



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Nachweis und Verarbeitung von Kartoffelprotein in
Fleischprodukten“

verfasst von / submitted by

Marie-Louise Kuisl, B.Sc.

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2021 / Vienna, 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 659

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Lebensmittelchemie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2020 bis Oktober 2020 unter der Betreuung von Dr. Kerstin Dolch und Dr. Tomas Bolumar am Max Rubner-Institut (MRI), Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel in Kulmbach, laborpraktisch durchgeführt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich für die vielfältig erfahrene Unterstützung bei der Anfertigung meiner Masterarbeit bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt zunächst Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl für ihre vielfältige Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung an der Universität Wien.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Dagmar Adeline Brüggemann bedanken, für die Möglichkeit der praktischen Durchführung meiner Masterarbeit am Max Rubner-Institut in Kulmbach.

Mein großer Dank gilt besonders Frau Dr. Kerstin Dolch für ihre kompetente, freundliche und immer hilfsbereite Unterstützung während der praktischen Arbeiten als auch beim Korrekturlesen meiner Masterarbeit. Ebenso möchte ich Herrn Dr. Tomas Bolmar vielmals für seine freundliche und kompetente Unterstützung bei der Entwicklung der Brühwurst mit Kartoffelprotein bedanken. Ebenso bedanke ich mich für die hilfreichen Ratschläge in allen organisatorischen, technologischen und molekularbiologischen Fragen.

Zusätzlich möchte ich Frau Dr. Sabine Andréé für ihre Unterstützung, bei den Analysen der Aminosäuren, herzlich danken. Ebenso geht ein herzliches Dankeschön an Herrn Dr. Sebastian Zimmermann für seine fachliche und freundliche Unterstützung in allen weiteren molekularbiologischen Fragen.

Mein herzlichster Dank gilt des Weiteren allen technischen Mitarbeiter*innen und Metzgern, welche mich in zahlreichen Analysen und in der Produktion der Würste unterstützt haben und mir mit vielen hilfreichen Ratschlägen und freundlichen Worten zur Seite standen. Dabei möchte ich mich ganz herzlich bei Tina Schobert, Edit Müller, Monika Korpilla, Silvia Höpfel, Jasmin Brugger, Carsten Ulrich, Joseph Haida und Marko Zäh bedanken.

Mein besonderer Dank gilt schließlich meiner Familie und meinem Freund, die mich mein gesamtes Studium hinweg immer moralisch unterstützt haben und jederzeit für mich da waren. Der größte Dank gebührt dabei meinen Eltern und meinen Großeltern für ihre emotionale und finanzielle Unterstützung und die damit verbundene Möglichkeit im wunderschönen Wien zu studieren.

Herzlichst möchte ich auch meinen Freunden für ihre emotionale und auch fachliche Unterstützung in allen Lebenslagen des Studiums und der Freizeit danken, besonders für die lustige Zeit im Labor. Ich bin sehr froh, dass wir uns getroffen haben, ihr mich unterstützt habt und immer ein offenes Ohr hattet. Mein besonderer Dank gilt dabei Julia und Yasmin. Herzlichst möchte ich mich zudem bei der lieben Heike für das Korrekturlesen und ihre langjährige Freundschaft bedanken.

Inhaltsverzeichnis	
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Formelverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
2. Zielsetzung	2
3. Theoretischer Hintergrund	3
3.1 Proteine	3
3.1.1 Bedeutung von Proteinen in der menschlichen Ernährung	3
3.1.2 Qualität von Nahrungsproteinen	3
3.2 Die Kartoffel als Proteinquelle	4
3.2.1 Kartoffelproteine	5
3.2.2 Physiologische Bedeutung von Kartoffelproteinen	5
3.2.3 Gewinnung und Verwendung von Kartoffelprotein	5
3.3 Fleisch	6
3.3.1 Zusammensetzung von Fleisch	6
3.3.2 Fleisch als Proteinquelle	6
3.4 Fleischerzeugnisse und Wurstwaren	7
3.4.1 Brühwürste	7
3.4.2 Technologie der Brühwurstherstellung	8
3.5 Hybride Fleischerzeugnisse	8
3.5.1 Kennzeichnung: Fremdprotein in Wurstwaren	9
3.5.2 Qualität und Verbrauchererwartung	9
3.6 Nachweismethoden von Fremdeiweiß in Fleischerzeugnissen	11
3.6.1 Nachweis von Fremdeiweiß auf DNA-Ebene	11
3.6.2 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)	13
3.6.3 Die real-time PCR	14
3.6.4 Publierte real-time PCR Methoden zum Nachweis von Kartoffel-DNA	19

4. Material und Methoden	21
4.1 Material	21
4.1.1 Zielgen	27
4.1.2 Zielsequenz	27
4.1.3 Oligonukleotide	28
4.1.4 Rohstoffe	31
4.1.5 Probenmaterial	32
Methoden Teil I: Entwicklung einer Brühwurst mit Kartoffelprotein	36
4.2 Produktentwicklung	36
4.2.1 Rohstoffe	36
4.2.2 Versuchsplanung Vorversuch	36
4.2.3 Versuchsplanung Hauptversuch	37
4.2.4 Herstellung und Prozessparameter	39
Methoden Teil II: Lebensmittelanalytik	41
4.3 Technologische und sensorische Qualitätsparameter	41
4.3.1 pH-Wert	41
4.3.2 Instrumentelle Texturanalyse	42
4.3.3 Instrumentelle Farbanalyse	43
4.3.4 Lebensmittelsensorik (Verkostung)	45
4.4 Nährwertanalyse	46
4.4.1 Wassergehalt (Trockenmasse)	46
4.4.2 Aschegehalt	47
4.4.3 Fettgehalt	47
4.4.4 Proteingehalt	49
4.4.5 Bestimmung der Aminosäuren	51
Methoden Teil III: Entwicklung einer real-time PCR Methode	52
4.5 Probenvorbereitung (Molekularbiologische Analysen)	52
4.6 DNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung	52
4.6.1 Wizard® Kit	52
4.6.2 CTAB-Extraktion	54

4.6.3 DNA Konzentrations-, und Qualitätsbestimmung	57
4.6.4 DNA-Aufreinigung.....	58
4.7 Konventionelle PCR.....	59
4.7.1 Standardreagenzien des Mastermix	59
4.7.2 Durchführung der konventionellen PCR.....	60
4.8 Agarose-Gelelektrophorese	61
4.8.1 Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese	61
4.8.2 Herstellung und Beladung der Agarosegele.....	61
4.8.3 Durchführung Agarose-Gelelektrophorese.....	61
4.8.4 Färbung und Dokumentation des Gels	62
4.8.5 DNA-Aufreinigung (Gel).....	62
4.9 Sequenzierung.....	63
4.10 Real-Time PCR.....	64
4.10.1 Standardbedingungen	64
4.10.2 Überprüfung auf Amplifizierbarkeit der DNA-Proben.....	66
4.11 Validierung der real-time PCR Methode	67
4.11.1 Spezifität.....	67
4.11.2 Optimierung der Annealing-Temperatur.....	68
4.11.3 Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentration	68
4.11.4 Effizienz.....	69
4.11.5 Nachweisgrenze (LOD ^{95%}).....	69
4.11.6 Robustheit	71
4.12 Anwendung der real-time PCR Methode an Wurstproben.....	71
5. Ergebnisse	72
Ergebnisse Teil I: Lebensmittelanalytik	72
5.1 Technologische und sensorische Qualitätsparameter	72
5.1.1 pH-Wert.....	72
5.1.2 Instrumentelle Texturanalyse.....	74
5.1.3 Instrumentelle Farbanalyse	79
5.1.4 Lebensmittelsensorik (Hedonische Prüfung).....	82

5.2 Nährwertanalyse	85
5.2.1 Wasser-, Fett-, Protein- und Aschegehalt	85
5.2.2 Aminosäuregehalt.....	87
Ergebnisse Teil II: DNA-basierte Methodenentwicklung.....	90
5.3 DNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung.....	90
5.4 Validierung der real-time PCR Methode	91
5.4.1 Theoretische Spezifität	91
5.4.2 Optimierung der Annealing-Temperatur.....	93
5.4.3 Schmelzkurvenanalyse (Spezifität der Primer)	95
5.4.4 Kreuzreaktivität der ausgewählten Primerpaare mit Sonde (PP2A-P und PI-P)	98
5.4.5 Real-time PCR aller Kartoffelsorten (Primerpaar PI-II mit der Sonde PI-P).....	100
5.4.6 Agarose-Gelelektrophorese	100
5.4.7 Sequenziererergebnisse und Alignments.....	102
5.4.8 Real-time PCR aller Kartoffelsorten mit den Sonden PI-MGB-P und PI-Kunitz-P107	
5.4.9 Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentration und Bestimmung der Effizienz	
.....	108
5.4.10 Anwendung der Sonde PI-Kunitz-P an 28 Kartoffelsorten und zwei Proteinpulvern	
.....	111
5.4.11 Überprüfung des Proteinpulvers	112
5.4.12 Kreuzreaktivität der Sonde PI-Kunitz-P	115
5.4.13 Nachweisgrenze (LOD ^{95%}).....	116
5.4.14 Robustheit	117
5.5 Anwendung der real-time PCR Methode	117
6. Diskussion.....	120
6.1 Herstellung einer Brühwurst mit Kartoffelprotein	120
6.1.1 pH-Wert.....	120
6.1.2 Textur-Profil-Analyse	120
6.1.3 Instrumentelle Farbanalyse	122
6.1.4 Lebensmittelsensorik (Verkostung).....	123
6.1.5 Nährwerte.....	124

6.1.6 Aminosäuren Zusammensetzung	124
6.2 DNA- basierte Methodenentwicklung zum Nachweis von Kartoffelprotein	125
6.2.1 Optimale Extraktionsmethode	125
6.2.2 Entwickelte real-time PCR Methode	126
7. Ausblick	131
Zusammenfassung	132
Abstract	133
References	134

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur der 2'-Desoxyribose und der einzelnen Basen (Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T), Cytosin (C)), verestert zum Polynukleotidstrang.....	12
Abbildung 2: Schematischer Aufbau der DNA.	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Polymerase Kettenreaktion.....	14
Abbildung 4: Bindung von SYBR™ Green an dsDNA führt zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals.....	15
Abbildung 5: DNA-Schmelzkurve. Die Ableitung der Änderung der Fluoreszenz (y-Achse) wurde gegen die Temperatur (x-Achse) aufgetragen.....	16
Abbildung 6: Hydrolyse-Sonde (TaqMan™-Assay).....	17
Abbildung 7: Schematische Darstellung der real-time PCR unter Verwendung einer MGB-Sonde.....	17
Abbildung 8: Real-time PCR Amplifikations-Kurve.....	18
Abbildung 9: Kraft-Verformungsdiagramm mehrerer Brühwurstmessungen	42
Abbildung 10: Koordinatensystem des CIELAB-Farbsystems.....	44
Abbildung 11: Beispiel eines Spektrums, erhalten mit dem Thermo Scientific NanoDrop™ 2000/2000c.	58
Abbildung 12: Ergebnisse der pH-Wert-Messungen der Würste des Vorversuches.....	73
Abbildung 13: Ergebnisse der pH-Wert-Messungen der Würste des Hauptversuches.....	73
Abbildung 14: Ergebnisse der Bruchfestigkeits-, Härte- und Gummiartigkeitsmessungen der Würste des Vorversuches	75
Abbildung 15: Ergebnisse der Bruchfestigkeits-, Härte- und Gummiartigkeitsmessungen der Würste des Hauptversuches.....	76
Abbildung 16: Ergebnisse der Kohäsionsmessungen der Würste des Vorversuches	76
Abbildung 17: Ergebnisse der Kohäsionsmessungen der Würste des Hauptversuches.....	77
Abbildung 18: Ergebnisse der Kaufähigkeitsmessungen der Würste des Vorversuches.....	78
Abbildung 19: Ergebnisse der Kaufähigkeitsmessungen der Würste des Hauptversuches...	78
Abbildung 20: Erscheinungsbild und Präsentation der Würste des Vorversuches zur sensorischen Verkostung	82
Abbildung 21: Ergebnisse der Lebensmittelsensorik der Würste des Vorversuches	83
Abbildung 22: Erscheinungsbild und Präsentation der Würste des Hauptversuches zur sensorischen Verkostung	84
Abbildung 23: Ergebnisse der Lebensmittelsensorik der Würste des Hauptversuches	84
Abbildung 24: Ergebnisse der Vollanalyse der Würste des Vorversuches	85
Abbildung 25: Ergebnisse der Vollanalyse der Würste des Hauptversuches	86
Abbildung 26: Amplifikationskurven der Kartoffel-DNA mit dem Primerpaar PP2A-I	93
Abbildung 27: Amplifikationskurven der Kartoffel-DNA mit dem Primerpaar PP2A-II	94

Abbildung 28: Amplifikationskurven der Kartoffel-DNA mit dem Primerpaar PI-I.....	94
Abbildung 29: Amplifikationskurven der Kartoffel-DNA mit dem Primerpaar PI-II.....	95
Abbildung 30: Ableitung der Schmelzkurven der PCR Produkte des Primerpaars PP2A-I der DNA-Proben.....	96
Abbildung 31: Ableitung der Schmelzkurven der PCR Produkte des Primerpaars PP2A-II der DNA-Proben.....	96
Abbildung 32: Ableitung der Schmelzkurven der PCR Produkte des Primerpaars PI-I der DNA-Proben	97
Abbildung 33: Ableitung der Schmelzkurven der PCR Produkte des Primerpaars PI-II der DNA-Proben	97
Abbildung 34: Amplifikationskurven der DNA aus Nachtschattengewächsen	99
Abbildung 35: Amplifikationskurven der DNA aus Nachtschattengewächsen	99
Abbildung 36: Amplifikationskurven der DNA von 28 Kartoffelsorten	100
Abbildung 37: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese (2,5 % Gel).....	101
Abbildung 38: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese	102
Abbildung 39: Alignment der Sequenz des Kartoffel-PCR-Produkts	105
Abbildung 40: Alignment der Sequenz des Kartoffel-PCR-Produkts	105
Abbildung 41: Alignment der Sequenz des Kartoffel-PCR-Produkts	105
Abbildung 42: Mehrfach-Alignment homologer Kartoffel-Sequenzen	106
Abbildung 43: Amplifikationskurven der DNA von 28 Kartoffelsorten	107
Abbildung 44: Amplifikationskurven der DNA von 28 Kartoffelsorten	108
Abbildung 45: Amplifikationskurve der Kartoffel-DNA	109
Abbildung 46: Standardgerade der Kartoffel-DNA	110
Abbildung 47: Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe der Kartoffel-DNA	110
Abbildung 48: Amplifikationskurven aller 28 Kartoffelsorten	111
Abbildung 49: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese der real-time PCR Produkte	111
Abbildung 50: Amplifikationskurven der DNA aus Kartoffeln.....	112
Abbildung 51: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese der real-time PCR Produkte	112
Abbildung 52: Amplifikationskurven der DNA aus Proteinpulver erhalten mit den 18SRG-Primern.....	113
Abbildung 53: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese	114
Abbildung 54: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese der real-time PCR Produkte	115
Abbildung 55: Statistische Auswertung des LOD ^{95%}	116
Abbildung 56: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese der real-time PCR Produkte	119

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Biologische Wertigkeit verschiedener Nahrungsmittelproteine	4
Tabelle 2: Chemikalien.	21
Tabelle 3: Kits und Enzyme.	22
Tabelle 4: Technische Geräte.	23
Tabelle 5: Verwendete Software.	25
Tabelle 6: Verbrauchsartikel	26
Tabelle 7: Zielsequenz in den ausgewählten Kartoffelgenen	27
Tabelle 8: Primer und ihre Sequenz unter Angabe der Nukleotid Anzahl.	28
Tabelle 9: Primerpaare	28
Tabelle 10: Sequenzier-Primer	29
Tabelle 11: Primer zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der DNA-Proben.	29
Tabelle 12: Fluorophore und Quencher unter Angabe der Absorptions- und Emissionswellenlänge und des Quenching Bereichs (Wellenlänge).	30
Tabelle 13: Sonden mit entsprechendem Fluorophor und Quencher.	31
Tabelle 14: Verwendete Rohstoffe zur Brühwurst-Herstellung.	31
Tabelle 15: Hergestellte Brühwurst- und Brätproben mit entsprechendem Prozentsatz an Kartoffelprotein.	32
Tabelle 16: Verwendete Kartoffelsorten unter Angabe des Herstellers.	33
Tabelle 17: Weitere getestete Nachtschattengewächse.	34
Tabelle 18: Getestete Gewürze und Gemüsearten.	35
Tabelle 19: Basisrezeptur zur Herstellung von Brühwürsten des Typs Lyoner im Vorversuch.	36
Tabelle 20: Menge an zugebenem Kartoffelproteinpulver pro Charge.	37
Tabelle 21: Tierisches Protein ersetzt durch 1 %, 2 %, oder 3 % pflanzliches Protein.	38
Tabelle 22: Basisrezeptur der Brühwürste des Typs Lyoner im Hauptversuch	38
Tabelle 23: Mengenangaben der Zutaten der einzelnen Chargen des Hauptversuches.	39
Tabelle 24: Lösungen zur Proteinbestimmung.	50
Tabelle 25: Programm der automatischen Wasserdampfdestillation.	50
Tabelle 26: Chemikalien zur Herstellung des Wizard® Extraktionspuffers.	53
Tabelle 27: Herstellung der verwendeten Lösungen für das Wizard® Kit.	53
Tabelle 28: Verwendete Chemikalien	56
Tabelle 29: Pipettierschema des Mastermixes der konventionellen PCR.	60
Tabelle 30: Temperaturprogramm der konventionellen PCR zur DNA-Vervielfältigung.	60
Tabelle 31: Chemikalien (gelöst in H ₂ O _{dd}) zur Herstellung von 1 L TBE-Puffer.	61
Tabelle 32: Verwendete Volumina der einzelnen DNA-Ladepuffer.	62
Tabelle 33: Verwendete Größen-Marker mit eingesetztem Volumen.	62

Tabelle 34: Standard Pipettierschema des Mastermix mit Fluoreszenzfarbstoff.	65
Tabelle 35: Standard Pipettierschema HotStarTaq® Mastermix mit Sonde.	65
Tabelle 36: Pipettierschema QuantiTect® Multiplex Mastermix.	66
Tabelle 37: Standard Temperaturprogramm der real-time PCR.....	66
Tabelle 38: Optimierung der Primer-, und Sonden-Konzentrationen.....	69
Tabelle 39: Verdünnungsstufen zur Bestimmung des LOD ^{95%}	70
Tabelle 40: Getestete Faktoren des real-time PCR Robustheitstests	71
Tabelle 41: Ergebnisse der Farbanalyse der Würste des Vorversuches.....	79
Tabelle 42: Ergebnisse der Farbanalyse der Würste des Hauptversuches.....	80
Tabelle 43: Konzentrationen (c) der 20 Aminosäuren der Würste des Vorversuches	87
Tabelle 44: Konzentrationen (c) der 20 Aminosäuren der Würste des Hauptversuches.....	89
Tabelle 45: Ergebnisse der DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen.....	90
Tabelle 46: Namen der Gene mit einer 100 %igen Übereinstimmung mit der Zielsequenz des Gens PI.	92
Tabelle 47: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Primer.	92
Tabelle 48: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Sonden.	92
Tabelle 49: Ergebnisse der Sequenzierung.	102
Tabelle 50: Homologe Sequenzen zur sequenzierten Zielsequenz.....	104
Tabelle 51: Theoretische Spezifität der neu designten Sonden	104
Tabelle 52: Ergebnisse der getesteten Primer- und Sonden-Kombination	109
Tabelle 53: Ergebnisse der Verdünnungsreihe zur Überprüfung auf Inhibitoren	113
Tabelle 54: Konzentration- und Reinheitsbestimmung.....	114
Tabelle 55: Ergebnisse der LOD ^{95%} Bestimmung.....	116
Tabelle 56: Ergebnisse des Robustheitstests	117
Tabelle 57: Ergebnisse der real-time PCR Analyse der Brät- und Wurstproben	118
Tabelle 58: Ergebnisse der real-time PCR Analyse der Brät- und Wurstproben	118

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Effizienz.....	19
Formel 2: Gesamtfarbdifferenz-Formel gemäß DIN 6176.	45
Formel 3: Berechnung des Wassergehaltes in g/100g.....	46
Formel 4: Berechnung der Trockenmasse.....	47
Formel 5: Berechnung des Aschegehaltes in g/100g.....	47
Formel 6: Berechnung des Gesamtfettgehaltes (w).	49
Formel 7: Berechnung des organischen Stickstoffs in Prozent.	51
Formel 8: Berechnung des Rohproteingehaltes.....	51
Formel 9: Lambert Beer'sches Gesetz.	57
Formel 10: Formel zur Berechnung der Kopien-Anzahl pro μL	70

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
ΔE^*ab	Gesamtfarbdifferenz
A, T, G, C	Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin
A1	Textur-Profil-Analyse: Fläche nach der ersten Belastung
A2	Textur-Profil-Analyse: Fläche nach der zweiten Belastung
AAS	<i>amino acid score</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
Bc	Bruchfestigkeit
BE	Bindegewebseiweiß
BEFFE	Bindegewebseiweißfreies Fleischeiweiß
BW	Biologische Wertigkeit
Cc	Kohäsion
CIE	Franz. Commission Internationale del' Éclairage
Cq-Wert	<i>quantification cycle</i>
CS	<i>chemical score</i>
-d(RFU)/dt	Erste Ableitung der relativen Fluoreszenz
DFD	<i>dark, firm, dry</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
dsDNA	<i>double stranded deoxyribonucleic acid</i>
Ec	Elastizität
Fc	Härte
Gc	Gummiartigkeit
gDNA	Genomische DNA
H ₂ O _{dd}	Wasser für molekularbiologische Analysen (doppelt destilliert)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
L*, a*, b*	Farbmaßzahlen des CIELAB-Systems
LFGB	Lebensmittel und Futtermittelgesetzbuch
MGB	<i>minor groove binder</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
nt	Nukleotid
NTC	Negativ-Kontrolle
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDCAAS	<i>protein digestibility corrected amino acid score</i>
PER	<i>protein efficiency ratio</i>

Abkürzungsverzeichnis

PI	Protease Inhibitor
PP	Protein Phosphatase
PSE	<i>pale, soft, exudative</i>
RFU	<i>relative fluorescence unit</i>
S I – S X	Deutsche Qualitätsstufen von Schweinefleisch
Taq.	Thermus aquaticus
Tm	Schmelztemperatur
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
VIS	Visueller Absorptionsbereich

1. Einleitung

Neben Wasser, Kohlenhydraten und Fetten zählen Proteine zu den Makronährstoffen der menschlichen Ernährung (Elmadfa & Meyer, 2019). Dabei können Proteine über tierische Nahrungsmittel wie Fleisch und Milchprodukte aufgenommen werden oder über pflanzliche Nahrungsmittel wie z.B. Hülsenfrüchte (Ustunol, 2015). Prognostiziert wird, dass der Fleischkonsum weltweit bis 2029 durch das vermehrte Bevölkerungswachstum ansteigen wird. Dazu kommt, dass das pro Kopf Einkommen in Entwicklungsländern zunehmen wird und Fleisch somit für größere Bevölkerungsgruppen zugänglich wird. Deutliche Unterschiede wird es bei den einzelnen Tierarten geben. 28 % des gesamten Anstiegs weltweit wird bei Schweinefleisch erwartet. Parallel wird in der Europäischen Union ein Rückgang prognostiziert. Die Gründe dafür sind unter anderem Umwelt-, Ethik- und Gesundheitsaspekte (OECD-FAO, 2020). Um die Versorgung der Bevölkerung bei steigender Bevölkerungszahlen mit Proteinen zu gewährleisten, als auch Umweltaspekte und ethische Hintergründe zu berücksichtigen, stellen Fleischanaloga aus pflanzlichem Protein eine Alternative dar. Zum Beispiel besitzt pflanzliches Protein den Vorteil, dass für den Anbau der jeweiligen Pflanzen weniger Fläche und weniger Wasser im Vergleich zur Tierzucht verbraucht wird (Aiking, 2011). Fleisch- und Wurstanaloga (auf Pflanzenbasis) werden bereits als Fertiggerichte eingesetzt. Diese gehen allerdings häufig mit zahlreichen Aromen und Zusatzstoffen einher, ebenso fehlt ihnen häufig das Vitamin B12. Somit besitzen diese Produkte nicht zwangsläufig einen Mehrwert (Alexy et al., 2017). Um den ursprünglichen sensorischen Eindruck von Fleisch und Wurstwaren zu bewahren sind hybride Modelle aus tierischem Muskelprotein und pflanzlichem Protein eine Möglichkeit einer alternativen Proteinquelle, in der die Vorteile pflanzlicher und tierischer Proteine kombiniert werden. In Europa werden bereits erste Hybrid-Produkte für die Verbraucher*innen angeboten (Grasso, 2020).

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, Brühwürste mit einem ausreichend hohen Anteil an Kartoffelprotein zu entwickeln, welche die Prüfung der verwendeten Qualitätsparameter bestehen und der Verbrauchererwartung entsprechen. Im Zuge dieser Arbeit sollten somit Brühwürste des Typs Lyoner mit Kartoffelproteinpulver im Pilotmaßstab entwickelt und hergestellt werden. Die Qualität der Produkte sollte unter Verwendung relevanter sensorischer Parameter (Textur, Farbe, usw.) instrumentell als auch hedonisch analysiert werden. Ebenso sollten die ernährungsphysiologischen Qualitätsparameter (Wassergehalt, Asche, Fett und Protein) sowie der Aminosäuregehalt bestimmt werden.

Zur Prüfung der Authentizität ist es weiterhin wichtig, eine selektive und empfindliche Methode zum Nachweis dieses Kartoffelproteins in Fleischprodukten zu entwickeln. Im Rahmen dieser Masterarbeit sollte deshalb ebenso ein real-time PCR System bestehend aus Primern und Sonde für den spezifischen Nachweis von Kartoffelprotein in Wurstwaren entwickelt werden. Dabei sollte zunächst die optimale Methode zur Isolierung der Kartoffel-DNA aus verschiedenen Teilen der Kartoffel ermittelt werden. Des Weiteren sollte eine ausreichend hohe Spezifität mit der Methode erreicht werden. Ebenso sollte die Methode ausreichend robust sein. Abschließend sollte das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte real-time PCR System an den eigens hergestellten Wurst-Produkten mit Kartoffelprotein angewendet werden.

3. Theoretischer Hintergrund

3.1 Proteine

Proteine sind Polymere, die aus mehreren Aminosäuren bestehen, welche wiederum über eine oder mehrere Peptidbindungen kovalent miteinander verknüpft sind. Aminosäuren besitzen eine NH_2 - und eine COOH -Gruppe am α -C-Atom. Sie unterscheiden sich in ihren Seitenketten. Insgesamt gibt es 20 verschiedene proteinogene Aminosäuren: Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin (Elmadfa & Meyer, 2019).

3.1.1 Bedeutung von Proteinen in der menschlichen Ernährung

Im menschlichen Körper erfüllen Proteine unterschiedliche Zwecke. Zum einen dienen sie der Synthese von Körpergewebe, z.B. Muskelgewebe und Bindegewebe, vor allem in Wachstumsphasen und während der Zellteilung. Des Weiteren werden sie für die Synthese von körpereigenen Proteinen wie z.B. Immunproteinen oder Transportproteinen benötigt. Zum anderen dienen sie als Energiequelle. Bei der Verstoffwechselung werden bis zu vier Kilokalorien pro Gramm Protein frei. Dies deckt aber nur in geringem Maße den menschlichen Energiebedarf (Elmadfa & Meyer, 2019).

3.1.2 Qualität von Nahrungsproteinen

Die Qualität von Nahrungsproteinen wird von der Menge essentieller (werden vom Körper selbst nicht hergestellt und müssen über die Nahrung aufgenommen werden) und nicht essentieller Aminosäuren bestimmt, ebenso von ihrem Verhältnis und von ihrer Bioverfügbarkeit (Elmadfa & Meyer, 2019). Die biologische Wertigkeit (BW) eines Proteins bezeichnet die Fähigkeit, durch Nahrung aufgenommene Proteine in körpereigene umzuwandeln. Durch die Kombination verschiedener Proteinquellen mit unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzungen lässt sich die BW erhöhen (Biesalski et al., 2004). Einige Beispiele für die ursprüngliche BW und die Erhöhung durch die Kombination von tierischem und pflanzlichem Protein sind in Tabelle 1 zu sehen.

Tabelle 1: Biologische Wertigkeit verschiedener Nahrungsmittelproteine und vorteilhafte Kombinationen (Elmadfa & Meyer, 2019).

Quelle der Nahrungsmittelproteine	Biologische Wertigkeit
Hühner-Vollei	100
Schweinefleisch	85
Kartoffeln	76
Kuhmilch	72
Bohnen	72
36 % Vollei + 64 % Kartoffeln *	136
75 % Milch + 25 % Weizenmehl *	125
52 % Bohnen + 48 % Mais *	99

* Die Mischverhältnisse beziehen sich auf den Stickstoff-, bzw. Proteingehalt der Nahrungsmittel.

Um den Nährwert bzw. die Eiweißqualität eines Produktes oder Lebensmittels zu bestimmen, gibt es neben der BW weitere Methoden. Unter anderem können folgende Ernährungsparameter verwendet und berechnet werden: *Protein Efficiency Ration* (PER) und der *Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score* (PDCAAS) (Elmadfa & Meyer, 2019).

3.2 Die Kartoffel als Proteinquelle

Die Kartoffel (*Solanum tuberosum*) wurde von spanischen Eroberern aus Südamerika nach Europa gebracht. Heutzutage spielt sie eine wichtige Rolle in der europäischen Ernährung (Hardin B., 1991). Es handelt sich bei der Kartoffel um eine Pflanze der Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) (Bohs & Olmstead, 1997). In der Europäischen Union (27 Länder) wurden 2020 53,3 Millionen Tonnen Kartoffeln geerntet (Statistisches Amt der Europäischen Union (Eurostat), 2021). Ca. 31 % der geernteten Kartoffeln werden in Europa zur Stärkegewinnung verwendet (Union der Deutschen Kartoffelwirtschaft e.V. (UNIKA), 2019). Bei der industriellen Gewinnung von Stärke aus Kartoffeln kann als Nebenprodukt das Kartoffelprotein isoliert werden. Bisher wurde dieses Protein als Düngemittel oder Tierfutterzusatzstoff verwendet (Darwish et al., 2003).

Da es sich bei der Kartoffel um ein natürliches Produkt handelt, schwanken ihre Inhaltsstoffe je nach Sorte und Klima. Allgemein ist zu sagen, dass der Wasseranteil bei 77,8 g/100g essbarem Anteil liegt, der Kohlenhydratgehalt bei 14,8 g/100g, der Eiweißgehalt bei 2,0 g/100g, Ballstoffgehalt bei ca. 2,1 g/100g, Mineralstoffgehalt bei 1,0 g/100g und der Fettgehalt bei 0,1 g/100g. In einer durchschnittlichen Speisekartoffel befinden sich zudem ca. 14,1 g Stärke/100g, in industriell verwendeten Kartoffeln speziell für die Stärkeherstellung dementsprechend mehr (Souci et al., 2004).

3.2.1 Kartoffelproteine

Die Trockenmasse des Kartoffelsaftes besteht aus 35 % Protein, 35 % Zucker, 20 % Mineralstoffen, 4 % organischen Säuren und 6 % chlorogenen Säuren (Knorr, 1977). Diese reaktiven chlorogenen oder phenolischen Verbindungen spielen eine entscheidende Rolle bei der Proteinrückgewinnung aus dem Kartoffelsaft (Alting et al., 2011). Die in Wasser löslichen Proteine können in drei Gruppen eingeteilt werden: Patatine (30 - 40 %) (Racusen & Foote, 1980), Protease-Inhibitoren (40 - 50 %) und andere Enzyme wie Kinasen oder solche, die vor allem in die Stärke-Synthese involviert sind (Pouvreau et al., 2001). In der Kartoffel wirken Patatine enzymatisch als Lipidacylhydrolasen und Acyltransferasen (Andrews et al., 1988). Protease-Inhibitoren werden durch Insekten, Krankheitserreger oder Umweltstress induziert. In Pflanzen kommen sie in Speicherorganen wie Samen, Knollen, Fortpflanzungsorganen und in vegetativen Zellen vor (Jongsma, 1995).

3.2.2 Physiologische Bedeutung von Kartoffelproteinen

Die Aminosäurezusammensetzung von Kartoffelproteinisolaten unterscheidet sich deutlich von der der ganzen Kartoffel. Dieser Unterschied ist bei Wurzeln und Knollenkulturen mit einem hohen Wassergehalt im Gegensatz zu Proteinen, die aus Samen stammen, üblich. In einer Kartoffel befinden sich ca. 0,4 - 0,6 % freie Aminosäuren und kleine Peptide. Diese Fraktion ist relativ reich an Glutamat, Aspartat und Asparagin (Alting et al., 2011; Hughes, 1958). Im Vergleich zu Soja und Weizen weist Kartoffelproteinisolat den höchsten PDCAAS- und PER-Wert der pflanzlichen Proteine auf (Alting et al., 2011). Die biologische Wertigkeit von Kartoffelprotein (76) (Elmadfa & Meyer, 2019) ist nicht sortenspezifisch, sondern eher vom Standort und entsprechenden Virusinfektionen abhängig (Schuphan & Weinmann, 1959). Auch ökologische Faktoren beeinflussen die Aminosäurezusammensetzung. So spielt die Düngung eine wichtige Rolle, denn eine erhöhte Stickstoffgabe führt zu einem höheren Aminosäuregehalt (30 - 40 %) (Mulder, 1955).

