

FISCH ALS LEBENSMITTEL

Differenzierung roher und geräucherter Aale durch Protein- und DNA-Analyse

Hartmut Rehbein, Institut für Biochemie und Technologie

Rohe und geräucherte Aale wurden durch isoelektrische Fokussierung der sarkoplasmatischen Proteine untersucht. Während roher Fisch spezifische Proteinmuster für *A. anguilla/A. rostrata*, *A. japonica* und *A. australis* ergab, war bei Räucherware nur eine Differenzierung zwischen pazifischen und atlantischen Spezies möglich. Die zur DNA-Analyse eingesetzte PCR-SSCP-Technik erlaubte zwar die Differenzierung der vier Aalarten bei Roh- oder Räucherware, muß aber noch hinsichtlich der intra-spezifischen Variabilität der DNA-Muster überprüft werden.

Einleitung

Räucheraal für den europäischen Markt wird überwiegend aus Fischen der Spezies *Anguilla anguilla* produziert. Daneben werden aber auch weitere Aalarten, wie *A. rostrata*, *A. japonica* und *A. australis* verarbeitet. Zur Zeit werden der Gattung *Anguilla* insgesamt 18 Arten, einschließlich dreier Unterarten, zugeordnet (Aoyama und Tsukamoto 1997). Die Aalarten unterscheiden sich zwar in Qualität und Preis, sind aber schon als Rohware, und erst recht in geräuchertem Zustand, nur schwer anhand äußerer Merkmale zu identifizieren. Handel, Fischindustrie und Lebensmittelüberwachung sind daher auf objektive Bestimmungsmethoden angewiesen, die auch dann anwendbar sind, wenn Räucheraal oder Teile desselben vorliegen.

Differenzierung durch Proteinanalyse

Zur Identifizierung der Fischart in Erzeugnissen hat sich in vielen Fällen die Eiweißelektrophorese in Form der isoelektrischen Fokussierung (IEF) der wasserlöslichen (sarkoplasmatischen) Muskelproteine als geeignete Methode erwiesen (Mackie 1996, Rehbein 1990). Daher wurde die IEF auch zur Differenzierung von Aalarten eingesetzt, wobei aus Muskelstücken roher oder geräucherter Aale wäßrige Extrakte hergestellt wurden, deren Proteine mit gebrauchsfertigen IEF-Gelen (Servalyt Precotes 3-10) wie früher beschrieben (Rehbein et al. 1995) aufgetrennt wurden.

Bei der IEF bildet sich im Elektrophoresegel ein stabiler pH-Gradient aus. Die Proteine wandern soweit im elektrischen Feld, bis sie die Position im Gel erreicht haben, bei der ihre Nettoladung Null ist. Der zugehörige pH-Wert entspricht dem isoelektrischen Punkt (pI-Wert) der Proteine.

Durch die Heißräucherung, bei der Temperaturen über 60 °C im Fischfleisch erreicht werden, wurde der über-

Tab.1: Proteingehalt von Extrakten aus der hellen Muskulatur roher und geräucherter Aale.

Rohe Proben wurden im Verhältnis 1 + 3 mit destilliertem Wasser homogenisiert, geräucherte Proben im Verhältnis 1 + 1. Zur Abtrennung ungelösten Materials wurden die Homogenate zentrifugiert. Der Proteingehalt der Überstände, die anschließend ohne weitere Behandlung zur IEF eingesetzt wurden, wurde mit einer Coomassiefarbstoff-Bindungsmethode (Bio-Rad Protein Assay) fotometrisch ermittelt.

Probe	Proteingehalt des Extraktes (mg/ml)
<i>A. anguilla</i> , roh	13,9
<i>A. anguilla</i> , geräuchert	5,2
<i>A. rostrata</i> , roh	12,2
<i>A. rostrata</i> , geräuchert	5,0
<i>A. australis</i> , roh	15,6
<i>A. australis</i> , geräuchert	6,7
<i>A. japonica</i> , roh	13,3
<i>A. japonica</i> , geräuchert	3,8

Differentiation of raw and smoked eel by protein- and DNA-analysis

Raw or smoked eel was analysed by isoelectric focusing of sarcoplasmic proteins. For raw fish specific protein patterns were obtained for *A. anguilla/A. rostrata*, *A. japonica* and *A. australis*, but in case of smoked fish differentiation was only possible between Atlantic and Pacific species.

Differentiation of raw or smoked eel was possible by PCR-SSCP, but patterns of ssDNA showed some intra-specific variability depending on the type of amplicon.

