

Super-sensitiver Nachweis von Schweine-DNA für Halal-Lebensmittel



Unsere Autorin: Dipl.-Oecotroph. **Erika Lorenzen**, Product-Management, Marketing & Sales CONGEN Biotechnologie GmbH, Headquarter Haus 55, Robert-Roessle-Str. 10, 13125 Berlin, Tel: +49 (0)30 9489 3517, Fax: +49 (0)30 9489 3510, Email: e.lorenzen@congen.de, Web: www.congen.de

In der heutigen globalisierten Welt steigen die Qualitätsansprüche an Lebensmittel. Die Anzahl der Personen, die aus ethischen oder religiösen Gründen eine spezielle Diät zu sich nehmen, ist steigend. In den Supermarkt-Regalen finden sich vermehrt Lebensmittel die zum Beispiel als „geeignet für Veganer“ deklariert werden. Seit einigen Jahren findet man auf einigen Lebensmittelverpackungen das Symbol Halal. Mit Halal werden Lebensmittel bezeichnet, die für Muslime zum Verzehr erlaubt sind. 2015 lag die Anzahl der Muslime in Deutschland bei 4,7 Mio^[1]. Bei einer Gesamteinwohnerzahl von 82 Mio ist dies ein Anteil von 5,7 % mit steigender Tendenz.

Was bedeutet Halal genau?

Das Deutsche Institut für Gütesicherung und Kennzeichnung e.V. (RAL) hat nach Befragung verschiedener Fach- und Verkehrskreise folgende Definition für den Begriff Halal festgelegt^[2]:

„Im Zusammenhang mit Lebensmitteln bedeutet Halal („das Zulässige, das Erlaubte, das Gestattete“), dass im Produkt

- keine vom Schwein stammenden Bestandteile wie Gelatine, Emulgatoren, Aromastoffe oder Farbstoffe aus Schweinebestandteilen verarbeitet oder verunreinigt bzw. unzureichend verpackt zusammen transportiert oder gelagert werden,

- kein berauschender Alkohol und Blut (ausgenommen im Fleisch gebundenes Restblut) enthalten ist,
- nur reine Pflanzenfresser bzw. Wiederkäuer (wie Schafe, Rinder, Geflügel, etc. und Meerestiere - ausgenommen Fleischfresser und schuppenlose Tiere) verwendet werden.“

Aus Pflanzen gewonnene Lebensmittel sind grundsätzlich „halal“, ausgenommen sind berauschende und toxische Produkte.

Beim Halal-Schlachten müssen die Tiere (ausgenommen Meerestiere) mittels Entblutungsschnitt vor Eintritt des Todes geschlachtet worden sein. Die Schlachtung erfolgt durch ein scharfes Schlachtinstrument mit einem schnellen Schnitt durch die Speiseröhre, Luftröhre und Halsschlagader des Tieres durch einen dafür ausgebildeten Schlachter muslimischen Glaubens. Zum Zeitpunkt der Schlachtung muss das Tier noch leben.

Die nationalen Tierschutzbestimmungen insbesondere für Transport, Haltung und Schlachtung müssen eingehalten werden. So ist beispielsweise in Deutschland eine betäubungslose Schlachtung gesetzlich verboten. Aus religiösen Gründen können jedoch Ausnahmegenehmigungen erteilt werden.

Das Gegenteil von „halal“ ist „haram“. „Haram“ steht für verboten, unerlaubt, unverletzlich, heilig. Typische Haram-Lebensmittel sind beispielsweise mit Schwei-

nefleisch gefüllte Tortellini, Zwiebelkuchen mit Speck, Pralinen mit alkoholhaltiger Füllung, Fruchtgummis mit Schweinegelatine und Blutwurst. Die Unterscheidung von „halal“ und „haram“ ist in islamischen Rechtsquellen, im Koran und in der Sunna (Lebensweise) des Propheten Muhammad beschrieben.

