

FISCH ALS LEBENSMITTEL

Fischartbestimmung von Caviar durch Protein- und DNA-Analyse

Hartmut Rehbein Institut für Biochemie

Deutscher Caviar, aus dem Rogen von Seehase oder Lodde hergestellt, liefert bei der Eiweißelektrophorese art-spezifische Proteilmuster.

Caviar aus Lachs- und Forellenrogen läßt sich mit den gleichen Methoden differenzieren.

Die Unterscheidung verschiedener Sorten von Störcaviar (Beluga, Osietra, Sevruga) ist mit der isoelektrischen Fokussierung (IEF) der Proteine möglich, nicht aber mit der SDS-PAGE.

Neue, PCR-gestützte Methoden der DNA-Analyse befinden sich in der Entwicklung mit dem Ziel, sichere Aussagen zur Herkunft der Rohware von Caviar auch bei Einbeziehung weiterer Störarten in die Caviarherstellung treffen zu können.

Caviar, ein Salzfischerzeugnis, wird aus dem Rogen von Stören, Lachsen, Forellen und Seehasen sowie anderer Fischarten hergestellt. Außerdem sind Verfahren zur Herstellung synthetischen Caviars entwickelt worden (Karmas 1982).

Aufgrund einer Reihe politischer, wirtschaftlicher und ökologischer Veränderungen ist kaum ein anderes Fischereierzeugnis inzwischen so umstritten wie Störcaviar. Die Verhältnisse auf dem Caviarmarkt werden als „chaotisch“ bezeichnet (Josupeit 1994) und es ist zu befürchten, daß Störcaviar aufgrund rigoroser Raubfänge in wenigen Jahren vom Markt verschwunden sein wird. Da die bisher in den Anrainerstaaten des Kaspischen Meeres zur Caviarproduktion genutzten Arten *Huso huso* (Beluga), *Acipenser stellatus* (Sevruga) und *A. gueldenstaedti* (Osietra) den Bedarf nicht mehr decken können, werden andere, auch geschützte, Störarten verarbeitet (DeSalle und Birstein 1996).

Zur Rettung bedrohter Fischarten, zur Erhaltung des Produktes „Störcaviar“ und zum Schutze von Verbrauchern, Händlern und Zollbehörden vor Täuschung und Übervorteilung ist es notwendig, zuverlässige Analysemethoden zur Identifizierung und Differenzierung von Caviarsorten zur Verfügung zu haben.

Im Folgenden wird dargestellt, wieweit sich Stör- und andere Caviarsorten durch Protein- und DNA-Analyse (DNA = Desoxiribonucleinsäure) unterscheiden lassen und wo noch methodische Verbesserungen erforderlich sind.

Untersuchung von Caviar durch Protein-Elektrophorese

Zur Bestimmung der Fischart in Erzeugnissen werden hauptsächlich folgende Methoden eingesetzt (Rehbein 1990):

(i) *Isoelektrische Fokussierung (IEF) in Polyacrylamidgelen*

Dazu werden die Proteine zunächst mit Wasser, ggf. auch mit harnstoffhaltigen Lösungen, aus dem Erzeugnis extrahiert. Anschließend trennt man die Proteine in einem elektrischen Feld gemäß ihrer Ladung auf und erhält nach Anfärbung artspezifische Muster. Abbildung 1 zeigt, daß sich Caviar aus Lodde (*Mallotus*

Fish species identification of caviar using protein- and DNA-analysis

Deutscher Caviar, made from roe of lumpfish or capelin, gives species specific patterns in protein electrophoresis.

The same techniques can be used to differentiate caviar from salmon and trout.

The differentiation of sturgeon caviar (beluga, osietra, sevruga) is possible by isoelectric focusing, but not by SDS-PAGE.

PCR-based methods of DNA-analysis for identification of the origin of sturgeon caviar are under development.

villosus) und Seehase (*Cyclopterus lumpus*) mit Hilfe der IEF gut unterscheiden lassen. Außerdem sind die Proteinmuster von unverarbeitetem Rogen und Caviar der jeweiligen Art nahezu identisch, so daß auch Rogen als Referenz für die Caviarbestimmung eingesetzt werden kann.