Tab. 2: Isoelektrische Punkte (pI-Werte) sarkoplasmatischer Proteine von Aalen. Die in allen Proben (roh und geräuchert) auftretenden Banden sind hervorgehoben

Bande	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fischart										
<i>A. anguilla</i>										
pI-Mittelwert	6,60	6,52	6,32	6,17	5,99	5,84	4,19	4,13		
Standardabweichung	0,006	0,013	0,022	0,034	0,038	0,132	0,053	0,070		
n	6	9	6	9	9	6	8	6		
<i>A. rostrata</i>										
pI-Mittelwert	6,61	6,54	6,33	6,16	5,98	5,93	4,17	4,08		
Standardabweichung	0,005	0,010	0,015	0,018	0,021	0,008	0,065	0,115		
n	4	7	6	6	8	4	8	6		
<i>A. japonicus</i>										
pI-Mittelwert	6,69	6,33	6,16	5,93	5,83	5,75	5,78	4,96	4,17	
Standardabweichung	0,008	0,023	0,025	0,077	0,035	0,073	0,007	0,024	0,024	
n	6	6	6	6	4	4	4	8	8	
<i>A. australis</i>										
pI-Mittelwert	6,75	6,55	6,34	6,18	6,00	5,85	5,80	5,74	4,96	4,16
Standardabweichung	0	0,013	0,015	0,022	0,035	0,024	0,019	0,059	0,022	0,063
n	2	9	7	7	7	5	5	5	9	9

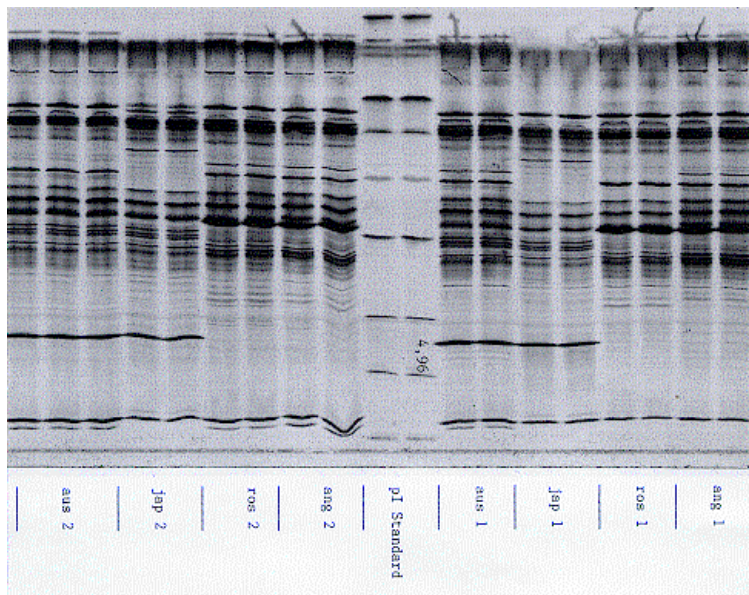


Abb. 1: Proteinmuster roher Aale.

Die sarkoplasmatischen Proteine aus der hellen Muskulatur von *A. anguilla* (ang), *A. rostrata* (ros), *A. japonica* (jap) und *A. australis* (aus) wurden durch IEF aufgetrennt. Proben 1 und 2 stammen von verschiedenen Fischen einer Art; die Anode befindet sich unten. Als pI-Standard wurde der Broad pI Calibration Kit (pH 3-10) von Pharmacia eingesetzt.

wiegende Teil der sarkoplasmatischen Proteine denaturiert und wasserunlöslich (Tabelle 1).

Die Proteinmuster roher atlantischer und pazifischer Aale unterschieden sich sehr deutlich, hauptsächlich

aufgrund einer ausgeprägten Proteinbande mit dem pI-Wert 4,96, die nur die pazifischen Aale aufwiesen (Abbildung 1, Tabelle 2). *A. japonica* und *A. australis* waren im rohen Zustand ebenfalls gut zu differenzieren, während die Proteinmuster der Räucherware aus diesen beiden Arten sehr ähnlich waren (Abbildung 2).

Die atlantischen Spezies *A. anguilla* und *A. rostrata* wiesen dagegen auch im rohen Zustand ein nahezu gleiches Proteinmuster auf und ließen sich daher mit der IEF nicht sicher unterscheiden.