Einige Stellen aus dem Koran lassen sich zitieren. In Sure 5, Vers 88 findet sich folgende Aussage: „Und esset von dem, was Gott euch an Erlaubtem und Gutem (rein, genießbar, akzeptabel, bekömmlich) als Lebensunterhalt beschert hat. Und enthaltet euch der Nichtbeachtung Gottes, gegenüber Dem ihr Gläubige seid“ (5.88)

In Sure 2 findet sich eine präzisere Darstellung eines Verbotes: „O die ihr glaubt, esst von den guten Dingen, die Wir euch als Lebensunterhalt beschert haben, und dankt Gott, wenn Er es ist, Den ihr anbetet.“(2.172)

„Verboten hat er euch nur Verendetes, Blut, Fleisch von Schweinen und das, worüber irgendein anderer (Name) als Gott geschworen wurde. Und wen die Not dazu zwingt ohne Verlangen oder Überschreitung des Maßes, auf dem ruht keine Sünde. Gewiss ist Gott vergebend, barmherzig.“ (2.173)

Eine genaue Beschreibung, was als „gut“ erachtet wird, findet sich in den Versen nicht und unterliegt daher der Interpretation von islamischen Rechtsgelehrten. Die Auslegung der religiösen Schriften ist un-



Axel Semrau®

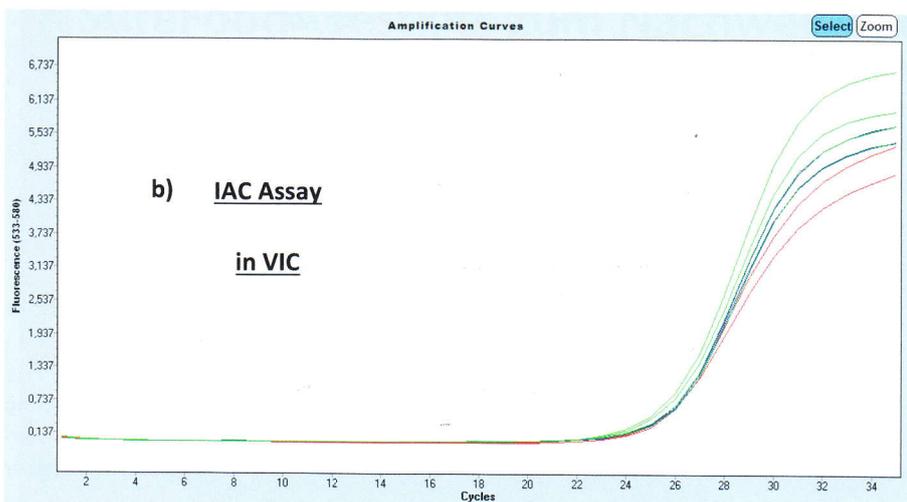
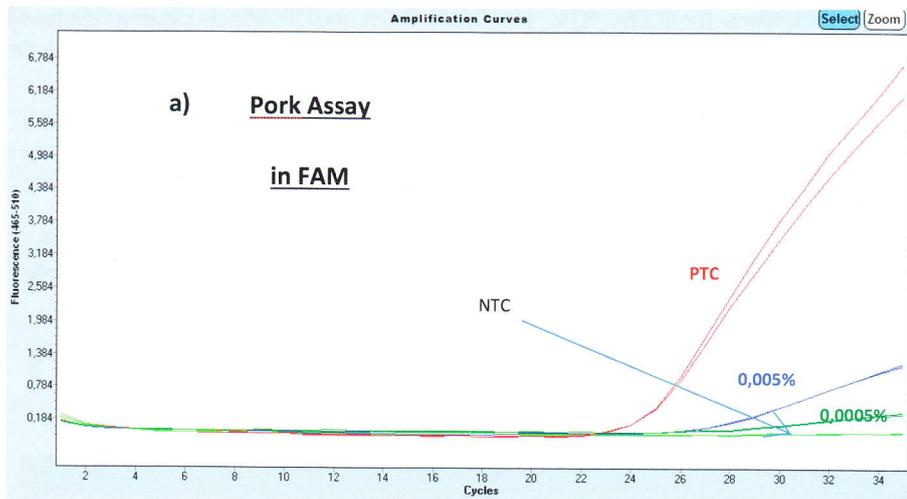


Abbildung. 1: Roche LightCycler® 480 II real-time PCR mit SureFood® ANIMAL ID Pork SENS PLUS Kit

- a) Zeigt die Amplifikationskurven für Schwein- positive Proben inklusive einer Negativ-Kontrolle (NTC) und einer Positiv-Kontrolle (PTC) im FAM Kanal.
- b) Zeigt die interne Amplifikationskontrolle im VIC Kanal.

