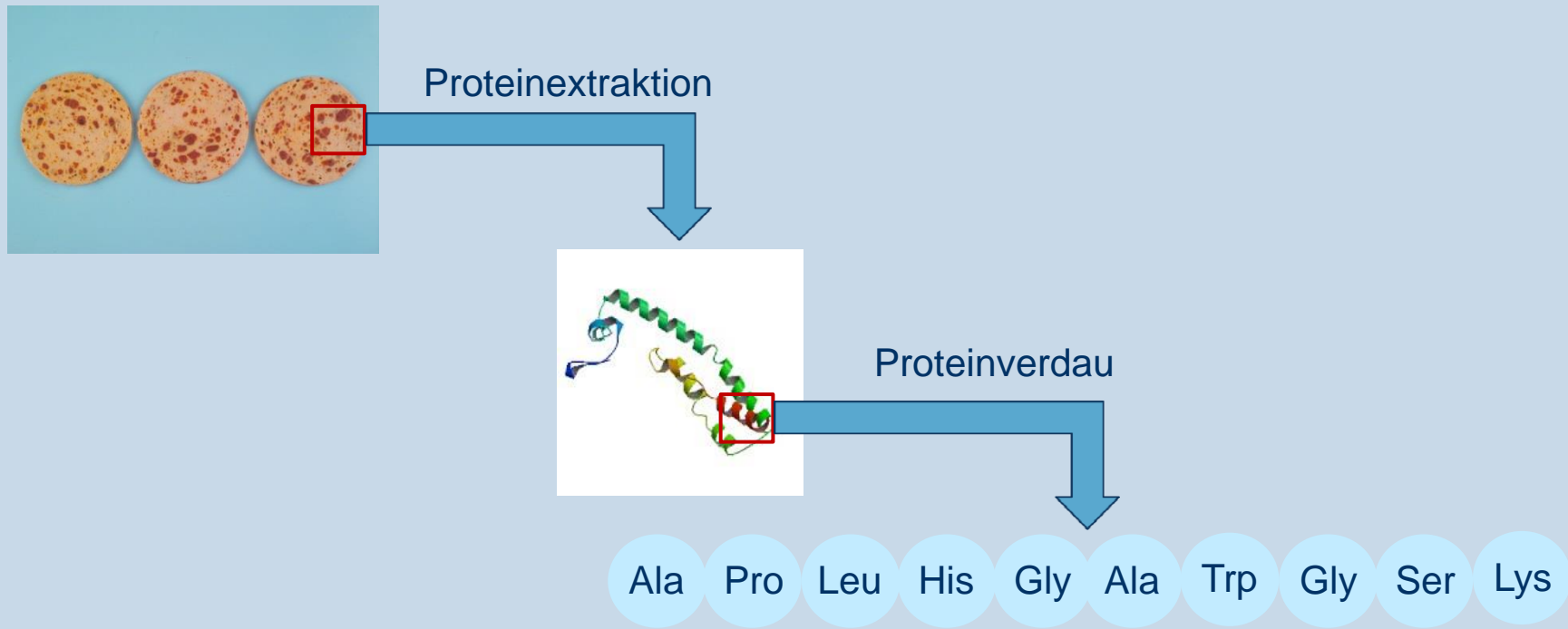
- Verifizierung der beiden Triplex-Systeme
- Etablierung weiterer Multiplex qPCR-Systeme
- Vergleich mit ddPCR
- Einfluss der Verarbeitung auf Detektion



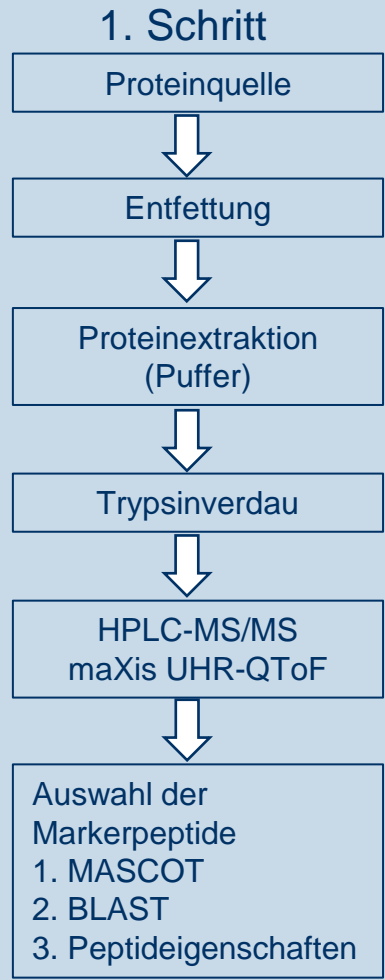
Priorität	Fremdeiweiß	Produktionszahlen in Tt	Gehalt Rohprotein [%]
A	Erbsen	129 (D2013)	25,7
	Gerste	10.344 (D2013)	10,6
	Kartoffel	9.670 (D2013)	2,0
	Lupine	31 (D2013)	36 - 48
	Mais	4.387 (D2013)	9,2
	Raps	5.784 (D2013)	35,4
	Soja	1796 (E1996)	41
	Weizen	25.019 (D2013)	11,7
	Blutmehl (Rind, Schwein, Geflügel)	k. A.	80 - 90
	Blutplasmaehl (Rind, Schwein, Geflügel)	k. A.	k. A.
	Ei		12,8 - 45
	Eidotter	824 / 12,4 Mrd Eier (D2012)	30
	Eiklar		59
	Fisch	22 / Frischmehl (D2009)	64 - 71
	Gelatine	80 (Gellin; ca. 25 % Marktanteil)	84 - 90
Milch	31.000 Milch (D2013)	k. A.	
Caseine		25,2	
Molke	373 / Molkepulver (D2012)	12	
(Bier)Hefe (getrocknet)	116 / 65 (Melasse) (D2013)	47,9	
Ackerbohne	60 (D2013)	25,2	
Algen	k. A.	45 - 55	
Hafer	628 (D2013)	12,6	
Kichererbse	120 (E1996)	22,7	
Linse	69 (E1996)	26,6	
Luzerne	k. A.	12,5 - 15,2	
B	Reis	470.000 (weltweit, 2012)	7,4
	Roggen	4.689 (D2013)	9,5
	Zuckerrübe	27.687 (D2012)	8 - 9
	Gartenbohnen	20.000 (weltweit, 2013)	21
	Hirse	90.900 (weltweit, 2015)	8 - 9
	Sonnenblumen	39.360 (weltweit, 2015)	9 - 40
	Griebmehl	k. A.	70
	Knochen-/Fleischmehl	379 (D2009)	43 - 61
	Amarant	k. A.	14
	Guarbohne	k. A.	55
C	Inca (Sacha) Inchi	k. A.	27
	Olive	2.200 (EU, Olivenöl)	6,2
	Quinoa	k. A.	14,8
	Chia	k. A.	15
	Federmehl	k. A.	80
	Insekten	k. A.	10 - 74
	Nageltiere	k. A.	k. A.
	Bakterien	k. A.	68
Quorn	k. A.	14,5	



