

# Projekt „KrustInUva“: Entwicklung von innovativen Untersuchungsverfahren als Voraussetzung für die Produktion sicherer und qualitativ hochwertiger Krustentiererzeugnisse und ein ressourcenschonendes Bestandsmanagement

Brenn C.<sup>1</sup>, Roggensack T.<sup>1</sup>, Stahl A.<sup>2</sup>, Hanel R.<sup>3</sup>, Clawin-Rädecker I.<sup>1</sup>, Kappel K.<sup>1</sup>, Rimkus G. & Schröder U.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Max Rubner-Institut, Institut für Sicherheit und Qualität bei Milch und Fisch, Hermann-Weigmann-Str. 1, 24103 Kiel

<sup>2</sup> Intertek Food Services GmbH, Olof-Palme-Str. 8, 28719 Bremen

<sup>3</sup> Johann Heinrich von Thünen-Institut, Institut für Fischereiökologie, Herwigstr. 31, 27572 Bremerhaven

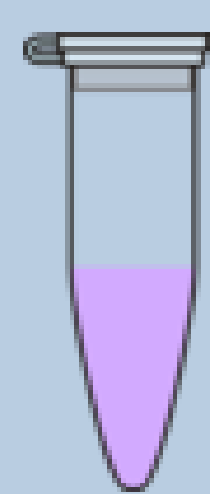
Krebstiere stellen mit mehr als 50.000 Arten bedeutende Fischereierzeugnisse dar, welche sich stark in ihrer sensorischen Qualität, dem Preis und den Produktionsbedingungen unterscheiden. Hierdurch besteht das Risiko für eine Verfälschung innerhalb der Lebensmittelkette. Im Projekt „KrustInUva“ werden daher verschiedene innovative Methoden zur verlässlichen Speziesidentifizierung entwickelt, um etwaige Fehldeklarierung bei Krebstieren aufzudecken und so einen wirksamen Verbraucherschutz zu gewährleisten. Voraussetzung dafür sind authentische Referenzproben handelsrelevanter Arten aus den Herkunftsländern, um die Entwicklung von verlässlichen Methoden und den Ausbau der öffentlichen DNA-Sequenz Datenbank "AquaGene" zu ermöglichen.

## Real-time PCR (MRI)

- Vervielfältigung von DNA-Abschnitten mit Detektion von Fluoreszenzsignalen
- Artdifferenzierung durch Unterschiede im zeitlichen Auftreten (Ct-Werte) und Intensität der Signale als Marker für artspezifische DNA
- Simultane Detektion mehrerer Zielarten (Multiplex real-time PCR)
- Geeignet für ein umfangreiches Screening nach kommerziell relevanten Krebstieren