3.2.3 Gewinnung und Verwendung von Kartoffelprotein

Kartoffelprotein wird hauptsächlich aus dem Kartoffelsaft gewonnen, welcher bei der Verarbeitung von Kartoffeln (hauptsächlich zur Stärkegewinnung) freigesetzt wird. Aus dem sogenannten Kartoffelverarbeitungswasser können in drei Schritten Proteine gewonnen werden: Proteinkoagulation (Ausfällung), Trennung (Entwässerung) und Trocknung. Zudem kann anschließend auch ein Konzentrationsschritt durchgeführt werden. Nebenprodukte wie Aminosäuren, organische Säuren oder Kaliumphosphate können nach der Proteinkoagulation im Proteinwasser verbleiben (Knorr, 1977).

Neben der Verwendung als Futtermittel wird Kartoffelprotein heutzutage vermehrt in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt, vor allem in der Backwaren- und Dessertindustrie. Zum Beispiel aufgrund der hohen Löslichkeit und anderer vorteilhafter Eigenschaften können Kartoffelproteine als Schaumbildner (van Koningsveld et al., 2002) oder zur Herstellung von Emulsionen (van Koningsveld et al., 2006) eingesetzt werden. Dabei spielt der Gedanke, tierische Proteine durch pflanzliche zu ersetzen, eine durchaus wichtige Rolle.

3.3 Fleisch

Laut Definition der deutschen Leitsätze bedeutet der Begriff „Fleisch“, „alle Teile von geschlachteten oder erlegten warmblütigen Tieren, die zum Genuss für den Menschen bestimmt sind“. Genauer gesagt ist dies die Skelettmuskulatur von Tieren (Säugetiere und Vögel), die für den menschlichen Verzehr geeignet sind. Dazu zählt ebenso das Bindegewebe dieser Tiere als auch das eingebettete Fettgewebe (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2015) .

3.3.1 Zusammensetzung von Fleisch

Da es sich bei Fleisch um ein natürliches Produkt handelt, schwankt die Zusammensetzung je nach Muskelpartie, Tierart, Alter und Aufzucht der Tiere. Mageres Muskelfleisch besteht hauptsächlich aus Wasser (75 %) und Proteinen (20 %). Dabei liegt das Wasser überwiegend immobilisiert zwischen myofibrillären Proteinen vor, oder ist als Hydratwasser an Proteine gebunden und liegt somit nicht frei vor. Kohlenhydrate kommen nur in einem geringen Maß im Frischgewebe vor (0,02 - 1 %). Am häufigsten ist dabei Glykogen, welches allerdings *post mortem* zu Milchsäure abgebaut wird (Rimbach et al., 2015). Der Fettgehalt von Fleisch variiert je nach Gewebeart stark (Callow, 1948) und beträgt im Schnitt 3 % (Ustunol, 2015). Vitamine kommen als B-Vitamine vermehrt in Fleisch vor. Vor allem Thiamin (B1), Riboflavin (B2), Pyridoxin (B6) und Cobalamin (B12) sind in größeren Mengen enthalten. Allerdings sind diese Vitamine nicht hitzestabil. Des Weiteren kommen die Mineralstoffe Eisen und Zink in Muskelfleisch vor. Eisen liegt dabei als Hämoglobin-, Myoglobin- und Ferritin-Eisen vor (Rimbach et al., 2015).

3.3.2 Fleisch als Proteinquelle

Die Einteilung der muskulären Proteine erfolgt in die Gruppen der myofibrillären-, der sarkoplasmatischen- und der Bindegewebsproteine. Den größten Anteil der myofibrillären Proteine bilden Myosin und Aktin. Zu den sarkoplasmatischen Proteinen gehören Myoglobin, Hämoglobin und glykolytische Enzyme. Beispiele für Bindegewebsproteine sind Kollagen, Elastin und Mitochondrienproteine (Rimbach et al., 2015). Nachfolgend werden einige wichtige Muskelproteine genauer in ihrer Funktion, im Zusammenhang mit Fleisch und Fleischerzeugnissen, beschrieben.

Myofibrilläre Proteine stellen 60 % der muskulären Proteine (Zayas, 1997). Sie spielen die entscheidende Rolle für den Strukturaufbau und somit die Textur von Fleisch und Fleischerzeugnissen (Zayas, 1997; Culioli et al., 1993). Sie besitzen die Fähigkeit, dreidimensionale viskoelastische Gele zu bilden und Wasser zu binden. Ebenso bilden sie kohäsive Membranen an der Öl/Wasser Grenzfläche. Dabei tragen hauptsächlich Aktin, Myosin und Aktomyosin zu den funktionellen Eigenschaften von Fleisch z.B. zur emulgierenden Wirkung bei (Li-Chan et al., 1985). Das Protein Myoglobin ist verantwortlich für die typische rote Farbe von frischem Fleisch. Es besitzt eine Häm-Gruppe und kann somit Sauerstoff binden (Gaonkar & McPherson, 2006).

3.4 Fleischerzeugnisse und Wurstwaren

„Fleischerzeugnisse“, auch Fleischprodukte genannt, „sind Erzeugnisse, die ausschließlich oder überwiegend aus Fleisch bestehen“. Der Begriff „Wurstwaren“ beschreibt „schnittfeste oder streichfähige Gemenge aus zerkleinertem Fleisch und Fettgewebe unter Verwendung geschmacksgebender oder technologisch begründeter Zutaten“ (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2015). Alleine in Deutschland sind über 1.500 verschiedene Wurstsorten in unterschiedlichen Ausführungen zu finden. Sie werden in Roh-, Brüh-, Koch- und Bratwürste unterteilt (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2015; Rimbach et al., 2015).

3.4.1 Brühwürste

„Brühwürste“ sind durch Brühen, Backen, Braten oder auf andere Weise hitzebehandelte Wurstwaren. Dabei wird zerkleinertes rohes Fleisch mit Kochsalz und gegebenenfalls anderen technologisch notwendigen Salzen unter dem Zusatz von Trinkwasser ganz oder teilweise aufgeschlossen. Unter Hitzebehandlung koaguliert das Muskeleiweiß mehr oder weniger zusammenhängend, sodass die Erzeugnisse bei etwaigem erneuten Erhitzen schnittfest bleiben (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2015). Ein typisches Merkmal ist zudem die Umrötung der Wurst mit Nitrit. Dabei wird Myoglobin zu Stickoxidmyoglobin. Die Farbe des Fleisches wechselt von purpurrot zu leuchtend rot (Potthast, 1987). Laut Leitsätzen besteht eine „Brühwurst, fein zerkleinert“, zu welcher Gruppe die Lyoner gehört, aus grob entsehtem Rindfleisch, grob entsehtem Kalb-/Jungrindfleisch, grob entfettetem Schweinefleisch, fettgewebereichem Schweinefleisch und Speck (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2015). Das Fleisch kann dabei in Deutschland in verschiedenen Qualitätsstufen, die nach Tierart sortiert werden, eingeteilt werden. So wird Schweinefleisch von S I bis S X eingeteilt. Für die Herstellung von „Brühwurst, fein zerkleinert“ wird häufig Fleisch des Standards S III „Feinbrätmaterial; mageres Kutterfleisch mit einem höheren Sehnenanteil; sichtbarer Fettanteil: max. 10 %“ (Gewürzmüller & Fleischereiberatung Hack (GEHA), 2018), verwendet.

3.4.2 Technologie der Brühwurstherstellung

Brühwürste (fein zerkleinert) sind emulgierte Fleischerzeugnisse, deren Partikel so fein sind, dass sie visuell nicht mehr wahrnehmbar sind. Emulgierte Fleischerzeugnisse können wiederum in „heiß emulgierte“ und „kalt emulgierte“ (Kaltbräten) unterteilt werden. Bei heiß emulgierten Brühwürsten wird das Fett in flüssigem, erhitztem Zustand zugegeben, bei kalt emulgierten Würsten im kalten, nativen Zustand. Die häufigste Methode ist dabei das „kalt Emulgieren“. Kalt emulgierte Würste bilden eher eine Multiphasen-Matrix anstatt einer typischen Emulsion, da es sich um eine Mischung aus gelöstem Fett und Fetttropfchen zusammen mit Luftbläschen handelt. Die andere Phase ist eine Mischung aus Proteinen, Wasser, Salz und Kohlenhydraten (Toldrá, 2010).

Das wichtigste Ausgangsmaterial im Herstellungsprozess von Brühwürsten ist das Fleisch von Säugetieren oder Geflügel, genauer als Skelettmuskulatur bezeichnet. Diese bindet bei der Erhitzung kochfest und sorgt somit für die schnittfeste Struktur (Koch & Fuchs, 2009). Das Protein Myosin hat dabei hauptsächlich die emulgierende Wirkung, aufgrund seines hydrophoben Kopfes und des hydrophilen Schwanzes (Dikeman et al., 2004). Als weitere Zutat wird Nitritpökelsalz verwendet, welches der Haltbarmachung und der Farberhaltung durch Umrötung dient (Potthast, 1987). Phosphate erhöhen die Wasserbindekapazität (Heinz & Hautzinger, 2007) und dienen der Stabilisierung der Farbe (Fernández-Martín et al., 1997). Anschließend wird das Kuttereis zugegeben, wodurch eine Protein-Lösung entsteht und die Temperatur niedrig gehalten wird (Dikeman et al., 2004). Das Brät hat zu diesem Zeitpunkt ca. 1°C. Danach werden das Fett und die restlichen Zutaten hinzugegeben und es beginnt die Strukturierung der Masse. Das tierische Fett dient dabei der Textur- und Geschmacksbildung (Lebret et al., 1996). Weitere Zutaten, wie z.B. Gewürze, dienen der Geschmacksbildung. Durch den Brühvorgang wird die Struktur verfestigt (Toldrá, 2010).

3.5 Hybride Fleischerzeugnisse

Zunächst ist es wichtig, den Unterschied zwischen hybriden Fleischerzeugnissen und Fleischerzeugnissen mit funktionellen, pflanzlichen Proteinen oder Füllstoffen zu verdeutlichen. Nach den deutschen Leitsätzen dürfen Fleischerzeugnissen pflanzliche Proteine zugesetzt werden, so lange dies technologisch oder geschmacklich begründet wird (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2015). Der Unterschied zwischen den beiden Produkten liegt somit im Zweck der Mischung von Fleisch und pflanzlichem Protein. Traditionell pflanzliche funktionelle Inhaltsstoffe werden hauptsächlich aus wirtschaftlichen und technologischen Gründen verwendet. Hybride Fleischerzeugnisse werden entwickelt, um ein proteinhaltiges Lebensmittel zu erhalten, welches die Umweltbelastung durch Tierzucht verringert und trotzdem einen fleischähnlichen Geschmack erzeugt (Grasso, 2020). Auf dem internationalen Markt konnten sich bereits hybride Fleischerzeugnisse etablieren.

Auf dem Großbritannischen Markt sind Würste oder Burger Pattys mit einer Mischung aus tierischem und pflanzlichem Protein erhältlich. Der Fleischanteil wurde hierbei um 25 - 50 % reduziert (Grasso, 2020). Des Weiteren konnte im Rahmen der Wissenschaft eine Wurst mit Chiamehl und Sojaprotein hergestellt werden (Souza et al., 2015) , ebenso hybride Chicken Nuggets mit Erbsen-, Sonnenblumen- oder Kürbisprotein. Hierbei wurden texturierte Proteinisolate oder Proteinmehle verwendet (Baune et al., 2020).

3.5.1 Kennzeichnung: Fremdprotein in Wurstwaren

Rechtlich gesehen wird pflanzliches Protein in Wurstwaren als Fremdeiweiß bezeichnet. Fremdeiweiß ist Eiweiß , welches nicht von geschlachteten oder erlegten warmblütigen Tieren stammt (z.B. Eiklar, Fischeiweiß, Sojaeiweiß) (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2015). Wird Fremdeiweiß bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen verwendet, so wird die Bezeichnung des Lebensmittels um die Angabe dieser Zutaten ergänzt. Ausgenommen ist hiervon die Speisegelatine (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2015).

Es müssen solche Lebensmittel gekennzeichnet werden, von dem die Verbraucher*innen erwarten würden, dass ein Bestandteil oder eine Zutat welcher/welche üblicherweise verwendet wird oder von Natur aus vorhanden ist, durch eine andere Zutat ersetzt wurde. Diese Kennzeichnung muss zusätzlich zum Zutatenverzeichnis, mit einer deutlichen Angabe der Zutat in unmittelbarer Nähe zum Produktamen stehen. Dabei muss deutlich werden, welcher Bestandteil des Produktes teilweise oder vollständig ersetzt wurde. Bei Fleischerzeugnissen, sind die zugesetzten oder ersetzten Eiweiße in die Bezeichnung des Lebensmittels einzubringen, mit einem Hinweis auf das Vorhandensein dieser Eiweiße und ihren Ursprung. Zudem kann es sich bei den verwendeten Eiweißen um allergene Bestandteile handeln, welche zum Schutz der Gesundheit der Verbraucher*innen gekennzeichnet sein müssen (Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union, 2011).

3.5.2 Qualität und Verbrauchererwartung

Die Definition der Qualität von Fleisch besagt: „Die Fleischqualität ist die Summe aller sensorischen und ernährungsphysiologischen, hygienisch-toxischen und verarbeitungstechnologischen Eigenschaften des Fleisches“. Allgemein nach der DIN-Norm 55350, Teil II, ist „Qualität“ definiert als die „Gesamtheit von Eigenschaften und Merkmalen eines Produktes bezogen auf deren Eignung zur Erfüllung gegebener Erfordernisse“ (Deutsches Institut für Normung e.V., 1987). Die gegebenen Erfordernisse bei Fleisch und Fleischerzeugnissen sind hier sensorische-, Nährwert-, hygienische-, und technologische Faktoren (Hofmann, 1973).

3.5.2.1 Sensorische Faktoren

Zu den sensorischen Faktoren gehören u.a. die Farbe, die Festigkeit, der Geruch und der Geschmack (Hofmann, 1987). Diese lassen sich hedonisch über die Sinnesorgane des Menschen oder instrumentell mit entsprechenden Messgeräten (Farbe und Festigkeit) erfassen (Klettner, 1995, 1994).

3.5.2.2 Nährwertfaktoren

Im Rahmen des Nährwertfaktors spielen bei Fleisch und Fleischerzeugnissen vor allem der Gehalt an Protein, Fett, Mineralstoffen und Vitaminen eine wichtige Rolle, ebenso der Kaloriengehalt und der Wassergehalt (Hofmann, 1987). Der Wassergehalt der Wurst ist wichtig im Zusammenhang mit dem Wasserbindevermögen des Fleisches als auch des Kartoffelproteins. Dies wiederum hat einen bedeutenden Einfluss auf die Textur der Wurst und ihre entsprechende Sensorik. Des Weiteren werden die Nährwertangaben Fett und Eiweiß auf die Trockenmasse bezogen (Matissek et al., 2014).

3.5.2.3 Hygienische Faktoren

Zu den hygienischen Faktoren zählt vor allem, dass für den Verbraucher vom Produkt kein gesundheitliches Risiko ausgehen darf. Dies gilt sowohl für Mikroorganismen als auch für eventuell toxische Zusatzstoffe wie z.B. Nitritpökelsalz. Des Weiteren zählt auch der pH-Wert zu den hygienischen Faktoren, da dieser die Haltbarkeit ebenso beeinflusst (Hofmann, 1987). Der pH-Wert des rohen Fleisches als auch des Brätes ist ein Qualitätsparameter, mit Hilfe dessen die Verwendung von blassem (*pale*), weichem (*soft*) und wässrigem (*exudative*) Fleisch (PSE-Fleisch) vermieden werden kann, ebenso von dunklem (*dark*), festem (*firm*) und trockenem (*dry*) Fleisch (DFD-Fleisch) (Kerth, 2013).

3.5.2.4 Technologische Faktoren

Die technologischen Faktoren beeinflussen die Verarbeitung des Fleisches zu z.B. Wurstwaren. Gleichzeitig gehören diese häufig auch zu den Bereichen der anderen drei Faktoren. Beispiele sind der pH-Wert, die Struktur, die Farbe oder der Gehalt an Protein und Fett (Hofmann, 1987).

3.5.2.5 Subjektive Qualitätsparameter

Zu den objektiv erfassbaren Eigenschaften kommt beim Begriff „Qualität“ noch die subjektive Bedeutung hinzu. Dies ist die Wertschätzung eines Produktes durch Konsument*innen. Somit beeinflussen die Wahrnehmung eines neuen Produktes auch Vorlieben, psychologische Aspekte sowie Marketingaspekte (Font-I-Furnols & Guerrero, 2014). In der Vergangenheit zeigte sich bereits, dass Konsumenten jene hybriden Fleischprodukte bevorzugen, welche dem originalen Produkt sehr ähnlich sind (Hoek et al., 2011), vor allem im Geschmack und der Textur (Hoek et al., 2013).

3.6 Nachweismethoden von Fremdeiweiß in Fleischerzeugnissen

Aufgrund des hohen Verarbeitungsgrades ist es besonders bei fein zerkleinerten Fleischerzeugnissen möglich, Fremdeiweiß unterzumischen. Dies ist häufig für die Verbraucher*innen nicht direkt wahrnehmbar. Dieses Fremdeiweiß kann mittels instrumenteller, analytischer Methoden nachgewiesen werden. Der direkte instrumentelle Nachweis von Fremdeiweiß erfolgt über die Spaltung der Proteine in Peptide. Diese spezifischen Peptidmuster können anschließend per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) (Castro et al., 2005) und Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) (Hoffmann et al., 2017) nachgewiesen werden, ebenso per Perfusionsflüssigkeitschromatographie (Criado et al., 2005) oder einer Ultra-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie- (UHPLC) MS/MS-Methode (Spörl et al., 2021). Mit der HPLC-Methode kann eine Bestimmungsgrenze von 0,28 % Sojaprotein in einem Fleischprodukt und eine Nachweisgrenze von 0,08 % erhalten werden (Castro et al., 2005). Die Nachweisgrenze der MS/MS-Methode schwankt dabei zwischen 2 mg/kg (Lupine), 4 mg/kg (Soja) und 5 mg/kg (Erbse) pflanzlichem Protein pro Fleischprodukt (Hoffmann et al., 2017).

Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden ist ein Nachweis auf Ebene der Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) möglich. Bei der Zugabe von pflanzlichem Protein kann dieses aufgrund der genetischen Unterschiede der einzelnen Pflanzenarten im Vergleich zur tierischen DNA nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgt anhand spezifischer Sequenzen mit Hilfe der real-time PCR Methode. Die Bestimmungsgrenze verschiedener real-time PCR Systeme schwankt zwischen 5-500 ppm zugegebenem pflanzlichem Protein (Dolch et al., 2019) (Şakalar, 2015).

3.6.1 Nachweis von Fremdeiweiß auf DNA-Ebene

Die Grundlage der Erbanlagen jedes Lebewesens bildet die DNA. Die DNA besteht aus Nukleotiden, welche aus drei Bestandteilen aufgebaut sind: Der Pentose (2'-Desoxyribose), einem Phosphatrest und aus einer von vier Basen (Adenin (A) Thymin (T), Cytosin (C) oder Guanin (G)). Nukleotide sind über die 3'-OH-Gruppe am Phosphatrest mit dem 5'-Kohlenstoffatom eines anderen Nukleotids verestert (Abbildung 1). Wird diese Verknüpfung fortgeführt, entsteht eine Sequenz bzw. ein Polynukleotidstrang. Gelesen wird die Sequenz ausgehend vom 5'-Phosphat (5'-Ende) in Richtung der 3'-OH-Gruppe (3'-Ende). Die Anordnung der Basen ist bei jedem Lebewesen individuell. Es paaren jeweils die Basen A und T sowie die Basen G und C. Die Polynukleotidstränge sind dabei komplementär zueinander. Zwischen den komplementären Basen entstehen Wasserstoffbrückenbindungen (Abbildung 2). In Zellen liegt die DNA doppelsträngig, in Form einer rechtsgängigen Doppelhelix, vor.

3. Theoretischer Hintergrund

Die individuelle DNA-Sequenz wird während der Transkription in die messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) umgeschrieben. Diese mRNA codiert anschließend während der Translation für die entsprechenden Aminosäuren und somit auch für die jeweiligen Proteine einer Spezies (Schmidt, 2017).

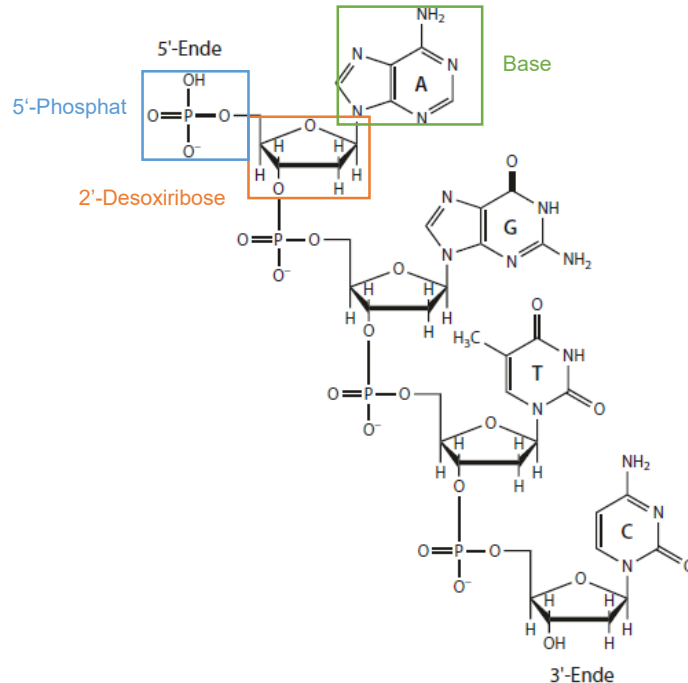


Abbildung 1: Chemische Struktur der 2'-Desoxyribose und der einzelnen Basen (Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T), Cytosin (C)), verestert zum Polynukleotidstrang. Abbildung abgeändert. (Schmidt, 2017).

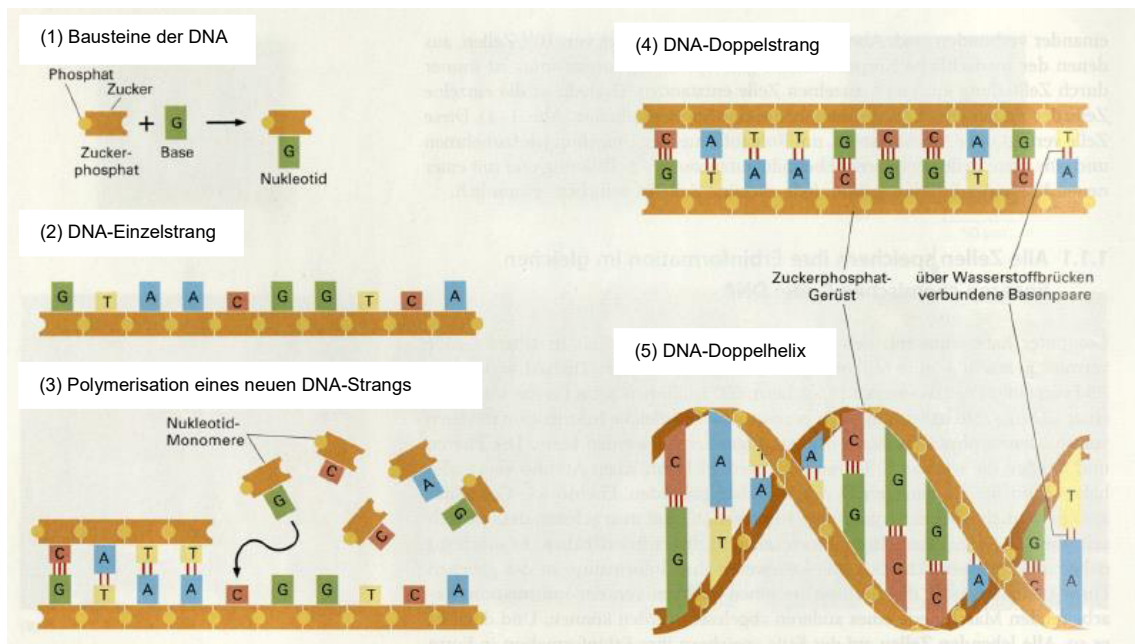


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der DNA. (1) Untereinheiten der DNA. (2) Aufbau des DNA-Strangs. (3) Polymerisation unter spezifischer Basenpaarung. (4) Der DNA-Doppelstrang, verknüpft durch Wasserstoffbrückenbindungen. (5) Rechtsgängige Doppelhelix. Abbildung abgeändert (Alberts et al., 2017).

3.6.2 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Im Jahr 1971 wurde von Kleppe *et. al.* erstmals eine Methode zur *in vitro* Amplifikation einzelsträngiger DNA mit Hilfe einer Polymerase und spezifischen Primern beschrieben (Kleppe et al., 1971). Diese Methode hatte allerdings erst ihren Durchbruch, als aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) eine DNA-Polymerase isoliert werden konnte, die bei hohen Reaktionstemperaturen nicht degradierte und somit nicht nach jedem Zyklus neu hinzugegeben werden musste (Saiki et al., 1988). Bei der Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) handelt es sich um eine enzymatisch katalysierte Amplifizierung kleinster Mengen DNA. Durch gegenläufige Primer können, mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase, DNA Abschnitte sequenzspezifisch vom 3'-Ende aus synthetisiert werden. Dieser Prozess kann zyklisch wiederholt werden, so dass eine Zielsequenz exponentiell vervielfältigt werden kann (Saiki et al., 1988).

3.6.2.1 Ablauf der PCR

Die PCR läuft in drei Phasen ab: Denaturierung, Annealing und Elongation (siehe Abbildung 3). Für jeden Schritt ist ein anderes Temperaturprofil nötig. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird die doppelsträngige DNA (dsDNA) bei einer Temperatur von 92 - 95 °C aufgeschmolzen und liegt anschließend einzelsträngig vor. Als nächstes lagern sich die Primer an den Einzelstrang an (Annealing). Je ein Primer lagert sich am 3'-Ende des einen Strangs und am 3'-Ende des komplementären Strangs an. Dies geschieht bei einer Temperatur von 40 – 60 °C. Im dritten Schritt, der Elongation, verlängert die DNA-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) den vorherigen Einzelstrang zu einem Doppelstrang. Die Elongation findet in der Regel bei 72 °C statt. So entsteht aus einem ursprünglichen Doppelstrang ein zweiter. Anschließend beginnt ein neuer Zyklus und die Menge des DNA-Strangs steigt (theoretisch) exponentiell. Ab einer gewissen Zyklenzahl kommt es zu einem Plateau-effekt. An diesem Punkt stagniert die Vervielfältigungsrate. Dies ist bei der konventionellen PCR ca. bei einer Zyklenzahl von über 30 der Fall (Müller & Prange, 2016).

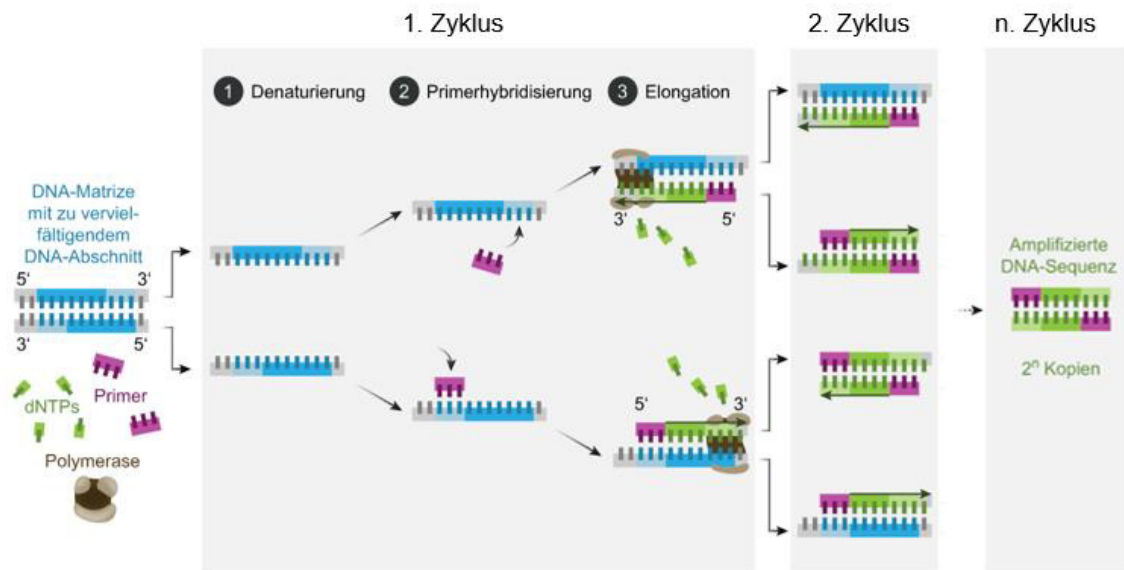


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Polymerase Kettenreaktion.
Abbildung abgeändert (CC BY-SA 4.0, 2020).

3.6.2.2 Detektion bei der konventionellen PCR

Bei der konventionellen PCR wird zur Detektion der amplifizierten DNA-Sequenzen die Gelelektrophorese verwendet. Bei der Gelelektrophorese können Biomoleküle im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Negativ geladene Moleküle, wie die DNA, werden durch das Gel, von der positiv geladenen Anode angezogen. Dadurch, dass sich die DNA in einem Gel befindet, bewegen sich größere Abschnitte langsamer zur Anode als kleinere. Die Beweglichkeit der DNA-Sequenzen hängt dabei von unterschiedlichen Faktoren ab wie z.B. ihrer Gesamt-Nettoladung, der Porengröße des Gels als auch der elektrischen Feldstärke. Für die Auftrennung von Nukleinsäuren werden häufig Agarose-Gele verwendet. Um eine Zuordnung der Nukleinsäuren Fragmente zu ermöglichen, muss bei jedem Lauf ein Größenstandard mitgeführt werden. Durch das Anfärben mit einem interkalierenden Farbstoff, z.B. Ethidiumbromid, können die aufgetrennten Amplifikate abschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden (Jansohn & Rothhämel, 2012).

3.6.3 Die real-time PCR

Bei der real-time PCR wird die Entstehung der PCR Produkte in Echtzeit (*real-time*) verfolgt. Dabei erfolgt der Nachweis nicht über die Gelelektrophorese, sondern über fluoreszierende Farbstoffe oder Sonden (fluorophor-markierte Oligonukleotide). Gemessen wird die Intensität der Fluoreszenz. Diese ist abhängig vom jeweiligen Zyklus als auch von der Produktmenge (Higuchi et al., 1993; Heid et al., 1996). Das allgemeine Detektionsprinzip basiert darauf, dass die mit kurzwelligem Licht (< 495 nm) angeregten Fluorophore längerwelliges Licht (500 - 800 nm) emittieren. Diese Emission wird pro real-time PCR Zyklus detektiert und die Fluoreszenzintensität wird ausgewertet (Müller & Prange, 2016).

3.6.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe

SYBR[™] Green I ist ein Farbstoff, der sequenzunabhängig an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA bindet und im gebundenen Zustand eine 1000-fach höhere Fluoreszenz emittiert als im ungebundenen Zustand (Abbildung 4) (Wittwer et al., 1997). Da es sich bei der mit SYBR[™] Green I erzeugten Fluoreszenz jedoch um ein Signal handelt, das nicht nur bei der Entstehung des spezifischen PCR Produktes entsteht, sondern auch durch die Bindung von SYBR[™] Green I an die Ausgangs-DNA, wie auch an unspezifische PCR Produkte, z.B. Primer-Dimere (Morrison et al., 1998), werden häufig Sonden zur Erzeugung sequenzspezifischer Fluoreszenzsignale eingesetzt. Ein Vorteil der Verwendung von SYBR[™] Green I im Vergleich zur Sonde ist jedoch die Möglichkeit der Identifikation des Amplikons anhand seiner spezifischen Schmelzkurve. Die Schmelztemperatur der dsDNA ist spezifisch für jedes Amplikon und wird durch den GC/AT Gehalt ebenso wie durch die Länge der Zielsequenz beeinflusst. Um die Schmelztemperatur eines Amplikons zu bestimmen, wird am Ende eines PCR Laufes die Temperatur schrittweise auf 95 °C erhöht und dabei die Änderung der Fluoreszenzintensität gemessen. SYBR[™] Green I dissoziiert von der dsDNA aufgrund der Denaturierung der DNA und das Fluoreszenzsignal nimmt dadurch ab. Die Messung der Änderung der Fluoreszenz über die Zeit während der Temperaturerhöhung führt zu einer spezifischen Schmelzkurve (Abbildung 5) (Ririe et al., 1997). Ebenso können unspezifische PCR Produkte und Primer-Dimere erkannt werden (Wilhelm & Pingoud, 2003).

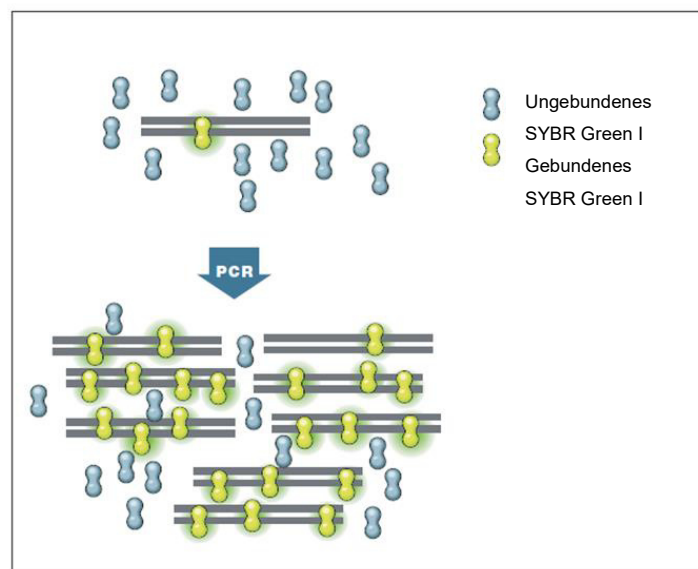


Abbildung 4: Bindung von SYBR[™] Green an dsDNA führt zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Abbildung abgeändert (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2006).