Generell waren die Proteinmuster der geräucherten Aale dadurch gekennzeichnet, daß nur noch wenige Banden, hauptsächlich von Proteinen mit niedrigem pI-Wert, vorhanden waren. Eine sichere Differenzierung zwischen atlantischen und pazifischen Aalen der vier hier untersuchten Spezies war jedoch auch bei Räucherware möglich.

Differenzierung durch DNA-Analyse

Da die Proteinanalyse mittels IEF keine Differenzierung der Räucheraale auf der Ebene der Arten erlaubte, haben wir eine auf der PCR (Polymerase-Kettenreakti-

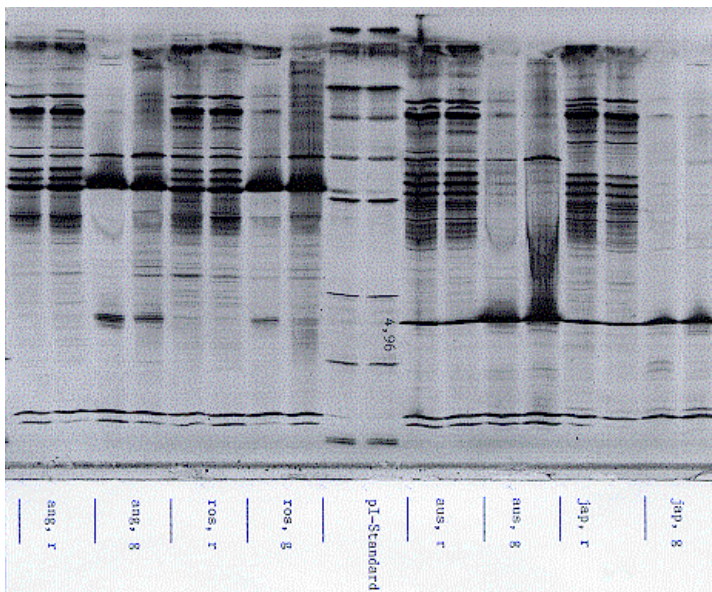


Abb. 2: Proteinmuster roher (r) und geräucherter (g) Aale nach Auftrennung durch IEF. *A. anguilla* (ang), *A. rostrata* (ros), *A. japonica* (jap), *A. australis* (aus).

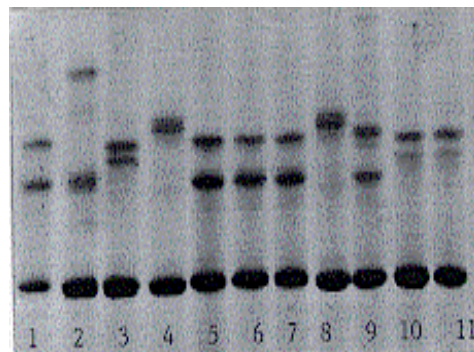


Abb. 3: PCR-SSCP roher und geräucherter Aale. Bahn 1, 5, 6, 7: *A. anguilla* (Die Proben auf Bahn 1, 5/6, 7 stammen von 3 verschiedenen Fischen). Bahn 2: *A. japonica*. Bahn 3, 10, 11: *A. rostrata* (3 Fische). Bahn 4, 8, 9: *A. australis* (3 Fische). Räucheraal: Bahn 7, 9, 11. Die doppelsträngige DNA (123 bp Länge) ist im unteren, anodischen Teil des Gels sichtbar, die Muster der ssDNA befinden sich darüber. Zur Elektrophorese wurde ein CleanGel 10% 48S von Pharmacia eingesetzt.