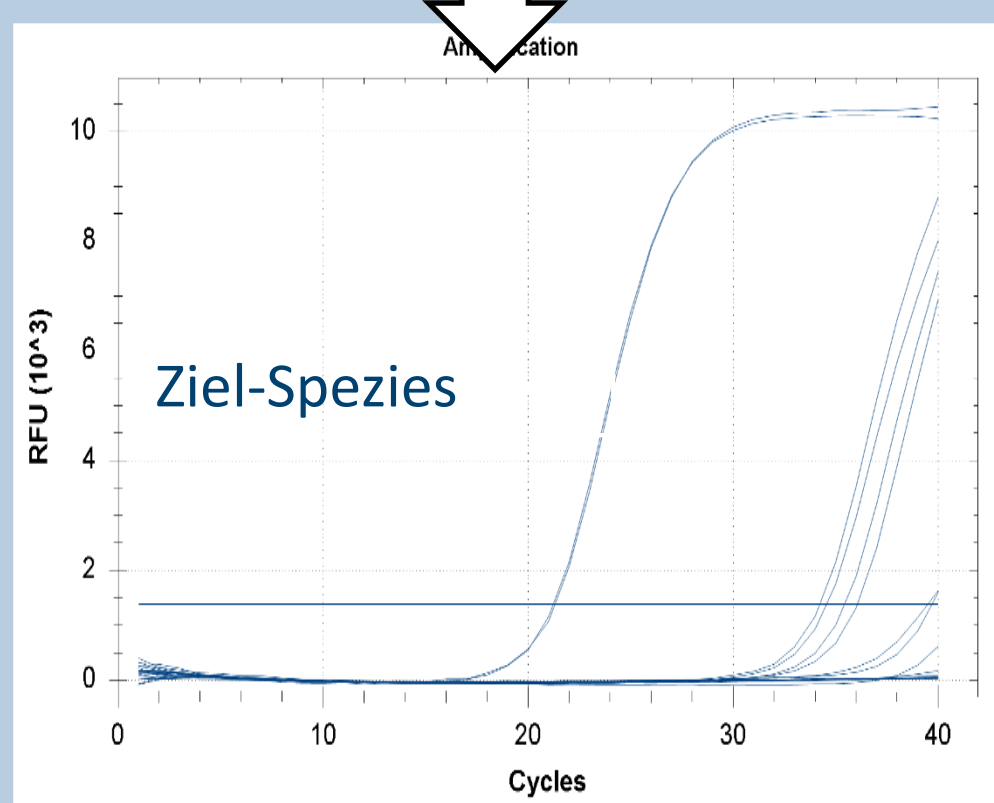
Muskelfleisch-entnahme



DNA-Extraktion



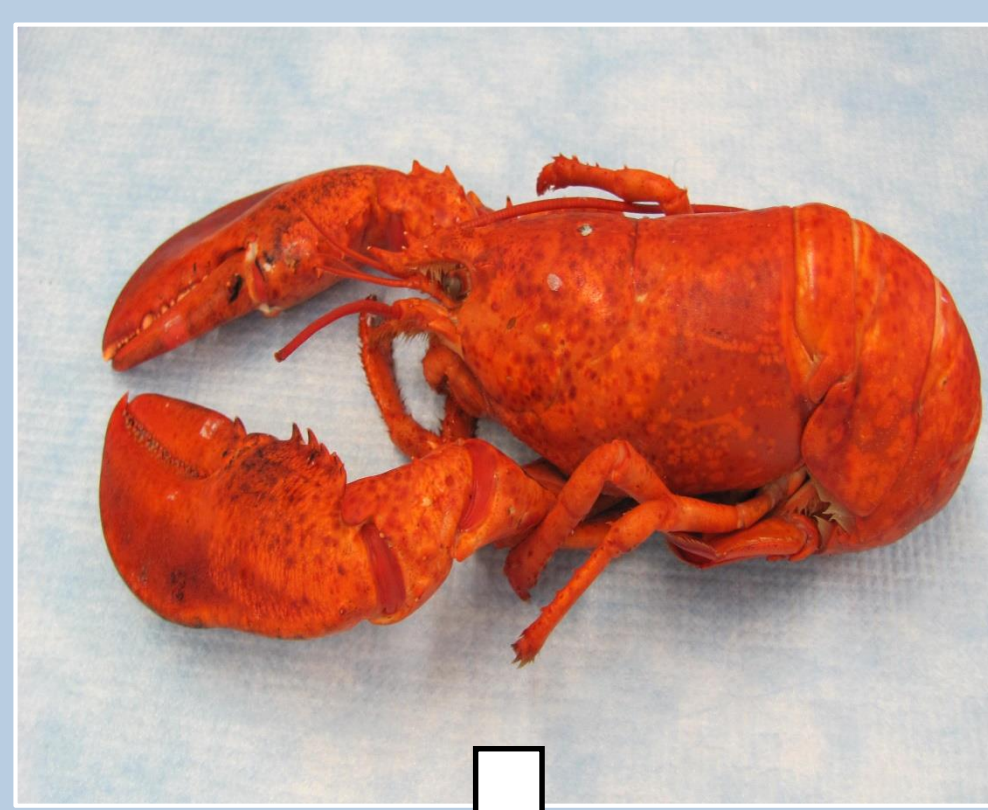
Durchführung der real-time PCR



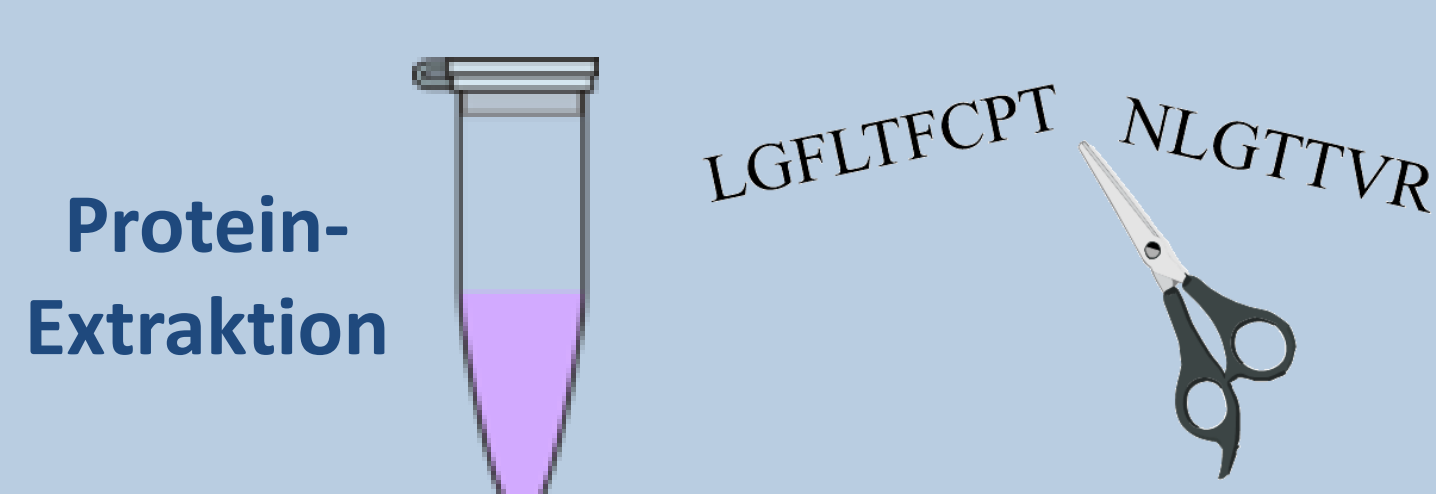
Auswertung von Ct-Werten / Spezies-differenzierung