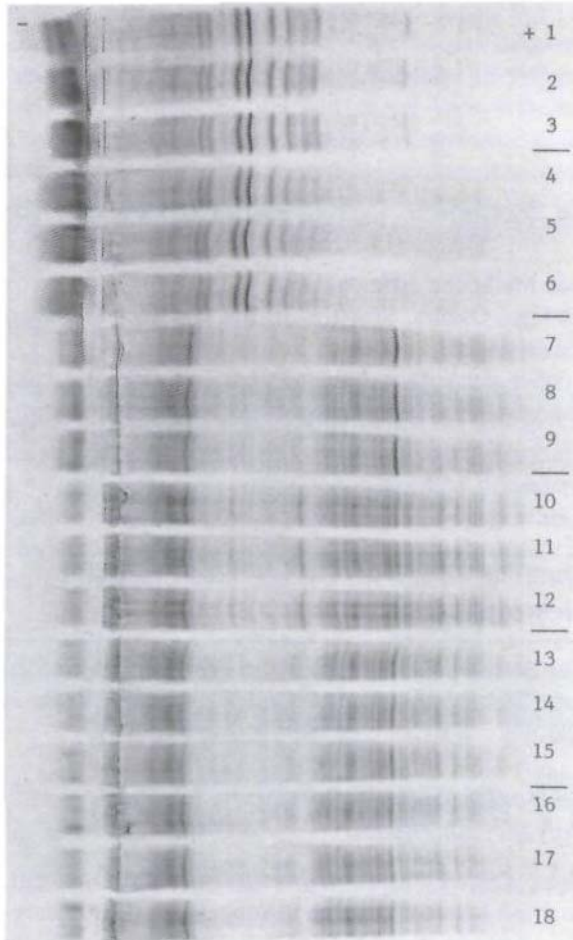


Abb. 1: Bestimmung der Fischart in Deutschem Caviar durch IEF. Rogen und Caviar von Caplin (= Lodde, *Mallotus villosus*) und Seehase (*Cyclopterus lumpus*) wurden zunächst zu Proteintrockenmassen verarbeitet (6). Anschließend wurden die Proteine in 8 M Harnstoff / 0,5 M 3-Mercapto-1,2-propandiol gelöst und durch IEF mit einem CleanGel (Pharmacia Biotech), das mit 8 M Harnstoff / 1,2 % Pharmalyt 2,5-5 / 2,4 % Pharmalyt 3-10 rehydratisiert wurde, aufgetrennt. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassiefarbstoff.

Untersuchte Proben: Bahn 1-3: Unbehandelter, tiefgefrorener Rogen aus Caplin; Bahn 4-6: Deutscher Caviar aus Caplinrogen; Bahn 7-9: Gesalzener Seehasenrogen; Bahn 10-12: Deutscher Caviar aus Seehasenrogen; Bahn 13-15: Deutscher Caviar aus Seehasenrogen, konserviert; Bahn 16-18: Deutscher Caviar aus Seehasenrogen, pasteurisiert.

Caviar aus Ketalachs und Forelle ergeben ebenfalls Muster, bei denen die Lage der Proteinbanden deutlich verschieden ist (Abbildung 2).

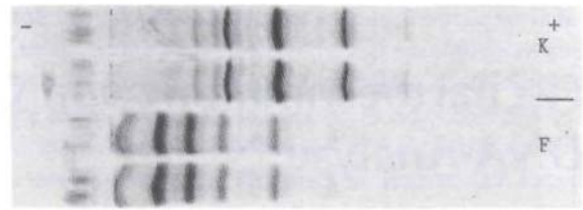


Abb. 2: Differenzierung von pasteurisiertem Keta (K)- und Forellen (F) - Caviar durch IEF mit harnstoffhaltigem CleanGel; gleiche IEF-Bedingungen wie für Abbildung 1 beschrieben.