Teilprojekt I: Direkter Protein-Nachweis über HPLC-MS/MS

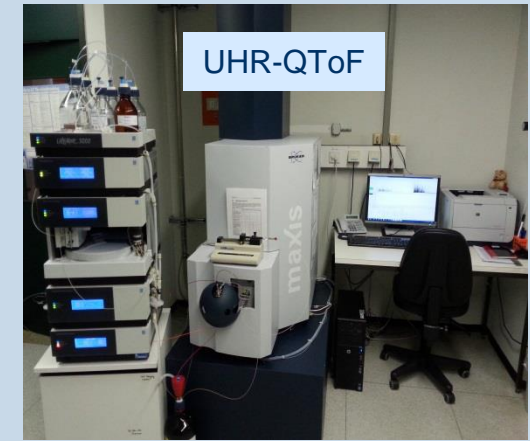
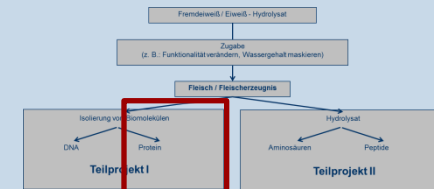
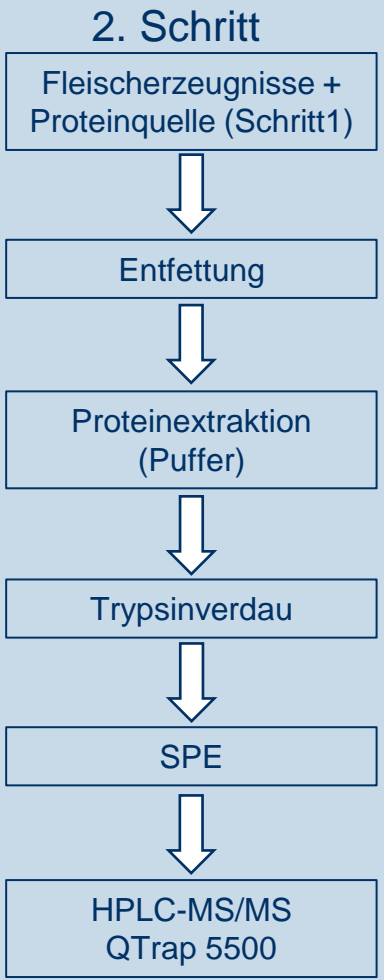


Teilprojekt I: Experimentelle Vorgehensweise

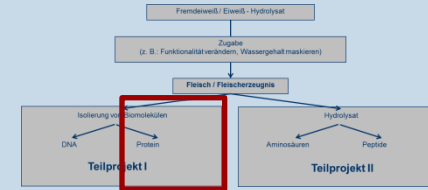



Optimierung:
- Puffer
- Temperatur
- Zeit

Optimierung:
- +/- DTT/IA
- Zeit

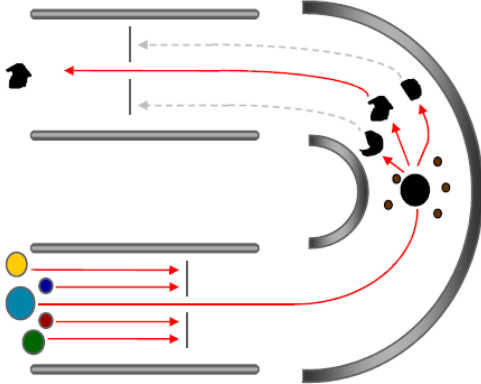


Teilprojekt I: Massenübergang beim QTrap-Massenspektrometer



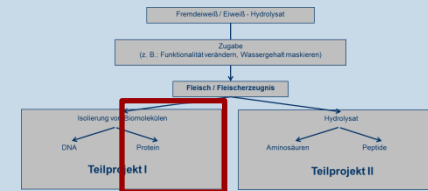


Multiple Reaction Monitoring (MRM)

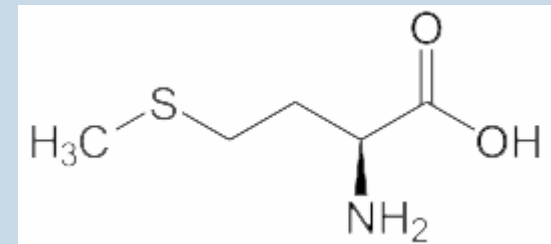
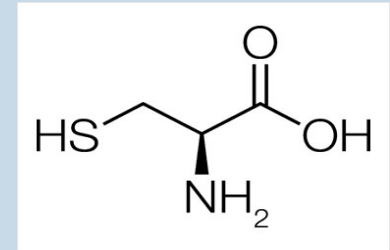