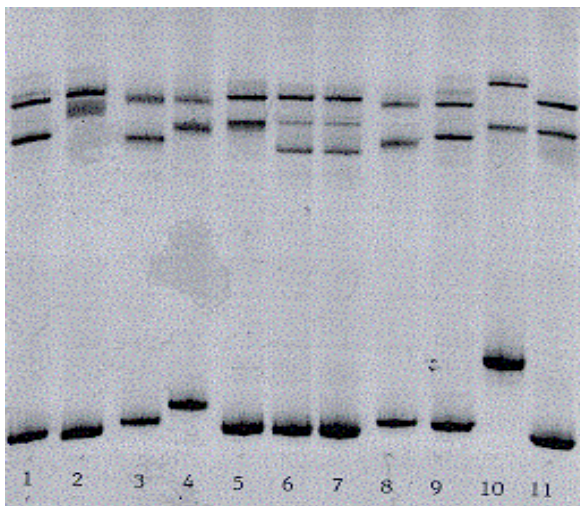


Abb. 4: PCR-SSCP roher und geräucherter Aale. Bahn 1, 2, 9: *A. rostrata* (3 Fische). Bahn 3, 4, 8: *A. australis* (3 Fische). Bahn 5, 6, 7, 11: *A. anguilla* (3 Fische: 5, 6/7, 11). Bahn 10: *A. japonica*. Räucheraal: Bahn 1, 3, 5. Die doppelsträngige DNA (358 bp Länge) ist im unteren, anodischen Teil des Gels sichtbar, die Muster der ssDNA befinden sich im oberen Gelabschnitt. Zur Elektrophorese wurde ein CleanGel 10% 48S von Pharmacia eingesetzt.

on) basierenden Technik der DNA-Analyse erprobt. Die PCR hat sich inzwischen auch in der Lebensmittelanalytik etabliert, da sie mit wenig Material auskommt, relativ einfach durchzuführen ist und DNA-Fragmente liefert, die durch eine Vielzahl von Methoden charakterisiert werden können (Meyer et al. 1995).

Zur Differenzierung von Aalen wurde folgende Methode eingesetzt: Nach Isolierung der DNA aus Muskelgewebe wurde ein bestimmter Genabschnitt aus der

mitochondrialen DNA (Cytochrom b - Gen) durch PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde durch Behandlung mit Wärme und Chemikalien in einzelsträngige DNA (ssDNA) überführt; die ssDNA wurde anschließend durch native Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt. Versuche mit anderen Fischarten haben gezeigt, daß diese Technik (PCR-SSCP; SSCP: single strand conformation polymorphism) zur Differenzierung von Fischkonserven und anderen Produkten geeignet ist (Rehbein et al. 1997).

Zur Untersuchung der Aale haben wir zwei DNA-Fragmente verschiedener Länge, mit 123 Basenpaaren (bp) (Abbildung 3) und 358 bp (Abbildung 4), eingesetzt. Abbildung 3 verdeutlicht, daß die vier Aalarten unterschiedliche DNA-Muster bei der SSCP-Analyse lieferten. Ein Einfluß der Räucherung auf die DNA-Muster wurde nicht gefunden. Die Aussagekraft der Methode wurde allerdings dadurch beeinträchtigt, daß bei Fischen derselben Spezies für das längere DNA-Fragment variable Muster gefunden wurden, sodaß das 358 bp-Fragment nicht zur SSCP geeignet erscheint. Im Falle des kürzeren Fragmentes trat diese Variabilität nur einmal auf, sodaß hier die Chance besteht, nach Untersuchung einer größeren Anzahl von Aalen zu einer sicheren Aussage zu gelangen.

Neben der relativ aufwendigen DNA-Sequenzierung (Sang et al., 1994; Aoyama et al., 1996a; Aoyama et al. 1996b; Tagliavini et al. 1996) stehen noch weitere PCR-gestützte Techniken zur Differenzierung von Aalen zur Verfügung. Durch enzymatische Spaltung von PCR-Produkten (RFLP-Methode) gelang die Differenzierung von *A. anguilla* und *A. rostrata* (Tagliavini et al. 1995).

Die RAPD-Technik, bei der die PCR mit einem unspezifischen Primer durchgeführt wird, wurde zur Identifizierung von *A. japonica*, *A. australis* und *A. bicolor* eingesetzt (Takagi und Taniguchi 1995). Die hierbei beobachtete intra-spezifische Variabilität der RAPD-Muster läßt diese Methode für die Lebensmittelanalytik, bei der in der Regel Einzelproben beurteilt werden müssen, als nicht sehr geeignet erscheinen.