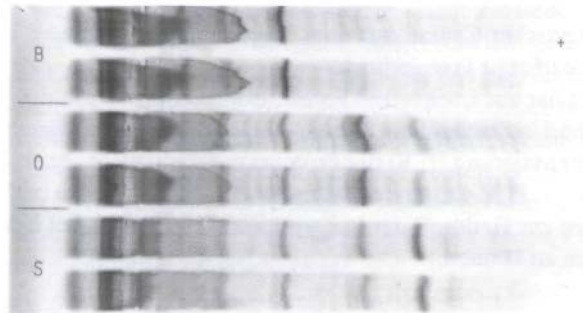


Abb. 3: Proteinmuster von Stör caviar. Beluga (B), Osietra (O) und Sevruga (S) wurden durch IEF mit einem CleanGel, das 8 M Harnstoff / 1,5 % Servalyt 4-6 / 1,5 % Servalyt 3-10 enthielt, untersucht.

Schwieriger ist die Differenzierung der Stör caviarsorten (Keyvanfar et al. 1988, Rehbein 1985, Chen et al. 1996). Die mit IEF erzeugten Proteinmuster sind sehr ähnlich für Beluga, Sevruga und Osietra und unterscheiden sich hauptsächlich in der Intensität, weniger in der Position der Banden (Abbildung 3), jedoch ist eine eindeutige Unterscheidung dieser drei Arten untereinander sowie vom Löffelstör-Caviar (*Polyodon spathula*) (Rehbein 1985) und einer Störart aus dem Golf von Mexiko (*Acipenser oxyrinchus desotoi*) (Chen et al. 1996) möglich. Allerdings wurden viele andere Störarten, die beispielsweise in China gefischt und verarbeitet werden (Sternin und Dore 1993), bisher nicht durch IEF analysiert.

(ii) Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist neben der IEF eine zweite häufig benutzte Elektrophoresemethode zur Auftrennung von Proteinen. Bei diesem Verfahren werden die Proteine zunächst mit Natriumdodecylsulfat (SDS, ein anionisches Detergenz) gelöst. Dabei nimmt jedes Protein eine bestimmte Menge SDS auf und erhält so eine negative Ladung. Bei der anschließenden Elektrophorese wandern alle Proteine zur Anode, dem positiven Pol, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit mit dem Molekulargewicht (d.h. mit der Größe) der Proteine abnimmt.

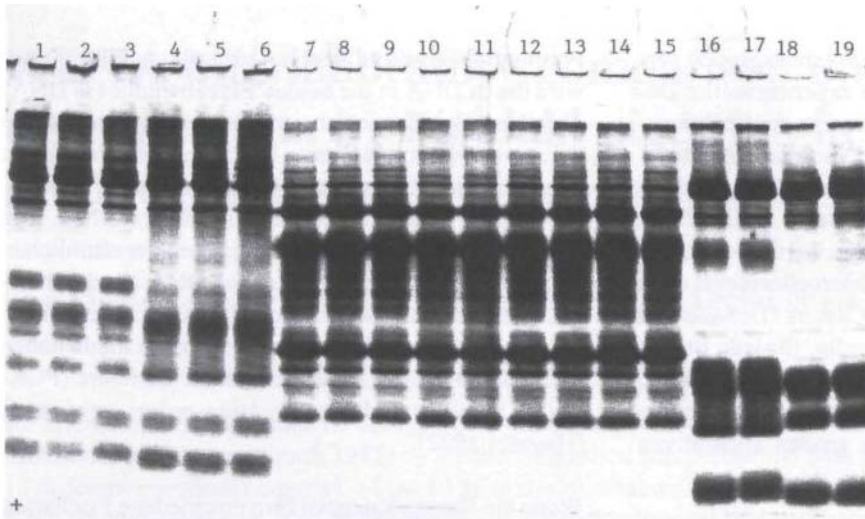


Abb. 4: Bestimmung der Fischart in Deutschem Caviar und Lachs- bzw. Forellencaviar durch SDS-PAGE. Die mit Hilfe von SDS gelösten Proteine wurden in einem 15 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit Silber angefärbt.