Q1: SIM
Q2: Fragmentierung
Q3: SIM

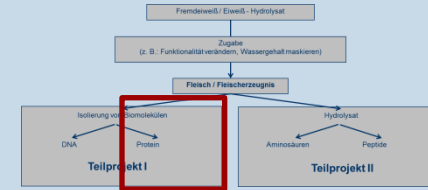
Teilprojekt I: Auswahl der Zielpeptide



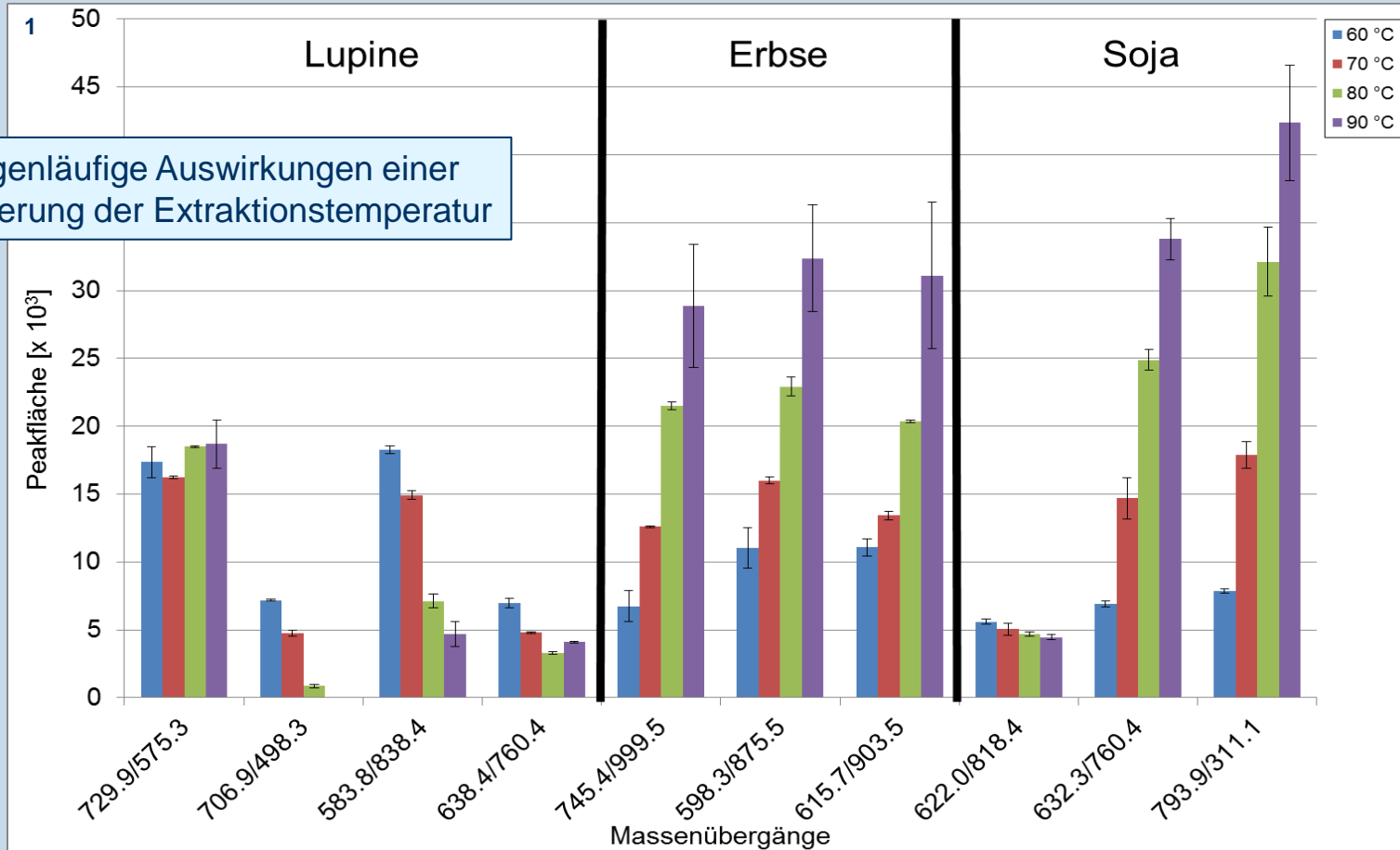
- Protein: in höherem Maße vorhanden; gut extrahierbar
- Größe der Peptide: ca. 7 bis 15 Aminosäuren
- C(ystein) und M(ethionin) nicht enthalten
- Einzigartigkeit
- mehrere Peptide je Fremdeiweiß (ca. drei)
- vorteilhaftes Fragmentierungsverhalten der Peptide
- mehrere Massenübergänge je Peptid (drei)



Teilprojekt I: Lupine, Erbse, Soja (Optimierung Extraktionstemperatur)

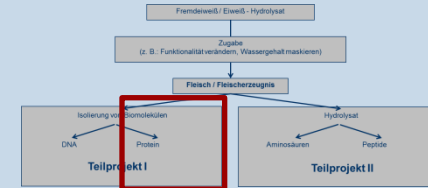


z.T. gegenläufige Auswirkungen einer Veränderung der Extraktionstemperatur

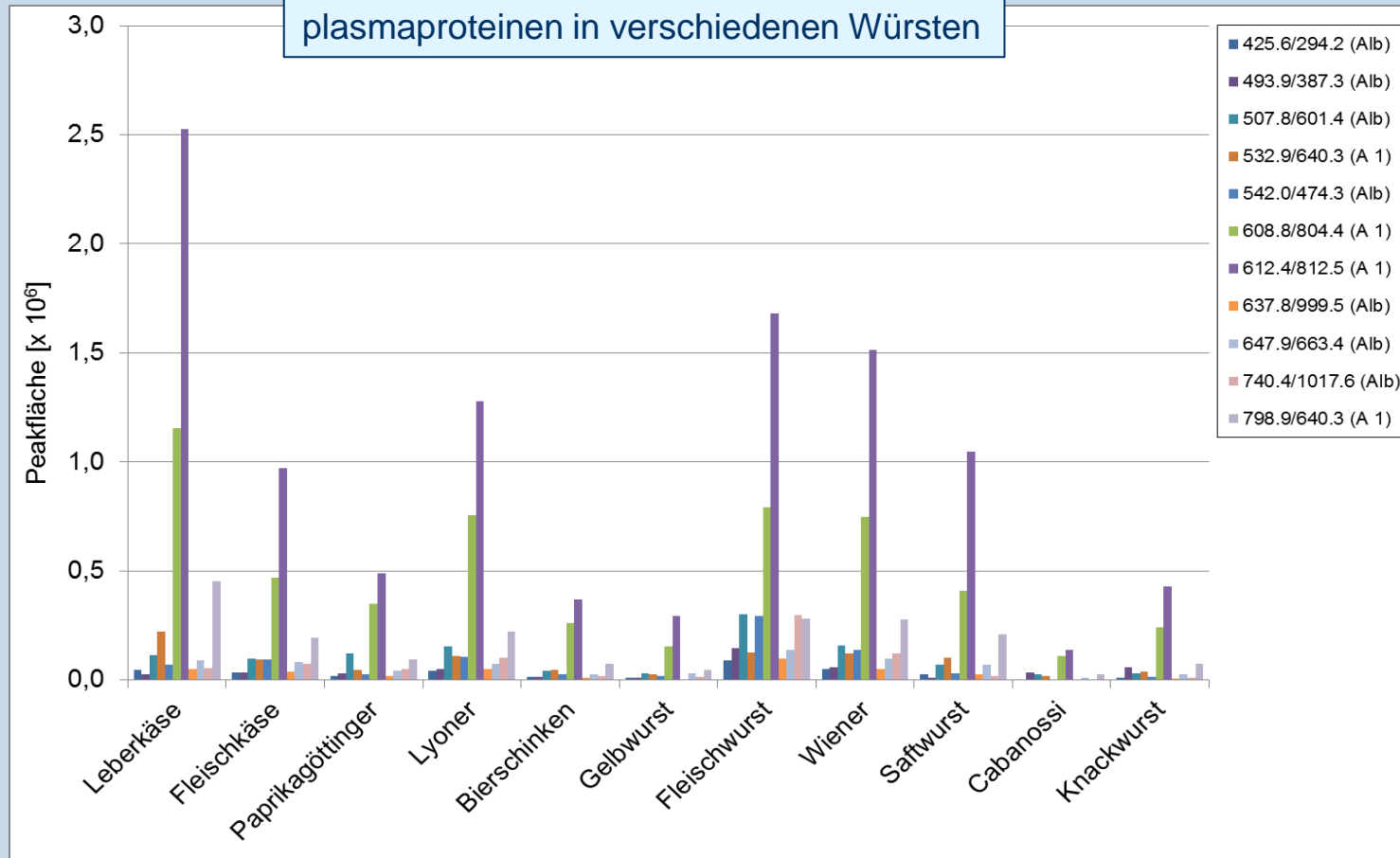


¹Hoffmann, B.; Münch S.; Schwägele, F.; Neusüß, C.; Jira, W. (2017) A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of lupine, pea, and soy proteins in meat products. Food Control, 71, 200-209.