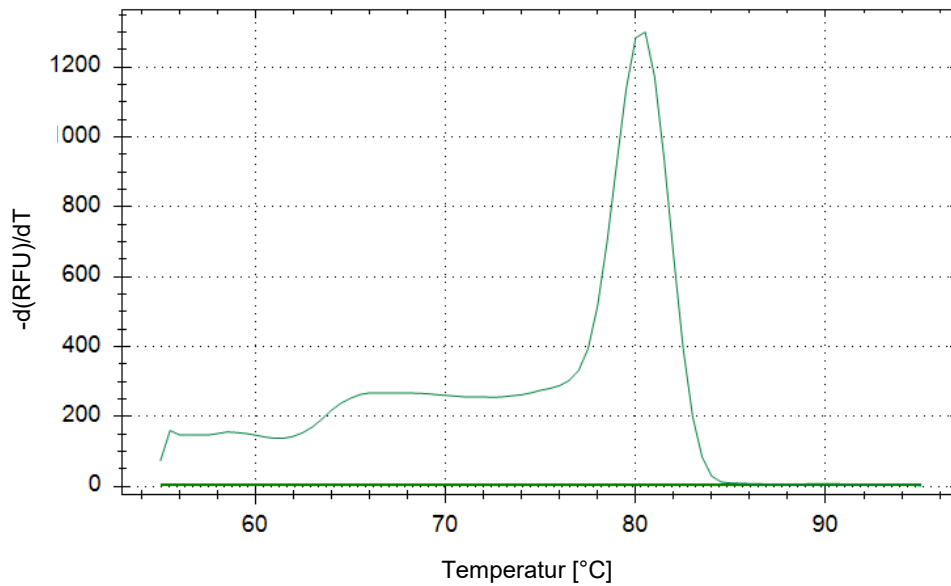


Abbildung 5: DNA-Schmelzkurve. Die Ableitung der Änderung der Fluoreszenz (y-Achse) wurde gegen die Temperatur (x-Achse) aufgetragen. Das Peakmaximum markiert die Temperatur, an der 50 % der Ziel-DNA aufgeschmolzen sind.

3.6.3.2 Sonden

Real-time PCR Sonden sind fluorophor-markierte Oligonukleotide, die komplementär zur Zielsequenz sind, und somit hybridisieren (Cardullo et al., 1988). Nach der Abspaltung der Sonde von der DNA ist ein, bei den verschiedenen Sonden-Typen auf unterschiedliche Weise entstehendes, Fluoreszenzsignal nachweisbar. Damit es nur zu einem Emissionssignal nach der Amplifikation der gewünschten Zielsequenz kommt, wird die Methode der Fluoreszenzlöschung (*quenching*) verwendet. Der Quencher ist ein Molekül, welches an das 3'-Ende des Oligonukleotids angefügt wird. Bei Anregung des zu detektierenden Fluorophors findet, anstatt Licht zu emittieren, ein Energietransfer auf das Quencher-Molekül statt. Für den Energietransfer ist jedoch eine räumliche Nähe nötig. Befinden sich Fluorophor und Quencher nicht mehr in räumlicher Nähe, kann kein Energietransfer mehr stattfinden, und Licht wird emittiert, das als Fluoreszenz gemessen werden kann (Kreuzer et al., 2001).

Die Hydrolyse-Sonden, auch TaqMan™-Sonden genannt, sind am 5'-Ende mit einem Reporterfluorophor und am 3'-Ende mit einem Quencher versehen. Während der PCR (Abbildung 6) hybridisiert die Sonde mit der komplementären Sequenz des Zielstranges und wird durch die 5'→3' Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert. Durch die Abspaltung kommt es zur räumlichen Trennung von Reporter und Quencher und somit, durch die Auflösung der „Quenchung“, zur Erfassung eines Fluoreszenzsignals (Gibson et al., 1996) (Holland et al., 1991).

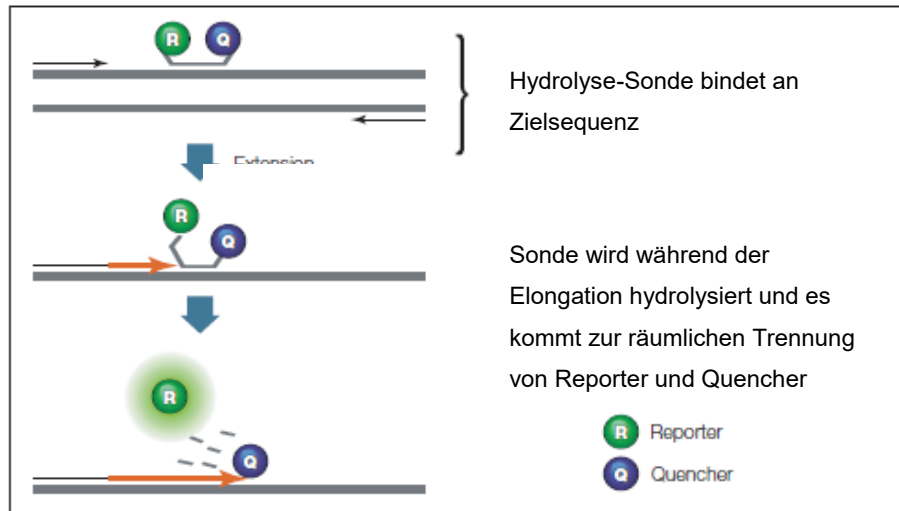


Abbildung 6: Hydrolyse-Sonde (TaqMan™-Assay).
Abbildung abgeändert (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2006).

Eine MGB-Sonde (*minor groove binder* (MGB)), ist ein Oligonukleotid, welches zusätzlich mit einem Tripeptid verknüpft ist. Dieses Tripeptid, z.B. 1,2-Dihydro- (3H) -pyrrolo [3,2-e] indol-7-carboxylat (CDPI3) bindet mit hoher Affinität an die kleine DNA-Furche der DNA-Doppelhelix. Dieses zusätzliche Tripeptid führt zu einer höheren Stabilität der Bindung zwischen Sonde und DNA und somit zu einer höheren Schmelztemperatur. Dadurch können kürzere Sonden verwendet werden (Kumar et al., 1998). Des Weiteren wird die Empfindlichkeit, auf die Fehlpaarung einzelner Basen zu reagieren, erhöht (Kutyavin et al., 2000). Abbildung 7 zeigt eine MGB-Sonde, die am 5'-Ende mit einem Fluorophor bzw. Reporter und am 3'-Ende mit einem Quencher und mittig mit dem MGB verknüpft ist.

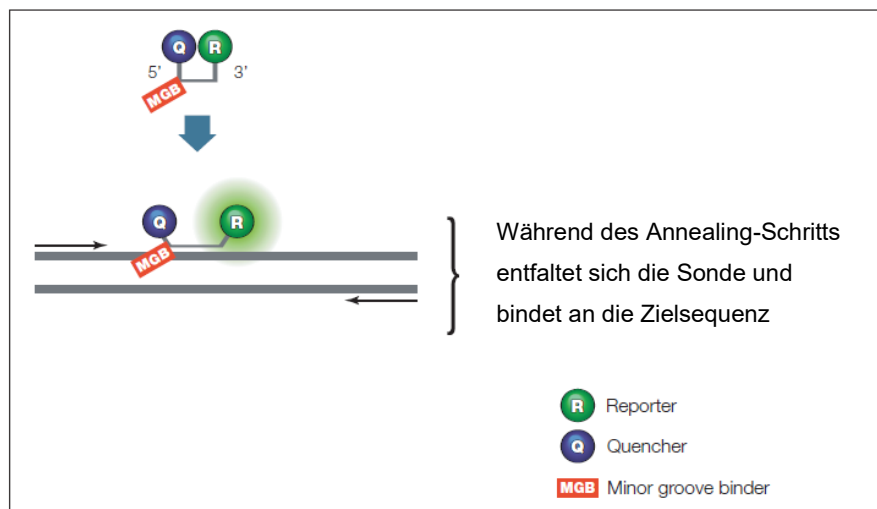


Abbildung 7: Schematische Darstellung der real-time PCR unter Verwendung einer MGB-Sonde.
Abbildung abgeändert (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2006).

3.6.3.3 Auswertung

Per Software wird der Verlauf der PCR in Echtzeit verfolgt. Nach jedem Lauf wird automatisch eine Basislinie berechnet, welche aber auch manuell festgelegt werden kann (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2021). Die Amplifikations-Kurve (Abbildung 8) zeigt dabei zwei Phasen: Die exponentielle Phase zu Beginn und die Plateau-Phase am Ende. In der exponentiellen Phase verdoppelte sich die Zielsequenz exponentiell in jedem Zyklus. Die Plateau-Phase beginnt, sobald u.a. die ersten Reaktionskomponenten aufgebraucht sind und somit keine exponentielle Verdopplung mehr möglich ist (hier ab Zyklus 28). In den Zyklen 1-18 ist hier das Fluoreszenz-Signal noch nicht intensiv genug und kann somit nicht vom Hintergrund-Rauschen unterschieden werden. Der Zyklus, in dem das Fluoreszenz-Signal zum ersten Mal das Hintergrund-Signal übersteigt, wird als Cq-Wert (*quantification cycle*) bezeichnet. Je mehr von der Ziel-DNA ursprünglich vorhanden war, desto kleiner der Cq-Wert (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2006).

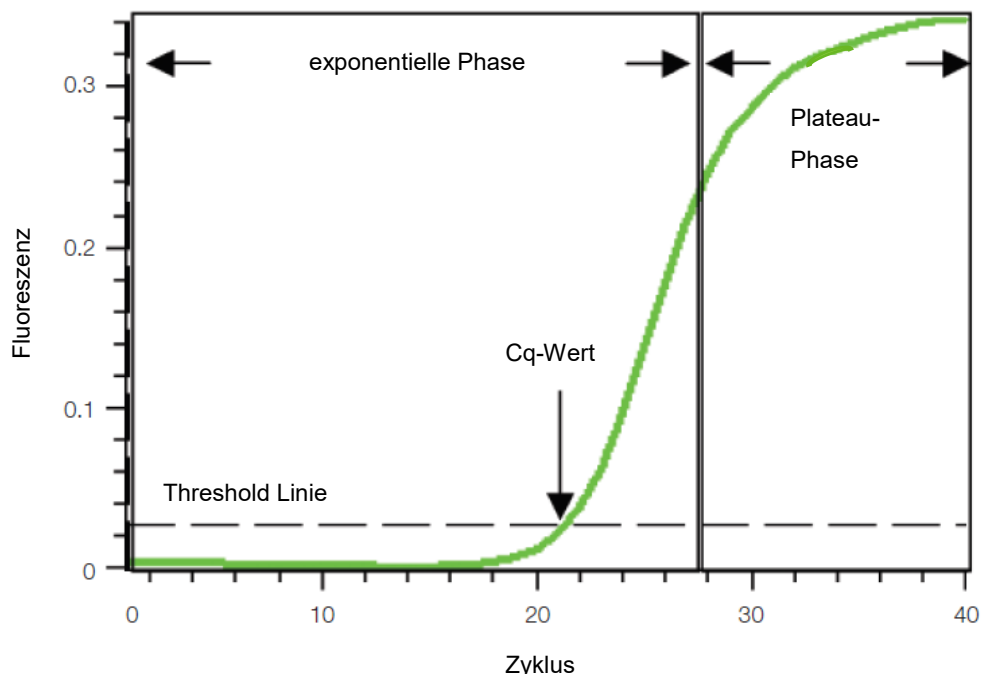


Abbildung 8: Real-time PCR Amplifikations-Kurve.
Abbildung abgeändert (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2006).

Werden parallel Standards gemessen, kann mit Hilfe der Linearen Regression eine Standardgerade erstellt werden. Dabei wird über eine Software automatisch die Steigung, die Effizienz wie auch das Bestimmtheitsmaß R^2 berechnet (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2021). Die Grundlage der Konzentrationsbestimmung besteht darin, dass zwischen der eingesetzten Konzentration der Ziel-DNA zu Beginn der PCR und den ermittelten Cq-Werten ein indirekter Zusammenhang besteht. Je höher die DNA-Konzentration desto niedriger der Cq-Wert.

Mit Hilfe der linearen Regression wird die Konzentration auf der x-Achse und die ermittelten Cq-Werte auf der y-Achse aufgetragen. Die Effizienz E [%] kann nach Formel 1 berechnet werden (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2016).

$$E [\%] = \left(10^{\left(\frac{-1}{s}\right)} - 1 \right) * 100$$

s = Steigung der Kurve

Formel 1: Berechnung der Effizienz.

Bei einer idealen Verdopplung (Effizienz von 100 %) und einer 10-fach Verdünnung der DNA (2^n = Verdünnungsfaktor 10) sollte n 3,32 betragen. n entspricht dabei dem Abstand zwischen den Cq-Werten der einzelnen Verdünnungsstufen. Somit sollten die Cq-Werte der einzelnen Verdünnungsstufen optimaler Weise 3,32 Zyklen auseinander liegen ($\Delta Cq +3,32$) (Codex Alimentarius Commission, 2010; Bio-Rad Laboratories, Inc., 2006). R^2 ist das Bestimmtheitsmaß, welches als Quadrat des Korrelationskoeffizienten berechnet wird (European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2015).

3.6.4 Publierte real-time PCR Methoden zum Nachweis von Kartoffel-DNA

Nachfolgend wird eine Auswahl verschiedener real-time PCR Methoden zum Nachweis von Kartoffel-DNA beschrieben. Ziel der meisten dieser Methoden ist es, gentechnisch veränderte Kartoffeln nachzuweisen. Bisher wurde keine DNA-basierte Methode zum Nachweis von Kartoffel-DNA, aus Kartoffelprotein in Fleischerzeugnissen, publiziert.

Chaouachi *et. al.* entwickelten eine real-time PCR Methode zur differenzierten Detektion und Quantifizierung von vier *Solanaceae*: Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Tomate (*Solanum lycopersicum*), Aubergine (*Solanum melongena*) und Paprika (*Capsicum annuum*). Angewendet wurde diese Methode in der Analytik gentechnisch veränderter Organismen. Es wurden drei Assays zum Nachweis von vier *Solanaceae* (Kartoffel, Tomate, Paprika und Aubergine) unter Verwendung des Gens einer endogenen Fruktosidase entwickelt. Zur Validierung der Methode wurden 17 - 50 verschiedene Arten der verwendeten *Solanaceae* verwendet, einschließlich wilder Arten. Des Weiteren wurde eine Duplex real-time PCR Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Tomaten und Kartoffeln entwickelt mit einer Nachweisgrenze von 20 haploiden Genom-Kopien. Die Bestimmungsgrenze aller Assays lag bei 200 haploiden Genom-Kopien (Chaouachi *et al.*, 2008).

Rho *et. al.* entwickelten qualitative und quantitative real-time PCR-Methoden zum Nachweis von drei Arten gentechnisch veränderter Kartoffeln. Für den quantitativen Nachweis wurde eine real-time PCR-Methode entwickelt, welche ein Standardplasmid verwendet. Dieses enthält sowohl eine spezifische Region des transgenen *Cry3A* als auch der endogenen *UDP-Glucose-Pyrophosphorylase* der Kartoffel. Das Vorhandensein von drei verschiedenen Kartoffel-Arten in unterschiedlichen Konzentrationen in einer Probe wurde als problematisch angesehen. Der mögliche Grund ist hierbei die Verwendung von verschiedenen Fluorophoren der Sonde, welche sich möglicherweise nachteilig beeinflussen. Die Quantifizierung der drei Arten war allerdings bei gleicher Konzentration möglich. Mit dieser Methode wurden Kartoffelproben mit 0,5, 1, 3 und 5 % GVO-Anteil quantifiziert (Rho et al., 2004).

In der Studie von Randhawa *et. al.* wurden Multiplex-PCR-Assays im Duplex-, Triplex- und Quatroplex-Format entwickelt. Diese dienten zum Nachweis des endogenen *UGPase*-Gens in gentechnisch veränderten Kartoffeln. Es wurden keine verwandten Pflanzen auf Kreuzreaktivität getestet (Randhawa et al., 2009).

Song *et. al.* entwickelten eine Multiplex-PCR-Methode zum Nachweis vier gentechnisch veränderter Kartoffelarten. Das entwickelte Multiplex-PCR-System wurde erfolgreich an 33 kartoffelhaltigen Lebensmitteln angewendet. Die Methode wurde nicht auf Kreuzreaktivität anderer verwandter Pflanzen getestet (Song et al., 2017).

4. Material und Methoden

4.1 Material

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien sind mit Bezeichnung und unter Angabe des Herstellers alphabetisch aufgelistet (Tab. 2-6).

Tabelle 2: Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol (zur Analyse)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Agarose Biozym LE	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Borsäure	Honeywell International Inc., Charlotte, USA
Cetyltrimethylammonium Bromid (CTAB)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform (zur Analyse)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DNA-freies Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol, absolut (99,9 % zur Analyse)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Ethidiumbromid (0,5 mg/mL)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Riedel-de Haen Ag, Seelze, Deutschland
Katalysator Tabletten Kjeltabs CX	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland
NaOH-Plättchen	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Petroleumbenzin, Siedebereich 40 - 60 °C	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 37 %, rauchend	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure 95 - 97 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Titrationismaßlösung 0,1N Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TRIS-EDTA Puffer-Lösung(1x), BioUltra for molecular biology, pH 8,0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3: Kits und Enzyme.

Bezeichnung	Hersteller
dNTP Mix (25 mM 2 x 0,5 mL)	Biozym Scientific GmbH; Oldendorf, Deutschland
HotStarTaq® DNA-Polymerase (1000U)	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Lambda DNA/HindIII Ladepuffer (6x)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Lambda DNA/HindIII Marker, 2 (0,5 µg/µL)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Proteinase K from Engyodontium album	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Purple Low Molecular Weight DNA-Marker, 50 µg/µL	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
QIAquick® (50 Stück)	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Qick-Load Loading Dye (no SDS) purple	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Quantitec Multiplex no Rox PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Ribonuclease A from bovine pancreas	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
SYBR Green I (10.000 × in DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Wizard® DNA Clean-Up System	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland

Tabelle 4: Technische Geräte.

Lebensmitteltechnologie	
Gerät mit Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage Sartorius CP423S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Ausstanz-Gerät	Eigenbau
Belichtungskammer	Eigenbau
Colorimeter Chroma-Meter (Cr 400)	Konica Minolta Sensing Europe B.V., Nieuwegein, Niederlande
Dampfkochschrank	H. Maurer und Söhne GmbH & Co. KG, Reichenau, Deutschland
Einstichthermometer GMH 2710	GHM Messtechnik GmbH, Remscheid Deutschland
Elektrophorese Einheit Power Pac™ HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Feinwaage Sartorius CP225D	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Geldokumentation Bio-Rad GelDoc™ XRT	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Gießzelle (70 mm*100 mm; Kamm: 16- slots, 8-slots)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Hydrolyse-Apparatur Hydrotherm	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland
Kolbenhubpipette Research plus (1000, 100, 20, 10, 2,5 µL)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette SL-Pette® XE (1000, 100, 20, 10, 2,5 µL)	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, Deutschland
Kugel-Mühle Bead Ruptor ELITE	Omni International, Kennesaw, USA
Kutter DMK 20 C	DMS-Maschinensysteme GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Ladenwolf Fleischwolf FW 70	Bizerba SE & Co. KG, Balingen, Deutschland
Lebensmittelanalytik	
Magnetrührer Heidolph Mr 2000	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
Messermühle Grindomix GM 200	RETSCH GmbH, Haan, Deutschland
Mikrowelle Ceramic Inside	Samsung Electronics GmbH DE, Schwalbach, Deutschland
Mini-Vortex Vornado™	Benchmark Scientific, Sayreville, USA
Mini-Zentrifuge Color Sprout Plus	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland

4. Material und Methoden

Muffelofen Heraeus M110	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Mühle, Tube Mill control	VWR International LLC, Darmstadt Deutschland
Multipipette HandyStep®	BRAND GmbH + Co.KG, Wertheim, Deutschland
Multistep-Pipette Sartorius Picus 300	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
PCR Thermocycler Mastercycler personal	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR UV2-Workstation	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
pH-Elektrode	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
pH-Meter pH 90 WTW	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland
Schneidemaschine Typ VS 8F	Bizerba SE & Co. KG, Balingen, Deutschland
Soxhlet-Apparatur Soxtherm	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland
Tageslichtlampe Osram Lumilux de Lupe L 19W12	Lumilux de Lupe OSRAM GmbH, München, Deutschland
Textur-Prüfmaschine Instron 1140, Textur Analyser XT2	Firma Instron, Offenbach/Main, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank WTC ED240	Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA
Vakuum-Manifold	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland
Vortex Genie 2	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5417C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 5: Verwendete Software.

Bezeichnung	Hersteller
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	National Center for Biotechnology Information (NCBI), Rockvill Pike, USA
Beacon Designer, free Edition	PREMIER Biosoft International, San Francisco, USA
CFX Manager	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
CLC Sequenz Viewer	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Online Software: quo data	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
Primer BLAST	National Center for Biotechnology Information (NCBI), Rockvill Pike, USA
Statistik-Software: Past	Hammer & Harper, Universität Oslo, Norwegen

Tabelle 6: Verbrauchsartikel

Bezeichnung	Hersteller
Extraktionshülsen (33 * 94 mm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Keramik Kugeln (1.4 mm)	Omni International, Kennesaw, USA
Kunstdarm Faserin, braun ohne Druck (Kaliber 60 x 50)	Schneider Fleischereibedarf Und Gastrotechnik GmbH, Berlin, Deutschland
PCR Platten (96-well)	4titude™ Ltd., Dorking, UK
PCR Reaktionsgefäße (0,2 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR-Folie Q-stick für qPCR	4titude™ Ltd., Dorking, UK
Pipetten-Spitzen SafeSeal-Tips professional (verschiedene Größen)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße (30 mL)	Omni International, Kennesaw, USA
Reaktionsgefäße Safe-Lock-Tubes (1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Seesand	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Skalpell-Klingen	Schreiber INST, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sterile Mahlkammern	VWR International LLC, Darmstadt Deutschland
Wägebapier	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter, Deutschland
Wägeschiffchen (stickstofffrei 58*10*10 mm)	MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Wurstgarn (verschiedene Farben)	Schneider Fleischereibedarf Und Gastrotechnik GmbH, Berlin, Deutschland
Zylinder zum Homogenisieren	Omni International, Kennesaw, USA

4.1.1 Zielgen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zielgene wurden bereits 2015 für das Projekt des Nachweises von Kartoffelprotein ausgewählt. Das Projekt wurde erst 2020 im Rahmen dieser Arbeit weitergeführt.

Grundsätzliche Auswahlkriterien für ein passendes Gen, auf dessen Basis Primer und Sonden designt wurden, sind nachfolgend aufgelistet:

- ubiquitäres Vorkommen
- konservierte DNA-Sequenz
- spezifisch für Kartoffeln, d.h. keine Homologien zu anderen Pflanzen- oder Tiersequenzen

Ausgewählt wurden folgende Zielgene:

- *Solanum tuberosum* serine/threonine-protein phosphatase PP2A-2 catalytic subunit-like (LOC102595411), transcript variant X1 (Sequence ID (NCBI): XM_006363482.2). Nachfolgend abgekürzt mit PP2A.
- *Solanum tuberosum* cultivar Istrinskii Kunitz-type proteinase inhibitor group A1 (PKPI-A5) gene (Sequence ID (NCBI): JN983810.1) Nachfolgend abgekürzt mit PI.

4.1.2 Zielsequenz

Innerhalb des ausgewählten Gens erfolgte die Auswahl der Zielsequenz nach folgenden Kriterien:

- 70 – 200 bp lang
- weniger als 4 bp-Wiederholungen
- GC-Gehalt von 50-60 %
- wenig bis keine Sekundärstrukturen

Ausgewählt wurden die in Tabelle 7 zusammengefassten Zielsequenzen.

Tabelle 7: Zielsequenz in den ausgewählten Kartoffelgenen unter Angabe der Nukleotide (nt).

Gen	Start-Position im Gen	Zielsequenz (5'-3')	Anzahl der nt
PP2A	193	GGTACGTGAATTCGATTTTGATTGAAATTTGTGTGTAAT ATTTGCGTTTCATCAATTGATCGGCGTGGAATTCGCAG ATCGGTGAGGAAATGCCGTGCAAC	101
PI	413	TTGGTTACAACCTATTGTCTTGCCCATTTACTTCTATTAT TTGTCTACGTTGCCCTGAGGATCAGTTTTGTGCAAAAG TGGGTGTAGTTATTCAAAATGGA	101

4.1.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden gefriergetrocknet geliefert. Vor Gebrauch wurden sie in H₂O_{dd} gelöst und auf 100 pmol/μL eingestellt. Gelagert wurden sie bei -20 °C. Die Primer (Tabelle 8) die Sonde PP2A-P und PI-P (Tabelle 13) wurden bereits 2015 für das Projekt des Nachweises von Kartoffelprotein ausgewählt.

4.1.3.1 Primer

Die grundsätzlichen Auswahlkriterien der verwendeten Primer sind nachfolgend aufgelistet, dabei ist ΔG die Änderung der Gibbs-Energie (ΔG). Hohe negative Werte deuten auf unerwünschte stabile Sekundärstrukturen hin (Sigma-Aldrich Biotechnology, 2010).

- spezifisch
- 18-25 bp
- GC-Gehalt von 50-60 %
- T_m : 54-64 °C
- maximal drei G oder C hintereinander
- wenig bis keine selbst- oder paarweise komplementären Sequenzen (Self Dimer (intern) $\Delta G \geq -6$ kcal/mol; Cross Dimer (intern) $\Delta G = \geq -6$ kcal/mol)
- wenig bis keine Sekundärstrukturen (Hairpin (intern) $\Delta G = \geq -5$ kcal/mol)

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 unter Angabe der Sequenz und der Anzahl an Nukleotiden (nt) aufgelistet. Die gebildeten Primerpaare sind in Tabelle 9 zu finden. Der Hersteller aller Primer ist Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Deutschland).

Tabelle 8: Primer und ihre Sequenz unter Angabe der Nukleotid Anzahl.

Gen	Name	Sequenz (5'-3')	Anzahl der nt
PP2A	PP2A-for1	TTGTGTGTAATATTTGCGTTTCATC	25
PP2A	PP2A-for2	GGTACGTGAATTCGATTTTGATTG	24
PP2A	PP2A-rev	GTTCGACGGCATTTCCTCAC	20
PI	PI-for	TTGGTTACAACCTTATTGTCTTGCC	24
PI	PI-rev1	TGCACAAAACCTGATCCTCAG	20
PI	PI-rev2	TCCATTTTGAATAACTACACCCACT	25

Tabelle 9: Primerpaare

Gen	Primerpaar	Kombinierte Primer
PP2A	PP2A-I	PP2A-for1 - PP2A-rev
PP2A	PP2A-II	PP2A-for2 - PP2A-rev
PI	PI-I	PI-for - PI-rev1
PI	PI-II	PI-for - PI-rev2

Um die exakte Sequenz einiger PCR Produkte zu erhalten wurden diese extern sequenziert (siehe Abschnitt 4.9). Für ein Sequenzierergebnis, welches alle Basen eindeutig bestimmt, wurden längere Primer verwendet. Dazu wurden M13-Primer (Deutsches Institut für Normung e.V., 2019) mit den Kartoffel-Primern vereint (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Sequenzier-Primer bestehend aus den M13-Primern for (blau markiert), dem rev (grün markiert) und den Primerpaaren PP2A-I und PI-II.

Name	Sequenz (5'-3')	Anzahl der nt
M13-PP2A-for1	TGTAAAACGACGGCCAGTTTGTGTGTAATATTTGCGTTTCATC	44
M13-PP2A-rev	CAGGAAACAGCTATGACCGTTCGACGGCATTTCCTCAC	39
M13-PI-for	TGTAAAACGACGGCCAGTTTGGTTACAACCTATTGTCTTGCC	43
M13-PI-rev2	CAGGAAACAGCTATGACCTCCATTTTGAATAACTACACCCACT	44

Zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit (siehe Abschnitt 4.10.2.1) der verwendeten DNA-Proben wurden die Primer aus Tabelle 11 nach Costa *et. al.* verwendet (Costa et al., 2017).

Tabelle 11: Primer zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der DNA-Proben.

Name	Sequenz (5'-3')	Anzahl der nt
18SRG-for	CTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTA	24
18SRG-rev	TTGGATGTGGTAGCCGTTTCTCA	23

4.1.3.2 Sonden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Hybridisierungssonden und eine MGB-Sonde der Firma biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) verwendet. Lediglich die Sonde PP2A-P stammte vom Hersteller Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Deutschland).

Alle Sonden wurden nach folgenden Kriterien designt (Sigma-Aldrich Biotechnology, 2010):

- 5 - 10 °C höhere T_m als bei Primern
- kein G am 5'-Ende
- 30 - 80 % GC-Gehalt
- mehr C als G (gDNA mit mehr G)
- ≤ 30 nt
- Wenig bis keine selbst- oder paarweise komplementäre Sequenzen (Self Dimer $\Delta G = \geq -10$ kcal/mol; Cross Dimer $\Delta G = \geq -9$ kcal/mol)
- Wenig bis keine Sekundärstrukturen (Hairpin $\Delta G = \geq -6$ kcal/mol; optimal eine GC-Clamp)
- MGB-Sonden: 12 - 18 nt (Kutyavin et al., 2000)

Die verwendeten Fluorophore und Quencher sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Sonden sind in Tabelle 13 zu finden.

Tabelle 12: Fluorophore und Quencher unter Angabe der Absorptions- und Emissionswellenlänge und des Quenching Bereichs (Wellenlänge).

Name	Abkürzung	Absorption [nm]	Emission [nm]	Quenching Bereich [nm]
Yakima Yellow	YAKYE	530	549	-
6-Carboxyfluorescein	6-FAM	494	520	-
Cyanine 5.5	CY5.5	675	694	-
Black Hole Quencher	BHQ1	534	-	480 - 580
Dark Quencher	BMN-Q535	494	-	480 - 580

Tabelle 13: Sonden mit entsprechendem Fluorophor und Quencher.

Gen	Name	Sequenz (5'-3') mit Fluorophor und Quencher	Anzahl an nt
PP2A	PP2A-P	YAKYE-ATCTGCGAATTCCACGCCGATCA-BHQ1	23
PI	PI-P	6-FAM-AAACTGATCCTCAGGGCAACGTAGACAAA- BMN-Q535	29
PI	PI-Kunitz- P	6-FAM-TTTCCTTTGTCCATTTTGTCTGATGATAAC- BMN-Q535	30
PI	PI-MGB-P	6-FAM-CATTTTCTTTGTCCA-MGB(CDPI3)-BMN-Q535	15
18SRG	18SRG-Pfl	CY5.5-ACGGGTGACGGAGAATTAGGGTTCGATT- BMN-Q535	28

4.1.4 Rohstoffe

Die zur Herstellung der Brühwurst (Typ Lyoner) verwendeten Rohstoffe sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Verwendete Rohstoffe zur Brühwurst-Herstellung.

Bezeichnung	Hersteller/
Ascorbat (Natriumascorbat)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kartoffelproteinpulver Portafy (79 g Protein/100g)	KMC Kartoffelmelcentralen Amb, Brande, Dänemark
Kuttereis	Leitungswasser Kulmbach. Deutschland
Nitritpökelsalz (Natriumchlorid mit 0,5 % Natriumnitrit)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phosphat (Dinatriumphosphat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Schweinefleisch (S3 Bug schier, mageres Kutterfleisch mit einem höheren Sehnenanteil)	Schlachthof Kulmbach, Deutschland
Schweinespeck (S7/S8 / Speck /Deckelspeck Rückenspeck)	Schlachthof Kulmbach, Deutschland
Standard Gewürzmischung für Lyoner (Matador)	RAPS GmbH & Co. KG, Kulmbach, Deutschland

4.1.5 Probenmaterial

Es wurden sowohl pflanzliche als auch tierische Proben verwendet. Feuchte Proben wurden kurzfristig bei 4 °C gelagert und längerfristig bei -20 °C tiefgefroren. Die verwendeten Brätproben wurden sofort bei -20 °C tiefgefroren. Getrocknete Proben wurden bei Raumtemperatur gelagert.

4.1.5.1 Brühwurst und Brät mit Kartoffelprotein

Brühwürste mit Kartoffelprotein wurden im Zuge dieser Arbeit am Max Rubner-Institut (Kulmbach, Deutschland) hergestellt. Im Vorversuch (V) der Herstellung blieb die Grundrezeptur der Brühwurst bei allen Chargen gleich und das Kartoffelprotein wurde „on top“ hinzugegeben. Im Hauptversuch (H) wurden mit den jeweiligen Prozentsätzen tierische Proteine durch pflanzliche ersetzt. Die hergestellten Proben sind in Tabelle 15 zu finden.

Tabelle 15: Hergestellte Brühwurst- und Brätproben mit entsprechendem Prozentsatz an Kartoffelprotein.

Chargen- und Probenbezeichnung	Probe	Beschreibung
VA0	Brät	ohne Kartoffelprotein
VB0	Brühwurst	
VA1	Brät	0,1 % Kartoffelprotein pro 5 kg Charge
VB1	Brühwurst	
VA2	Brät	1 % Kartoffelprotein pro 5 kg Charge
VB2	Brühwurst	
VA3	Brät	5 % Kartoffelprotein pro 5 kg Charge
VB3	Brühwurst	
VA4	Brät	10 % Kartoffelprotein pro 5 kg Charge
VB4	Brühwurst	
HA0	Brät	ohne Kartoffelprotein
HB0	Brühwurst	
HA1	Brät	1 % Kartoffelprotein pro 7 kg Charge
HB1	Brühwurst	
HA2	Brät	2 % Kartoffelprotein pro 7 kg Charge
HB2	Brühwurst	
HA3	Brät	3 % Kartoffelprotein pro 7 kg Charge
HB3	Brühwurst	

4.1.5.2 Kartoffeln und Kartoffelproteinpulver

Zur DNA-basierten Methodenentwicklung wurden 28 verschiedene Kartoffelsorten (Art: *Solanum tuberosum* aber unterschiedlichen Sorten, durch Züchtung entwickelt) verwendet, um eine möglichst hohe genetische Vielfalt zu untersuchen (Tabelle 16).