Untersuchte Proben: Bahn 1-3: Caplinrogen; Bahn 4-6: Deutscher Caviar aus Caplinrogen; Bahn 7-9: Seehasenrogen; Bahn 10-15: Deutscher Caviar aus Seehasenrogen, Bahn 10-11: Produkt A, Bahn 12-13: Produkt B, Bahn 14-15: Produkt C; Bahn 16-17: Ketacaviar; Bahn 18-19: Forellencaviar.

Proteinmuster (Abbildung 4). Dagegen konnten wir und andere (Chen 1996) zeigen, daß die Proteinmuster von Beluga, Sevruga und Osietra nahezu identisch sind, so daß die SDS-PAGE bei Störccaviar zur Differenzierung ungeeignet ist. Synthetisch hergestellte Caviarprodukte, sowie die als Ausgangsmaterial verwendbaren Proteine Casein, Ovalbumin, Collagen und Actomyosin aus Fischmuskel, lassen sich durch SDS-PAGE, wie auch durch IEF in harnstoffhaltigen Gelen, identifizieren (Abb.5).

Untersuchung von Caviar durch DNA-Analyse

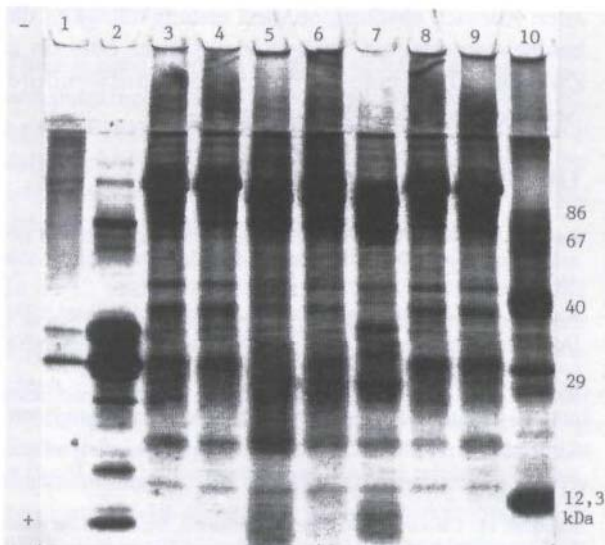


Abb. 5: Proteinmuster von Störccaviar, Casein und Collagen nach SDS-PAGE. Die Proben wurden in einem SDS-haltigen Puffer gelöst, in einem 15 %-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit Silber gefärbt.

Bahn 1: Collagen, wasserlöslich; Bahn 2: Casein; Bahn 3-9: Störccaviar (3: Sevruga, 4: Osietra, 5-7: Osietra oder Sevruga mit deutlichem Eiweißabbau, 8: Beluga, 9: Sevruga); Bahn 10: Markerproteine, deren Molekulargewicht (kDa) auf der rechten Seite angegeben ist.

In den letzten Jahren sind neue, aussagekräftige und zeitsparende molekularbiologische DNA-Analysenverfahren entwickelt worden, mit denen sich Unterschiede in der DNA verschiedener Arten, verschiedener Populationen einer Art und sogar verschiedener Individuen derselben Population bzw. Art nachweisen lassen (Carvalho und Pitcher 1995). Inzwischen beginnen diese Methoden Einzug in lebensmittelanalytische Labors zu halten (Meyer und Candrian 1996), da sie frühere Techniken der Identifizierung von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren ergänzen oder ihnen überlegen sind.