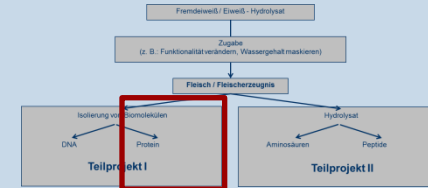
Teilprojekt I: Blutplasma Proteine (Schwein)



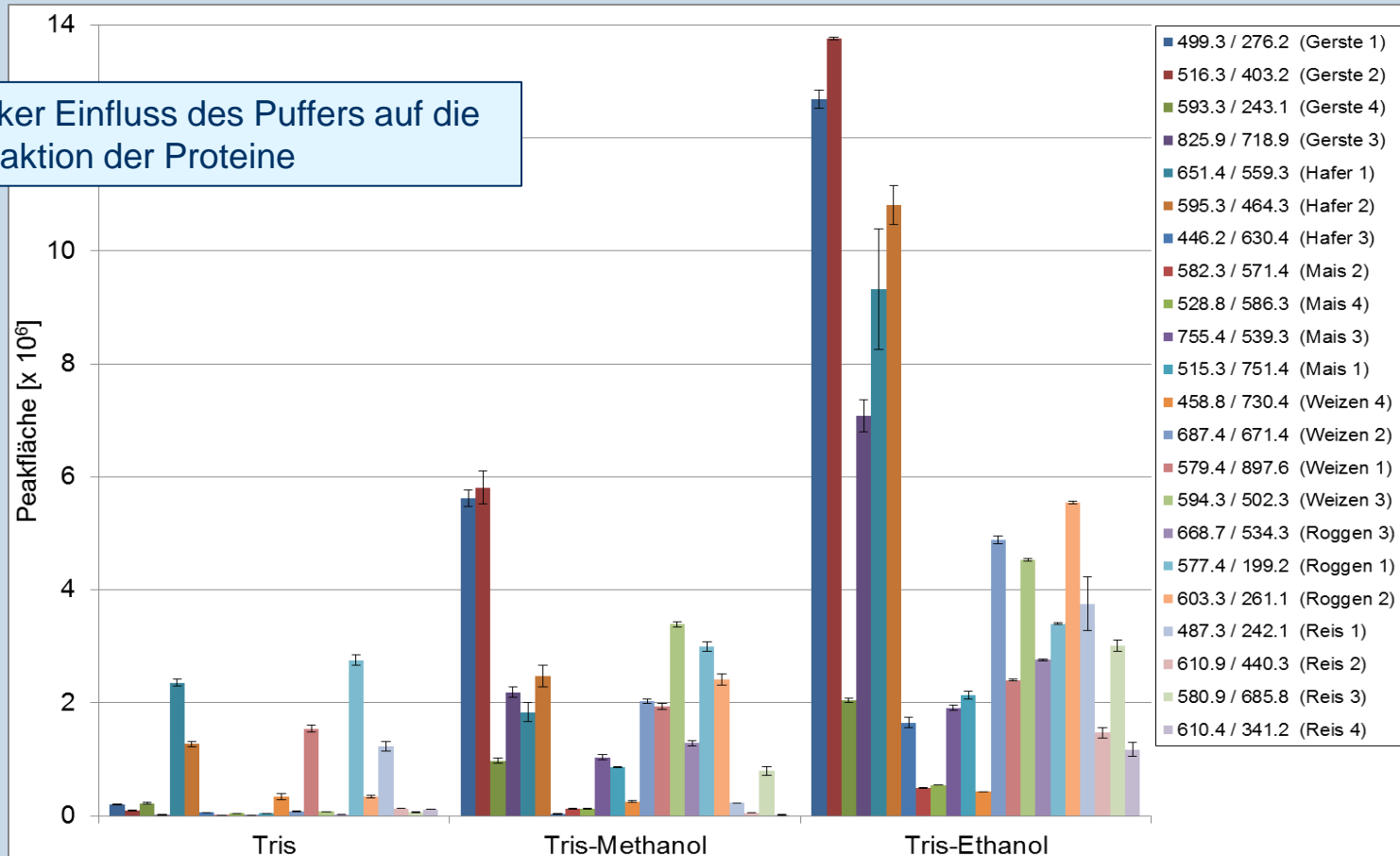
deutlich unterschiedliche Gehalte an Blutplasma Proteinen in verschiedenen Würsten