terschiedlich und kann zu abweichenden Halal-Standards führen. Derzeit gibt es zahlreiche Zertifizierer mit unterschiedlichen Anforderungen. Ein geschütztes Siegel für die „halal“-Kennzeichnung gibt es derzeit in Europa nicht. Dennoch bietet aufgrund unzureichender Kennzeichnung ein Halal-Siegel eine wichtige Entscheidungshilfe bei der Auswahl von Lebensmitteln. International wird der Markt für Halal-Lebensmittel auf etwa 350 Milliarden Euro geschätzt, jeder fünfte Mensch auf der Erde ist Muslim. Neben der gesetzlichen Grundlage für eine einheitliche Bewertung sind hoch empfindliche Analysemethoden für den Nachweis von Schwein unerlässlich.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine geeignete Methode um Produktverfälschungen in Fleischwaren zu analysieren. Bei der PCR wird unter Einwirkung eines thermostabilen Enzyms (DNA-Polymerase)

und Verwendung geeigneter Primer ein spezifischer DNA-Abschnitt vervielfältigt. Nach initialer Denaturierung des DNA-Doppelstrangs erfolgt das Anlagern der Oligonukleotid-Primer an den Einzelstrang (das sogenannte Annealing). Die angelagerten Primer geben das „Start-Signal“ für die DNA-Polymerase zur Amplifikation des DNA-Abschnitts.

Bei der real-time PCR kann über Fluoreszenzfarbstoffe die Zunahme von PCR-Produkten in Echtzeit verfolgt werden. Die real-time PCR ist eine der wichtigsten molekularbiologischen Methoden und kann für sehr unterschiedliche Fragestellungen eingesetzt werden. Sie bietet durch den direkten proportionalen Zusammenhang zwischen der Zunahme der Fluoreszenz und der Zunahme der PCR-Produkte in der exponentiellen Phase auch die Möglichkeit zur Quantifizierung.



CHRONECT®
LC-GC

Workstation
MOSH/MOAH

- Applikationserfahrung seit 2011
- Weltweit über 80 installierte Systeme
- Betreuung durch erfahrene MOSH/MOAH-Experten

info@axel-semrau.de

Anzeige

Neben der Verwendung einfacher interkalierender Fluoreszenz-Farbstoffe kann der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ausgenutzt werden. Bei TaqMan-Sonden verwendet man Sonden, die an einem Ende mit einem Quencher-Farbstoff und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenz-Farbstoff (z.B. TAMRA und FAM) markiert wurden. Die Taq-Polymerase hat zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3' Exonuklease-Aktivität. Dadurch werden während der Amplifikation Quencher und Fluorophor voneinander getrennt und Fluoreszenz freigesetzt. Diese Methode hat den Vorteil einer sehr hohen Spezifität.

Durch die Verwendung eines Multi-copy-Zielgens, welches mehrfach in der Zelle vorhanden ist, können hoch empfindliche Nachweissysteme entwickelt werden.

Der SureFood® ANIMAL ID Pork SENS PLUS ist ein Duplex-PCR System basierend auf einem multi-copy Zielgen (cyt b). Zusätzlich ist der Test mit einer internen Amplifikationskontrolle ausgestattet. Das Nachweissystem wurde in einer umfangreichen in-house Validierung auf Robustheit, Spezifität, Richtigkeit und Stabilität getestet. Die Nachweisgrenze liegt bei $\leq 0,0005$ % bei Verwendung des SureFood® PREP Basic Kits zur DNA-Extraktion.

Zusätzlich wurden in einer externen Studie^[3] 42 prozessierte typische türkische Fleischprodukte wie „Soudjouk“ (Hackfleisch mit Gewürzen), Salami, Würstchen, Fleischklopse, geräuchertes und gewürztes Rindfleisch und Döner Kebap mit SureFood® ANIMAL ID Pork SENS PLUS getestet. Insgesamt 36 Proben wurden negativ auf Schwein getestet ($< 0,1$ %); 4 Proben waren korrekt etikettiert, dass Schwein enthalten ist.

Weiterhin wurden zerkleinerte Fleischprodukte mit verschiedenen Gehalten an Schwein auf der Basis von Rindfleisch, Hühnchen- und Putenfleisch hergestellt. Diese Fleischprodukte wurden im rohen Zustand und nach 20-minütigem Kochen bei 200 °C untersucht. Sowohl in rohen als auch in gekochten Fleischproben konnte mit der SureFood® ANIMAL ID Pork SENS PLUS real-time PCR Schweine-DNA bis zu einem Gehalt $< 0,1$ % zuverlässig detektiert werden.