Tabelle 16: Verwendete Kartoffelsorten unter Angabe des Herstellers.

Nr.	Produkt	spezifischer Produktname	Hersteller
1	Kartoffel-Keimlinge	Helena (Stärkesorte)	GLKS Groß Lüsewitzer
2	Kartoffel-Keimlinge	Falke (Stärkesorte)	GLKS Groß Lüsewitzer
3	Kartoffel-Keimlinge	Möwe (1940) (universale Sorte)	GLKS Groß Lüsewitzer
4	Kartoffel-Keimlinge	Intenso (Stärkesorte)	GLKS Groß Lüsewitzer
5	Kartoffel-Keimlinge	Limba (universale Sorte)	GLKS Groß Lüsewitzer
6	Kartoffel-Keimlinge	Tatranka (Stärkesorte)	GLKS Groß Lüsewitzer
7	Kartoffel-Keimlinge	Ewerest (Stärkesorte)	GLKS Groß Lüsewitzer
8	Kartoffel-Keimlinge	Ultimus (Stärkesorte)	GLKS Groß Lüsewitzer
9	Kartoffel-Keimlinge	Dianella (Stärkesorte)	GLKS Groß Lüsewitzer
10	Kartoffel-Keimlinge	Cilena (Speisekartoffel)	Wehmeier's Hof in Lemgo
11	Kartoffel-Keimlinge	Prinzess (Speisekartoffel)	Wehmeier's Hof in Lemgo
12	Kartoffel-Keimlinge	Allians (Speisekartoffel)	Wehmeier's Hof in Lemgo
13	Kartoffel-Keimlinge	Belana (Speisekartoffel)	Wehmeier's Hof in Lemgo
14	Kartoffel-Keimlinge	Regina (Speisekartoffel)	Wehmeier's Hof in Lemgo
15	Kartoffel-Keimlinge	Red Lady (Speisekartoffel)	Wehmeier's Hof in Lemgo
16	Kartoffel-Keimlinge	Secura (Speisekartoffel)	Wehmeier's Hof in Lemgo
17	Kartoffel (getrocknet)	Granola (Speisekartoffel)	Wehmeier's Hof in Lemgo
18	Kartoffel-Keimlinge	Miranda (Speisekartoffel)	Wehmeier's Hof in Lemgo
19	Kartoffel-Keimlinge	Lilly (Speisekartoffel)	Wehmeier's Hof in Lemgo
20	Kartoffel-Keimlinge	Agria (Pommes Sorte)	Erzeugerge. Ankum
21	Kartoffel-Keimlinge	Fontane (Pommes Sorte)	Erzeugerge. Ankum
22	Kartoffel-Keimlinge	Pelikan (Chipssorte)	Erzeugerge. Ankum
23	Kartoffel-Keimlinge	Hansa	Erzeugerge. Ankum
24	Kartoffel-Keimlinge	Charlotte	Erzeugerge. Ankum
25	Kartoffel-Keimlinge	Krone	Erzeugerge. Ankum
26	Kartoffel-Keimlinge	Maris Peer	Erzeugerge. Ankum
27	Kartoffel-Keimlinge	Maris Piper	Erzeugerge. Ankum
28	Kartoffel-Keimlinge	Blaue St. Galler	Kiepenkerl

Dabei handelte es sich um Sorten mit unterschiedlichem Verwendungsspektrum. Als Bezugsquelle diente sowohl das Groß Lüsewitzer Kartoffelsortiment (Leibnitz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gattersleben, Deutschland), die Erzeugergemeinschaft Ankum (Ankum, Deutschland) der Wehmeier Hof (Lemgo, Deutschland) als auch der Einzelhandel. Alle Kartoffeln wurden bis zur Verwendung im Dunkeln gelagert.

Des Weiteren wurden zwei Kartoffelproteinpulver untersucht. Eines davon (PP1) war geeignet zur Herstellung von Lebensmitteln und wurde für die Produktion der Würste mit Kartoffelprotein verwendet (siehe Tabelle 14). Das andere Produkt (PP2) hatte Futtermittelqualität und wurde nur zur DNA-basierten Methodenentwicklung genutzt (Bergophor, Kulmbach, Deutschland).

4.1.5.3 Andere Pflanzenarten

Um die Kreuzreaktivität der Methode zu testen, wurden verschiedene verwandte Pflanzenarten verwendet. Bezogen wurden diese Samen über das IPK (Gattersleben, Deutschland) als auch über den Einzelhandel. In Tabelle 17 sind die jeweiligen Pflanzen genauer beschrieben. Dabei wurden die Samen der einzelnen Arten zur DNA-Isolierung genutzt. Im Falle der Aubergine wurden bei einer Probe auch die Blätter genutzt.

Tabelle 17: Weitere getestete Nachtschattengewächse.

Anzahl der Proben	Art	Art (lateinisch)	Anzahl der Sorten
12	Aubergine	<i>Solanum melongena</i> L.	12
1	Goji-Beere	<i>Lycium chinense</i> Mill.	1
10	Paprika/	<i>Capsicum annuum</i> L.,	5
	Chilis	<i>Capsicum frutescens</i> L.,	1
		<i>Capsicum pubescens</i> Ruiz & Pav.,	1
		<i>Capsicum chinense</i> ,	1
		<i>Capsicum baccatum</i> subsp. <i>praetermissum</i>	2
2	Physalis	<i>Physalis peruviana</i> L.	1
2	Tabak	<i>Nicotina tabacum</i> L. var. <i>Tabacum</i>	1
1	Tamarillo	<i>Cyphomandra betacea</i> (Cav.) Sendtn.	1
2	Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	2

Des Weiteren wurden typische Gewürze und Gemüsesorten getestet, welche häufig in Wurstwaren oder allgemein in Lebensmittel vorkommen können. Getestet wurde in Gruppen, diese sind in Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 18: Getestete Gewürze und Gemüsearten.

Mischung Nr.	Arten
1	Bundzwiebeln, Fenchel, Bohne, Knoblauch, Ingwer
2	Spargel, Bärlauch, Rote Beete, Guarbohne, Johannisbrotbaumkerne
3	Muskatblüte, Weizen, Liebstöckel, Salbei, Ackerbohne
4	Sonnenblume, Lupine weiß, Erbse, Soja, Mais
5	Pistazien, Zitrone, Petersilie, Majoran, Kümmel
6	Lauch, Hokkaido Kürbis, Schwarzwurzel, Kardamom, Koriander
7	Sellerie, Radieschen, Gurke, Zucchini, Karotte
8	Kresse, Matador (Gewürzmischung), Weißkohl, Broccoli, Pfeffer
9	Speiserübe, Wirsing, Kohlrabi, Brauner Senf, Zwiebel

Methoden Teil I: Entwicklung einer Brühwurst mit Kartoffelprotein

4.2 Produktentwicklung

Es wurde die Wurstsorte „Brühwurst, fein zerkleinert“ des Typs Lyoner gewählt. Es wurde zunächst ein Vorversuch durchgeführt, in welchem das Kartoffelproteinpulver auf die 100 % der Kartoffelrezeptur aufgerechnet wurde. Dies hat den Vorteil, dass die Grundlage der Rezeptur für alle produzierten Chargen gleich ist und dies somit keinen Einfluss auf die späteren Analysen nimmt.

Im Hauptversuch wurde anschließend tierisches Protein anteilig durch pflanzliches ersetzt. Dies führt zu einer Änderung der Grundrezeptur, da die restliche Menge durch Wasser (Kuttereis) ersetzt wurde.

4.2.1 Rohstoffe

Die Brühwurst des Typs Lyoner wurde aus den Hauptzutaten Schweinefleisch, Schweinespeck und Wasser in Form von Eis hergestellt. Dazu kamen Nitritpökelsalz zur Umrötung und die Kutterhilfsmittel Phosphat und Ascorbat. Ebenso wurde Kartoffelproteinpulver verwendet. Im Hauptversuch wurden zusätzlich Gewürze als eine geschmacksgebende Komponente hinzugefügt.

4.2.2 Versuchsplanung Vorversuch

Die Basisrezeptur der jeweiligen Zutaten und Mengenangaben ist in Tabelle 19 zu finden. Diese Rezeptur ist auf ein Gesamtgewicht von 5 kg pro Charge ausgerichtet und wurde intern am Max Rubner-Institut zur Herstellung von Brühwurst mit Fremdeiweiß entwickelt.

Tabelle 19: Basisrezeptur zur Herstellung von Brühwürsten des Typs Lyoner im Vorversuch.

Hauptzutaten	Menge [kg]	Anteil
S3 Bug schier	2,70	54 %
S7/ S8/ Speck/ Deckelspeck und Rückenspeck	1,20	24 %
Eis	1,00	20 %
Salz und Kutterhilfsmittel	[g]	
Nitritpökelsalz	90,00	18 g/kg Brät
Phosphat	10,00	2 g/kg Brät
Ascorbat	1,50	0,3 g/kg Brät
Summe	5,0 kg	

Insgesamt wurden fünf Chargen an Brühwürsten im Vorversuch hergestellt. Eine Charge wurde als Kontrollwurst verwendet, sie enthielt lediglich die Basisrezeptur und kein Kartoffelprotein. Vier Chargen davon wurde „on top“ Kartoffelprotein in verschiedenen Mengen beigemischt. Die einzelnen Chargen mit entsprechender Proteinpulver-Zugabe sind in Tabelle 20 aufgelistet. Von jeder Charge wurden 9 - 10 Brühwürste à 500 g hergestellt.

Tabelle 20: Menge an zugegebenem Kartoffelproteinpulver pro Charge.

Charge	Menge an zugegebenem Proteinpulver [g]
Kontrolle	-
0,1 % Kartoffelproteinpulver	5
1 % Kartoffelproteinpulver	50
5 % Kartoffelproteinpulver	250
10 % Kartoffelproteinpulver	500

Um später die „neutralen“ Würste in der Verkostung beurteilen zu können, wurden keine Gewürze (außer Salz) verwendet.

4.2.3 Versuchsplanung Hauptversuch

Im Hauptversuch wurde tierisches Protein anteilig durch pflanzliches Kartoffelprotein ersetzt. Dazu wurde zunächst berechnet, wie viel tierisches Protein durch 1 %, 2 % und 3 % pflanzliches Kartoffelprotein ersetzt werden kann. Die Prozentzahlen sind bezogen auf die 7 kg Gesamtgewicht der Charge. Aufgrund einer größeren Menge an benötigtem Probenmaterial enthielt jede Charge im Hauptversuch 7 kg Gesamtgewicht.

4.2.3.1 Kalkulation

Schweinefleisch des Standards III (S3) besteht zu 19 % aus Fleischeiweiß. Dieses setzt sich zusammen aus bindegewebeseiweißfreiem Fleischeiweiß (BEFFE) und Bindegewebeseiweiß (BE). Dies entspricht einem Schweinefleischprotein-Faktor von 0,19 (Gewürzmüller & Fleischereiberatung Hack (GEHA), 2018).

Verwendet wurde die Basisrezeptur aus Tabelle 19, bezogen auf die Prozentsätze an verwendetem Schweinefleisch und Schweinespeck. Der Schweinefleischprotein Faktor betrug 0,19, der Kartoffelproteinfaktor 0,79 (79 g Protein/100 g Pulver). Der geringe Prozentsatz an tierischem Protein in Schweinespeck wurde vernachlässigt. Entsprechend dieser Ausgangsbedingungen wurden die Werte in Tabelle 21 berechnet.

Tabelle 21: Tierisches Protein ersetzt durch 1 %, 2 %, oder 3 % pflanzliches Protein.

Prozentsatz an Proteinpulver * [%]	Kartoffelprotein- pulver [g]	Kartoffel- protein [g]	tierisches Protein [g]	Differenz ** [g]	Prozentsatz an ersetzttem Schweinefleisch * [%]
1	70,00	55,30	291,05	221,05	8
2	140,00	110,60	582,11	442,11	16
3	210,00	165,90	873,16	663,16	23

* pro 7 kg Charge

** Differenz wurde mit Kuttereis aufgefüllt

4.2.3.2 Rezeptur

Eine zusätzliche Veränderung zum Vorversuch war die Zugabe von Gewürzen (Matador-Gewürzmischung). Die veränderte Rezeptur ist in Tabelle 22 aufgelistet.

Tabelle 22: Basisrezeptur der Brühwürste des Typs Lyoner im Hauptversuch (Kontrollwurst HB0).

Hauptzutaten	Menge [g]	Anteil
S3 Bug schier	3750	54 %
S7/ S8/ Speck/ Deckelspeck und Rückenspeck	1680	24 %
Eis	1400	20 %
Gewürze und Kutterhilfsmittel	[g]	
Nitritpökelsalz	126,0	18 g/kg Brät
Phosphat	14,0	2 g/kg Brät
Ascorbat	2,1	0,3 g/kg Brät
Matador	28,0	4 g/kg Brät
Summe	7,0 kg	

Die entsprechenden Mengenangaben und Anteile der drei Chargen mit Kartoffelprotein sind in Tabelle 23 zu finden. Die Mengen an Gewürzen und Kuttermitteln blieb jeweils gleich.

Tabelle 23: Mengenangaben der Zutaten der einzelnen Chargen des Hauptversuches.

Charge 1 %	Fleisch und Fettkomponenten	Menge [g]	Anteil
	S3 Bug schier	3459	54 %
	S7/S8 / Speck /Deckelspeck und Rückenspeck	1680	24 %
	Eis	1621	20 %
	Proteinpulver	70	1 %
Charge 2 %			
	S3 Bug schier	3168	45 %
	S7/S8 / Speck /Deckelspeck und Rückenspeck	1680	24 %
	Eis	1842	26 %
	Proteinpulver	140	2 %
Charge 3 %			
	S3 Bug schier	2877	41 %
	S7/S8 / Speck /Deckelspeck und Rückenspeck	1680	24 %
	Eis	2063	30 %
	Proteinpulver	210	3 %

4.2.4 Herstellung und Prozessparameter

Das Fleisch kann dabei in Deutschland in verschiedenen Qualitätsstufen, die nach Tierart sortiert werden, eingeteilt werden. So wird Schweinefleisch von S I bis S X eingeteilt. Für die Herstellung von Brühwurst fein zerkleinert wird häufig Fleisch des Standards S III „Feinbrätmaterial; mageres Kutterfleisch mit einem höheren Sehnenanteil; sichtbarer Fettanteil: max. 10 %“ (Gewürzmüller & Fleischereiberatung Hack (GEHA), 2018) verwendet.

Die fertigen Würste wurden im Ganzen bei 4 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

4.2.4.1 Vorbereitungen

Das Schweinefleisch als auch der Schweinespeck wurden zunächst von unerwünschten Sehnen und Knochenrückständen befreit und separat auf 3 mm in einem Ladenwolf zerkleinert. Anschließend wurden die entsprechenden Chargenmengen eingewogen und in separaten Schüsseln über Nacht bei 2 °C gelagert.

4.2.4.2 Herstellung

Das Kuttern erfolgte im Magerbrätverfahren (Kunz, 1993). Jede Charge wurde entsprechend ihrer Rezeptur hergestellt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde immer zuerst die Charge ohne Kartoffelproteinpulver hergestellt.

Schritt 1: Das Fleisch wurde mit dem Nitritpökelsalz und mit den Kutterhilfsmitteln im Kutterer (1.500 – 3.000 Umdrehungen pro Minute) angekuttert. Während des Kutter-Vorgangs wurde die Temperatur regelmäßig überwacht. Anschließend wurde die Hälfte des Kuttereises hinzugegeben und zügig untergekuttert. Die Temperatur sank dabei auf ca. 1 °C. Als nächstes wurde das Kartoffelpulver langsam hinzugegeben und ebenfalls untergekuttert. Danach wurde der Speck und abschließend die Gewürze hinzugegeben. Zuletzt wurde die restliche Hälfte des Kutter-Eis zugegeben. Die Endtemperatur betrug 12 °C.

Schritt 2: Das Brät wurde mittels eines Vakuumabfüllers in Kaliber 60 Kunstdarm abgefüllt. Es wurden für den Vorversuch neun bis zehn Würste à 500 g abgefüllt. Für den Hauptversuch wurden sieben Würste à 500 g – 1000 g abgefüllt.

Schritt 3: Die Würste wurden bei 75 °C im Dampfkochschrank bis zu einer Kerntemperatur von 72 °C gegart (ca. 1h 30 min). Anschließend wurden sie für 45 min langsam bis zu einer Temperatur von 22 °C abgekühlt .

Methoden Teil II: Lebensmittelanalytik

In diesem Abschnitt der Arbeit werden die einzelnen Analysemethoden zur Erfassung der Qualitätsparameter beschrieben. Von jeder Charge wurden je vier Würste analysiert. Sowohl die Würste des Vorversuchs als auch die Würste des Hauptversuches wurden mit den jeweiligen Kontrollwürsten des Versuches verglichen. Alle in diesem Abschnitt erfassten Messwerte wurden statistisch durch Bildung des Mittelwertes und des Standardfehlers ausgewertet. Soweit nicht anders angegeben, wurde ebenso eine Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt (Tukey's pairwise comparison), um festzustellen, ob es signifikante Unterschiede zwischen den Chargen gab. Die Messungen waren signifikant unterschiedlich bei $p < 0,05$. Verwendet wurde dabei die online Version der Software Past. Zusätzliche Auswertungen werden im jeweiligen Abschnitt beschrieben.

4.3 Technologische und sensorische Qualitätsparameter

Instrumentell wurden die Parameter pH-Wert, Textur und Farbe analysiert. Über eine lebensmittelsensorische Verkostung wurden die Parameter Textur, Farbe, Geschmack, Geruch und Gesamteindruck bewertet.

4.3.1 pH-Wert

Der pH-Wert des rohen Fleisches als auch des Brätes ist ein Qualitätsparameter. Gemessen wurde der pH-Wert mit einer pH-Elektrode. Vor Verwendung wurde die pH-Elektrode kalibriert.

4.3.1.1 Prinzip

Der pH-Wert ist definiert als negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenaktivität ($\text{pH} = -\log_{10}(\text{aH}_3\text{O}^+)$). Die pH-Wert Messung basiert auf der Bestimmung der Aktivität der Wasserstoff Ionen. Dabei wird mit einer Einstabmesskette (bestehend aus Bezugselektrode und Glaselektrode) und einem Potentiometer gemessen. Mit diesem Potentiometer (pH-Meter) wird die Spannungsdifferenz zwischen der Bezugselektrode und der Glaselektrode gemessen. Das Signal wird durch das Potentiometer verstärkt und in pH-Einheiten abgelesen. Die Spannungsdifferenz ist proportional zur H_3O^+ -Ionenkonzentration (Pohling, 2015).

4.3.1.2 pH-Wert Bestimmung: Rohes Fleisch und Brät

Am Tag der Vorbereitung wurde der pH-Wert des zerkleinerten Fleisches dreimal an unterschiedlichen Einstichstellen gemessen. Ebenso wurde die Temperatur mit einem entsprechenden Stabthermometer erfasst. Nach dem Kuttern wurde der pH-Wert des Endbrätes nochmal an drei Einstichstellen gemessen, ebenso die Temperatur.

4.3.1.3 pH-Wert Bestimmung: Wurst

Des Weiteren wurde der pH-Wert der fertigen Wurst gemessen. Dazu wurde die pH-Elektrode an drei verschiedenen Stellen ca. 2 cm tief in die aufgeschnittene Wurst gesteckt. Die Temperatur wurde wiederum mit einem Stabthermometer überprüft.

4.3.2 Instrumentelle Texturanalyse

Die Analyse der Textur erfolgte zunächst instrumentell, mit einem Kraftmessgerät. Neben der Messung der Textur mit einem Kraftmessgerät wurde diese auch sensorisch über eine Verkostung beurteilt

4.3.2.1 Prinzip der Texturanalyse mit einem Kraftmessgerät

Bei der Textur-Profil-Analyse wird eine zylindrische Probe mithilfe eines wesentlich größeren Druckstempels gestaucht. Diese Stauchung erfolgt zwei Mal. Der Vorgang wird anschließend in einem Kraft-Verformungsdiagramm dargestellt (Abbildung 9). Bei der ersten Belastung kommt es zu einem ersten Bruch der Textur, im Diagramm dargestellt als erster Peak. Die Höhe dieses Peaks wird als Bruchfestigkeit (B_c) definiert (c = Kompression). Die Gesamtstauchung wird als zweiter Peak dargestellt und ist definiert als die Härte (F_c).

Der Druckstempel bewegt sich nach der ersten Belastung wieder nach oben, anschließend für die zweite Belastung nach unten. Die Elastizität (E_c) ist definiert als die Grundlinie der zweiten Belastung. Die Kohäsion (C_c) definiert das Verhältnis der Fläche der zweiten Belastung (A_2), zur Fläche der ersten Belastung (A_1). Das Produkt aus Härte und Kohäsion ist die Gummiartigkeit (G_c). Das Produkt aus Härte, Elastizität und Kohäsion beschreibt die Kaufähigkeit (Klettner, 1994).

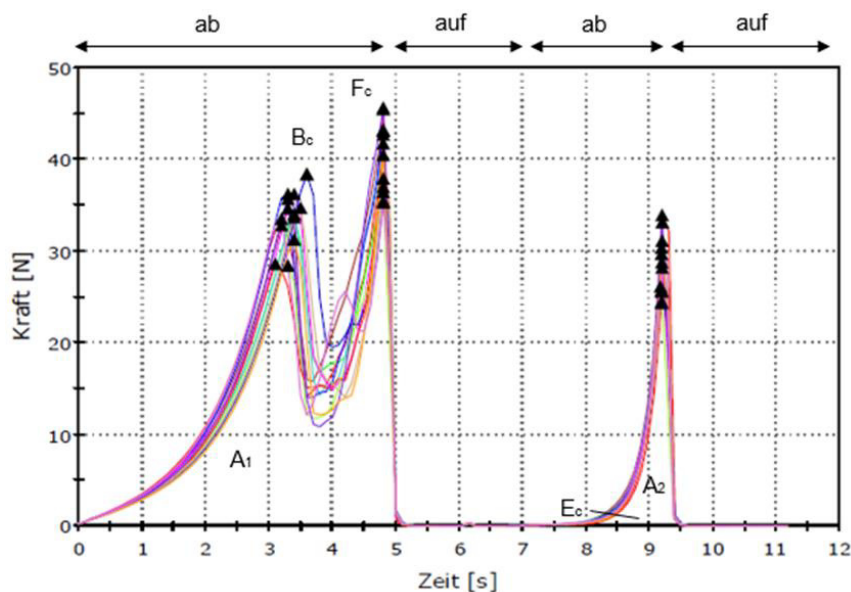


Abbildung 9: Kraft-Verformungsdiagramm mehrerer Brühwurstmessungen (5°C; 12,3 mm; Durchmesser V; Geschwindigkeit 2 mm/s).

4.3.2.2 *Probenvorbereitung*

Von jeder Wurst wurden Scheiben à 1 cm abgeschnitten. Anschließend wurden aus jeder Scheibe Zylinder, mit einem Durchmesser von 12,3 mm, ausgestochen. Dabei war darauf zu achten, dass keine Hohlräume in der Wurst mit ausgestochen wurden. Ebenso sollte kein Druck beim Ausstanzen ausgeübt werden, sondern die Zylinder wurden herausgedreht, um das spätere Ergebnis nicht zu verfälschen. Alle Zylinder wurden bis zur Messung bei 5 °C gelagert.

4.3.2.3 *Messung Textur-Prüfmaschine*

Die Messung der Textur erfolgte mit einer Textur-Prüfmaschine (Instron 1140). Mittels dieser wurde eine Textur-Profil-Analyse durchgeführt. Dabei wurden die Härte, Bruchfestigkeit, Kohäsion, Gummiartigkeit und Kaufähigkeit der Probe gemessen.

Die Stauchung betrug 80 % bis zum Bruch, die Temperatur der Probenzylinder 5 °C. Gemessen wurde mit einem 57 mm großen Druckstempel. Die Stauchung erfolgte zweimal pro Zylinderprobe. Pro Zylinder entstand ein Kraft-Verformungsdiagramm.

4.3.3 *Instrumentelle Farbanalyse*

Die Farbe wurde sowohl objektiv mit einem Farbmessgerät analysiert als auch während einer Verkostung beurteilt. Die Messung wurde mit dem tragbaren Chroma-Meter Colorimeter durchgeführt. Das Farbprinzip beruht dabei auf dem CIE $L^*a^*b^*$ -System nach DIN 6174 (Deutsches Institut für Normung e.V., 2007).

4.3.3.1 *Prinzip*

Die Messung der Farbe mit Farbmessgeräten basiert auf der mathematischen Definition der Farbe. Mit einem entsprechenden Dreibereichs-Farbmeßgerät können die Remissionsfarbwerte ermittelt werden, woraus die Normfarbewerte X, Y und Z berechnet werden können. Beim verwendeten CIELAB-System (CIE: Commission Internationale del' Éclairage) können die Farbmaßzahlen L^* , a^* und b^* aus den Normfarbwerten berechnet werden. Dabei gilt folgendes für das entsprechende Koordinatensystem: Im Nullpunkt liegen Grautöne (siehe Abbildung 10). Bei einem L^* -Wert von 0 ist die Farbe schwarz, bei einem Wert von 100 weiß. Die Farbtöne werden im a^* und b^* Koordinatensystem bestimmt. Negative a^* -Werte stellen grün dar, positive rot. Hingegen stellen negative b^* -Werte ein Maß für blau dar, positive b^* -Werte für gelb. Die Sättigung der Farbe ist damit umso höher, je positiver ein Wert ist (Klettner & Stiebing, 1980).

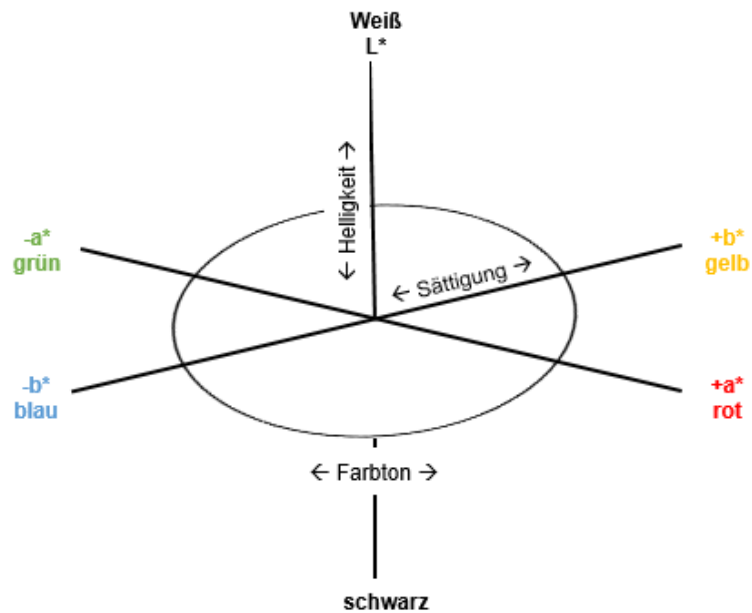


Abbildung 10: Koordinatensystem des CIELAB-Farbsystems.
Abbildung abgeändert (Klettner & Stiebing, 1980).

4.3.3.2 Probenvorbereitung

Von jeder Wurst wurden Scheiben à 4 mm Dicke abgeschnitten und sofort lichtgeschützt verpackt. Scheiben, welche Lufteinschlüsse oder inhomogene Bereiche aufwiesen, wurden nicht verwendet. Alle Scheiben wurden auf einem weißen Tablett ausgelegt.

4.3.3.3 Messung

Vor Verwendung wurde das Gerät entsprechend den Herstellerangaben kalibriert (Konica Minolta, 2002-2013). Die Messung erfolgte an drei verschiedenen Stellen pro Wurstscheibe. Die Messöffnung des Gerätes besaß einen Durchmesser von 8 mm. Pro Messung wurde jeweils für 1 s ein Blitzlicht von der Xenon Blitzlampe des Colorimeters emittiert. Die Farbmessungen erfolgten mit der Normlichtart D65, was natürlichem Tageslicht entspricht (Deutsches Institut für Normung e.V., 2014). Die Messung erfolgte mit einer spektralen Empfindlichkeit von CIE: 2° (Standard-Beobachter). Der Messempfänger besteht aus sechs Silizium-Fotodioden, welche das von der Probe senkrecht reflektierte Licht messen (laut CIE empfohlene Messgeometrie von $d/0^\circ$). Anschließend berechnete der Mikroprozessor des Gerätes die Farbwerte $L^*a^*b^*$.

Es wurde ebenso die Farberhaltung bestimmt. Dazu wurden die Scheiben auf einem Tablett ausgelegt. Das Tablett wurde für 30 min in einen Belichtungsschrank gestellt. Dieser wurde mit einer Tageslicht-Lampe ausgeleuchtet. Nach den 30-minütigen Belichtungen wurde die Farbmessung wie zuvor beschrieben durchgeführt.

4.3.3.4 Auswertung

Die Gesamtfarbdifferenz ΔE_{ab}^* wird mit der entsprechenden Formel nach DIN 6176 (EN ISO 11664-4) (Deutsches Institut für Normung e.V., 2018) berechnet (Formel 2). Dabei werden die Differenzen von ΔL^* , Δa^* und Δb^* berechnet, indem jeweils die L^* -, a^* -, und b^* -Werte einer Wurst ohne Kartoffelprotein von der einer Wurst mit Kartoffelprotein abgezogen werden.

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Formel 2: Gesamtfarbdifferenz-Formel gemäß DIN 6176.

Eine Gesamtfarbdifferenz (Farbabstand) von 1,00 stellt dabei allgemein einen visuell gerade noch wahrnehmbaren Unterschied zwischen den Chargen dar. Ein Wert über 2,00 wird deutlich vom Konsumenten wahrgenommen (Rödel, 1991).

4.3.4 Lebensmittelsensorik (Verkostung)

Neben der zuvor beschriebenen instrumentellen Textur- und Farbmessung wurde zudem eine, sensorische Prüfung der entwickelten Lyoner mit Kartoffelprotein, in Form einer Verkostung, durchgeführt. Sowohl die Würste des Vorversuches als auch des Hauptversuches wurden von Probanden verkostet. Die Verkostung wurde am Max Rubner-Institut in Kulmbach durchgeführt und es nahmen 9 Probanden im Vorversuch und 14 Probanden im Hauptversuch teil.

4.3.4.1 Prinzip

Die hergestellten Würste wurden im Rahmen einer Blindverkostung mit Hilfe der menschlichen Sinne wahrgenommen und bewertet. Verwendet wurde dafür ein Beliebtheitstest mit einer 9-Punkte-Skala.

4.3.4.2 Durchführung

Die Probanden sollten verschiedene Parameter, numerisch skaliert von 1 (nicht gut) bis 9 (sehr gut) bewerten. Ebenso konnten sie dazu noch eine Bemerkung abgeben. Auf dem Prüfbogen wurden folgende Parameter bewertet: „Wie finden sie ...: Textur, Farbe, Geschmack und Gesamteindruck von Produkt 1, 2“, usw. Im Hauptversuch wurde zusätzlich noch der Geruch bewertet.

Die sensorische Prüfung fand in einem Raum mit ausreichend Tageslicht und bei Raumtemperatur statt. Jeder Teilnehmer erhielt einen weißen Keramikteller mit drei gleich dicken Wurstscheiben (3 mm) pro Charge. Im Hauptversuch wurde, um die Textur besser erfassen zu können, eine einzelne dickere (10 mm) Scheibe hinzugelegt. Die Wurstchargen wurden durcheinander auf dem Teller ausgelegt und nummeriert.

4.4 Nährwertanalyse

In Bezug auf die ernährungsphysiologische Qualität der entwickelten Brühwurst wurden in einer Vollanalyse die allgemeinen Parameter Wasser-, Asche-, Fett- und Proteingehalt der einzelnen Chargen ermittelt. Als Anleitung diente dabei die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, 2005).

Die Homogenisation der Probe wurde mit einer Messermühle durchgeführt. Pro Wurst wurden ca. 100 g Probenmaterial homogenisiert. Anschließend wurde das Probenmaterial innerhalb von 24 h weiterverwendet. Vor der Einwaage wurde die Gesamtprobe nochmals durchmischt und auf Raumtemperatur gebracht. Alle Werte wurden auf eine Stelle nach dem Komma gerundet und sind in Gramm pro 100 g angegeben.

4.4.1 Wassergehalt (Trockenmasse)

Als Methode wurde das Referenzverfahren „Bestimmung des Wassergehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen – Gravimetrisches Verfahren“ (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2014c) verwendet.

4.4.1.1 Prinzip

Die homogenisierte Probe wird nach dem Verreiben mit Seesand bei 103 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet. Der Wassergehalt wird anschließend durch Differenzialwägung gravimetrisch ermittelt und daraus die Trockenmasse berechnet.

4.4.1.2 Durchführung und Berechnung

Eine Glasschale wurde mit ca. 30 g Seesand und mit einem Glasstab befüllt. Anschließend wurde die Glasschale mit dem Seesand auf 1 mg genau gewogen (Leergewicht). 5 g ± 10 % der homogenisierten Probe wurde in die vorbereitete Glasschale eingewogen und gleichmäßig mit dem Sand verrieben. Die Trocknung fand für 4 h im Trockenschrank bei 103 °C statt. Die Proben wurden anschließend im Exsikkator abgekühlt. Zuletzt wurde die Probe samt Schale auf 1 mg genau zurückgewogen. Der Wassergehalt der Probe in g/100g wird mit Hilfe der Formel 3 berechnet.

$$\text{Wassergehalt} \left[\frac{\text{g}}{100\text{g}} \right] = \frac{(m_0 - (m_2 - m_1)) * 100}{m_0}$$

m_0 : Einwaage [g]

m_1 : Masse der Glasschale mit Seesand und Glasstab (Leergewicht) [g]

m_2 : Masse der Abdampfschale mit Sand, Glasstab und getrockneter Probe (Rückwaage) [g]

Formel 3: Berechnung des Wassergehaltes in g/100g

Aus dem Wassergehalt lässt sich die Trockenmasse mit Hilfe der Formel 4 berechnen:

$$100 - \text{Wassergehalt [g]} = \text{Trockenmasse [g]}$$

Formel 4: Berechnung der Trockenmasse.