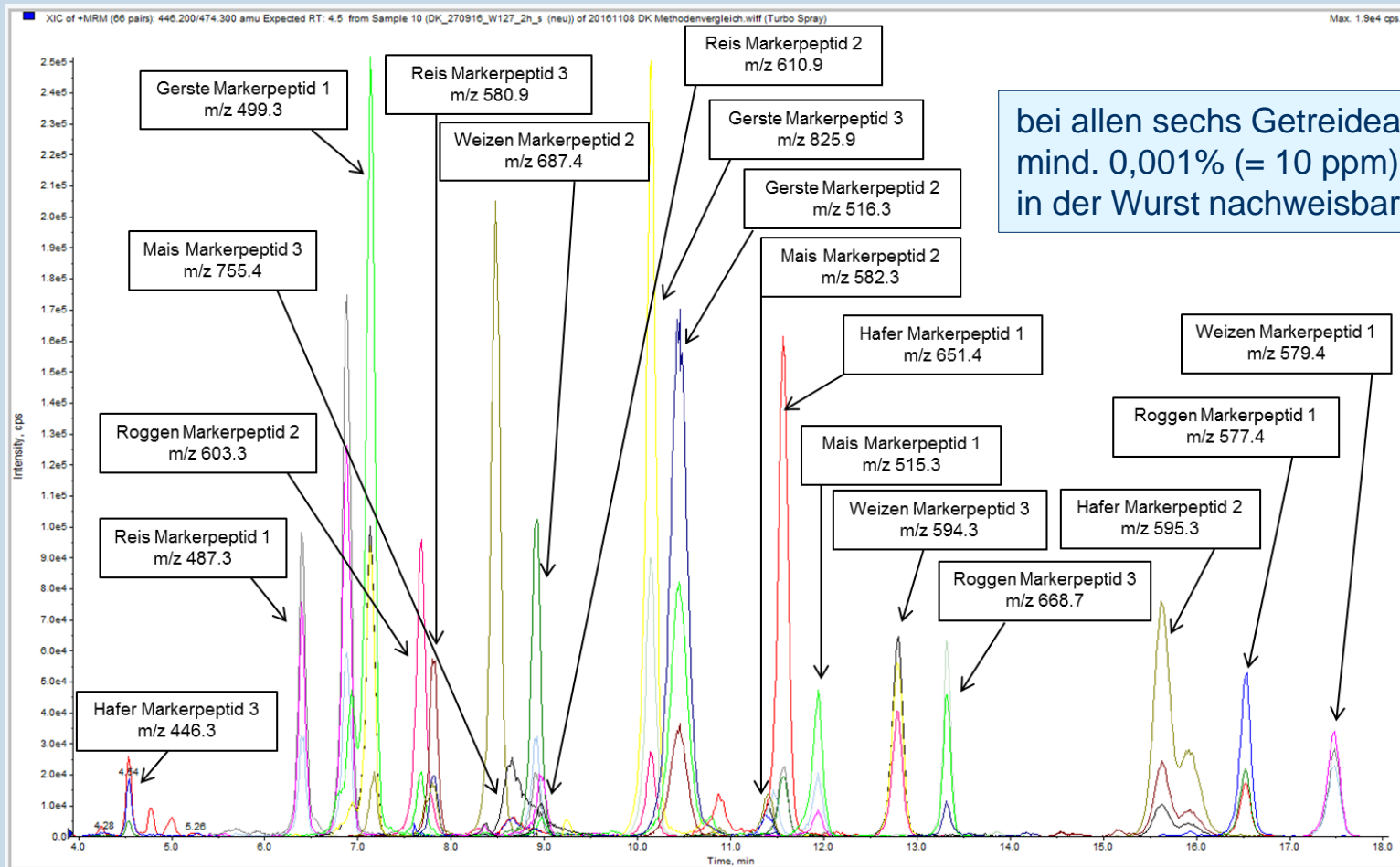
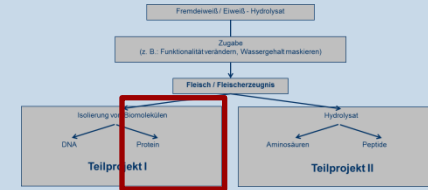
Teilprojekt I: Getreide (Optimierung Extraktion)



starker Einfluss des Puffers auf die Extraktion der Proteine



Teilprojekt I: Getreide (Chromatogramm Multimethode)



bei allen sechs Getreidearten
mind. 0,001% (= 10 ppm) Protein
in der Wurst nachweisbar

Food Control 71 (2017) 200–209



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont



A sensitive HPLC-MS/MS screening method for the simultaneous detection of lupine, pea, and soy proteins in meat products

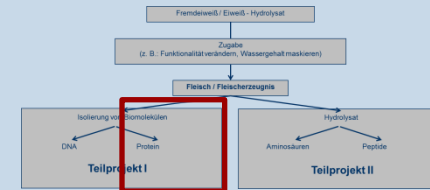
Björn Hoffmann^a, Siegfried Münch^a, Fredi Schwägele^a, Christian Neusüß^b,
Wolfgang Jira^{a,*}

^a Max Rubner-Institut (MRI), Federal Research Institute of Nutrition and Food, Department of Safety and Quality of Meat, 95326 Kulmbach, Germany

^b Aalen University, 73430 Aalen, Germany



Teilprojekt I: Bewertung HPLC-MS/MS

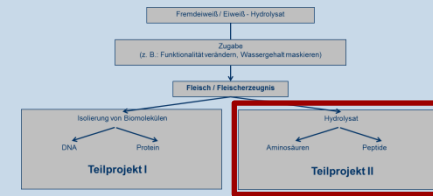


Nachteil:

- sehr hoher apparativer und fachlicher Aufwand

Vorteile:

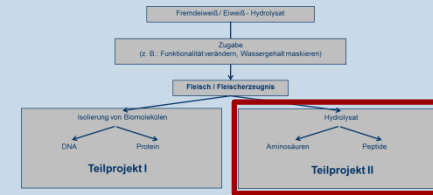
- mehrere Fremdeiweiße/Allergene simultan bestimmbar
- sehr hohe Spezifität erreichbar
- niedrige Nachweisgrenzen erzielbar
- prinzipiell nicht von der räumlichen Struktur des Proteins abhängig (prozessierte Lebensmittel)
- direkter Nachweis des Proteins
- grundsätzlich bei allen Proteinen einsetzbar (auch tierischen)



Teilprojekt II: Fremdeiweiß-Hydrolystate

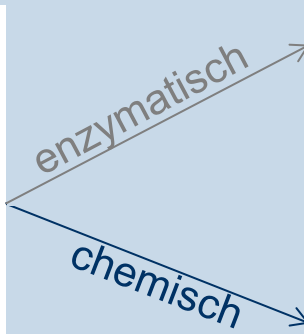


Teilprojekt II: Hydrolysat-Herstellung

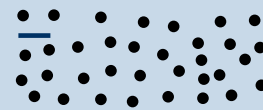


Kollagen (α -1)

Hydrolyse



kurz-, mittel und langkettige Peptide



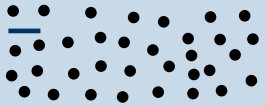
Aminosäuren (ggf. kurzkettige Peptide)



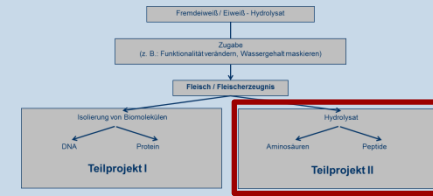
Frischfleisch

¹MODBASE, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. Ursula Pieper, Benjamin M. Webb, Guang Qiang Dong, Dina Schneidman-Duhovny, Hao Fan, Seung Joong Kim, Natalia Khuri, Yannick G. Spill, Patrick Weinkam, Michal Hammel, John A. Tainer, Michael Nilges, Andrej Sali Nucleic Acids Research 42, D336-46, 2014.

Teilprojekt II: Hydrolysat-Zugabe



ist kostengünstig und einfach herzustellen



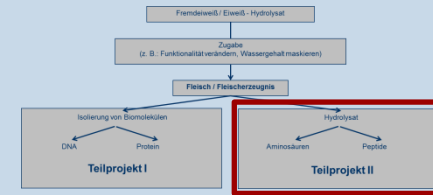
- Bestandteil: 20 proteinogenen Aminosäuren
- Gut in Wasser löslich
- Generell nicht schädlich bei menschlichem Verzehr¹
- „Ökonomisch sinnvolle“ Zugabe: Ca. 10 % Hydrolysatlösung bezogen auf die Gesamtmasse
- Übliche Nachweismethoden nicht anwendbar:
 - Histologie (Salzgehalt entscheidend)
 - Vollanalyse (Feder-Zahl unverändert)
 - Einstichuntersuchungen (Einstiche verschwinden)
 - DNA (Zersetzt)

¹Schaafsma G. (2009) Safety of protein hydrolysates, fractions thereof and bioactive peptides in human nutrition. European Journal of Clinical Nutrition, 63, 1161-1168.