Für diese Teilstudie wurden frische Fleischproben von Schwein, Rind, Hühnchen und Pute auf dem Markt und bei lokalen Schlachthöfen gekauft. Jeweils 300 g der Fleischprobe wurden zerkleinert und homogenisiert und abschließend unter Verwendung von Stößel und Mörser zu einer feinen, homogenen Paste gemischt. Verschiedene Mengen feiner Schweinefleischpaste wurden zu unterschiedlichen Mengen

Tabelle 1: Ct Werte für 100%, 10%, 1%, 0,5%, 0,1% und 0% Mischungen von Schwein mit Rind, Hühnchen und Pute. Die Ct-Werte wurden aus Doppelbestimmungen jeder DNA-Extraktion gewonnen.

Fleischtyp	Anteil an Schwein (%)	Ct Wert	RSD (%)
Rind	0	nd	nd
Hühnchen	0	nd	nd
Pute	0	nd	nd
Schwein	100	15,5	1,2
Rind	10	18,58	1,1
Hühnchen	10	17,87	1,0
Pute	10	17,63	2,2
Rind	1	21,47	1,5
Hühnchen	1	21,7	1,1
Pute	1	22,59	1,8
Rind	0,5	22,45	1,3
Hühnchen	0,5	23,19	1,1
Pute	0,5	23,42	1,4
Rind	0,1	23,82	2,4
Hühnchen	0,1	24,67	4,1
Pute	0,1	24,44	3,6

Ct= cycle threshold; nd = nicht detektierbar; RSD = relative standard deviation (relative Standardabweichung)

von Rind, Hühnchen und Putenpaste gemischt um 1 bis 100 g Mischungen mit 10; 1; 0,5 und 0,1 % (w/w) Schwein zu erhalten.

Von den rohen und gekochten Fleischprodukten wurde die DNA aus 50 mg Probe unter Verwendung des SureFood® PREP Basic extrahiert. Die Lyse erfolgte unter Zugabe von Proteinase K bei 65 °C für 30 Minuten im Thermomixer. Anschließend wurde jede Probe nach Kit-Manual bearbeitet. Dabei wurde die DNA an einen Spin-Filter gebunden und in mehreren Waschschritten aufgereinigt. Zuletzt wurden 100 µl DNA eluiert. Die Extrakte wurden anschließend direkt in die PCR eingesetzt.

Tabelle 1 zeigt die real-time PCR Ergebnisse der mit Schweinefleisch gespickten Fleischproben.

Tabelle 1: Ct Werte für 100%, 10 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % und 0 % Mischungen von Schwein mit Rind, Hühnchen und Pute. Die Ct-Werte wurden aus Doppelbestimmungen jeder DNA-Extraktion gewonnen.

Tabelle 1 zeigt die Ct Werte, die mit einer auf einem multi-copy Zielgen (cyt b) basierten real-time PCR unter Verwendung Schweinspezifischer Primer gemessen wurden. 100 % Schweinefleisch gab einen Ct Wert von 15,5. Homogene Proben von Rind, Hühnchen und Pute mit 10; 1,0; 0,5 und 0,1 % Schwein zeigten erwartungsgemäß steigende Ct Werte von 18 (10 % Schwein) bis 24 (0,1 %

Schwein). Die relative Standardabweichung lag bei < 5 %. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass ein Anteil von 0,1 % Schwein sicher nachweisbar ist und die Nachweisgrenze der Methode noch deutlich niedriger liegt.

In unserem Servicelabor wurden viele verschiedene Matrices mit SureFood® ANIMAL ID Pork SENS PLUS untersucht. Dabei wurden auch einige Produkte, die als „halal“ ausgelobt wurden, positiv auf Schwein getestet.

Für Halal-Lebensmittel gibt es derzeit keinen regulatorischen Schwellenwert. Dies ist für die betroffenen Verbraucher sehr unbefriedigend. Eine Festlegung eines einheitlichen Standards für die Halal-Kennzeichnung ist anzustreben, um für den Verbraucher Sicherheit bei der Kaufentscheidung zu schaffen. Empfindliche Analysemethoden wie z.B. real-time PCR sind bereits verfügbar, um einen sehr sensitiven Nachweis von Schwein zu ermöglichen.

Referenzen:

- ^[1] Statistisches Bundesamt 31.12.2015
- ^[2] RAL, Siegburger Straße 39, 53757 Sankt Augustin, E-Mail: RAL.-Institut@RAL.de
- ^[3] Pelin Ulca, Handan Balta, Ilknur Cagin, Hamide Z. Senyuva (2013). Meat species identification and Halal authentication using PCR analysis of raw and cooked traditional Turkish foods. *Meat Science* 94, 280-284