Grundlage vieler Techniken ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), mit der sich gezielt DNA-Abschnitte vervielfältigen lassen. Die PCR besitzt für die Lebensmittelanalytik mehrere wesentliche Vorteile gegenüber anderen Methoden:

- (i) Sie ist auch auf stark abgebaute DNA, so wie sie in Lebensmitteln häufig vorkommt, anwendbar. Es reicht aus, DNA-Abschnitte von 100 bis 1000 Basenpaaren (bp) Länge zu vervielfältigen.
- (ii) Es ist nur wenig Ausgangsmaterial erforderlich (z.B. ein einziges Caviarkorn), da durch die PCR die entsprechenden DNA-Abschnitte millionenfach kopiert werden (DeSalle und Birstein 1996).
- (iii) Es steht eine Vielzahl von Methoden unterschiedlichen Schwierigkeitsgrades zur Charakterisierung der durch PCR vervielfältigten DNA-Abschnitte zur Verfügung (Newton und Graham 1994).

Mit Hilfe der SDS-PAGE gelingt es, Rogen verschiedener Lachse und Forellen zu unterscheiden (Scobbie und Mackie 1995). Deutscher Caviar, hergestellt aus Loden oder Seehase, ergibt ebenfalls artspezifische

Bisher sind zwei auf der PCR basierenden Methoden zur Identifizierung der Störart bei Caviar eingesetzt worden. In der Zeitschrift „Nature“ wurde im Mai 1996

die Zuschrift einer amerikanischen Arbeitsgruppe veröffentlicht, in der - ohne Angabe experimenteller Details - gezeigt wird, daß durch Steuerung der Reaktionsbedingungen für die PCR, d.h. die Verwendung artspezifischer Primer (Primer: kurze einzelsträngige DNA-Stücke, an denen die PCR jeweils ansetzt), gezielt DNA verschiedener Störarten vervielfältigt werden kann. Das Auftreten einer DNA-Bande im Elektrophoresegel dient als Beweis für die Herkunft des Caviars (DeSalle und Birstein 1996). Es ist also notwendig, für jede Störart absolut spezifische Primer zu entwickeln; wenn ein solches Arsenal an Primern vorhanden ist, kann die DNA-Analyse schnell und ohne großen apparativen Aufwand durchgeführt werden.

Im Institut für Biochemie und Technologie wird eine andere PCR-gestützte Methode zur Identifizierung von Caviar entwickelt. Zunächst wird mit Hilfe von Universalprimern, d.h. Primern die mit möglichst allen interessierenden Fischarten reagieren, ein bestimmter DNA-Abschnitt (aus dem mitochondrialen Cytochrom b - Gen) vervielfältigt. Im Elektrophoresegel ergeben alle Störarten daher eine DNA-Bande in annähernd gleicher Position (untere DNA-Bande in Abbildung 6). Die durch PCR erzeugte DNA ist zunächst doppelsträngig (ds DNA). Durch Erwärmung in alkalischer

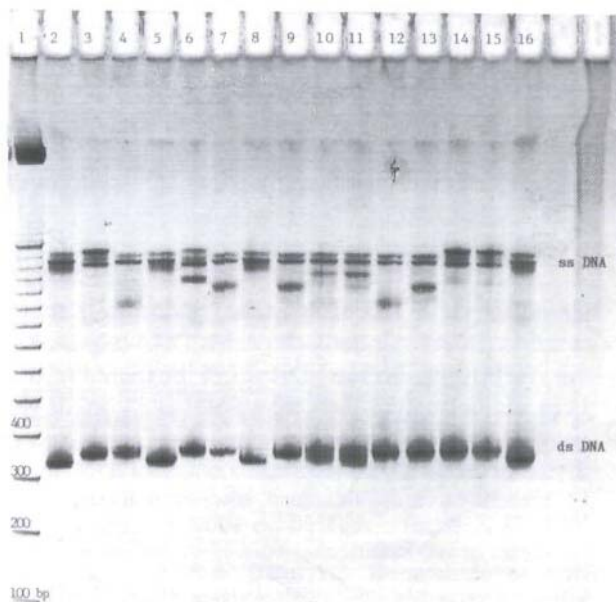


Abb. 6: PCR-SSCP von Störkaviar. Durch PCR wurde ein 358 Basenpaare (bp) langer DNA-Abschnitt (dsDNA) aus dem mitochondrialen Cytochrom b - Gen vervielfältigt. Nach Herstellung der Einzelstrang-DNA (ssDNA) wurde die DNA-Stränge auf in einem 15 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit Silber angefärbt.