4.4.2 Aschegehalt

Unter dem Begriff Aschegehalt ist ein Rückstand zu verstehen, der bei der vollständigen Verbrennung aller organischen Bestandteile eines Lebensmittels entsteht. Dieser Rückstand kann abzüglich etwaiger Verunreinigungen oder auch Kohlepartikel korrelativ als Mineralstoffgehalt angegeben werden (Matissek et al., 2014). Zur Analyse des Aschegehaltes wurde das Referenzverfahren „Bestimmung der Asche in Fleisch und Fleischerzeugnissen - Gravimetrisches Verfahren“ (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2017) verwendet.

4.4.2.1 Prinzip

Die homogenisierte Probe wird in einem Quarztiegel vorverascht und anschließend bei 550 °C im Muffelofen verascht. Die Masse des so enthaltenen Rückstandes wird per Differentialwägung gravimetrisch erfasst.

4.4.2.2 Durchführung und Berechnung

5 g ± 10 % der homogenisierten Wurstprobe wurden in einen trockenen Quarztiegel eingewogen und bei 550 °C für 4 h verascht. Nach dem Abkühlen im Exsikkator (ca. 1,5 h) wird die Asche auf 1 mg genau zurück gewogen. Der Aschegehalt wurde mit Hilfe der Formel 5 in g/100g berechnet.

$$\text{Aschegehalt} \left[\frac{\text{g}}{100\text{g}} \right] = \frac{(m_2 - m_1) * 100}{m_0}$$

m_0 : Einwaage [g]

m_1 : Masse des leeren Quarztiegels (Leergewicht) [g]

m_2 : Masse des Quarztiegels mit der Asche nach dem Glühen [g]

Formel 5: Berechnung des Aschegehaltes in g/100g.

4.4.3 Fettgehalt

Um die ernährungsphysiologische Qualität der hergestellten Brühwurst mit Kartoffelprotein zu überprüfen, wurde der Gesamtfettgehalt der einzelnen Chargen bestimmt. Als Referenzverfahren wurde die „Gravimetrische Bestimmung des Gesamtfettgehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen nach Weibull-Stoldt“ (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2014a) verwendet.

4.4.3.1 Prinzip

Um Proteine aufzuschließen und gebundene Lipide freizusetzen, wird die Probe mit Salzsäure erhitzt. Die aufgeschlossene Lösung wird anschließend filtriert, neutral gewaschen und das zurückgehaltene Fett nach dem Trocknen des Filters mit Petrolether extrahiert. Das Extraktionsmittel wird abdestilliert, der getrocknete Rückstand gewogen und der Fettgehalt per Differenzialwägung ermittelt.

4.4.3.2 Vorbereitungen

Es wurden $7 \text{ g} \pm 10 \%$ der homogenisierten Probe in ein Wägeschiffchen eingewogen und in das Aufschlussglas überführt. Die Extraktionsgläser wurden mit 3 - 5 Siedesteinchen bestückt und für ca. 1 h im Trockenschrank bei $103 \text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet, im Exsikkator auf Raumtemperatur gebracht und abschließend gewogen.

4.4.3.3 Hydrolyse

Der Probenaufschluss wurde automatisiert mit einer Aufschlussapparatur durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben (C. Gerhardt GmbH & Co. KG, 2010). Nach dem Einsetzen des Faltenfilters konnte der Vorgang gestartet werden. Alle weiteren Schritte erfolgten automatisch. Zunächst erfolgte die Zugabe von 100 mL Salzsäure, welche zum Sieden gebracht wurde und für ca. 1 h schwach weiter siedete. Anschließend wurde die Mischung mit heißem Wasser auf die doppelte Menge verdünnt, durch den angefeuchteten Faltenfilter filtriert und das Filtrat anschließend neutral gewaschen. Der Filter wurde auf ein Urglas platziert und bei $103 \text{ }^{\circ}\text{C}$ im Trockenschrank ca. 1,5 h getrocknet.

4.4.3.4 Extraktion

Der abgekühlte Filter wurde in eine Extraktionshülse gegeben und diese mit Watte verschlossen. Anschließend wurde die Extraktion automatisch in der Soxhlet Apparatur nach den Herstellerangaben (C. Gerhardt GmbH & Co. KG, 2010) durchgeführt. Als Extraktionsmittel wurde Petrolether (vol% 40/60) verwendet. Die Extraktionszeit betrug 1 h. Nach Ablauf des Programms wurden die Extraktionsgläser bei $103 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für ca. 1 h im Trockenschrank getrocknet. Die getrockneten Extraktionsgläser wurden anschließend im Exsikkator abgekühlt und auf 1 mg genau bis zur Massenkonstanz ausgewogen.

3.6.3.5 Berechnung

Zur Berechnung des Gesamtfettgehalts (w) wurde Formel 6 verwendet. Das Ergebnis wurde in g/100 g angegeben. Das Ergebnis wurde auf eine Stelle nach dem Komma gerundet.

$$w = \frac{(m_2 - m_1) * 100}{m_0}$$

m_1 : Masse des leeren Extraktionsglases mit Siedesteinchen [g]

m_2 : Masse des Extraktionsglases mit Fett nach der Trocknung [g]

m_0 : Einwaage [g]

Formel 6: Berechnung des Gesamtfettgehaltes (w).

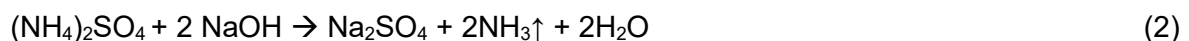
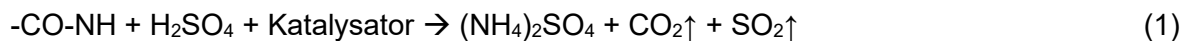
4.4.4 Proteingehalt

Um den Nährwert an Protein in den hergestellten Würsten zu analysieren, wurde das Referenzverfahren „Bestimmung des Rohproteingehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen – Titrimetrisches Verfahren nach Kjeldahl“ (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2014b) verwendet.

4.4.4.1 Prinzip

Bei der Kjeldahl Methode wird der organisch gebundene Stickstoff (Reaktionsgleichung 1) mit konzentrierter Schwefelsäure und unter Zugabe eines Katalysatorgemisches oxidativ aufgeschlossen. Das Katalysatorgemisch beinhaltet Metallsalze/oxide welche zur Sauerstoffübertragung dienen und Kaliumsulfat, das zur Erhöhung der Siedetemperatur verwendet wird.

Nach dem Aufschluss wird das entstandene Ammoniumsulfat mit Alkalizusatz versetzt (Reaktionsgleichung 2). Der daraus freigesetzte Ammoniak wird, nach Zugabe von konzentrierter Natronlauge, mit Hilfe einer Wasserdampfdestillation in eine borsäurehaltige Titrationsvorlage überführt (Reaktionsgleichung 3). Die anschließende Titration findet mit Salzsäure statt (Reaktionsgleichung 4). Der Proteingehalt der zu analysierenden Wurstprobe wird unter Berücksichtigung des Stickstoffgehaltes (Faktor 6,25) berechnet.



4.4.4.2 Herstellung der Lösungen

Die hergestellten Lösungen sind in Tabelle 24 zu finden.

Tabelle 24: Lösungen zur Proteinbestimmung.

Lösung	Konzentration	Herstellung
Natronlauge	15 %	180 g NaOH-Plättchen wurden mit 1010 mL dest. Wasser gelöst.
Indikator Bromthymolblau	-	5 g Bromthymolblau wurden in 20 mL Ethanol gelöst und mit 1 L dest. Wasser versetzt

4.4.4.3 Aufschluss

Es wurden $1,5 \text{ g} \pm 10 \%$ homogenisierte Wurstprobe mittels eines Wägeschiffchens in einen Kjeldahl-Kolben eingewogen. Anschließend wurden 20 - 25 mL konzentrierte Schwefelsäure und zwei Katalysatortabletten hinzugegeben. Pro Aufschluss wurde mindestens ein Blindwert mitgeführt. Die vorbereiteten Kjeldahl-Kolben wurden anschließend in den Aufschlussblock des Hochtemperatur-Schnellaufschluss-Systems gestellt. Zunächst heizte das Gerät bis zum Sieden auf. Anschließend wurde die Probe für 60 - 80 min aufgeschlossen. Nach 30 min sollte die Lösung klar und hellgrün geworden sein. Während der gesamten Aufschlusszeit lief der Gaswäscher. Für die Wasserflasche wurden ca. 1,2 L einer 15 % Natronlauge mit 2 - 3 mL Bromthymolblau als Indikator versetzt (Farben: Neutral = grün, Sauer = gelb, Alkalisch = blau).

4.4.4.4 Wasserdampfdestillation und Titration

Die Wasserdampfdestillation und Titration wurden ebenfalls automatisch durchgeführt. Die Einstellungen des Programms orientierten sich dabei an den Herstellerangaben und sind in Tabelle 25 zu finden. Die Titration erfolgte automatisch. Zur Titration wurde eine 0,1 mol/L Salzsäure als Maßlösung verwendet. Titriert wurde nach pH-Wert, bis zu einem festgelegten Endpunkt. Dieser entspricht dem pH-Wert der Borsäurelösung in der Destillatvorlage. Vor Verwendung wurde die pH-Elektrode kalibriert.

Tabelle 25: Programm der automatischen Wasserdampfdestillation.

Programmparameter	Einstellungen (VAP 50s LFGB§64)
H ₂ O Zugabe	87 mL
konzentrierte NaOH	78 mL
Destillationszeit	4 min
Dampfleistung	100 %
H ₃ BO ₃ Zugabe	71 mL
Probenabsaugung	30 s
Vorlagenabsaugung	30 s
Titration (Maßlösung HCl)	automatisch

4.4.4.5 Berechnung

Der Anteil an organischem Stickstoff in der Probe wird in Prozent mit der Formel 7 berechnet.

$$N [\%] = \frac{1,4007 * c * (V - V_b)}{E}$$

1,4007: 1 mL 0,1 N HCl Maßlösung entspricht 1,407 mg Stickstoff

c: H⁺-Ionenkonzentration der Maßlösung (HCl c = 0,1 mol/L)

V: Verbrauch an Titrant für die Probe [mL]

V_b: Verbrauch an Titrant für die Blindprobe [mL]

E: Einwaage [g]

Formel 7: Berechnung des organischen Stickstoffs in Prozent.

Daraus wird der Anteil an Rohprotein in Prozent berechnet (siehe Formel 8)

$$\text{Rohprotein} [\%] = N [\%] * 6,25$$

N: Anteil an organischem Stickstoff in der Probe [%]

Formel 8: Berechnung des Rohproteingehaltes.

4.4.5 Bestimmung der Aminosäuren

Die Aminosäurebestimmung wurde intern von einer anderen Arbeitsgruppe des MRI Kulmbach durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. Es wurde die Methode nach Buta *et. al.* verwendet (Buta et al., 2019).

Pro Wurst und Brät wurden ca. 100 g Probenmaterial homogenisiert. Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmungen. Der Aminosäuregehalt wurde in mg pro 100g erhalten. Es wurden je zwei Würste pro Charge analysiert.

Methoden Teil III: Entwicklung einer real-time PCR Methode

4.5 Probenvorbereitung (Molekularbiologische Analysen)

Nach Erhalt der Kartoffelknollen wurde jeweils eine bis zwei der entsprechenden Sorte bei Tageslicht bis zur Keimung gelagert. Sobald genügend Keimlinge vorlagen, wurden diese mit einem sterilen Skalpell abgetrennt. Parallel wurden von einzelnen Kartoffeln auch Proben der Knolle verwendet, der Kartoffelschale oder der getrockneten Knolle (über Nacht bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet). Von allen weiteren Pflanzen wurden jeweils die Samen zur DNA-Isolierung genutzt. Zum Zerkleinern wurden alle Proben in einer Getreidemühle gemahlen, bis eine homogene Masse oder ein feines Pulver entstand. Verwendet wurden sterile Mahlkammern.

Sowohl 10 g der Wurst- als auch der Brät-Proben wurden in sterilen Einweg-Reaktionsgefäßen mittels einer Kugel-Mühle homogenisiert, bis eine homogene Masse entstand.

Von allen feuchten Proben wurden 300 mg in ein 2 mL Reaktionsgefäß eingewogen (auf 1 mg genau). Von allen getrockneten Proben wurden 100 mg eingewogen. Die Einwaage wurde mittels einer Feinwaage durchgeführt. Von einer Ausgangsprobe wurden je zwei Proben eingewogen.

4.6 DNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung

Um die genomische DNA aus den vorhandenen pflanzlichen oder tierischen Proben zu isolieren, wurden zwei verschiedene kommerzielle Kits getestet und eine Cetyltrimethylammoniumbromid-Methode (CTAB-Methode). Die extrahierte DNA wurde für maximal eine Woche bei 4 °C gelagert oder zur langfristigen Lagerung bei -20 °C tiefgefroren.

4.6.1 Wizard® Kit

Mit Hilfe des Wizard® Kits (Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System + Wizard® DNA Clean-Up System) wurde genomische DNA aus pflanzlichen und tierischen Lebensmittelproben isoliert.

4.6.1.1 Prinzip

Das Wizard® Kit basiert auf einer Silika-Harz Methode. Durch chemische und enzymatische Behandlung der Probe werden die Zellen aufgeschlossen, Proteine denaturiert und die DNA in wässrige Lösung gebracht. Anschließend erfolgt die Bindung der DNA an eine Silika-Säule. Das Waschen erfolgt mit einer alkoholhaltigen Lösung. Anschließend wird mit einem Puffer eluiert.

4.6.1.2 Herstellung der Lösungen

Alle Lösungen, welche für die Anwendung des Wizard® Kit benötigt werden, sind in Tabelle 26 und 27 zusammengefasst.

Tabelle 26: Chemikalien zur Herstellung des Wizard® Extraktionspuffers, mit Mengenangaben für 1 L. Der pH-Wert wurde mit verdünnter Salzsäure auf 8,0 eingestellt.

Chemikalie	Konzentration	Menge [g]
TRIS *	10 mM	1,21
NaCl	150 mM	8,77
EDTA **	2 mM	0,74
SDS ***	1 %	10,0

* Tris(hydroxymethyl)aminomethan ** Ethylendiamintetraacetat *** Natriumdodecylsulfat

Tabelle 27: Herstellung der verwendeten Lösungen für das Wizard® Kit.

Lösung	Konzentration	Herstellung
Guanidin Hydrochlorid	5 M	47,8 g Guanidin Hydrochlorid gelöst in 100 mL autoklaviertem bidest. Wasser
Proteinase K	20 mg/mL	50 mg der Proteinase K in 2,5 mL Puffer gelöst
RNase	10 mg /mL	100 mg RNase A gelöst in 10 mL H ₂ O _{dd}
Elutionspuffer	10 mM TRIS	242,4 mg TRIS in 200 mL autoklaviertem bidest. Wasser gelöst. pH-Wert wurde mit verdünnter Salzsäure auf 9,0 eingestellt.
Waschpuffer	95 % Ethanol	95 mL, 99,9 % Ethanol gemischt mit 5 mL H ₂ O _{dd}
Isopropanol	80 %	80 mL, 100 % Isopropanol gemischt mit 20 mL H ₂ O _{dd}

4.6.1.3 Durchführung

Alle Zentrifugationsschritte fanden bei Raumtemperatur in einer Mikrozentrifuge statt. Handelte es sich um trockenes Probenmaterial, wurde der Einwaage (100 mg) noch 200 µL H₂O_{dd} hinzugegeben. Zusätzlich wurde bei jeder Extraktion eine Extraktionskontrolle mitgeführt (300 µL H₂O_{dd}). Zur Zellyse wurden 900 µL Extraktionspuffer, 100 µL 5 M Guanidin-Hydrochlorid und 40 µL Proteinase K (20 mg/mL) hinzugegeben und anschließend auf einem Vibrationsmischer durchmischt. Die Inkubation der Proben fand unter Schütteln (Zyklus: 1 min 1.200 rpm, 5 min Pause) über Nacht im Thermomixer statt.

Am nächsten Tag wurden die Proben nach kurzem Abkühlen für 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. 500 µL des Überstandes wurden danach entnommen und in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß pipettiert und mit 5 µL RNase (10 mg/mL) versetzt. Danach erfolgte die Inkubation bei 60 °C für 5 min im Thermomixer. Nach erneutem Abkühlen erfolgte die Zugabe von 1 mL Wizard® Resin. Durch leichtes Kippen wurden die Lösungen vermischt.

Das Wizard®-Syringe Barrel und die Wizard® - Minisäule wurden zusammengesteckt und auf das Vakuum Manifold aufgesteckt. Nun wurde die Proben-Resin-Mischung in das Wizard® - Syringe Barrel pipettiert und durch Anlegen eines Vakuums durch die Säule gezogen. Im nächsten Schritt wurde die Minisäule gewaschen. Dazu wurde 1 mL Wizard®-Wasch-Lösung in das Syringe Barrel gegeben und wie zuvor beschrieben anschließend per Vakuum durch die Säule gezogen. Der zweite Waschschrift erfolgte mit 2 mL 80 % Isopropanol. Danach wurde das Syringe Barrel verworfen, die Minisäule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und bei 10.000 rpm für 2 min abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde die Minisäule für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet, um das Isopropanol vollständig zu entfernen.

Abschließend erfolgte der Elutionsschritt. Die getrocknete Säule wurde dazu in ein frisches 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde mittig auf die Säule 100 µL des 70 °C heißen Elutionspuffers gegeben. Proben, bei denen ein sehr geringer DNA-Gehalt erwartet wurde, wurden mit 50 µ eluiert. Nachdem die Säule 5 min stehen gelassen wurde, erfolgte abschließend die Zentrifugation der Säule bei 10.000 rpm für 2 min.

4.6.2 CTAB-Extraktion

Neben der Silika-Gel-basierten Methode wurden zwei CTAB-Methoden getestet. Dabei wurde ein kommerzielles Kit verwendet: DNeasy® mericon® Food Kit und eine nicht-kommerzielle, modifizierte CTAB-Methode. Bei letzterem handelt es sich um die Methode AM022 „Qualitative PCR zum Nachweis transgener Kartoffeln mit verändertem Stärkestoffwechsel oder Schädlingsresistenz“ (Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, 2009).

4.6.2.1 Prinzip

Durch enzymatische Behandlung der homogenisierten Probe werden die Zellen lysiert und die DNA in wässrige Lösung gebracht. Abhängig von der Salzkonzentration bildet CTAB Komplexe mit unterschiedlichen Molekülen. Bei niedrigen Salzkonzentrationen bildet es Komplexe mit Nukleinsäuren, bei hohen Salzkonzentrationen mit entsprechenden Inhibitoren (z.B. Proteine). Dabei bilden sich zwei Phasen, eine untere organische, in der möglichst viele Inhibitoren enthalten sind, und eine obere wässrige Phase, in der die DNA gelöst vorliegt. Anschließend wird die DNA mit Isopropanol gefällt und abschließend mit Ethanol gewaschen. Nach vollständigem Trocknen des Pellets wird dieses wieder in wässrige Lösung gebracht.

4.6.2.2 Durchführung DNeasy® mericon® Food Kit

Die Durchführung erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers für eine Probenmenge von 200 mg. Bei trockenen, gemahlenen Proben wurden zu 100 mg Einwaage, 100 µL H₂O_{dd} ergänzt. Dem Waschpuffer wurden vor Verwendung 99,9 % Ethanol hinzugefügt (Volumen nach Herstellerangaben). Alle anderen Lösungen lagen bereits gebrauchsfertig vor.

Zu dem bereits eingewogenen Probenmaterial wurden 1 mL Lyse-Puffer und 2,5 µL Proteinase K Lösung (20 mg/mL) hinzugefügt. Anschließend fand die Inkubation der Proben bei 60 °C für 30 min im Thermomixer statt. Es wurde konstant mit 1.000 rpm geschüttelt. Danach wurden die Proben, auf Eis, auf Raumtemperatur abgekühlt. Nun wurde bei 4.900 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Da immer noch Schwebeteilchen im Überstand sichtbar waren, wurde nochmals bei 10.000 rpm für 5 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden 500 µL Chloroform in einem 2 mL Reaktionsgefäß vorgelegt.

Um genügend Überstände für die Chloroform Extraktion zu erhalten, wurden vier Proben für die Lyse angesetzt, welche beim Extraktionsschritt vereint wurden. Dazu wurde der Überstand der vier Proben in einem neuen Reaktionsgefäß gemischt. Von diesem Gesamtüberstand wurden anschließend 700 µL zum bereits vorgelegten Chloroform pipettiert. Dieses wurde dann für 15 s mittels Vibrationsmischer vermischt und bei 14.000 rpm für 15 min zentrifugiert.

Im Aufreinigungsschritt wurden 350 µL Bindepuffer in einem neuen 2 mL Reaktionsgefäß vorgelegt. Zu diesem wurden 350 µL des wässrigen Überstandes aus dem vorherigen Schritt gegeben und mittels Vibrationsmischer gemischt. Des Weiteren wurde diese Lösung auf eine QIAquick-Säule pipettiert, welche zuvor auf ein neues 2 mL Sammelgefäß gesetzt wurde. Die Lösung wurde anschließend bei 13.000 rpm für 1 min durch die Säule zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Nun wurden 500 µL Waschpuffer auf die Säule gegeben und erneut bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Alle Reste des Waschpuffers wurden durch die Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min entfernt. Als letztes wurde die Säule auf ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß gesetzt, 150 µL Elutionspuffer auf die Säule gegeben und bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert. Zentrifugiert wurde abschließend bei 13.000 rpm für 1 min.

4.6.2.3 Durchführung modifizierte CTAB-Extraktion

Der in Tabelle 28 beschriebene CTAB-Extraktionspuffer wurde für die nicht kommerzielle CTAB-Methode verwendet. Ebenso wurden die in Tabelle 27 beschriebenen Proteinase K und RNase-Lösungen verwendet als auch eine 75 % Ethanol-Lösung, hergestellt aus 99,9 % Ethanol.

4. Material und Methoden

Tabelle 28: Verwendete Chemikalien (Gelöst in H₂O_{dd}) zur Herstellung von 500 mL CTAB-Extraktionspuffer. Der pH-Wert wurde mit verdünnter Salzsäure auf 8,0 eingestellt.

Chemikalie	Konzentration	Menge [g]
CTAB	20 g/L	10,00
NaCl	1,4 mol/L	40,19
TRIS	0,1 mol/L	6,06
EDTA	0,02 mol/L	3,72

Zur Zelllyse wurde die homogenisierte und eingewogene Probe mit 1 mL CTAB-Extraktionspuffer versetzt. 10 µL RNase A (100 mg/mL) wurden anschließend dazu pipettiert. Die Mischung wurde 30 s gevortext und für 30 min bei 65 °C im Thermomixer inkubiert. Zwischendurch wurde die Probe drei bis vier Mal mittels Vibrationsmischer gemischt. Nach der Inkubation wurde bei 10.000 rpm für 20 s zentrifugiert, danach 25 µL Proteinase K-Lösung (20 mg/mL) hinzugegeben und wiederum per Vibrationsmischer gemischt. Nun wurde die Probenlösung nochmals bei 65 °C für 2 h im Thermomixer unter schütteln (1000 rpm) inkubiert. Währenddessen wurde gelegentlich mittels Vibrationsmischer gemischt.

Im nächsten Schritt wurde nicht lysiertes Probenmaterial bei 10.000 rpm für 10 min abzentrifugiert. 800 µL des Überstandes konnten anschließend abgenommen werden und wurden in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt. 600 µL Chloroform wurden hinzu pipettiert und die Mischung anschließend mittels Vibrationsmischer vermengt.

Durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 min erfolgte die Phasentrennung. Danach wurde die obere, wässrige Phase in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt, in welchem bereits 600 µL Chloroform vorgelegt waren. Die Lösung wurde vier bis fünf Mal invertiert und anschließend 15 s mittels Vibrationsmischer gemischt. Zentrifugiert wurde nun für 5 min bei 10.000 rpm, bis eine Phasentrennung erfolgte.

Im weiterführenden Schritt, der Isopropanolfällung, wurden 400 µL der oberen, wässrigen Phase abgenommen und in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 320 µL Isopropanol pipettiert, das Ganze gemischt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Danach erfolgte die Pelletierung der DNA durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 15 min. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen.

Im vorletzten Schritt erfolgte die Reinigung der DNA. Dazu wurden zum Pellet 500 µL einer 75 % Ethanol-Lösung hinzugegeben und das Ganze anschließend mittels Vibrationsmischer gemischt. Zentrifugiert wurde danach bei 10.000 rpm für 5 min, der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Der Reinigungsschritt wurde darauffolgend nochmals wiederholt.

Abschließend wurde ein letztes Mal für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, um alle Ethanol-Reste abzutrennen. Nun wurde das Pellet mit offenem Deckel 5 min bei Raumtemperatur getrocknet, falls nötig auch etwas länger. Alle Pellets wurden im letzten Schritt in 100 µL H₂O_{dd} resuspendiert. Bei Proben, bei denen eine geringe Menge DNA erwartet wurde, wurde das Pellet in nur 50 µL aufgenommen.

4.6.3 DNA Konzentrations-, und Qualitätsbestimmung

Die DNA-Konzentration als auch die Reinheit der Lösung wurde mittels UV-Spektroskopie bestimmt. Verwendet wurde dafür das Vollspektrum-UV/VIS-Spektralphotometer NanoDrop™. Dieses Gerät zeichnet sich dadurch aus, dass nur geringste Volumina an DNA-Lösung zur Messung benötigt werden (0,5 - 2 µL). Doppelsträngige DNA kann in einem Konzentrationsbereich von 2 - 15.000 ng/µL detektiert werden.

4.6.3.1 Prinzip

DNA besitzt ein Absorptionsmaximum bei 260 nm und kann somit photometrisch erfasst werden (Schmidt, 2017). Das Messprinzip beruht auf den Grundlagen des Lambert Beer'schen Gesetzes (Formel 9), mit Hilfe dessen die Konzentration einer klaren Lösung bestimmt werden kann. Dabei wird die Extinktion E (Abschwächung der Intensität) eines Lichtstrahls beim Durchqueren einer klaren Lösung gemessen. Die Extinktion ist dabei abhängig von den chemischen Eigenschaften der absorbierenden Substanz in der Lösung. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration c (Saunders & Parkes, 1999; Thermo Scientific, 2010)

$$E = \varepsilon \times c \times d$$

ε = Molarer Extinktionskoeffizient in (ng/µL)⁻¹·cm⁻¹

c = Konzentration der absorbierenden Moleküle in ng/µL

d = Länge der Messstrecke (Küvette) in cm

Formel 9: Lambert Beer'sches Gesetz.

Ebenso kann die Reinheit der Probe bestimmt werden, in dem die Extinktion zusätzlich bei 230 nm (Absorption organischer Verbindungen und Kohlenhydrate) und bei 280 nm (Absorption Proteine) gemessen wird. Daraus werden die Quotienten A_{260/280} und A_{260/230} gebildet. Dabei werden Quotienten wie für eine reine DNA-Lösung angestrebt. Reine DNA-Lösungen haben einen Quotienten A_{260/280} von mindesten 1,8 und einen Quotienten A_{260/230} zwischen 2,0 und 2,2 (Kang, 2019).

4.6.3.2 Durchführung

Es wurde im „doppelsträngige DNA“ Modus gemessen. Als erstes erfolgte die Messung des Blindwertes, welcher nachfolgend automatisch von jeder weiteren Messung abgezogen wurde. Dazu wurden 2 µL des bei der DNA-Extraktion verwendeten Elutionspuffers analysiert. Anschließend erfolgte die Messung der DNA-Proben (2 µL). Das Spektrum der Extinktionsmessung wurde automatisch von 220–340 nm aufgezeichnet (siehe Abbildung 11) und die DNA-Konzentration nach Formel 9 automatisch berechnet. Ebenso wurden die Quotienten $A_{260}/230$ und $A_{260}/280$ berechnet. Jede DNA-Probe wurde zweimal gemessen. Anschließend wurde aus den erhaltenen Werten jeweils der Mittelwert berechnet und mit dieser Konzentration weitergearbeitet. Zur Qualitätskontrolle wurde bei jeder Messung auch die Extraktionskontrolle gemessen.

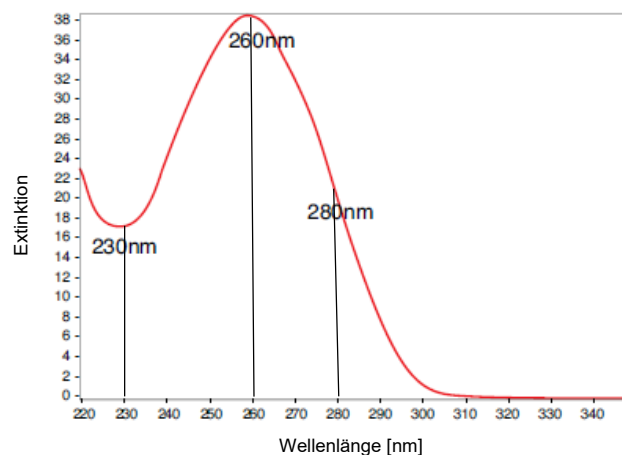


Abbildung 11: Beispiel eines Spektrums, erhalten mit dem Thermo Scientific NanoDrop™ 2000/2000c. Das Spektrum einer DNA-Lösung wurde von 220 - 340 nm aufgenommen. Im Graphen sind die zwei wichtigen Punkte bei 230 und 280 nm, sowie das Absorptionsmaximum der doppelsträngigen DNA bei 260 nm beschriftet (Thermo Scientific, 2010).

4.6.4 DNA-Aufreinigung

DNA-Proben, deren Extinktionsverhältnis nicht $A_{260}/230 \geq 1,8$ und $A_{260}/280 = 2,0 - 2,2$ entsprachen, wurden mit Hilfe eines kommerziellen Kits aufgereinigt. Zur DNA-Aufreinigung wurde das QIAquick® PCR Purification Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben.

4.6.4.1 Prinzip

Die gelöste DNA wird mit einem salzhaltigen Puffer versetzt und an eine Silika-Säule gebunden. Noch vorhandene Inhibitoren oder Verunreinigungen werden durch das Waschen der Säule mit einer Ethanol-Lösung entfernt. Abschließend wird die gereinigte DNA mit einem wässrigen, salzarmen Puffer eluiert.

4.6.4.2 Durchführung

Vor Verwendung des Kits wurden dem QIAquick® Bindepuffer im Verhältnis 1:250 der beiliegende pH-Indikator zugegeben. Eine gelbe Farbe zeigt den gewünschten pH-Wert von 7,5 an. Nach den Herstellerangaben wurden dem QIAquick® Waschpuffer 99,9 % Ethanol beigelegt.

250 µL Bindepuffer wurden zu 50 µL DNA-Lösung in einem 1,5 µL Reaktionsgefäß pipettiert. (Falls der pH-Indikator orange oder violett wurde, wurden 10 µL 3M Natriumacetat hinzugegeben (pH 5,0), um den pH-Wert wieder auf 7,5 einzustellen). Die Lösung wurde durch Invertieren gemischt. Es wurde jeweils eine QIAquick® Säule in ein passendes 2 mL Sammel-Reaktionsgefäß gestellt. Im nächsten Schritt wurde die DNA-Puffer-Lösung auf die Säule gegeben und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wieder in das gleiche Sammel-Reaktionsgefäß gestellt. Im nachfolgenden Waschschrift wurden 750 µL QIAquick® Waschpuffer auf die Säule gegeben, und erneut für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt, um die Säule zu trocknen. Abschließend wurde die Säule auf ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß gesetzt und 30 - 50 µL QIAquick® Elutionspuffer (10 mM Tris•Cl, pH 8.5) mittig auf die Säule pipettiert. Anschließend wurde für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert.

4.7 Konventionelle PCR

Um die passende Zielsequenz sequenzieren zu lassen und eine ausreichende Menge an DNA dieses Abschnittes vorliegen zu haben, wurde eine konventionelle PCR mit Hilfe eines Thermocyclers durchgeführt. Das Prinzip der konventionellen PCR ist in Abschnitt 3.6.2 beschrieben.

4.7.1 Standardreagenzien des Mastermix

Alle Reagenzien der konventionellen PCR wurden bei -20 °C gelagert und vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht. Gearbeitet wurde in einer sterilen Werkbank.

Als Polymerase wurde die HotStarTaq® DNA-Polymerase verwendet. Dabei handelt es sich um eine Polymerase, welche durch initiale Denaturierung aktiviert werden muss. Neben der Polymerase wurde der dazugehörige HotStarTaq® Puffer (enthält 15 mM MgCl₂) als auch die Magnesiumchlorid-Lösung (25 mM) verwendet. Vor Gebrauch wurde die 25 mM dNTP-Stammlösung 1:10 mit 0,1 M TE Puffer verdünnt. Mit H₂O_{dd} Wasser wurde der Mastermix auf sein endgültiges Volumen von 50 µL ergänzt.

4.7.2 Durchführung der konventionellen PCR

Jeder Einzelansatz bestand aus 50 µL. Zur Minimierung von Fehlern durch das Pipettieren wurde der Mastermix für alle Ansätze eines Laufes gemeinsam pipettiert. Von jeder DNA-Lösung wurden 20 ng DNA pro PCR Lauf verwendet. Als Negativkontrolle wurde bei jedem Lauf eine „no template control“ (NTC) mitgeführt. Diese enthielt anstatt der DNA-Lösung das gleiche Volumen an H₂O_{dd}. Für den Mastermix wurde das Pipettierschema aus Tabelle 29 verwendet.