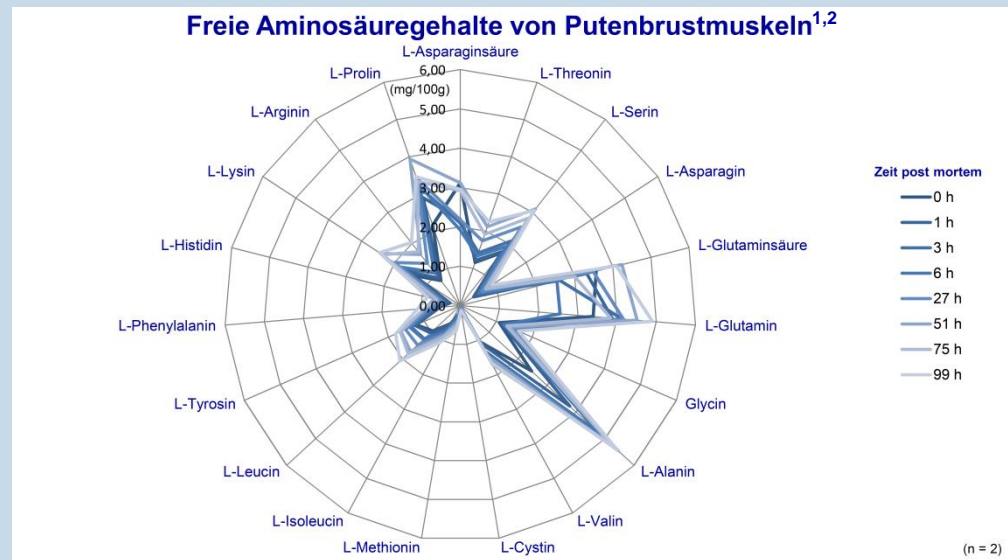
Teilprojekt II: Nachweismethode

- Chromatographisch:

Gehalte der freien Aminosäuren

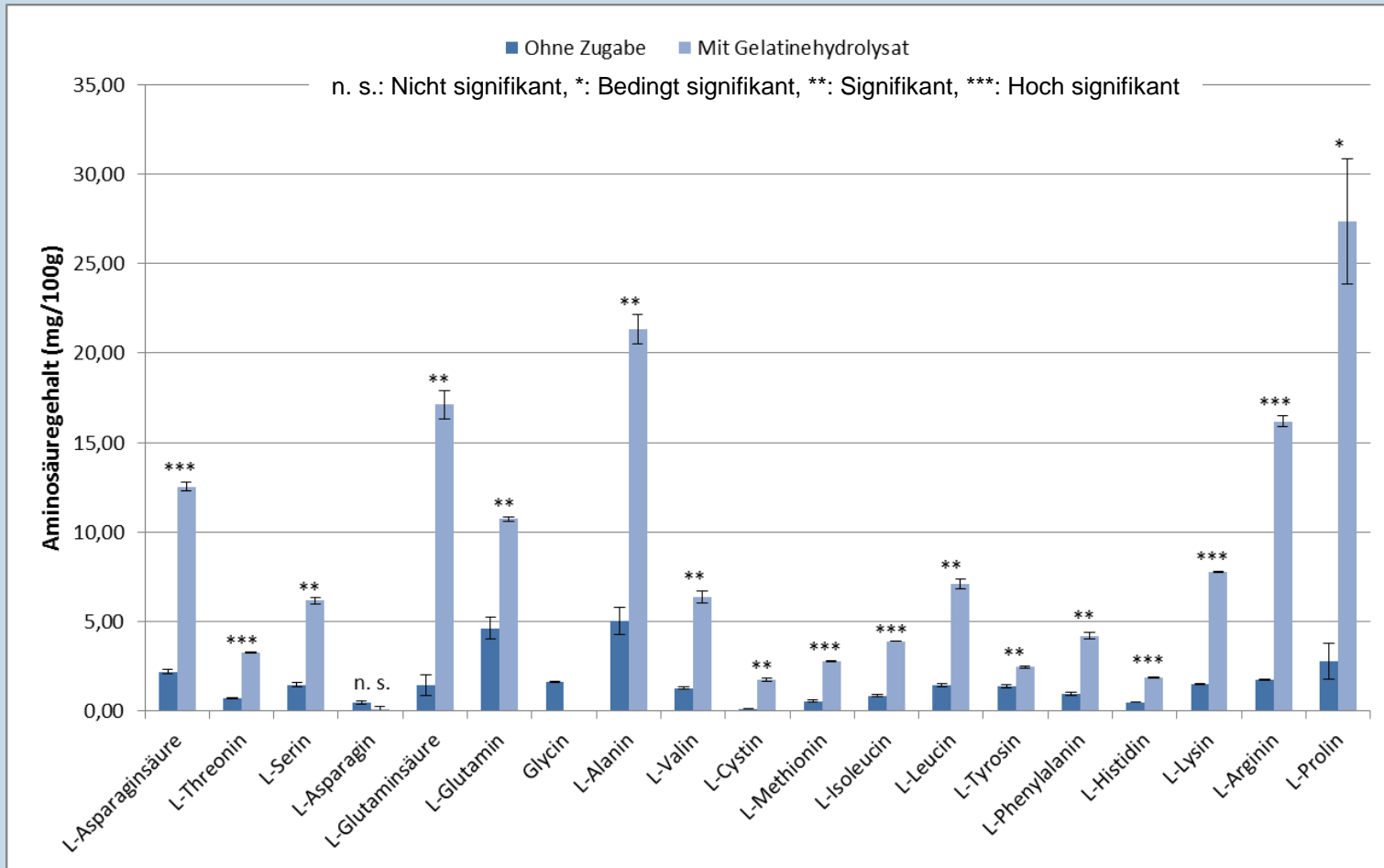
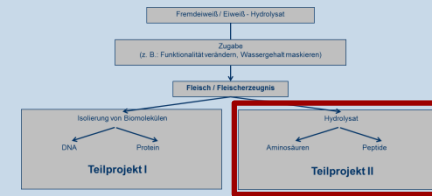


- Paralleler Nachweis aller 20 proteinogenen Aminosäuren
- Veränderungen durch Zugaben müssen über den natürlichen Schwankungen (z. B. Lagerung) liegen:



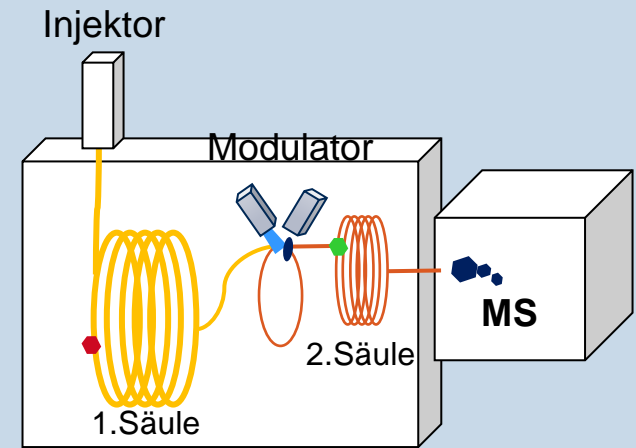
¹Kranz, B., Andrée, S., Brüggemann, D. A. (2016) Amino acid profile of turkey hens for the detection of meat fraud: A feasibility study. 62nd International Congress of Meat Science and Technology (62nd ICoMST) / ²Kranz, B., Andrée, S., Brüggemann, D. A. (2017) Amino acid profile of turkey hens for the detection of meat fraud with amino acid solutions. 68. Arbeitstagung des Regionalverbandes Bayern der Lebensmittelchemischen Gesellschaft

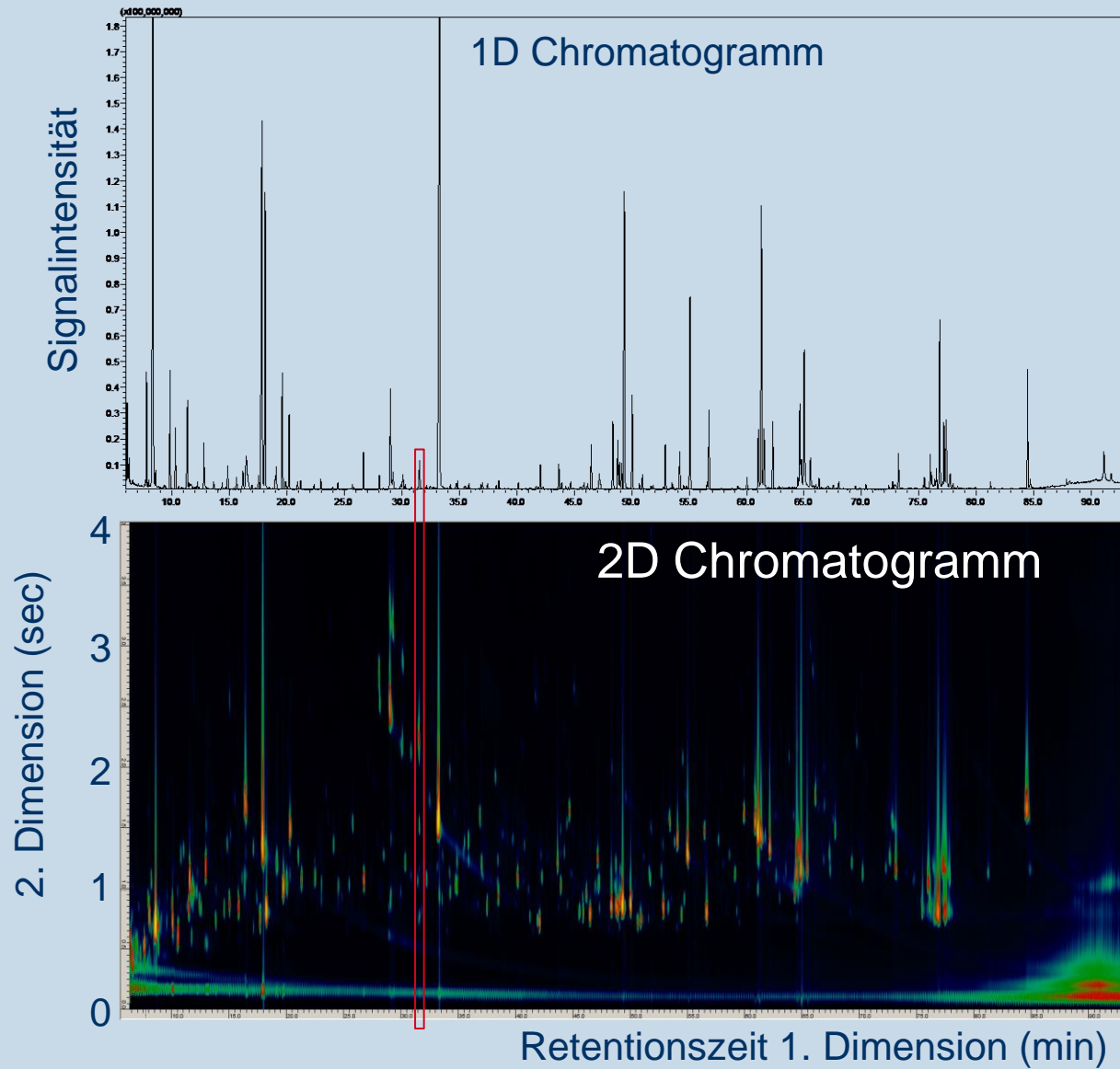
Teilprojekt II: Ergebnis



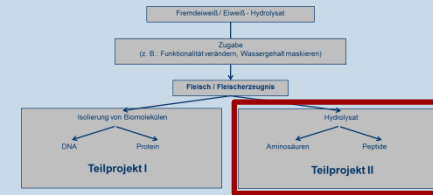
MRI: 2-Dimensionale GC-MS Analytik

- Kombination von 2 Säulen unterschiedler Polarität
 - ➡ 1. Dimension: Siedepunkt
 - ➡ 2. Dimension: Polarität
- bessere Trennung komplexer Proben
 - ➡ genauere Quantifizierung
 - ➡ bessere Identifizierung