## LC-MS/MS (MRI)

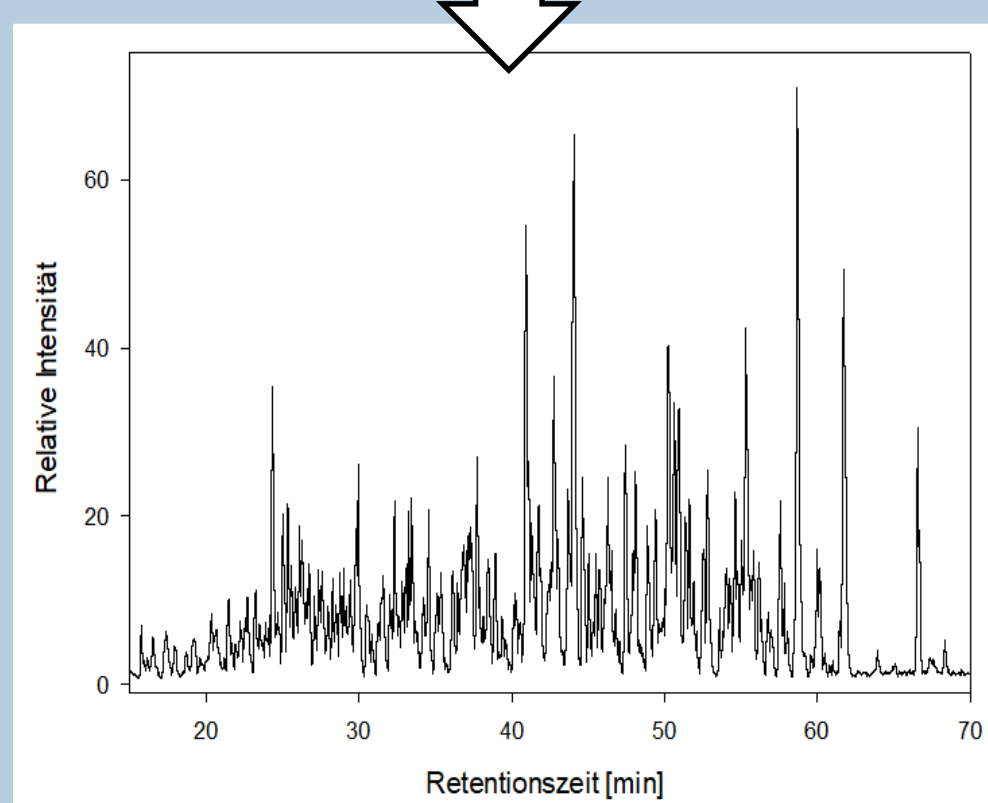
- Proteinextraktion und enzymatischer Verdau zu Peptiden
- Chromatographische Analyse der Peptid-Profile mittels LC-MS/MS
- Identifizierung spezifischer Peptidmarker durch Analyse der LC-MS/MS-Spektren
- Entwicklung von sensitiven Multiple reaction monitoring (MRM)-Methoden zur quantitativen Bestimmung
- Direkter Allergennachweis durch identifizierte Biomarker aus allergenen Proteinen möglich