Tabelle 29: Pipettierschema des Mastermixes der konventionellen PCR.

Lösung	Konzentration	Volumen [µL]	Endkonzentration
H ₂ O _{dd}	-	23,5	-
PCR Puffer	10x, 15,0 mM MgCl	5,0	-
MgCl ₂	25,0 mM	5,0	4,0 mM
dNTP Mix	2,5 mM	2,0	0,1 mM
Primer forward	10,0 µM	2,0	0,4 µM
Primer reverse	10,0 µM	2,0	0,4 µM
HotStarTaq® Polymerase	5,0 U/µl	0,5	2,5 U
+ DNA-Probe	2,0 ng/µL	10,0	20 ng/Ansatz
Gesamtvolumen	-	50,0	-

Das Temperaturprogramm des Cyclers ist in Tabelle 30 zu finden.

Tabelle 30: Temperaturprogramm der konventionellen PCR zur DNA-Vervielfältigung.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	15 min	einmalig zu Beginn
Denaturierung	95	15 s	} 40
Annealing	60	60 s	
Elongation	72	30 s	
Halten	20	-	

4.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde für die Überprüfung der konventionellen PCR, für die Überprüfung von real-time PCR Läufen und zusätzlich für die Bestimmung der Fragmentierung der isolierten DNA aus Kartoffelprotein genutzt.

4.8.1 Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund der negativen Ladung wird die DNA im elektrischen Feld vom Pluspol der Elektrode angezogen. Durch die Porosität des Agarosegels bewegen sich große DNA-Abschnitte langsamer zum Pluspol als kleinere Abschnitte. Nach der Auftrennung der PCR Produkte wird die DNA mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid angefärbt. Anschließend erfolgt die Fotodokumentation des Gels unter UV-Licht.

4.8.2 Herstellung und Beladung der Agarosegele

Zur Herstellung der Gele wurde der in Tabelle 31 beschriebene TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) verwendet.

Tabelle 31: Chemikalien (gelöst in H₂O_{dd}) zur Herstellung von 1 L TBE-Puffer.

Chemikalie	Konzentration [mM]	Menge [g]
TRIS	89	10,8
Borsäure	89	5,5
EDTA	2	0,7

Für ein 2,5 % Agarosegel wurden 2,5 g Agarosepulver mit 100 mL TBE-Puffer versetzt. Die Lösung wurde in der Mikrowelle bei 450 Watt bis zum vollständigen Auflösen erhitzt. Für 1 % Gele wurde entsprechend 1 g Agarosepulver in 100 mL TBE-Puffer gelöst. Anschließend wurde die Lösung in die Gießapparatur mit einem 16-Taschen-Kamm oder einem 8-Taschen-Kamm gegossen. Zum Erstarren wurden die Gele für 1-2 h stehen gelassen. Anschließend wurde der Kamm entfernt, das Gel aus der Gießkammer genommen und direkt weiterverwendet oder bei 4 °C für maximal eine Woche gelagert.

4.8.3 Durchführung Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese fand mittels des PowerPac™ HC-Netzteils statt. Als Puffer-Lösung wurde TBE-Puffer verwendet.

4.8.3.1 Überprüfung der konventionellen PCR und der real-time PCR

Das 2,5 % Agarosegel wurde in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresewanne gelegt und wie in Tabelle 32 beschrieben beladen. Zur Größen-Markierung wurden die Marker aus Tabelle 33 verwendet. Bei jedem Lauf wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, wobei die Probenlösung durch die NTC der PCR ersetzt wurde. Im Anschluss wurde für ca. 1-1:30 h eine Spannung von 100 V angelegt.

Tabelle 32: Verwendete Volumina der einzelnen DNA-Ladepuffer.

Gel	Anzahl Geltaschen	Volumen DNA- Lösung [μL]	Volumen DNA- Ladepuffer [μL]	Gesamtvolumen [μL]
2,5 %	16	10	2 *	12
2,5 %	8	23	2 *	25
1 %	16	5	5 **	10

* DNA-Ladepuffer: BioLabs Loading Dye (6x) no SDS purple

** DNA-Ladepuffer: Lambda DNA/HindIII (6x)

Tabelle 33: Verwendete Größen-Marker mit eingesetztem Volumen.

Gel	Größen-Marker [bp]	Verwendetes Volumen [μL]
2,5 %	25-766	6
1 %	125-23130	3 (+ 5 DNA-Ladepuffer)

4.8.3.2 Prüfung auf DNA-Fragmentierung

Des Weiteren wurde eine Agarose-Gelelektrophorese der isolierten Proteinpulver-DNA durchgeführt und als Referenz wurde die DNA aus einer frischen Kartoffel eingesetzt. Verwendet wurde dazu ein 1 % Gel, welches wie in Tabelle 32 beschrieben, beladen wurde. Außerdem wurde der Marker aus Tabelle 33 verwendet. Es wurde für ca. 1 h eine Spannung von 100 V angelegt. Als Negativ-Kontrolle wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ verwendet.

4.8.4 Färbung und Dokumentation des Gels

Das Gel wurde zunächst für 30 min in die Ethidiumbromid-Färbelösung (300 mL TBE Puffer + 600 μL Ethidiumbromid (0,5 mg/mL)) gelegt und anschließend für 10 min in die Waschlösung ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$). Die Fotodokumentation des Gels fand anschließend unter UV-Licht statt.

4.8.5 DNA-Aufreinigung (Gel)

Zur Weiterverwendung wurden die zuvor per Agarose-Gelelektrophorese getrennten, spezifischen Banden mittels eines UV-Tisches aus dem Gel herausgeschnitten und in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die DNA aus den herausgeschnittenen Banden wurde anschließend mittels des Wizard® SV Gel und PCR Clean-Up Systems aus dem Gel herausgelöst. Bei jeder Isolierung wurde eine Extraktionskontrolle mitgeführt.

4.8.5.1 Prinzip

Der Schmelzpunkt von Agarose liegt bei 50-65 °C. Dadurch kann die DNA durch Erhitzen aus dem Agarosegel gelöst werden. Nach dem Schmelzen wird die DNA an eine Silika-Membran, in Anwesenheit chaotroper Salze gebunden. Anschließend wird die Silika-Säule mittels alkoholhaltiger Lösung gewaschen. Abschließend wird die DNA mittels wässriger Lösung von der Membran eluiert.

4.8.5.2 Durchführung

Vor Verwendung des Kits wurden 95 % Ethanol zur Lösung des Waschpuffers (10 mM Natriumacetat pH 5,0; 16,7 µM EDTA pH 8,0) hinzugefügt.

Die aus dem Gel ausgeschnittene DNA Bande wurde dabei in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Anschließend wurden 10 µL Bindepuffer (4,5 M Guanidinisocyanat, 0,5 M Natriumacetat pH 5,0) pro 10 mg Gel hinzugegeben. Nach kurzem Mischen wurde für 10 min bei 60 °C im Thermomixer unter schütteln inkubiert. Danach wurde mittels Vibrationsmischer gemischt und nochmal für 10 min bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung kurz zentrifugiert. Im nächsten Schritt fand die Bindung der DNA an die Membran statt. Dazu wurde das geschmolzene Gel mittig auf eine Mini-Säule pipettiert, diese befand sich auf einem Sammel-Reaktionsgefäß. Insgesamt konnten maximal 350 mg Gel + 350 µL Bindepuffer auf eine Säule gegeben werden. Inkubiert wurde anschließend für 1 min. Nun wurde bei 14.000 rpm für 2 min abzentrifugiert, der Durchfluss danach verworfen.

Im Waschschrift wurden 700 µL Waschpuffer auf die Säule gegeben und anschließend bei 14.000 rpm für 2 min abzentrifugiert und der Durchfluss wurde verworfen. Das Gleiche wurde mit 500 µL Waschpuffer wiederholt. Dabei wurde bei 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Durchfluss wieder verworfen. Um alle Waschpufferreste zu entfernen, wurde anschließend die leere Säule bei 12 000 rpm für 2 min zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die Säule auf ein frisches 1,5 mL Reaktionsgefäß gesteckt und mittig auf die Säule 30 µL H₂O_{dd} pipettiert. Anschließend wurde für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend bei 14.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Die Minisäule wurde verworfen und die DNA-Konzentration des Eluats mittels NanoDrop™ bestimmt.

4.9 Sequenzierung

Die einzelnen DNA-Proben wurden mit einer Konzentration von 10 - 50 ng/µL und einem Volumen von 20 µL in 1,5 µL Reaktionsgefäßen versendet. Die Sanger-Sequenzierung fand in einem externen Dienstleistungslabor statt (Eurofins Genomics Germany GmbH, Köln, Deutschland), welches das Sequenzier-Ergebnis bereitstellte.

4.10 Real-Time PCR

Das Prinzip der real-time PCR ist in Abschnitt 3.6.3 zu finden. Alle real-time PCR Analysen wurden mit dem CFX96™ real-time PCR Cycler durchgeführt. Die Verfolgung in Echtzeit sowie die Auswertungen erfolgten mit der Software CFX Manager. Bei diesem Gerät werden als Lichtquelle LEDs verwendet. Die LEDs sind über einen Shuttle-Mechanismus über jeder Vertiefung so positioniert, dass jede Vertiefung unabhängig beleuchtet werden kann. Es werden sechs gefilterte LEDs und sechs gefilterte Fotodioden zur Anregung und Detektion verwendet. Das Licht wird in einer engen Bandbreite gefiltert, um sicherzustellen, dass nur Daten der gewünschten Fluorophore gesammelt werden (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2010).

4.10.1 Standardbedingungen

Alle Reagenzien der real-time PCR wurden bei -20 °C gelagert und bei Raumtemperatur verwendet. Gearbeitet wurde unter einer sterilen Werkbank. Als Standard Polymerase wurde die HotStarTaq® DNA Polymerase mit entsprechenden Reagenzien verwendet.

4.10.1.1 QuantiTect® Multiplex no Rox

Des Weiteren wurde ein fertiger Mastermix verwendet, welcher speziell für Multiplexanalysen geeignet ist. Das QuantiTect® Multiplex no Rox PCR Kit beinhaltet eine DNA Polymerase, welche zu Beginn bei 95 °C aktiviert werden muss, den QuantiTect® Multiplex PCR Puffer, welcher eine Kombination aus NH_4^+ und K^+ Ionen enthält und einen dNTP Mix.

4.10.1.2 Fluoreszenzfarbstoff und Sonden

Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR™ Green verwendet. Dieser wurde vor Verwendung 1:3000 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ verdünnt.

Alle Sonden wurden gefriergetrocknet geliefert und anschließend in DNA-freiem Wasser gelöst. Die Ausgangskonzentration betrug jeweils 100 pmol/ μL .

4.10.1.3 Pipettierschema

Nachfolgend ist das Standard Pipettierschema aller real-time PCR Komponenten jeweils für den entsprechenden Mastermix zu finden. Je nach Experiment variierten dabei die Konzentrationen. Für jeden Lauf wurde eine 96-Well-Platte verwendet. Zur Minimierung von Fehlern durch das Pipettieren wurde ein Mastermix für alle DNA-Proben pipettiert. Jede Einzelreaktion enthielt ein Endvolumen von 25 μL und dabei wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ aufgefüllt. Die Standardkonzentration der DNA-Probe war 2 ng/ μL . Dies entspricht 10 ng DNA pro Reaktionsansatz.

In Tabelle 34 ist das Standard Pipettierschema für einen real-time PCR Lauf unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes zu sehen.

Tabelle 34: Standard Pipettierschema des Mastermix mit Fluoreszenzfarbstoff.

Lösung	Konzentration	Volumen [µL]	Endkonzentration
Wasser	-	10,75	-
PCR Puffer (10x, 15 mM MgCl)	15 mM	2,5	-
MgCl ₂	25 mM	2,5	4 mM
dNTP Mix	2,5 mM	1	0,1 mM
Primer forward	10 µM	1	0,4 µM
Primer reverse	10 µM	1	0,4 µM
HotStarTaq® Polymerase	5 U/µl	0,25	1,25 U
SYBR™ Green	1:3000	1	-
+ DNA-Lösung	2 ng/µL	5	10 ng/Ansatz
Gesamtvolumen	-	25	-

Tabelle 35 zeigt das Standard Pipettierschema unter Verwendung der Hydrolyse-Sonde. Für alle Analysen mit Sonde wurde diese verwendet, wenn nicht anders vermerkt. In Tabelle 36 ist das Pipettierschema des QuantiTect® Multiplex no Rox Mastermix aufgelistet.

Tabelle 35: Standard Pipettierschema HotStarTaq® Mastermix mit Sonde.

Lösung	Konzentration	Volumen [µL]	Endkonzentration
Wasser	-	11,5	-
PCR Puffer (10x, 15 mM MgCl)	15 mM	2,5	-
MgCl ₂	25 mM	2,5	4 mM
dNTP Mix	2,5 mM	1,0	0,1 mM
Primer forward	10 µM	1,0	0,4 µM
Primer reverse	10 µM	0,5	0,2 µM
HotStarTaq® Polymerase	5 U/µl	0,25	1,25 U
Sonde	10 µM	0,75	0,3 µM
+ DNA-Lösung	2 ng/µL	5	10 ng/Ansatz
Gesamtvolumen	-	25	-

Tabelle 36: Pipettierschema QuantiTect® Multiplex Mastermix.

Lösung	Konzentration	Volumen [μL]	Endkonzentration
Wasser	-	5,25	-
PCR MM QuantiTect 2x	-	12,5	-
Primer forward	10 μM	1,0	0,4 μM
Primer reverse	10 μM	0,5	0,2 μM
Sonde	5 μM	0,75	0,3 μM
+ DNA-Lösung	2 ng/ μL	5,0	10 ng/Ansatz
Gesamtvolumen	-	25	-

Jeder Lauf beinhaltete 40 Zyklen. Alle Proben wurden mindestens im Duplikat analysiert. Ebenso wurden immer eine NTC und eine Positivkontrolle (Kartoffel-DNA) mitgeführt.

4.10.1.4 Temperaturprogramm

Für alle real-time PCR Läufe wurde das in Tabelle 37 aufgelistete Temperaturprogramm verwendet, falls nicht anders vermerkt.

Tabelle 37: Standard Temperaturprogramm der real-time PCR.

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	15 min	einmalig zu Beginn
Denaturierung	95	15 s	} 40
Annealing	60	1 min	
Finale Denaturierung	95	10 s	
Hold	20	-	

4.10.2 Überprüfung auf Amplifizierbarkeit der DNA-Proben

Bei einem negativen Amplifizier-Ergebnis wie auch einer geringen Amplifikationseffizienz wurden die DNA-Proben mit einem unspezifischen real-time PCR System überprüft.

4.10.2.1 Überprüfung auf Amplifizierbarkeit

Mit Hilfe der Eukarya real-time PCR 18SRG-Pfl ist es möglich, jegliche Art von Pflanzen-DNA nachzuweisen. Damit kann überprüft werden, ob die entsprechende DNA grundsätzlich amplifizierbar ist. Es wurden die Primer und Sonde aus Tabelle 11 und 13 verwendet. Des Weiteren wurde das Pipettierschema aus Tabelle 36 verwendet (Abänderung: Primer-Konzentration for/rev 0,4 μM). Die Eukarya real-time PCR 18SRG-Pfl basiert auf den Grundlagen der Methode nach Costa *et. al.* (Costa et al., 2017).

4.10.2.2 Inhibitionskontrolle

Beim Verdacht auf Inhibitoren wurde eine Inhibitionskontrolle durchgeführt. Es wurde das Pipettierschema aus Tabelle 35 und das Temperaturprogramm aus Tabelle 37 verwendet. Der real-time PCR Lauf enthielt 50 Zyklen. Dabei wurden verschiedene Verdünnungen der jeweiligen DNA-Lösung hergestellt. Folgende Konzentrationen wurden verwendet: 100; 10; 5; 1; 0,5; 0,1 und 0,05 ng DNA pro Reaktionsansatz. Die Messung erfolgte im Triplikat und es wurde mindestens eine NTC mitgeführt. Anschließend wurden die C_q-Werte der einzelnen Konzentrationen verglichen.

4.11 Validierung der real-time PCR Methode

Die Validierung der real-time PCR Methode orientierte sich an den „Leitlinien zur Einzellabor-Validierung qualitativer real-time PCR Methoden“ des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2016). Die Grundlagen der Validierung basieren dabei auf den Leistungskriterien der europäischen Ebene (ENGL) (European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2015) als auch der internationalen Ebene (Codex) (Codex Alimentarius Commission, 2010). Es wurden die Spezifität (Kreuzreaktivität) und die Effizienz getestet. Ebenso wurden die Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) wie auch die Robustheit der real-time PCR Methode bestimmt.

4.11.1 Spezifität

Beim Testen der Spezifität wurde geprüft, ob die ausgewählte Sequenz als auch die dazugehörigen Primer und Sonde dafür geeignet sind, lediglich Kartoffel DNA nachzuweisen. Dies wurde zunächst theoretisch, computergestützt geprüft und anschließend praktisch getestet.

4.11.1.1 Theoretische Überprüfung der Spezifität

Die verwendeten Oligonukleotide wurden vor der praktischen Verwendung theoretisch mittels verschiedener online Software analysiert. Verwendet wurden dabei die durch Sequenzierung erhaltenen DNA-Sequenzen (siehe Abschnitt 5.4.7) und die Sequenzen der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Die Software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) und Primer BLAST wurden zur Bildung von Alignments verwendet. Mit der Software CLC Sequence Viewer konnten multiple Sequenzalignments erstellt werden. Mittels der Software Beacon Designer, free Edition wurden die Primer- und Sonden-Kriterien überprüft. Dabei wurde auf mögliche homologe Sequenzen vor allem bei Nachtschattengewächsen (*Solanaceae*) getestet. Es wurde aber auch allgemein mit allen in der Datenbank vorhandenen Sequenzen verglichen.

4.11.1.2 Schmelzkurvenanalyse (Spezifität der Primer)

Für die Schmelzkurvenanalyse wurde das Pipettierschema aus Tabelle 34 mit dem Fluorophor SYBR™ Green verwendet. Des Weiteren wurde das Temperaturprogramm aus Tabelle 37 verwendet. Die Kartoffel-DNA Lösung wurde im Triplikat eingesetzt. Alle anderen DNA-Lösungen wurden im Duplikat verwendet. Parallel wurden die Primer (siehe Tabelle 8) an allen verwandten Arten aus Tabelle 17 getestet. Pro Art wurde eine Sorte verwendet. Es wurden alle vier Primerpaare (siehe Tabelle 9) getestet. Am Ende eines real-time PCR Laufes wurde die Temperatur in kontinuierlichen 0,5 °C Schritten von 55,0 °C auf 95 °C erhöht.

4.11.1.3 Kreuzreaktivität der ausgewählten Primer und Sonden

Da Sonden die Spezifität eines real-time PCR Systems zusätzlich erhöhen, wurde das ausgewählte Primerpaar mit verschiedenen Sonden auf eine mögliche Kreuzreaktivität getestet. Dazu wurden neben den nah verwandten Pflanzen (Tabelle 17) anschließend auch typische Gewürze und Gemüsearten getestet, welche häufig in Wurstwaren oder allgemein in Lebensmitteln vorkommen (Tabelle 18). Getestet wurde eine Mischung aus fünf Gewürzen pro real-time PCR-Ansatz. Jede Mischung enthielt von jeder Pflanzenart eine DNA-Konzentration von 2 ng/μL. Wies eine Mischung einen Cq Wert < 37 auf, wurden alle Komponenten der Mischung nochmals einzeln getestet. Soweit nicht anders beschrieben, wurden das Pipettierschema aus Tabelle 35 und das Standard-Temperaturprogramm aus Tabelle 37 verwendet.

4.11.2 Optimierung der Annealing-Temperatur

Um die optimale Annealing-Temperatur der einzelnen Primerpaare zu finden, wurde ein real-time PCR Lauf mit Temperaturgradienten durchgeführt. Als Fluoreszenz-Farbstoff wurde SYBR™ Green verwendet (Pipettierschema Tabelle 34). Der Gradient der Annealing-Temperatur reichte von 56 - 66 °C. Bei acht verschiedenen Annealing-Temperaturen wurden die Messungen durchgeführt.

4.11.3 Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentration

Zur Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentrationen wurden verschiedene Kombinationen getestet (siehe Tabelle 38). Entsprechend angepasst wurde dazu das Pipettierschema aus Tabelle 35. Jede Primer- und Sonden-Kombination wurde als Standardreihe im Triplikat aufgetragen.

Tabelle 38: Optimierung der Primer-, und Sonden-Konzentrationen.

Konzentration Primer for [μM]	Konzentration Primer rev [μM]	Konzentration Sonde [μM]
0,1	0,2	0,1
0,2	0,1	0,1
0,2	0,2	0,1
0,2	0,2	0,2
0,3	0,3	0,1
0,2	0,4	0,2
0,4	0,2	0,1
0,4	0,2	0,2
0,4	0,2	0,3
0,4	0,2	0,4
0,4	0,4	0,2
0,4	0,4	0,4
0,4	0,6	0,4
0,6	0,4	0,4
0,6	0,6	0,4

4.11.4 Effizienz

Für die Bestimmung der Effizienz sind Standards mit bekannter Konzentration notwendig. Hierbei wurden fünf Standards verwendet: 100; 10; 5; 1; 0,5 ng DNA pro Ansatz, welche mithilfe einer Verdünnungs-Reihe aus der Kartoffel-DNA-Lösung erstellt wurden. Verdünnt wurde mit dem jeweiligen Elutionspuffer (Wizard® oder QIAquick®). Die Berechnung der Effizienz (Formel 1, siehe Abschnitt 3.6.3.3) wurde automatisch von der verwendeten Software durchgeführt, ebenso wurde auch das R^2 ermittelt.

4.11.5 Nachweisgrenze ($LOD^{95\%}$)

Die Nachweisgrenze ist die kleinste Menge oder Konzentration an DNA in einer Probe, die zuverlässig nachgewiesen, aber nicht quantifiziert werden kann (European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2015). Verwendet wurde das Pipettierschema aus Tabelle 35.

Zunächst wurde die theoretische Anzahl an Kopien der Zielsequenz berechnet. Verwendet wurde dazu Formel 10. Dies geschah auf der Basis der Genommasse der Kartoffel. Je nach verwendeter Datenbank oder Literatur kann es hier zu Abweichungen kommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde 1,8 pg (Arumuganathan & Earle, 1991) als Masse des haploiden Genoms verwendet.

$$\text{Anzahl der Kopien pro } \mu\text{L} = \frac{\text{DNA - Konz. } \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} \right] * 1000}{\text{haploides Genommasse [pg]}}$$

Formel 10: Formel zur Berechnung der Kopien-Anzahl pro μL ausgehend von der Konzentration.

Im ersten Schritt wurde die Konzentration einer Kartoffel-DNA-Lösung mit dem NanoDrop™ gemessen. Im zweiten Schritt wurde aus der Stammlösung eine Verdünnungsreihe erstellt. Dies erfolgte in einer drei-stufigen Verdünnungsreihe: ausgehend von 10.000 auf 1000, 100 und abschließend 20 Kopien/ μL . Die letzte Lösung mit 20 Kopien/ μL wurde als Ausgangslösung für die nächsten fünf Stufen verwendet. In Tabelle 39 sind die jeweiligen Stufen mit den entsprechenden Konzentrationen aufgelistet. Zwölf Replikate von jeder Stufe wurden mit Hilfe der real-time PCR gemessen.

Tabelle 39: Verdünnungsstufen zur Bestimmung des LOD^{95%} mit entsprechender Anzahl an Kopien.

Stufe	Nominale Kopien/ μL	Nominale Kopien/ Ansatz (in 5 μL)
1	4	20
2	2	10
3	1	5
4	0,4	2
5	0,2	1
6	0,02	0,1

Die Ermittlung des LOD^{95%} erfolgte über die online Software *quo data* des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, welche auf der Methode nach Uhlig *et.al* (Uhlig et al., 2015) basiert sowie auf der ISO-Norm 16140-2: 2 (Deutsches Institut für Normung e.V., 2016). Die Software berechnet die Anzahl der Kopien der Ziel-DNA-Sequenz, die erforderlich sind, um eine Nachweiswahrscheinlichkeit von 95 % sicherzustellen. Dafür wird das 95 % Vertrauensintervall als auch die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit einer Detektion (*probability of detection*, POD) als Kurve angeben sowie deren zugehöriger 95 % Vertrauensbereich berechnet.

Bei einer qualitativen PCR-Methode hängt die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses im Allgemeinen von der Anzahl der Kopien der Zielsequenz in der DNA-Probe ab. Theoretisch sollte die Wahrscheinlichkeit einer positiven Reaktion 0 sein, wenn die Ziel-DNA-Sequenz nicht vorhanden ist, und die Wahrscheinlichkeit sollte mit zunehmender Anzahl der Kopien der Ziel-DNA-Sequenzen zu 1 tendieren (Wehling et al., 2011).

Des Weiteren wird die Nachweisrate (*rate of detection*, ROD) angegeben. Die Nachweisrate ist definiert als die Anzahl positiver Testergebnisse dividiert durch die Gesamtzahl der wiederholten Tests. Für ein bestimmtes Verdünnungsniveau erhält somit jedes Labor seinen eigenen ROD (Uhlig et al., 2015).

Zur Auswertung werden die Kopien/Ansatz der PCR, die Anzahl der Replikate als auch die Zahl der positiven Ergebnisse verwendet. Zur Verifizierung der einzelnen Verdünnungsstufen darf die Stufe mit 0,1 Kopien/Ansatz maximal zwei positive Ergebnisse liefern.

4.11.6 Robustheit

Die Robustheit eines Verfahrens ist ein Maß für seine Fähigkeit, von kleinen absichtlichen Abweichungen von den im Verfahren beschriebenen Versuchsbedingungen unbeeinflusst zu bleiben (European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2015). Es wurde das Pipettierschema aus Tabelle 35 bzw. 36 verwendet und entsprechend angepasst.

Zur Bestimmung der Robustheit wurden mehrere Faktoren in einem multifaktoriellen Versuchsdesign getestet. Im Rahmen der Robustheitsanalyse wurden je zwei Faktoren auf fünf Ebenen getestet. Als Konzentration der Ziel-DNA wurden 20 Kopien/Ansatz verwendet. Es wurden die in Tabelle 40 angegebenden Parameter getestet. Jede Kombination wurde im 6-fach Ansatz aufgetragen.

Tabelle 40: Getestete Faktoren des real-time PCR Robustheitstests (A = HotStarTaq®; B= QuantiTect; X= unverändert).

Faktor	Kombination							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Real-Time PCR Kit	A	A	B	B	A	A	B	B
Primer Konzentration [%]	X	- 30	X	- 30	X	- 30	X	- 30
Sonden Konzentration [%]	X	- 30	- 30	X	- 30	X	X	- 30
Volumen Mastermix [μ L] *	19	19	21	21	21	21	19	19
Annealing-Temperatur [$^{\circ}$ C]	+ 1	- 1	+ 1	- 1	- 1	+ 1	- 1	+ 1

* + 5 μ L DNA-Lösung

4.12 Anwendung der real-time PCR Methode an Wurstproben

Die entwickelte real-time PCR Methode wurde an den in Abschnitt 4.2. hergestellten Brühwürsten getestet. Analysiert wurden dabei fünf Brät- und fünf Wurstproben aus dem Vorversuch. Anschließend wurden vier Brät- und vier Wurstproben aus dem Hauptversuch untersucht. Es wurde das Pipettierschema aus Tabelle 35 und das Standard-Temperaturprogramm aus Tabelle 37 verwendet.

5. Ergebnisse

Ergebnisse Teil I: Lebensmittelanalytik

Die Analysen des Vorversuches sollten zeigen, welchen Einfluss das verwendete Kartoffelproteinpulver auf die verschiedenen Analyseparameter hat, da es zur Grundrezeptur hinzugegeben wurde. Im Hauptversuch wurde anschließend tierisches Protein anteilig durch pflanzliches Protein ersetzt. Dies führt zu einer geringeren Menge Schweinefleisch in der Rezeptur. Bei den nachfolgenden Analysen wurde somit der Einfluss des Kartoffelproteins, in Fleischprodukten beim Ersatz von tierischem Protein, auf die Qualität untersucht.

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ Standardfehler angegeben. Die Würste ohne Kartoffelproteinpulver werden als „Kontrolle“ angegeben. Zur Vergleichbarkeit wurde bei allen Analysen eine Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt (Tukey's pairwise comparison), um signifikante Unterschiede zwischen den Chargen festzustellen. Bei einer ANOVA von $p < 0,05$, wurden Unterschiede als signifikant betrachtet.

5.1 Technologische und sensorische Qualitätsparameter

5.1.1 pH-Wert

Die Bestimmung des pH-Wertes, als Qualitätsparameter, des rohen Fleisches und der Brühwürste erfolgte wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben. Das rohe Fleisch hatte einen pH-Wert von 5,4 bis 5,7, für das Brät wurde ein pH-Wert zwischen 5,7 und 6,1 ermittelt. Damit entsprachen sowohl das rohe Fleisch als auch das Brät den Qualitätsansprüchen, sie konnten somit uneingeschränkt verwendet werden.

Die Mittelwerte der pH-Werte der einzelnen Chargen im Vorversuch sind in Abbildung 12 dargestellt. Der Standardfehler wurde nicht mit angegeben, da er bei 0,00 lag. Der pH-Wert der Kontroll-Charge lag bei $6,00 \pm 0,10$ und war nicht signifikant ($p = 0,989$) unterschiedlich vom dem pH-Wert der Charge mit 0,1 % Kartoffelprotein ($5,99 \pm 0,10$). Die Chargen mit 1 % ($5,94 \pm 0,09$), 5 % ($5,77 \pm 0,11$) und 10 % ($5,56 \pm 0,11$) Kartoffelprotein hatten einen signifikant niedrigeren pH-Wert als die Würste ohne Kartoffelprotein (alle $p < 0,001$). Den niedrigste pH-Wert hatten die Würste mit 10 % Kartoffelprotein.

5. Ergebnisse

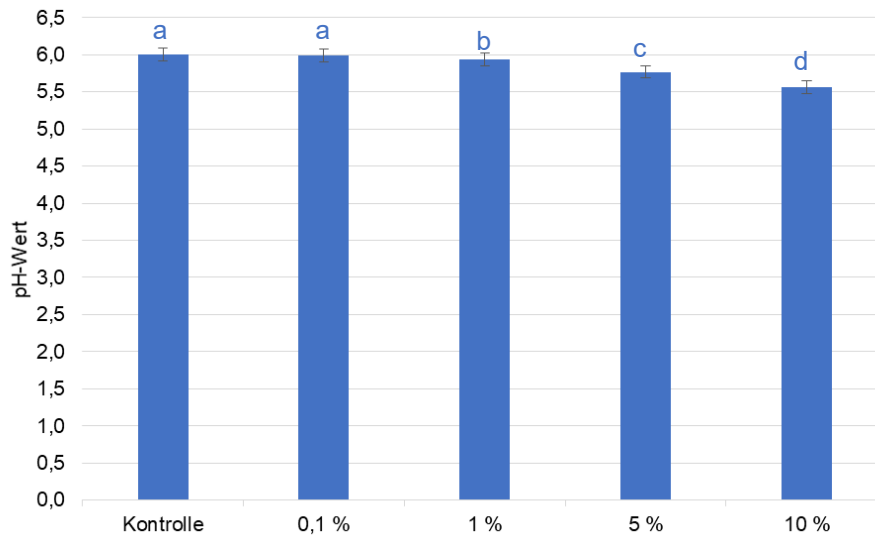


Abbildung 12: Ergebnisse der pH-Wert-Messungen der Würste des Vorversuches (Kontrolle; 0,1 - 10 % Kartoffelprotein) (n = 4). Verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Im Hauptversuch (Abbildung 13) betrug der pH-Wert der Kontroll-Charge $6,09 \pm 0,04$ und unterschied sich von den pH-Werten der Chargen mit 1 % ($6,04 \pm 0,05$) und 2 % ($6,01 \pm 0,05$) Kartoffelproteinpulver nicht signifikant (1 %: $p = 0,967$; 2 %: $p = 0,934$). Der pH-Wert der Würste mit 3 % ($5,92 \pm 0,05$) Kartoffelprotein war signifikant ($p < 0,001$) niedriger als der pH-Wert der anderen Chargen.

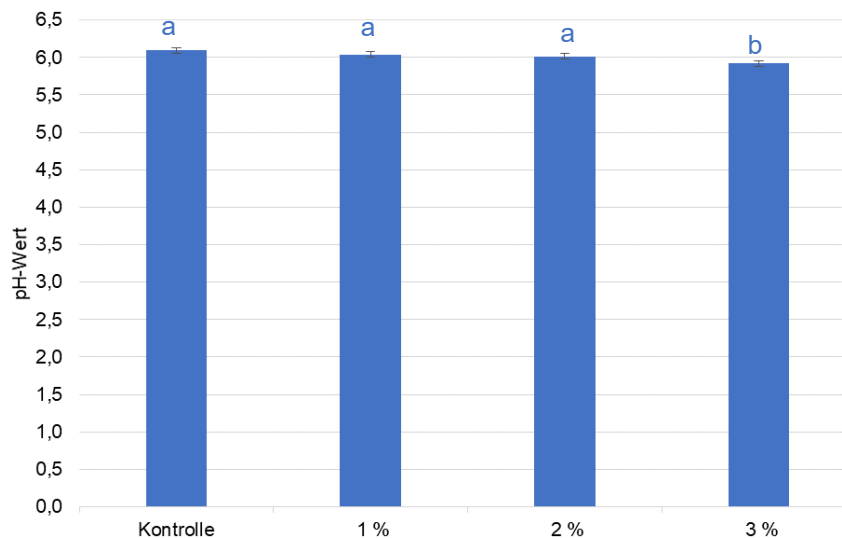


Abbildung 13: Ergebnisse der pH-Wert-Messungen der Würste des Hauptversuches (Kontrolle; 1 - 3 % Kartoffelprotein) (n = 4). Verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

5.1.2 Instrumentelle Texturanalyse

Bruchfestigkeit, Härte, Gummiartigkeit und Kaufähigkeit gehören zu den sensorischen Qualitätsparametern von Brühwürsten. Hierbei wurde der Einfluss des Kartoffelproteins (0,1 - 10 % im Vorversuch und 1 - 3 % im Hauptversuch) auf diese vier Parameter analysiert (Durchführung siehe Abschnitt 4.3.2).