LITERATUR

- Aoyama, J.; Tsukamoto, K.: Evolution of the freshwater eels. *Naturwissenschaften* 84: 17-21, 1997.
- Aoyama, J.; Kobayashi, T.; Tsukamoto, K.: Phylogeny of eels suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nippon Suisan Gakkaishi* 62: 370-375, 1996.
- Aoyama, J.; Nishida, M.; Tsukamoto, K.: Molecular phylogenetic approach to the evolution of the freshwater eels, *Anguilla*. *Mem. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*: 44 (1), 2-10, 1997.
- Mackie, I.M.: Authenticity of fish. In: *Food Authentication* (Hrsg.: Ashurst, P.R.; Dennis, M.J.). Blackie Academic and Professional, London, 140-170, 1996.
- Meyer, R.; Höfelein, C.; Lüthy, J.; Candrian, U.: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J. AOAC Intern.*: 78, 1542-1551, 1995.
- Rehbein, H.: Electrophoretic techniques for species identification of fishery products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 191: 1-10, 1990.
- Rehbein, H.; Etienne, M.; Jerome, M.; Hattula, T.; Knudsen, L.B.; Jessen, F.; Luten, J.B.; Bouquet, W.; Mackie, I.M.; Ritchie, A.H.; Martin, R.; Mendes, R.: Influence of variation in methodology on the reliability of the isoelectric focusing method of fish species identification. *Food Chem.* 52: 193-197, 1995.
- Rehbein, H.; Kress, G.; Schmidt, T.: Application of PCR-SSCP to species identification of fishery products. *J. Sci. Food Agric.*: 74, 35-41, 1997.
- Sang, T.-K.; Chang, H.-Y.; Chen, C.-T.; Hui, C.-F.: Population structure of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Mol. Biol. Evol.*: 11, 250-260, 1994.
- Tagliavini, J.; Gandolfi, G.; Deiana, A.M.; Salvadori, S.: Phylogenetic relationships among two Atlantic and three Indo-Pacific *Anguilla* species (Osteichthyes, Anguillidae). *Ital J. Zool.*: 271-276, 1996.
- Tagliavini, J.; Harrison, I.J.; Gandolfi, G.: Discrimination between *Anguilla anguilla* and *A. rostrata* by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Fish Biol.* 47: 741-743, 1995.
- Takagi, M.; Taniguchi, N.: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of three species of *Anguilla*, *A. japonica*, *A. australis*, and *A. bicolor*. *Fisheries Science* 61: 884-885, 1995.

Vergleichende Texturuntersuchungen an Filets von Kliesche (*Limanda limanda*) und Scholle (*Pleuronectes platessa*) in Abhängigkeit von Eislagerzeit *post mortem*, TK-Lagerung und Erhitzen

Reinhard Schubring und Werner Münkner, Institut für Biochemie und Technologie

Instrumentelle Texturuntersuchungen wurden mittels Textur-Profil-Analyse an Kliesche und Scholle durchgeführt, wobei als Texturparameter die Härte, Gummiartigkeit, Kaubarkeit, Elastizität, Kohäsion und Adhäsion bewertet wurden. Die Filets beider Fischarten wurden dazu aus tiefgefrorener, ausgenommener und geköpfter Ware ohne Schwanz und Flossensaum (aoKoSoFs) nach 9, 23 und 34wöchiger Gefrierlagerung hergestellt und sowohl im rohen Zustand nach dem Auftauen als auch nach dem Erhitzen in einem Mikrowellenofen untersucht. Das Tiefgefrieren der aoKoSoFs-Ware an Bord erfolgte sowohl fangfrisch als auch nach 6tägiger Eislagerung. Beide Fischarten sind in ihren Texturparametern vergleichbar. Die Festigkeit der erhitzten Kliesche ist im Vergleich zur Scholle leicht erhöht. Dagegen zeigen alle anderen Parameter eine recht gute Übereinstimmung. Während sich die Härte der Kliesche beim Erhitzen erhöht, verringert sie sich bei der Scholle im Vergleich zum aufgetauten Filet. Dieses war der einzige signifikante Unterschied zwischen beiden Fischarten während des Erhitzens. Besonders deutlich sind bei beiden Fischarten die Zunahme von Adhäsion und Kohäsion während des Erhitzens. Veränderungen infolge der Eislagerung sind offensichtlich nur tendenziell. Die TK-Lagerung bewirkt dagegen bei beiden Fischarten eine deutliche Abnahme der Adhäsion der erhitzten Filets.

Einleitung

Die Kliesche - eine von der deutschen fischverarbeitenden Industrie bisher wenig genutzte Fischart - steht in jüngster Zeit im Blickpunkt wissenschaftlichen Interesses. Unsere Untersuchungen verfolgten das Ziel, die Qualität von Filets eisgelagerter Kliesche (Münkner

und Oehlenschläger 1997) oder von unterschiedlichen Erzeugnissen (Rehbein 1997), die aus an Bord ausgenommenen und tiefgefrorenen Klieschen hergestellt wurden, zu bewerten. In beiden Fällen wurde die Scholle als Vergleichsfischart einbezogen. Im Ergebnis kamen die Untersucher zu dem Schluß, daß die Qualität von