Muskelfleisch-entnahme



Analyse mittels LC-MS/MS

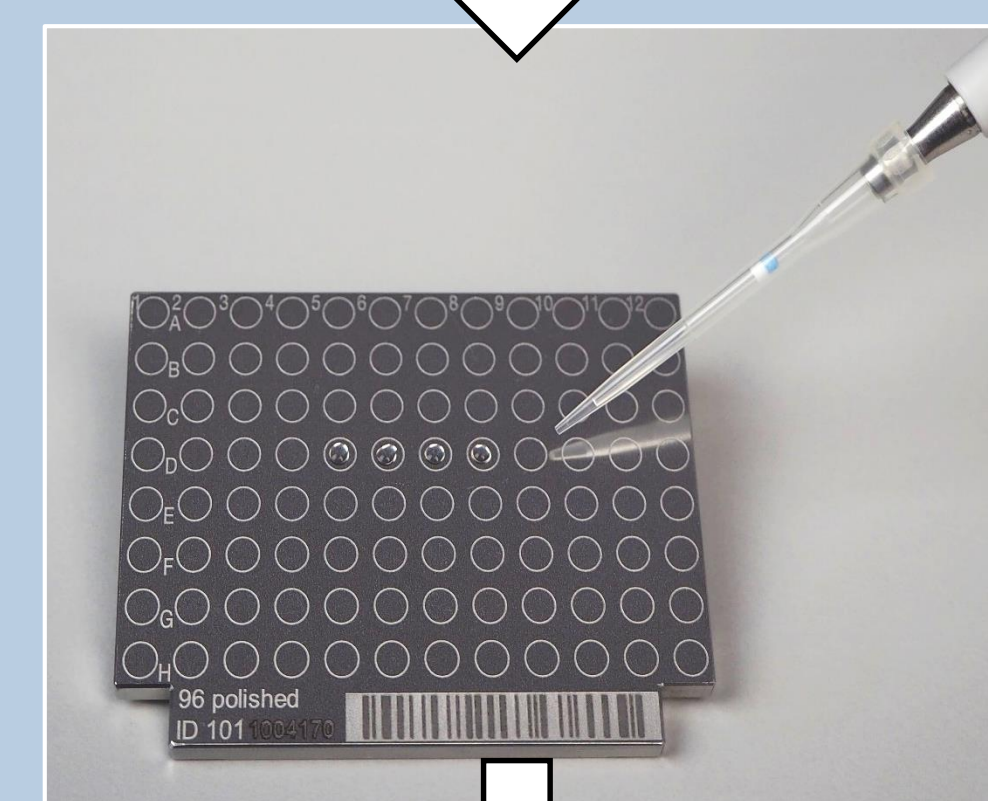


## MALDI MS (Intertek)

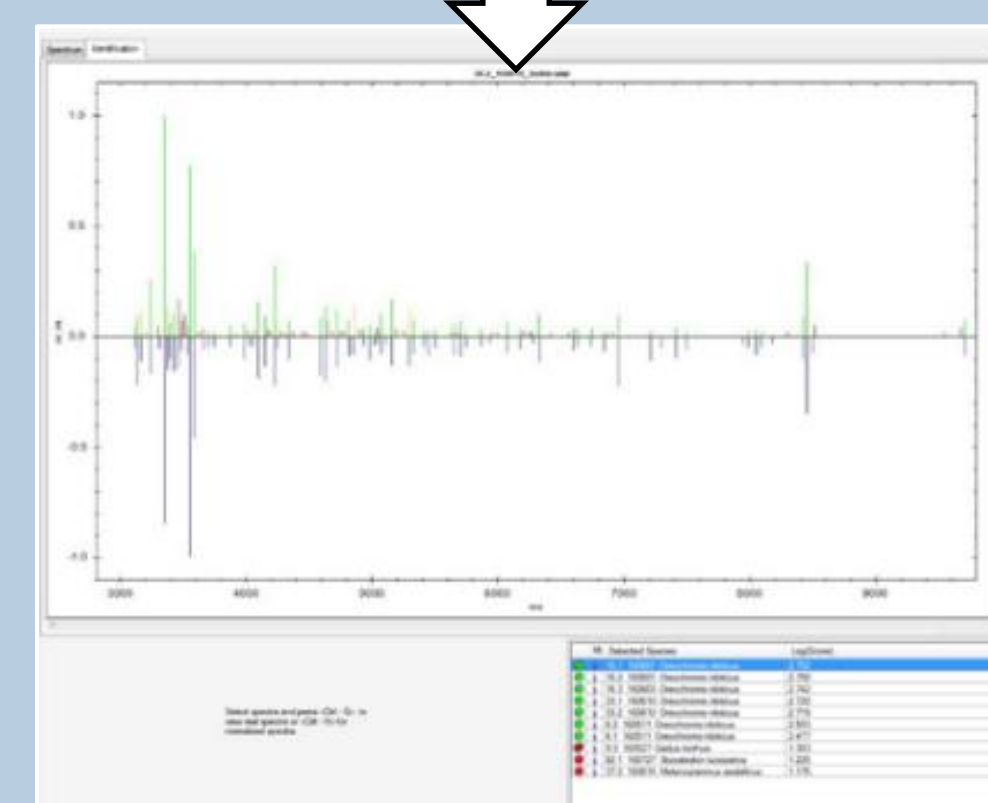
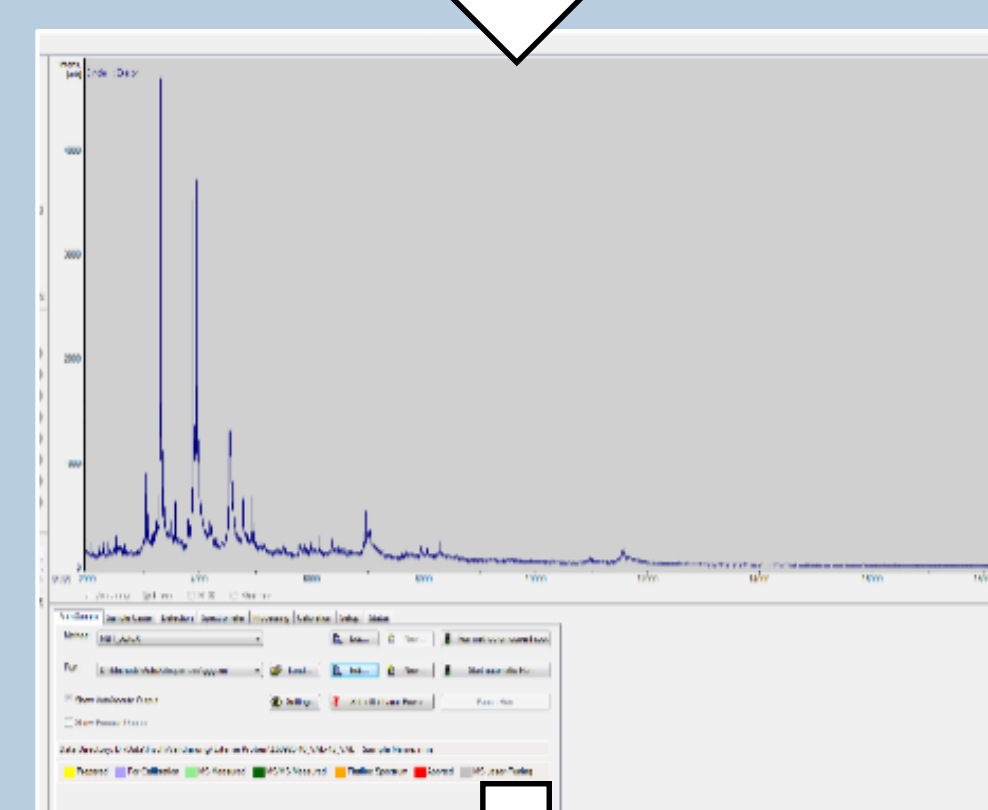
- Artbestimmung mittels matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) MS
- Abgleich artspezifischer Peptid- und Proteinspektren mit verifizierten Referenzspektren
- Breite Anwendung in der klinischen Mikrobiologie und bei höher entwickelten Organismen
- Kosteneffiziente und schnelle Methode mit relativ simplen Laboraufwand