5.1.2.1 Bruchfestigkeit, Härte und Gummiartigkeit

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der Bruchfestigkeits-, der Härte-, und der Gummiartigkeits-Messung des Vorversuches dargestellt. Die Brühwürste mit 10 % Kartoffelprotein konnten mit dieser Methode nicht analysiert werden, da es zu keinem Bruch der Probe während der Messung kam.

Im Vergleich zu den Brühwürsten ohne Kartoffelprotein ($31,23 \pm 1,11$ N) erhöhte sich die Bruchfestigkeit mit zunehmendem Prozentsatz an Kartoffelprotein (0,1 %: $33,65 \pm 1,43$ N; 1 %: $35,59 \pm 1,48$ N; 5 %: $40,15 \pm 4,96$ N). Ein signifikanter Unterschied (0,1 %: $p = 0,003$; 1 % und 5 %: $p < 0,001$) bestand dabei zwischen der Kontroll-Charge und den Würsten mit 1 % und 5 % Kartoffelprotein. Keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,239$) in der Bruchfestigkeit gab es bei den Würsten der Kontroll-Charge und denen mit 0,1 % Kartoffelprotein, ebenso wie zwischen den 0,1 % Würsten und den 1 % Würsten ($p = 0,369$). Die Härte der Würste unterschied sich signifikant ($p < 0,001$) zwischen den Würsten ohne Kartoffelprotein und denen mit 1 - 5 % Kartoffelprotein. Allerdings unterschied sich die Härte der Würste ohne Kartoffelprotein nicht signifikant ($p = 0,241$) von denen mit 0,1 % Kartoffelprotein (Kontrolle: $31,25 \pm 1,11$ N; 0,1 %: $33,65 \pm 1,43$ N; 1 %: $35,59 \pm 1,48$ N; 5 %: $40,15 \pm 4,97$ N). Die Gummiartigkeit der Würste ohne Kartoffelprotein ($3,81 \pm 0,37$ N) unterschied sich nicht signifikant (0,1 %: $p = 0,712$; 1 %: $p = 0,228$) von der Gummiartigkeit der Würste mit 0,1 % ($4,21 \pm 0,42$ N) Kartoffelprotein und 1 % ($4,52 \pm 0,38$ N). Lediglich die Würste mit 5 % Kartoffelprotein wichen mit einer signifikant ($p < 0,001$) höheren Gummiartigkeit ($7,05 \pm 1,51$ N) von den anderen Chargen ab.

5. Ergebnisse

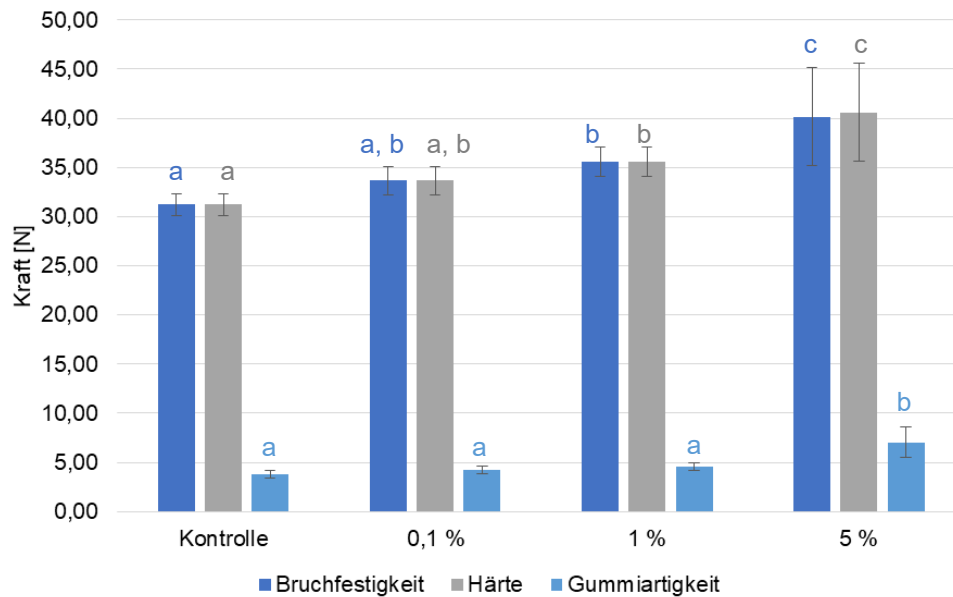


Abbildung 14: Ergebnisse der Bruchfestigkeits-, Härte- und Gummiartigkeitsmessungen der Würste des Vorversuches (Kontrolle; 0,1 - 5 % Kartoffelprotein) (n = 4) unter Angabe des Standardfehlers. Verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Chargen und innerhalb einer Messgröße.

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Bruchfestigkeits-, der Härte-, und der Gummiartigkeits-Messung des Hauptversuches dargestellt. Bezogen auf die Bruchfestigkeit unterschied sich jede Charge an Würsten signifikant von den anderen ($p < 0,001$). Insgesamt nahm die Bruchfestigkeit von den Würsten ohne Kartoffelprotein ($33,30 \pm 1,16$ N) über die Würste mit 1 % ($31,72 \pm 1,28$ N) und 2 % Kartoffelprotein ($27,68 \pm 0,97$ N) zu denen mit 3 % Kartoffelprotein ($23,42 \pm 0,87$ N) stetig ab. Die Härte der Brühwürste mit Kartoffelprotein (1 %: $34,77 \pm 1,55$ N; 2 %: $34,71 \pm 1,77$ N; 3 %: $34,23 \pm 1,94$ N) unterschied sich untereinander nicht signifikant ($p = 0,567 - 0,976$). Allerdings unterschieden sich alle drei Chargen mit Kartoffelprotein signifikant ($p < 0,001$) von den Würsten ohne Kartoffelprotein ($40,50 \pm 2,29$ N), in dem sie eine geringere Härte aufwiesen. Die Gummiartigkeit der Würste ohne Kartoffelprotein ($4,36 \pm 0,39$ N) unterschied sich signifikant ($p \leq 0,004$) von der Gummiartigkeit der Würste mit Kartoffelprotein (1 %: $3,71 \pm 0,29$ N; 2 %: $3,02 \pm 0,28$ N; 3 %: $3,33 \pm 0,28$). Die Würste mit 2 % und 3 % Kartoffelprotein unterschieden sich allerdings nicht signifikant ($p = 0,125$) in ihrer Gummiartigkeit.

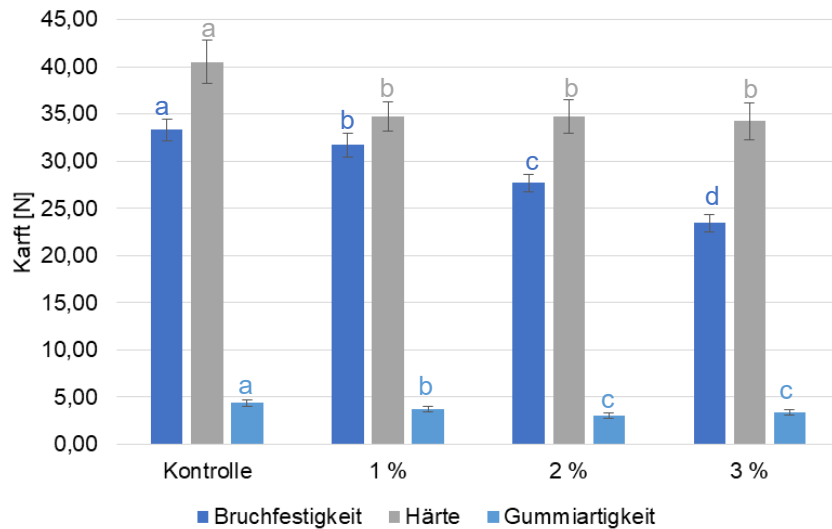


Abbildung 15: Ergebnisse der Bruchfestigkeits-, Härte- und Gummiartigkeitsmessungen der Würste des Hauptversuches (Kontrolle; 1-3 % Kartoffelprotein) (n = 4) unter Angabe des Standardfehlers. Verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Chargen und innerhalb einer Messgröße.

5.1.2.2 Kohäsion

Im Rahmen der Textur-Profil-Analyse wurde des Weiteren die Kohäsion der verschiedenen Würste bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 und 17 dargestellt. Die Kohäsion der Würste im Vorversuch ohne Kartoffelprotein ($0,122 \pm 0,011 \text{ N/mm}^2$) unterschied sich nicht signifikant (0,1 %: $p = 0,998$; 1 %: $p = 0,993$) von der Kohäsion der Chargen mit 0,1 % ($0,126 \pm 0,013 \text{ N/mm}^2$) und 1 % Kartoffelprotein ($0,128 \pm 0,011 \text{ N/mm}^2$). Es bestand allerdings ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den Würsten mit 5 % Kartoffelprotein ($0,213 \pm 0,095 \text{ N/mm}^2$) und allen anderen Chargen. Allerdings war der Standardfehler bei dieser Charge ebenso am höchsten.

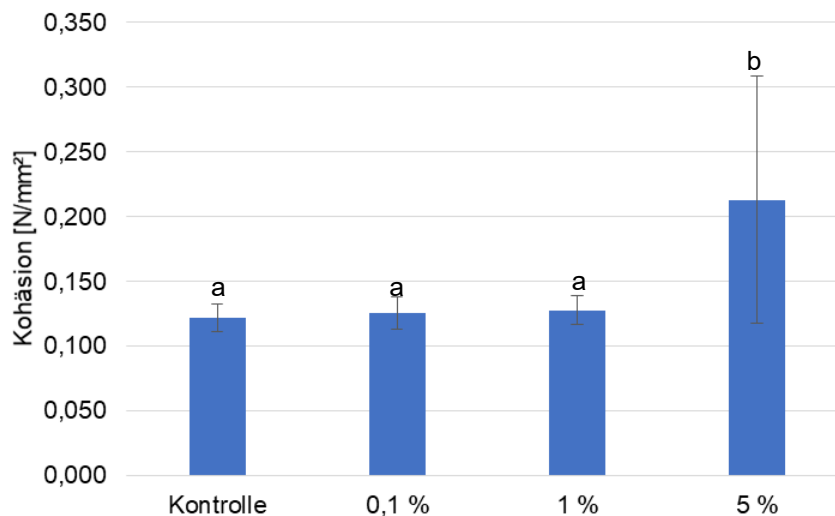


Abbildung 16: Ergebnisse der Kohäsionsmessungen der Würste des Vorversuches (Kontrolle; 0,1 – 5 % Kartoffelprotein) (n = 4) unter Angabe des Standardfehlers. Verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Die Kohäsion der Würste ohne Kartoffelprotein ($0,108 \pm 0,006 \text{ N/mm}^2$), im Hauptversuch, unterschied sich nicht signifikant ($p = 0,986$) von den Würsten mit 1 % ($0,106 \pm 0,006 \text{ N/mm}^2$) Kartoffelprotein. Allerdings wurde ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den Chargen mit 2 % ($0,087 \pm 0,006 \text{ N/mm}^2$) und 3 % ($0,097 \pm 0,005 \text{ N/mm}^2$) Kartoffelprotein deutlich, wobei die Kohäsion der Würste mit 2 % Kartoffelprotein niedriger war als die mit 1 %, 3 % und ohne Kartoffelprotein.

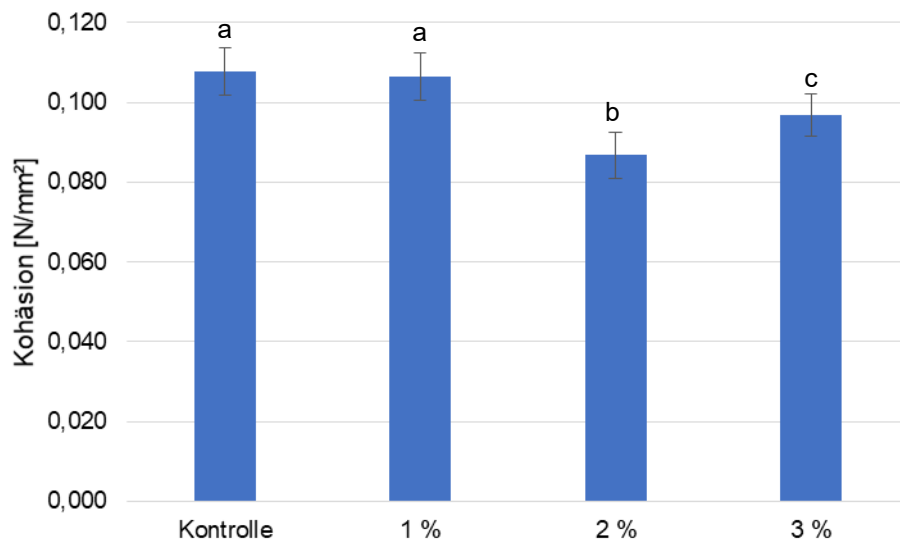


Abbildung 17: Ergebnisse der Kohäsionsmessungen der Würste des Hauptversuches (Kontrolle; 1-3 % Kartoffelprotein) ($n = 4$) unter Angabe des Standardfehlers. Verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

5.1.2.3 Kaufähigkeit

Die Ergebnisse der Bestimmung der Kaufähigkeit der Würste des Vorversuches sind in Abbildung 18 dargestellt. Die Kaufähigkeit der Würste der Charge ohne Kartoffelprotein ($0,045 \pm 0,005 \text{ J}$) unterschieden sich nicht signifikant ($p = 0,561$) von den Würsten mit 0,1 % ($0,049 \pm 0,005 \text{ J}$) Kartoffelprotein. Des Weiteren unterschieden sich die Chargen mit 0,1 % und 1 % Kartoffelprotein ($0,053 \pm 0,004 \text{ J}$) nicht signifikant ($p = 0,507$). Es unterschieden sich alle Chargen signifikant ($p < 0,001$) von der Charge mit 5 % Kartoffelprotein ($0,075 \pm 0,009 \text{ J}$). Die Kaufähigkeit war hier am höchsten.

5. Ergebnisse

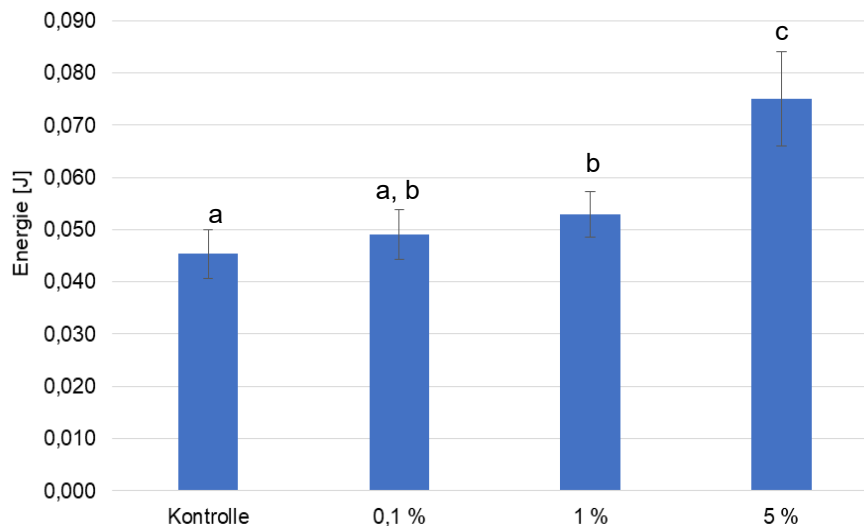


Abbildung 18: Ergebnisse der Kaufähigkeitsmessungen der Würste des Vorversuches (0,1 - 5 % Kartoffelprotein) ($n = 4$) unter Angabe des Standardfehlers. Verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse der Bestimmung der Kaufähigkeit der Würste im Hauptversuch sind in Abbildung 19 dargestellt. Den höchsten Wert der Kaufähigkeit konnte bei den Würsten ohne Kartoffelprotein ($0,057 \pm 0,005$ J) festgestellt werden. Diese Würste unterschieden sich signifikant von den Chargen mit Kartoffelprotein ($p < 0,001$). Die Würste mit 1 % Kartoffelprotein ($0,047 \pm 0,004$ J) unterschieden sich signifikant (2 %: $p < 0,001$; 3 %: $p = 0,012$) von den Würsten mit 2 % ($0,039 \pm 0,004$ J) und 3 % ($0,043 \pm 0,004$ J) Kartoffelprotein. Die beiden Chargen mit dem höchsten Prozentsatz an Kartoffelprotein unterschieden sich in ihrer Kaufähigkeit nicht signifikant ($p = 0,129$).

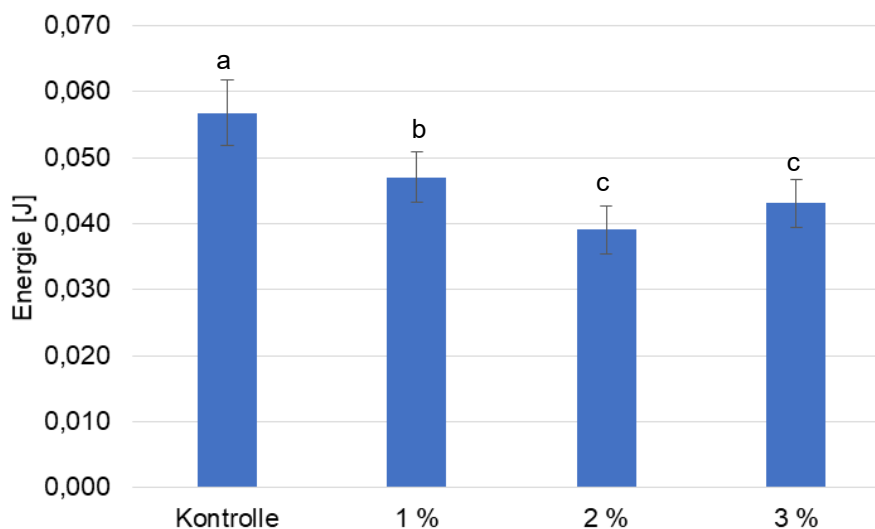


Abbildung 19: Ergebnisse der Kaufähigkeitsmessungen der Würste des Hauptversuches (Kartoffel; 1-3 % Kartoffelprotein) ($n = 4$) unter Angabe des Standardfehlers. Verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

5.1.3 Instrumentelle Farbanalyse

Um den Einfluss des Kartoffelproteinpulvers auf die Farbe und Helligkeit der Brühwurst zu analysieren, wurde eine instrumentelle Farbmessung durchgeführt (siehe Abschnitt 4.3.3). In Tabelle 41 sind die Ergebnisse der Farbmessung der Würste des Vorversuches zu finden. Bestimmt wurden die L^* -, a^* - und b^* -Werte sowie die Gesamtfarbdifferenz ΔE^*_{ab} .

Tabelle 41: Ergebnisse der Farbanalyse der Würste des Vorversuches (Kontrolle; 0,1 - 5 % Kartoffelprotein) (n = 4) unter Angabe des Standardfehlers.

Farbe					
	Kontrolle	0,1 %	1 %	5 %	10 %
L^* -Wert	74,21 $\pm$ 0,23 ^a	73,58 $\pm$ 0,22 ^b	73,50 $\pm$ 0,23 ^b	70,66 $\pm$ 0,28 ^c	69,15 $\pm$ 0,22 ^d
a^* -Wert	12,65 $\pm$ 0,15 ^a	12,80 $\pm$ 0,10 ^a	11,54 $\pm$ 0,10 ^b	9,38 $\pm$ 0,14 ^c	7,74 $\pm$ 0,09 ^d
b^* -Wert	9,45 $\pm$ 0,09 ^a	9,66 $\pm$ 0,09 ^b	11,00 $\pm$ 0,08 ^c	14,66 $\pm$ 0,13 ^d	17,00 $\pm$ 0,14 ^e
ΔE^*_{ab}	-	0,68 $\pm$ 0,05	2,03 $\pm$ 0,05	7,10 $\pm$ 0,06	10,15 $\pm$ 0,08
Farberhaltung (30 min Tageslicht-Belichtung)					
	Kontrolle	0,1 %	1 %	5 %	10 %
L^* -Wert	74,58 $\pm$ 0,22 ^a	74,23 $\pm$ 0,32 ^b	73,02 $\pm$ 0,31 ^c	69,97 $\pm$ 0,19 ^d	69,26 $\pm$ 0,17 ^e
a^* -Wert	9,76 $\pm$ 0,09 ^a	9,98 $\pm$ 0,14 ^a	9,21 $\pm$ 0,17 ^b	8,18 $\pm$ 0,10 ^c	6,96 $\pm$ 0,10 ^d
b^* -Wert	11,02 $\pm$ 0,09 ^a	11,29 $\pm$ 0,11 ^b	12,10 $\pm$ 0,08 ^c	15,14 $\pm$ 0,11 ^d	17,28 $\pm$ 0,17 ^e
ΔE^*_{ab}	-	0,49 $\pm$ 0,10	1,98 $\pm$ 0,13	6,38 $\pm$ 0,04	8,68 $\pm$ 0,09

^{a-e} Verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Chargen und innerhalb einer Messgröße.

Im Vorversuch wurden die Würste mit zunehmendem Anteil an Kartoffelproteinpulver dunkler (0,1 %: 73,58 $\pm$ 0,22 bis 10 %: 69,15 $\pm$ 0,22). Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) war hierbei zwischen den Würsten ohne Kartoffelprotein und denen mit Kartoffelprotein zu erkennen. Die Helligkeit der Würste nahm ebenso nach 30-minütiger Belichtung stetig und mit zunehmendem Kartoffelproteinanteil (0,1 %: 74,58 $\pm$ 0,22 bis 10 %: 69,26 $\pm$ 0,17) ab. Die Helligkeit der Wurstscheiben nach der Belichtung von 30 Minuten veränderte sich bei allen Chargen signifikant ($p < 0,001$), bis auf die Würste mit 10 % Kartoffelprotein (69,15 $\pm$ 0,22 zu 69,26 $\pm$ 0,17), zu den Würsten der gleichen Charge ohne Belichtung ($p = 0,420$).

Des Weiteren tendierte die Farbe der Würste in Bezug auf den Rot- Grünanteil (a^* -Wert) mit zunehmendem Anteil an Kartoffelprotein zu einem signifikant ($p < 0,001$) höheren Anteil an grün, da der a^* -Wert kleiner wurde (1 %: 11,54 $\pm$ 0,10 bis 10 %: 7,74 $\pm$ 0,09). Es unterschieden sich der Rot- Grünanteil der Würste ohne Kartoffelprotein und der Würste mit 0,1 % Kartoffelprotein nicht signifikant ($p = 0,135$). Dies war ebenso nach der 30-minütigen Belichtung der Fall. Nach der Belichtung im Vergleich zu ohne Belichtung wurde der a^* -Wert aller Chargen kleiner und der Rotanteil somit geringer.

Der Gelb- Blauanteil (b^* -Wert) der Würste war zwischen den Würsten ohne Kartoffelprotein ($9,45 \pm 0,09$), und den Würsten mit Kartoffelprotein signifikant unterschiedlich ($p < 0,002$). Insgesamt nahm der b^* -Wert mit steigendem Anteil an Kartoffelprotein zu (0,1 %: $9,66 \pm 0,09$ bis 10 %: $17,00 \pm 0,14$), das bedeutet, dass der Gelbanteil zunahm. Im Vergleich zu den jeweiligen Chargen ohne Belichtung nahm der Gelbanteil nach der Belichtung ebenso zu. Alle Würste mit Kartoffelprotein unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$) von den Würsten ohne Kartoffelprotein (b^* -Wert: Kontrolle: $11,02 \pm 0,09$; 0,1 %: $11,29 \pm 0,11$; 1 %: $12,10 \pm 0,08$; 5 %: $15,14 \pm 0,11$; 10 %: $17,28 \pm 0,17$). Auch nach der Belichtung stieg der Gelbanteil mit zunehmendem Prozentsatz an Kartoffelprotein.

Die Berechnungen der Gesamtfarbdifferenzen (ΔE^*_{ab}) ergaben, dass die Farbunterschiede der Würste ohne Kartoffelprotein und der mit 0,1 % Kartoffelprotein visuell nicht unterscheidbar sind, da ΔE^*_{ab} mit $0,68 \pm 0,5$ unter 1,0 (Rödel, 1991) liegt. Bei allen anderen Chargen wären die Unterschiede deutlich visuell wahrnehmbar, da sie über 2,0 (Rödel, 1991) liegen (1 %: $2,03 \pm 0,5$; 5 %: $7,10 \pm 0,06$; 10 %: $10,15 \pm 0,08$). Die gleiche Tendenz zeigte sich nach der Belichtung (0,1 %: $0,49 \pm 0,10$; 1 %: $1,98 \pm 13$; 5 %: $6,38 \pm 0,04$; 10 %: $8,68 \pm 0,09$).

Die Ergebnisse der Farbanalyse des Hauptversuches sind in Tabelle 42 zusammengefasst.

Tabelle 42: Ergebnisse der Farbanalyse der Würste des Hauptversuches (1-3 % Kartoffelprotein) (n = 4), nach 30-minütiger Belichtung unter Angabe des Standardfehlers.

Farbe				
	Kontrolle	1 %	2 %	3 %
L*-Wert	$72,56 \pm 0,26^a$	$73,31 \pm 0,22^b$	$72,92 \pm 0,20^b$	$73,10 \pm 0,22^b$
a*-Wert	$12,28 \pm 0,12^a$	$10,78 \pm 0,09^b$	$10,13 \pm 0,10^b$	$8,91 \pm 0,09^c$
b*-Wert	$10,38 \pm 0,10^a$	$11,47 \pm 0,10^b$	$13,33 \pm 0,07^c$	$13,33 \pm 0,10^c$
ΔE^*_{ab}	-	$1,99 \pm 0,04$	$2,46 \pm 0,07$	$4,51 \pm 0,05$
Farberhaltung (30 min Tageslicht-Belichtung)				
	Kontrolle	1 %	2 %	3 %
L*-Wert	$73,27 \pm 0,21^a$	$73,90 \pm 0,29^b$	$73,25 \pm 0,18^a$	$73,44 \pm 0,18^a$
a*-Wert	$9,47 \pm 0,09^a$	$8,70 \pm 0,12^b$	$8,26 \pm 0,08^b$	$7,65 \pm 0,09^c$
b*-Wert	$12,23 \pm 0,06^a$	$12,69 \pm 0,09^b$	$13,51 \pm 0,08^c$	$14,13 \pm 0,07^c$
ΔE^*_{ab}	-	$1,09 \pm 0,09$	$1,76 \pm 0,03$	$2,63 \pm 0,03$

^{a-c} Verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Chargen und innerhalb einer Messgröße.

Im Hauptversuch war der L^* -Wert und somit die Helligkeit der Brühwürste ohne Kartoffelprotein ($72,56 \pm 0,26$) signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$) zur Helligkeit der Würste mit Kartoffelprotein (1 %: $73,31 \pm 0,22$; 2 %: $72,92 \pm 0,20$; 3 %: $73,10 \pm 0,22$). Die einzelnen Prozentsätze unterschieden sich allerdings untereinander nicht signifikant ($p = 0,420 - 0,999$). Nach der Belichtung der Würste ließ sich keine eindeutige Tendenz festlegen, da sich die Chargen mit 2 % und 3 % Kartoffelprotein (2 %: $73,25 \pm 0,18$; 3 %: $73,44 \pm 0,18$) nicht signifikant ($p = 0,795$) von der Charge ohne Kartoffelprotein ($73,27 \pm 0,21$) unterschieden. Die Würste mit 1 % Kartoffelprotein ergaben den höchsten L^* -Wert ($73,90 \pm 0,29$). Im Vergleich zu den entsprechenden Würsten ohne Belichtung wurden alle Würste nach der Belichtung heller.

Die a^* -Werte der Würste ohne Kartoffelprotein ($12,28 \pm 0,12$) unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$) von den a^* -Werten der Würste mit Kartoffelprotein (1 %: $10,78 \pm 0,09$; 2 %: $10,13 \pm 0,10$; 3 %: $8,91 \pm 0,09$). Mit steigendem Prozentsatz an Kartoffelprotein wurden die a^* -Werte kleiner und der Rotanteil nahm somit ab. Diese Tendenz war ebenso nach der Belichtung der Würste zu erkennen (Kontrolle: $9,47 \pm 0,09$; 1 %: $8,70 \pm 0,12$, 2%: $8,26 \pm 0,08$; 3 %: $7,65 \pm 0,09$). Dabei waren die a^* -Werte der jeweiligen Würste signifikant niedriger nach der Belichtung ($p < 0,001$). Der Rotanteil nahm somit weiter ab.

Der b^* -Wert der Würste mit Kartoffelprotein war signifikant ($p < 0,002$) höher als der der Würste ohne Kartoffelprotein, was für einen höheren Gelbanteil spricht (Kontrolle: $10,38 \pm 0,06$; 1 %: $11,47 \pm 0,09$; 2 %: $13,33 \pm 0,08$; 3 %: $13,33 \pm 0,07$). Hierbei gab es wieder einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den Würsten ohne Kartoffelprotein und den Würsten mit Kartoffelprotein. Der Gelbanteil nahm mit Erhöhung des Kartoffelproteinanteils zu. Allerdings ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,987$) zwischen den b^* -Werten der Chargen mit 2 % und 3 % Kartoffelprotein.

Die Berechnungen der Gesamtfarbdifferenz ΔE^*_{ab} ergaben, dass alle Farbunterschiede der einzelnen Chargen über 2,0 (Rödel, 1991) liegen und somit visuell deutlich wahrnehmbar waren (1 %: $1,99 \pm 0,04$; 2 %: $2,46 \pm 0,07$; 3 %: $4,51 \pm 0,05$). Nach der Belichtung sank die Gesamtfarbdifferenz und die Farbunterschiede von Würsten ohne Kartoffelprotein und mit 1 % ($1,09 \pm 0,09$) und 2 % ($1,76 \pm 0,03$) Kartoffelprotein waren nicht mehr deutlich visuell unterscheidbar (Werte unter 2,0). Der Unterschied der Charge mit 3 % ($2,63 \pm 0,03$) Kartoffelprotein ließ sich deutlich visuell wahrnehmen.

5.1.4 Lebensmittelsensorik (Hedonische Prüfung)

Durch die sensorische Verkostung wurde die Beliebtheit der Würste mit Kartoffelproteinpulver von 9 - 14 Probanden beurteilt. Dabei wurden die Kategorien Aussehen, Textur, Geschmack und Gesamteindruck anhand einer 9-Punkte-Skala bewertet (aufsteigend von 0 „nicht gut“ bis 9 „sehr gut“). Bei der Verkostung der Würste des Hauptversuchs wurde zusätzlich der Geruch bewertet (siehe Abschnitt 4.3.4). Es nahmen sowohl geschulte als auch ungeschulte Testpersonen teil.

Das Erscheinungsbild und die Präsentation der Würste des Vorversuches sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Ergebnisse der Verkostung der Würste des Vorversuches sind in Abbildung 21 dargestellt. In allen Kategorien am höchsten bewertet wurden die Würste ohne Kartoffelprotein (Aussehen: $7,89 \pm 0,4$; Textur $7,11 \pm 0,5$; Geschmack: $6,89 \pm 0,7$; Gesamteindruck: $7,00 \pm 0,6$). Danach folgten die Würste mit 0,1 % Kartoffelprotein (Aussehen: $7,89 \pm 0,4$; Textur $6,59 \pm 0,4$; Geschmack: $6,78 \pm 0,6$; Gesamteindruck: $6,89 \pm 0,6$), und die Würste mit 1 % Kartoffelprotein (Aussehen: $7,11 \pm 0,4$; Textur $5,89 \pm 0,5$; Geschmack: $5,44 \pm 0,6$; Gesamteindruck: $5,89 \pm 0,6$). Allerdings waren die Unterschiede zwischen den drei Chargen in keiner Kategorie signifikant ($p < 0,223 - 0,994$). Die zweitniedrigste Bewertung erhielten nach den Würsten mit 5 % Kartoffelprotein (Aussehen: $2,67 \pm 0,4$; Textur $2,33 \pm 0,3$; Geschmack: $2,00 \pm 0,3$; Gesamteindruck: $2,11 \pm 0,4$) die Würste mit 10 % Kartoffelprotein. Beide Chargen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p < 0,674 - 0,989$), aber sie unterschieden sich signifikant von den drei Chargen ohne, mit 0,1 % und 1 % Kartoffelprotein ($p < 0,001$). Am niedrigsten und damit am schlechtesten wurden die Würste mit 10 % Kartoffelprotein bewertet (Aussehen: $1,89 \pm 0,4$; Textur $1,67 \pm 0,2$; Geschmack: $1,67 \pm 0,2$). Der Gesamteindruck wurde hierbei mit $1,44 \pm 0,2$ am schlechtesten bewertet.

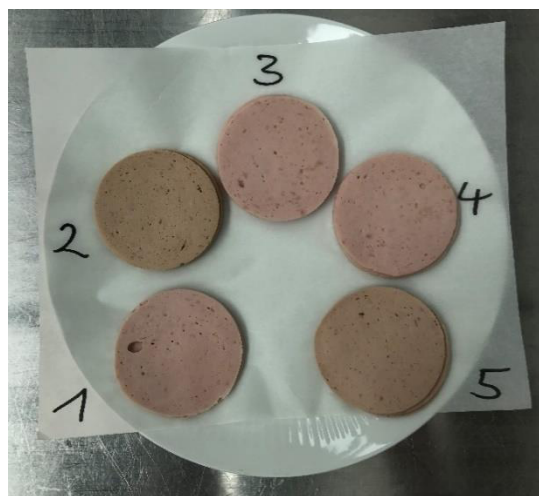


Abbildung 20: Erscheinungsbild und Präsentation der Würste des Vorversuches zur sensorischen Verkostung (Nr. 1: 1 % Kartoffelprotein; Nr. 2: 10 %; Nr. 3: 0,1 %; Nr.4: Kontrolle; Nr.5: 5 %).