Bahn 1: DNA-Längenstandard (100 bp - Leiter); Bahn 2, 5, 8, 16: verschiedene als "Beluga" deklarierte Proben; Bahn 3, 6, 14, 15: verschiedene als "Sevruga" deklarierte Proben; Bahn 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13: verschiedene als "Osietra" deklarierte Proben.

Formamidlösung und rasche Abkühlung mit Eiswasser wird die ds DNA in die beiden Einzelstränge (ss DNA) überführt. Bei der sich anschließenden Elektrophorese in nativen (d.h. ohne Zusatz von Harnstoff, Formamid oder ähnlichen Substanzen) Polyacrylamidgelen wandert die ss DNA langsamer als die ds DNA. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der räumlichen Anordnung (Konformation) der ss DNA ab, die ihrerseits von der Basensequenz des DNA-Stranges mitbestimmt wird. Diese Konformationsunterschiede haben den Namen dieser Analysetechnik geliefert (PCR-SSCP, single strand conformation polymorphism) (Hayashi 1992).

Wenn die Basensequenzen für verschiedene Fischarten unterschiedlich sind, resultieren artspezifische Muster von ss DNA - Banden wie Abbildung 6 für verschiedene Sorten von Störkaviar demonstriert. Diese Methode hat gegenüber dem o.g. Verfahren den Vorteil, daß nur ein Primerpaar eingesetzt werden muß und keine falsch negativen Resultate auftreten können. Zeitbedarf und Kosten beider Techniken bewegen sich etwa im gleichen Rahmen. Erst nach Einbeziehung weiterer Störarten läßt sich absehen, ob die Leistungsfähigkeit der beiden vorgestellten Techniken ausreicht oder ob in Zweifelsfällen eine, zur Zeit noch aufwendige, Sequenzierung der DNA notwendig ist.

Literatur

- Karmas, E.: Meat, Poultry and Seafood Technology - Recent Developments. Noyes Data Corporation, Park Ridge, New Jersey, 368-369, 1982.
- Josuweit, H.: World trade of caviar and sturgeon. FAO, Rom, 1994.
- DeSalle, R.; Birstein, V.J.: PCR identification of black caviar. Nature 381, 197-198, 1996.
- Rehbein, H.: Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 191, 1-10, 1990.
- Keyvanfar, A.; Rochu, D.; Fine, J.M.: Comparative study of sturgeon oocyte soluble protein by isoelectric focusing. Comp. Biochem. Physiol. 90B, 393-396, 1988.
- Rehbein, H.: Caviare: proximate composition, amino acid content and identification of fish species. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 180, 457-462, 1985.
- Chen, I.-C.; Chapman, F.A.; Wei, C.I.; O'Keefe, S.F.: Preliminary studies on SDS-PAGE and isoelectric focusing identification of sturgeon sources of caviar. J. Food Sci. 61, 533-536, 539, 1996.
- Stemin, V.; Dore, I.: Caviar-The Resource Book. Cultura, Moskau, 1993.
- Scobbie A.E.; Mackie, I.M.: The use of sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis to confirm the presence of salmon (*Salmo salar*) eggs in an illegal fish bait. Electrophoresis 16, 306-307, 1995.
- Molecular Genetics in Fisheries (Hrsg.: Carvalho, G.R. und Pitcher, T.J.). Chapman and Hall, London, 1995.
- Meyer, R. und Candrian, U.: PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. Lebensm.-Wiss. u. -Technol. 29, 1-9, 1996.
- Newton, C.R.; Graham, A.: PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994.
- Hayashi, K.: PCR-SSCP: a method for detection of mutations. Genetic Anal. Tech. Appl. 9, 73-79, 1992.