Muskelfleisch-entnahme & Zellaufschluss



Auftrag des Extrakts auf MALDI Target



## Bisherige Ergebnisse:

- Entwicklung eines Multiplex real-time PCR Screening Assays für vier kommerziell relevante Krebstiere (*P. monodon*, *L. vannamei*, *P. muelleri*, *N. norvegicus*)
- Umfangreiche Validierung (u.a. Spezifität, Sensitivität, Effizienz, Robustheit)
- Differenzierung nah-verwandter Projektproben möglich

- Optimiertes Protokoll zur Proteinextraktion von Krebstieren erstellt
- Entwicklung einer ungerichteten LC-MS-Methode (Vorsäuleneinstellungen, Gradient, Äquilibration)
- Umfangreiche Validierung (u.a. Wiederfindung, Linearität, Präzision, Stabilität etc.)
- Datenanalyse zur Identifizierung von spezies-spezifischen Biomarkern relevanter Krebstierarten
- Differenzierung nah-verwandter Spezies möglich

- Krebstier-spezifisches Protokoll zur Probenaufarbeitung erstellt
- Qualitätsgeprüfte Datenbankeinträge zum Aufbau einer Referenzdatenbank auf Basis bisher vorhandener Projektproben erstellt.
- Differenzierung von Projektproben mit Einschränkung mancher nah verwandter Arten möglich

**Fazit:** Es wurden drei Methoden für die Speziesidentifizierung/-differenzierung von Krebstieren entwickelt. Eine abschließende Verifizierung der Methoden-Spezifität wird mit weiteren authentischen Referenzproben erfolgen.