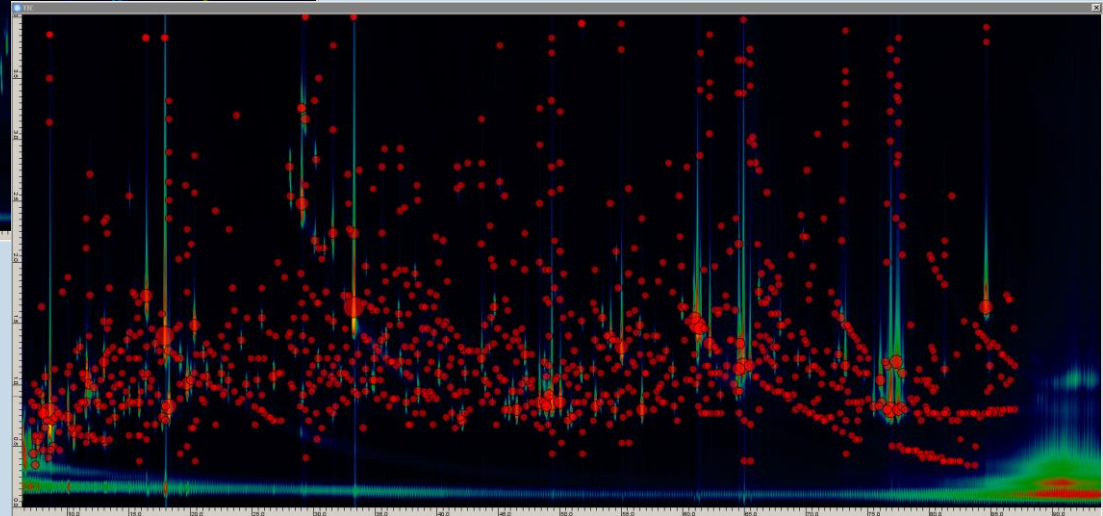
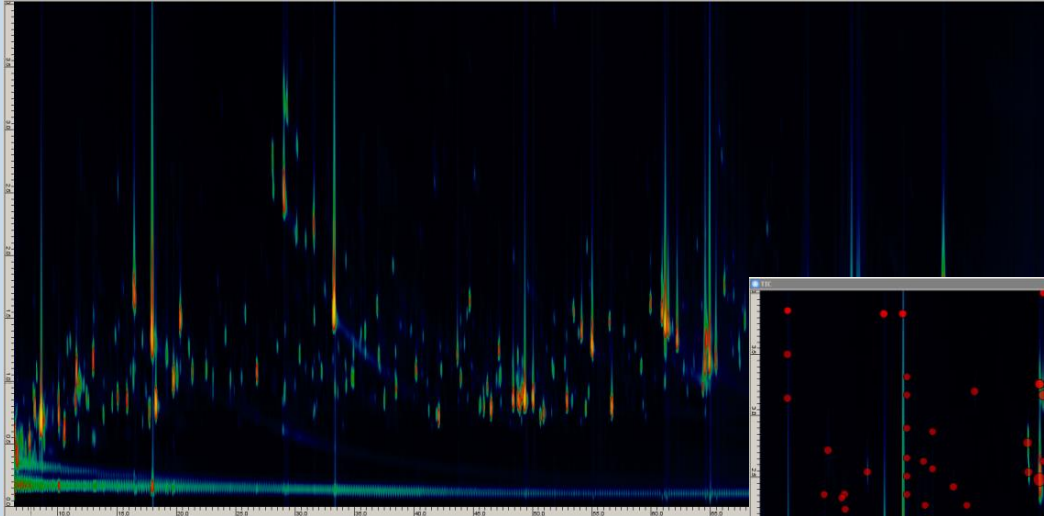






Teilprojekt II: Fazit

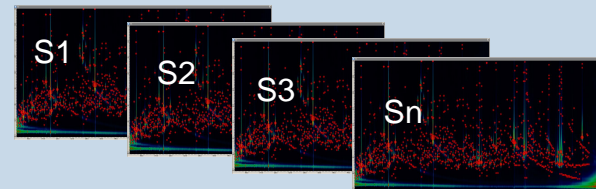


- Nachweis verschiedener Hydrolysat-Zugabe zu Putenfleisch ist etabliert (Modellsystem)
- Erstellung von Datensätzen der freien Aminosäuregehalte wird durchgeführt
- Fraktionierte Probenaufarbeitung (Aminosäuren / Peptide / Proteine) wird durchgeführt
- Nachweismethode für Peptide wird durchgeführt

Datenanalyse – „Finde die Nadel im Heuhaufen“

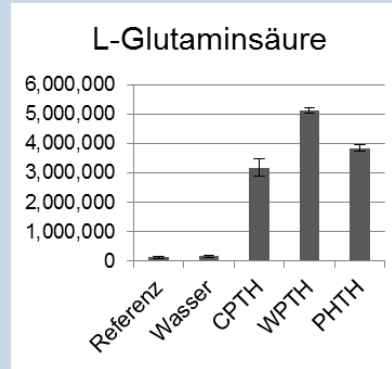
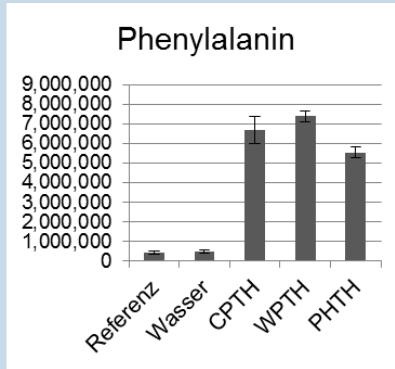
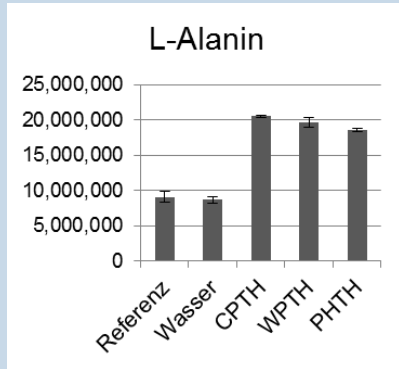


ID\Sample	 1	 2	 3	 n
n	Wert
n+1
n+2
n+x

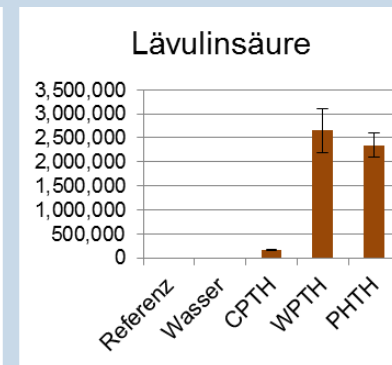
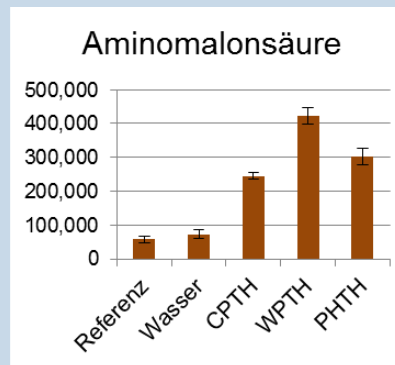
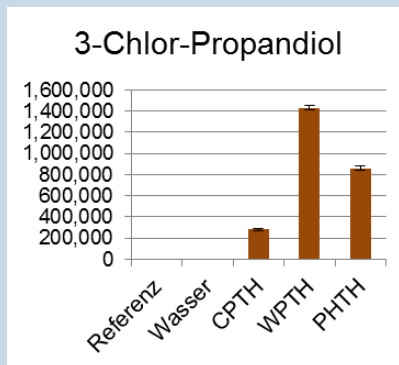


Beispiel: Zugabe von Proteinhydrolysaten zu Putenbrustfleisch

➤ Hydrolysate verschiedener Quellen (Casein, Weizengluten, Total-Pflanzenprotein)



Gezielte Analyse:
Aminosäure-Profile



Ungerichteter Ansatz:
Detektion von
Begleitsubstanzen