Abbildung 21: Ergebnisse der Lebensmittelsensorik der Würste des Vorversuches (Kontrolle; 0,1 – 10 % Kartoffelprotein) unter Verwendung einer 9-Punkte-Beliebtheitsskala (aufsteigend von 0 „nicht gut“ bis 9 „sehr gut“). Bewertet wurden die Kategorien Aussehen, Textur, Geschmack und Gesamteindruck (n = 9).

Das Erscheinungsbild und die Präsentation der Würste des Vorversuches sind in Abbildung 22 dargestellt. Die Ergebnisse der Verkostung der Würste des Hauptversuches sind in Abbildung 23 dargestellt.

Die Würste ohne Kartoffelprotein wurden in allen Kategorien am besten bewertet (Aussehen: $6,79 \pm 0,4$; Geruch: $6,50 \pm 0,5$; Textur: $6,93 \pm 0,4$; Geschmack: $6,93 \pm 0,4$; Gesamteindruck: $6,93 \pm 0,4$), wobei kein signifikanter Unterschied zu den Würsten mit 1 % Kartoffelprotein (Aussehen: $6,14 \pm 0,4$; Geruch: $5,86 \pm 0,5$; Textur: $6,54 \pm 0,3$; Geschmack: $6,50 \pm 0,3$; Gesamteindruck: $6,29 \pm 0,3$) bestand. Die Würste mit 2 % Kartoffelprotein wurden in den Kategorien Aussehen ($5,64 \pm 0,4$) und Geruch ($5,36 \pm 0,4$) nicht signifikant ($p < 0,383 - 0,533$) unterschiedlich zu den Würsten mit 0 % und 1 % Kartoffelprotein bewertet. Lediglich die Textur ($4,79 \pm 0,4$), der Geschmack ($4,43 \pm 0,4$) und der Gesamteindruck ($4,50 \pm 0,5$) wurden signifikant schlechter bewertet ($p < 0,029$). Am niedrigsten und damit am schlechtesten, in allen Kategorien, wurden die Würste mit 3 % Kartoffelprotein bewertet (Aussehen: $4,50 \pm 0,6$; Geruch: $4,14 \pm 0,6$; Textur: $3,34 \pm 0,5$; Gesamteindruck: $4,07 \pm 0,6$). Lediglich die Kategorie Geschmack ($4,14 \pm 0,6$) wurde gleich bewertet wie die der Würste mit 2 % Kartoffelprotein.

5. Ergebnisse

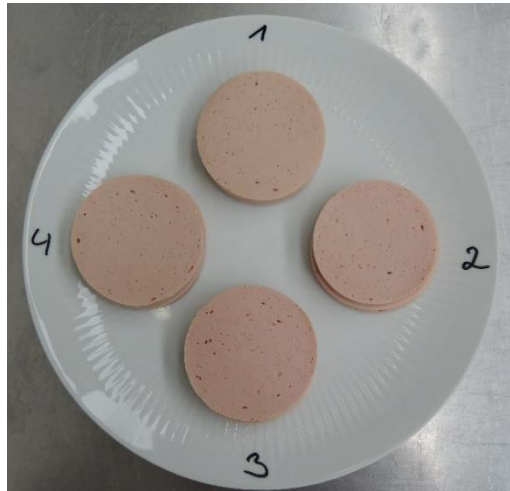


Abbildung 22: Erscheinungsbild und Präsentation der Würste des Hauptversuches zur sensorischen Verkostung (Nr. 1: 3 % Kartoffelprotein; Nr. 2: 1 %; Nr. 3: Kontrolle; Nr.4: 2 %).

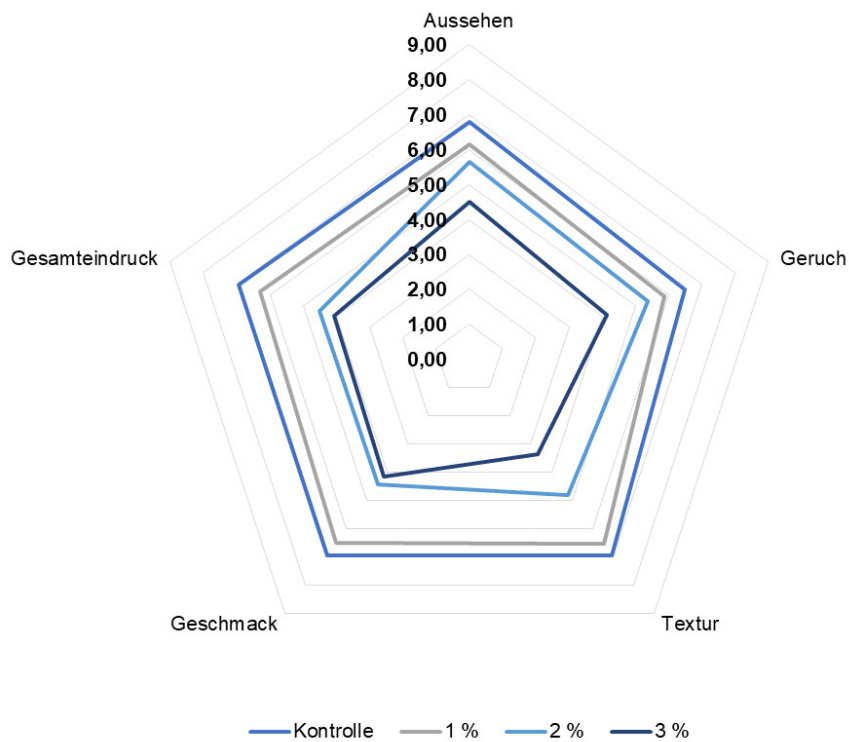


Abbildung 23: Ergebnisse der Lebensmittelsensorik der Würste des Hauptversuches (Kontrolle; 1 - 3 % Kartoffelprotein) unter Verwendung einer 9-Punkte-Beliebtheitsskala (aufsteigend von 0 „nicht gut“ bis 9 „sehr gut“ Bewertet wurden die Kategorien Aussehen, Textur, Geschmack und Gesamteindruck (n = 14).

5.2 Nährwertanalyse

5.2.1 Wasser-, Fett-, Protein- und Aschegehalt

Im Rahmen der Vollanalyse wurden die qualitätsbestimmenden Nährwertfaktoren Wasser-, Fett-, Proteingehalt und der Aschegehalt bestimmt (Durchführung siehe Abschnitt 4.4.1 bis 4.4.4). In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der Analysen der Würste des Vorversuches dargestellt. Der Wassergehalt der Würste ohne Kartoffelprotein ($62,30 \pm 0,09$ g/100g) unterschied sich nicht signifikant (0,1 %: $p = 0,872$; 1 %: $p = 0,059$) von dem der Würste mit 0,1 % ($61,90 \pm 0,20$ g/100g) und 1 % Kartoffelprotein ($61,05 \pm 0,31$ g/100g). Der Wassergehalt der Würste mit 5 % Kartoffelprotein ($59,09 \pm 0,45$ g/100g) war signifikant niedriger ($p < 0,002$) als der der Würste mit weniger oder keinem Kartoffelproteinanteil. Bei den Würsten mit 10 % Kartoffelprotein ($56,76 \pm 0,28$ g/100g) konnte der geringste Anteil an Wasser nachgewiesen werden. Der Fettgehalt der Würste unterschied sich bei keiner Charge signifikant ($p = 0,057 - 0,960$) von einer anderen (Kontrolle: $23,29 \pm 0,21$ g/100g; 0,1 %: $23,29 \pm 0,16$ g/100g; 1 %: $23,86 \pm 0,25$ g/100g; 5 %: $23,10 \pm 0,15$ g/100g; 10 %: $22,43 \pm 0,22$ g/100g).

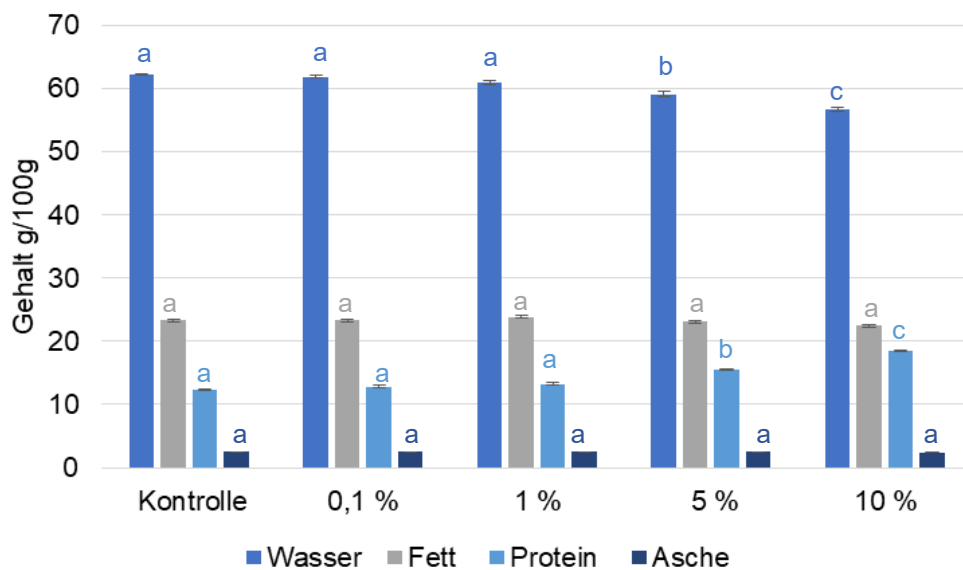


Abbildung 24: Ergebnisse der Vollanalyse der Würste des Vorversuches (0,1 - 10 % Kartoffelprotein) ($n = 4$) unter Angabe des Standardfehlers. Verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Chargen und innerhalb einer Messgröße.

Der Proteingehalt der Würste ohne Kartoffelprotein ($12,41 \pm 0,13$ g/100g) unterschied sich nicht signifikant (0,1 %: $p = 0,497$; 1 %: $p = 0,055$) von den Chargen mit 0,1 % ($12,83 \pm 0,28$ g/100g) und 1 % Kartoffelprotein ($13,02 \pm 0,22$ g/100g). Die Chargen mit 5 % Kartoffelprotein ($15,58 \pm 0,10$ g/100g) und 10 % Kartoffelprotein ($18,45 \pm 0,10$ g/100g) unterschieden sich signifikant untereinander und von den Chargen mit weniger bis keinem Kartoffelprotein ($p < 0,001$).

Bei den Würsten mit 10 % Kartoffelprotein konnte der höchste Anteil an Protein nachgewiesen werden. Des Weiteren unterschied sich der Anteil der Asche der verschiedenen Würste mit und ohne Kartoffelprotein nicht signifikant (Kontrolle: $2,59 \pm 0,01$ g/100g; 0,1 %: $2,51 \pm 0,02$ g/100g; 1 %: $2,49 \pm 0,01$ g/100g; 5 %: $2,48 \pm 0,03$ g/100g; 10 %: $2,45 \pm 0,01$ g/100g; $p = 0,130 - 0,998$).

Die Ergebnisse der Vollanalyse der Würste des Hauptversuches sind in Abbildung 25 dargestellt. Weder beim Wassergehalt (Kontrolle: $60,82 \pm 0,35$ g/100g; 1 %: $60,80 \pm 0,34$ g/100g; 2 %: $61,45 \pm 0,40$ g/100g; 3 %: $60,67 \pm 0,33$ g/100g) noch beim Fettgehalt (Kontrolle: $24,20 \pm 0,25$ g/100g; 1 %: $24,53 \pm 0,19$ g/100g; 2 %: $23,62 \pm 0,14$ g/100g; 3 %: $24,05 \pm 0,33$ g/100g) konnten signifikante Unterschiede (Wassergehalt: $p = 0,439 - 0,999$; Fettgehalt: $p = 0,078 - 0,969$) zwischen den einzelnen Chargen festgestellt werden. Dasselbe gilt für den Proteingehalt (Kontrolle: $12,11 \pm 0,25$ g/100g; 1 %: $12,06 \pm 0,14$ g/100g; 2 %: $12,06 \pm 0,24$ g/100g; 3 %: $11,89 \pm 0,16$ g/100g; $p = 0,866 - 0,995$) und den Aschegehalt (Kontrolle: $2,60 \pm 0,05$ g/100g; 1 %: $2,56 \pm 0,03$ g/100g; 2 %: $2,47 \pm 0,01$ g/100g; 3 %: $2,51 \pm 0,02$ g/100g; $p = 0,061 - 0,891$).

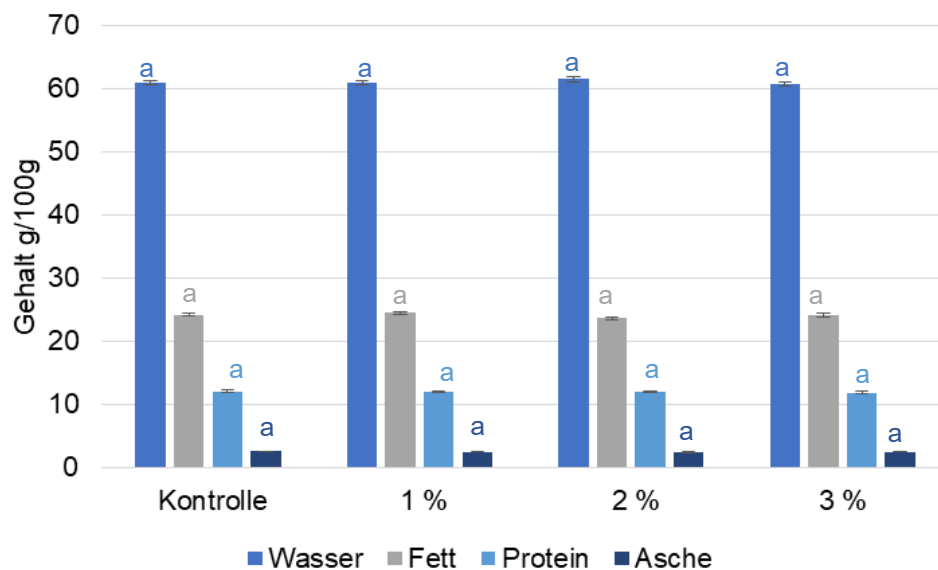


Abbildung 25: Ergebnisse der Vollanalyse der Würste des Hauptversuches (1 - 3 % Kartoffelprotein) ($n = 4$) unter Angabe des Standardfehlers. Verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Chargen und innerhalb einer Messgröße.

5.2.2 Aminosäuregehalt

Der Aminosäuregehalt ist ebenfalls ein Qualitätsmerkmal. Durch die Analysen der entwickelten Würste mit Kartoffelprotein sollte festgestellt werden, wie sich die Zusammensetzung der Aminosäuren in den neu entwickelten Würsten verändert (siehe Abschnitt 4.4.5). Die Konzentrationen an Aminosäuren der Würste des Vorversuches sind in Tabelle 43 aufgelistet.

Die Würste ohne Kartoffelprotein unterscheiden sich in ihren Konzentrationen in keiner Aminosäure signifikant ($p = 0,056 - 0,983$) von den Würsten mit 0,1 % und 1 % Kartoffelprotein. Die Chargen mit 5 % Kartoffelprotein und 10 % Kartoffelprotein unterscheiden sich signifikant ($p < 0,019$) sowohl untereinander als auch von den niedriger dosierten Chargen (Kontrolle, 0,1 %, 1 %).

Tabelle 43: Konzentrationen (c) der 20 Aminosäuren der Würste des Vorversuches (0,1 – 10 % Kartoffelprotein) unter Angabe des Standardfehlers ($n = 2$).

Aminosäure c	Kontrolle	0,1 %	1 %	5 %	10 %
[mg/100g]					
L-Asparaginsäure	1338 ± 19 ^a	1165 ± 19 ^a	1230 ± 3 ^a	1605 ± 49 ^c	2153 ± 43 ^d
L-Glutaminsäure	2320 ± 18 ^a	2127 ± 53 ^a	2168 ± 6 ^a	2446 ± 40 ^c	2873 ± 43 ^d
L-Serin	563 ± 2 ^a	587 ± 5 ^a	635 ± 3 ^a	850 ± 13 ^c	1047 ± 4 ^d
L-Glycin	794 ± 9 ^a	843 ± 43 ^a	859 ± 9 ^a	1020 ± 18 ^c	1154 ± 6 ^d
L-Histidin	498 ± 5 ^a	523 ± 3 ^a	540 ± 3 ^a	628 ± 14 ^c	654 ± 10 ^d
L-Arginin	882 ± 9 ^a	942 ± 13 ^a	970 ± 5 ^a	1151 ± 8 ^c	1264 ± 10 ^d
L-Threonin	651 ± 0 ^a	674 ± 3 ^a	721 ± 2 ^a	919 ± 9 ^c	1107 ± 4 ^d
L-Alanin	863 ± 31 ^a	806 ± 24 ^a	820 ± 0 ^a	975 ± 11 ^c	1157 ± 29 ^d
L-Prolin	524 ± 4 ^a	590 ± 17 ^a	603 ± 2 ^a	766 ± 5 ^c	932 ± 5 ^d
L-Cystein	195 ± 1 ^a	186 ± 4 ^a	195 ± 4 ^a	260 ± 5 ^c	289 ± 7 ^d
L-Tyrosin	474 ± 3 ^a	456 ± 13 ^a	475 ± 1 ^a	787 ± 1 ^c	912 ± 57 ^d
L-Valin	681 ± 4 ^a	673 ± 3 ^a	729 ± 3 ^a	976 ± 16 ^c	1230 ± 38 ^d
L-Methionin	414 ± 1 ^a	366 ± 2 ^a	380 ± 1 ^a	453 ± 1 ^c	498 ± 0 ^d
L-Isoleucin	615 ± 0 ^a	612 ± 3 ^a	659 ± 1 ^a	850 ± 5 ^c	1053 ± 5 ^d
L-Lysine	1149 ± 37 ^a	1073 ± 9 ^a	1117 ± 7 ^a	1294 ± 59 ^c	1650 ± 29 ^d
L-Leucin	1121 ± 8 ^a	1036 ± 1 ^a	1116 ± 1 ^a	1450 ± 6 ^c	1818 ± 3 ^d
L-Phenylalanin	541 ± 3 ^a	554 ± 5 ^a	605 ± 8 ^a	869 ± 18 ^c	1035 ± 26 ^d
L-Tryptophan	146 ± 3 ^a	147 ± 1 ^a	154 ± 2 ^a	195 ± 3 ^c	236 ± 1 ^d

^{a-d} Verschiedene Buchstaben markieren signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Chargen und innerhalb einer Messgröße.

In Tabelle 43 sind die Ergebnisse der Aminosäurebestimmung der Würste des Hauptversuches aufgelistet. Zwischen den Würsten ohne Kartoffelprotein und denen mit 1 - 3 % Kartoffelprotein gab es, mit Ausnahmen, keine signifikante Unterschiede bei der Konzentration der Aminosäuren ($p = 0,098 - 0,999$). Lediglich bei den Aminosäuren Serin, Valin und Isoleucin gab es Unterschiede. Die Konzentration an Serin der Würste ohne Kartoffelprotein unterschied sich nicht signifikant ($p = 0,379$) von der Konzentration der Würste mit 1 % Kartoffelprotein (Kontrolle: 530 ± 3 mg/100g; 1 % 544 ± 7 mg/100g). Allerdings war die Konzentration der Würste mit 2 % (583 ± 8 mg/100g) und 3 % (597 ± 0 mg/100g) Kartoffelprotein signifikant höher zu den Würsten ohne Kartoffelprotein (2 %: $p = 0,008$; 3 % $p = 0,004$). Die beiden höheren Konzentrationen unterschieden sich allerdings nicht signifikant ($p = 0,426$).

Die gleichen Tendenzen zeigten sich bei Valin (Kontrolle: 643 ± 2 mg/100g; 1 %: 658 ± 7 mg/100g; 2 %: 707 ± 5 mg/100g; 3 %: 715 ± 1 mg/100g) und Isoleucin (Kontrolle: 588 ± 1 mg/100g; 1 %: 594 ± 14 mg/100g; 2 %: 642 ± 5 mg/100g; 3 %: 649 ± 2 mg/100g). Hierbei unterschieden sich die Konzentrationen der Aminosäuren der Würste ohne Kartoffelprotein nicht signifikant von denen mit 1 % Kartoffelprotein (Valin: $p = 0,263$; Isoleucin $p = 0,917$) und signifikant von denen mit 2 % und 3 % Kartoffelprotein (Valin: $p = 0,005 - 0,001$; Isoleucin: $p = 0,033 - 0,014$).

Des Weiteren war die Konzentration an Histidin bei den Würsten mit 3 % Kartoffelprotein signifikant niedriger ($p = 0,042$) als die Konzentration der Würste ohne Kartoffelprotein (Kontrolle: 402 ± 6 mg/100g; 1 %: 394 ± 3 mg/100g; 2 %: 371 ± 11 mg/100g; 3 %: 360 ± 5 mg/100g).

5. Ergebnisse

Tabelle 44: Konzentrationen (c) der 20 Aminosäuren der Würste des Hauptversuches (0,1 - 10 % Kartoffelprotein) unter Angabe des Standardfehlers (n = 2).

Aminosäure c [mg/100g]	Kontrolle	1 %	2 %	3 %
L-Asparaginsäure	1149 ± 57 ^a	1241 ± 71 ^a	1271 ± 5 ^a	1290 ± 9 ^a
L-Glutaminsäure	2084 ± 61 ^a	2121 ± 97 ^a	2094 ± 11 ^a	2003 ± 11 ^a
L-Serin	530 ± 3 ^a	544 ± 7 ^a	583 ± 8 ^b	597 ± 0 ^b
L-Glycin	715 ± 8 ^a	732 ± 9 ^a	750 ± 18 ^a	736 ± 6 ^a
L-Histidin	402 ± 6 ^a	394 ± 3 ^a	371 ± 11 ^a	360 ± 5 ^b
L-Arginin	774 ± 11 ^a	769 ± 9 ^a	767 ± 23 ^a	755 ± 6 ^a
L-Threonin	628 ± 8 ^a	628 ± 7 ^a	662 ± 9 ^a	661 ± 1 ^a
L-Alanin	707 ± 14 ^a	728 ± 29 ^a	722 ± 14 ^a	705 ± 5 ^a
L-Prolin	491 ± 16 ^a	506 ± 16 ^a	547 ± 20 ^a	558 ± 9 ^a
L-Cystein	106 ± 0 ^a	113 ± 7 ^a	96 ± 2 ^a	103 ± 1 ^a
L-Tyrosin	345 ± 2 ^a	372 ± 4 ^a	371 ± 17 ^a	392 ± 8 ^a
L-Valin	643 ± 2 ^a	658 ± 7 ^a	707 ± 5 ^b	715 ± 1 ^b
L-Methionin	310 ± 7 ^a	305 ± 1 ^a	305 ± 7 ^a	298 ± 2 ^a
L-Isoleucin	588 ± 1 ^a	594 ± 14 ^a	642 ± 5 ^b	649 ± 2 ^b
L-Lysine	1046 ± 1 ^a	1075 ± 16 ^a	1156 ± 11 ^a	1170 ± 1 ^a
L-Leucin	1047 ± 48 ^a	1073 ± 51 ^a	1129 ± 7 ^a	1095 ± 9 ^a
L-Phenylalanin	399 ± 0 ^a	426 ± 5 ^a	426 ± 20 ^a	452 ± 9 ^a
L-Tryptophan	140 ± 5 ^a	137 ± 3 ^a	147 ± 2 ^a	131 ± 2 ^a

Ergebnisse Teil II: DNA-basierte Methodenentwicklung

Alle Konzentrationen und Cq-Werte sind als Mittelwerte $\pm$ ihre Standardabweichung angegeben. Der Cq-Wert 37 wurde als Cut-off Wert festgelegt, da es bei einer Zykluszahl > 37 zur Bildung von unspezifischen Produkten kam.

5.3 DNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung

Die Kartoffelknolle (herkömmliche Speisekartoffel) besteht zu 14,1 % (Souci et al., 2004) aus Stärke. Diese polymeren Kohlenhydrate stören die Extraktion von DNA aus Kartoffeln und wirken als Inhibitoren. Daher wurden im Zuge dieser Arbeit verschiedene Pflanzenteile der Kartoffel zur Isolierung von DNA getestet (Keimling, Schale, Knolle, getrocknete Knolle). Letztendlich weitergearbeitet wurde nur mit dem Teil der Kartoffel und der Methode, welche die höchste Konzentration und die reinste DNA lieferten. Dabei sollte der Quotient A260/280 mindestens 1,8 entsprechen und der Quotient A260/230 zwischen 2,0 und 2,2 liegen (siehe Abschnitt 4.6.3.1). Nur reine DNA-Lösungen wurden für die real-time PCR eingesetzt.

Zur DNA-Isolierung wurde eine Kartoffelsorte (Tabelle 16, Sorte 28) verwendet sowie die Isolierungsmethoden des Wizard® Kits (siehe Abschnitt 4.6.1), des DNeasy® mericon® Food Kit (siehe Abschnitt 4.6.2.2) und eine modifizierte CTAB-Methode (siehe Abschnitt 4.6.2.3). Die Ergebnisse der DNA-Reinheits- und Konzentrationsbestimmung sind in Tabelle 45 aufgelistet.

Tabelle 45: Ergebnisse der DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen (Quotienten A260/280, A260/230 der DNA-Extrakte, die aus verschiedenen Kartoffelbestandteilen mit verschiedenen Kits erhalten wurden) (n = 2).

Methode	Probe	Konzentration [ng/μL]	A260/280	A260/230
Wizard®	Keimling	258,7 $\pm$ 0,8	1,7	1,4
	Schale	58,5 $\pm$ 0,4	1,4	0,8
	Knolle	17,9 $\pm$ 0,7	1,6	0,8
	Knolle (getrocknet)	36,8 $\pm$ 1,0	1,8	1,3
DNeasy®	Keimling	24,6 $\pm$ 0,2	1,9	2,1
	Schale	5,8 $\pm$ 0,1	2,1	1,3
	Knolle	2,4 $\pm$ 0,2	3,3	1,6
	Knolle (getrocknet)	14,7 $\pm$ 0,5	2,0	2,4
CTAB	Keimling	90,0 $\pm$ 1,2	1,8	1,5
	Schale	44,9 $\pm$ 0,1	1,6	0,8
	Knolle	35,1 $\pm$ 1,3	2,5	0,3
	Knolle (getrocknet)	71,5 $\pm$ 3,7	2,0	0,4

Die DNA-Isolierung mit dem DNeasy® mericon® Food Kit erbrachte bei allen Bestandteilen der Kartoffel die geringste DNA-Konzentration. Allerdings konnte mit Hilfe dieses Kits die annähernd reinste DNA-Lösung erhalten werden. Mit Hilfe der modifizierten CTAB-Methode konnte eine höhere Konzentration an DNA in Lösung isoliert werden, allerdings mit einer geringeren Reinheit (Quotient A260/230). Mit Hilfe des Wizard® Kits konnte die höchste DNA-Konzentration mit $258,7 \pm 0,8$ ng/μL bei der Isolierung der Kartoffel-DNA aus den Keimlingen erhalten werden. Allerdings konnte hierbei keine reine DNA-Lösung isoliert werden (A260/280: 1,7; A260/230: 1,4). Aus den Proben „Knolle“ und „Knolle getrocknet“ konnte mit Hilfe der CTAB-Methode eine höhere DNA-Konzentration isoliert werden. Insgesamt konnten aus den Proben der Schale als auch aus denen der frischen Knolle die geringsten DNA-Konzentrationen isoliert werden. Dies waren auch die Lösungen mit der geringsten Reinheit (Quotient A260/230).

Letztendlich wurde das Wizard® Kit zur DNA-Isolierung aller weiteren Proben verwendet. Allerdings wurden alle Proben, deren Quotienten A260/280 nicht mindestens 1,8 und A260/230 nicht 2,0 - 2,2 entsprachen, mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (siehe Abschnitt 4.8.5) aufgereinigt. Die Konzentration der gereinigten DNA-Lösung aus dem Keimling, isoliert mit dem Wizard® Kit, lag bei $207,4 \pm 1,8$ ng/μL und einem Quotienten A260/280 von 1,8 und A260/230 von 2,0.

5.4 Validierung der real-time PCR Methode

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zielgene wurden bereits 2015 für das Projekt des Nachweises von Kartoffelprotein ausgewählt. Ebenso lagen die Primer (Tabelle 11) und die Sonde PP2A-P und PI-P (Tabelle 13) bereits zu Beginn der Arbeit vor. Soweit nur eine Kartoffelsorte für die Analyse verwendet wurde, war dies Sorte 28 (siehe Tabelle 16).

5.4.1 Theoretische Spezifität

5.4.1.1 Theoretische Spezifität der Zielsequenz

Die ausgewählten Zielsequenzen (Tabelle 7) wurden mittels der Software BLAST über Alignments auf homologe Sequenzen getestet (siehe Abschnitt 4.11.1.1). Betrachtet wurden dabei verwandte Pflanzen der Familie *Solanaceae*, welche als Lebensmittel Relevanz haben. Des Weiteren wurden lebensmittelrelevante, nicht verwandte Pflanzen und Tiere geprüft.

Laut Datenbank wurden für die Zielsequenz des Gens PP2A keine homologen Sequenzen zu anderen lebensmittelrelevanten Pflanzen oder Tieren gefunden.

Die Zielsequenz des Gens PI zeigte eine hohe Übereinstimmung mit Sequenzen weiterer Protease-Inhibitoren der Kartoffel. Die homologen Sequenzbereiche lagen bei 83 - 100 % im Vergleich zur Zielsequenz. Die Sequenzen, die zu 100 % übereinstimmten, sind in Tabelle 46 aufgelistet. Des Weiteren wurden keine Homologien mit anderen lebensmittelrelevanten Pflanzen oder Tieren gefunden.

Tabelle 46: Namen der Gene mit einer 100 %igen Übereinstimmung mit der Zielsequenz des Gens PI.

Name des Gens	NCBI BLAST ID
Solanum tuberosum cultivar Agria aspartic protease inhibitor 5 (API5) mRNA, complete cds	MH686153.1
PREDICTED: Solanum tuberosum aspartic protease inhibitor 3 (LOC102604582), mRNA	XM_006362606.2

5.4.1.2 Theoretische Spezifität der Primer und Sonden

Die verwendeten Primer und die beiden Sonden PP2A-P und PI-P wurden zunächst mit der Software Beacon Designer nach den in Abschnitt 3.1.3 angeführten Kriterien getestet (Tabelle 47 und 48). Dabei wurden keine Auffälligkeiten festgestellt.

Tabelle 47: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Primer	Länge [bp]	Tm [°C]	GC [%]	GC Clamp [Anzahl]	Self Dimer ΔG [Kcal/mol]	Hairpin ΔG [Kcal/mol]	Cross Dimer ΔG [Kcal/mol]
PP2A-for1	25	56	32	1	-2,8	0,0	Mit PP2A-rev - 2,0
PP2A-for2	24	58	38	1	-3,1	0,0	Mit PP2A-rev - 3,1
PP2A-rev	20	60	55	1	-3,1	0,0	Siehe PP2A- for 1 & 2
PI-for	24	58	38	3	-2,1	-2,1	Siehe PI-rev 1 & 2
PI-rev1	20	55	45	3	-3,4	-2,4	Mit PI-for -2,1
PI-rev2	25	58	36	1	0,0	0,0	Mit PI-for -1,8

Tabelle 48: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Sonden.

Sonde	Länge [bp]	Tm [°C]	GC [%]	GC Clamp [Anzahl]	Self Dimer ΔG [Kcal/mol]	Hairpin ΔG [Kcal/mol]	Cross Dimer ΔG [Kcal/mol]
PP2A-P	23	62	52	1	-4,3	2,9	Mit PP2A-for 1: 4,3; mit PP2A-rev 4,8
PI-P	29	64	44	1	-3,3	-2,4	Mit PI-for: -5,0; mit PI-rev2: -2,0

5.4.2 Optimierung der Annealing-Temperatur

Alle vier Primerpaare (Tabelle 9) wurden auf ihre optimale Annealing-Temperatur getestet. Die Durchführung erfolgte wie in Abschnitt 4.11.2 beschrieben. Die Temperatur wurde anhand des niedrigsten C_q-Wertes ausgewählt. Zusätzlich wurde die relative Fluoreszenz betrachtet. Falls es dabei zu keinen größeren Abweichungen zwischen den Temperaturen kam, wurde eine Annealing-Temperatur von 60 °C festgelegt, da sich diese Temperatur für mögliche spätere Multiplex-Analysen etabliert hat. Abbildung 26 zeigt die Amplifikationskurven, welche mit dem Primerpaar PP2A-I erhalten wurden. Die Optimierung wurde bei acht verschiedenen Annealing-Temperaturen in einem Bereich von 56 – 66 °C durchgeführt. Des Weiteren wurde eine Schmelzkurven-Analyse der bei den acht Annealing-Temperaturen erhaltenen Amplikons durchgeführt. Bei der Amplifizierung der Kartoffel-DNA mit dem Primerpaar PP2A-I war in dem untersuchten Temperaturbereich kein Einfluss auf den C_q-Wert zu erkennen. Die Intensität des Fluoreszenzsignals war bei 66,0 °C am höchsten. Ausgewählt wurde eine Annealing-Temperatur von 60,0 °C. Die Schmelzkurvenanalyse zeigte, dass bei allen Annealing-Temperaturen nur ein Produkt erhalten wurde, dessen Schmelztemperatur 83,0 °C betrug.

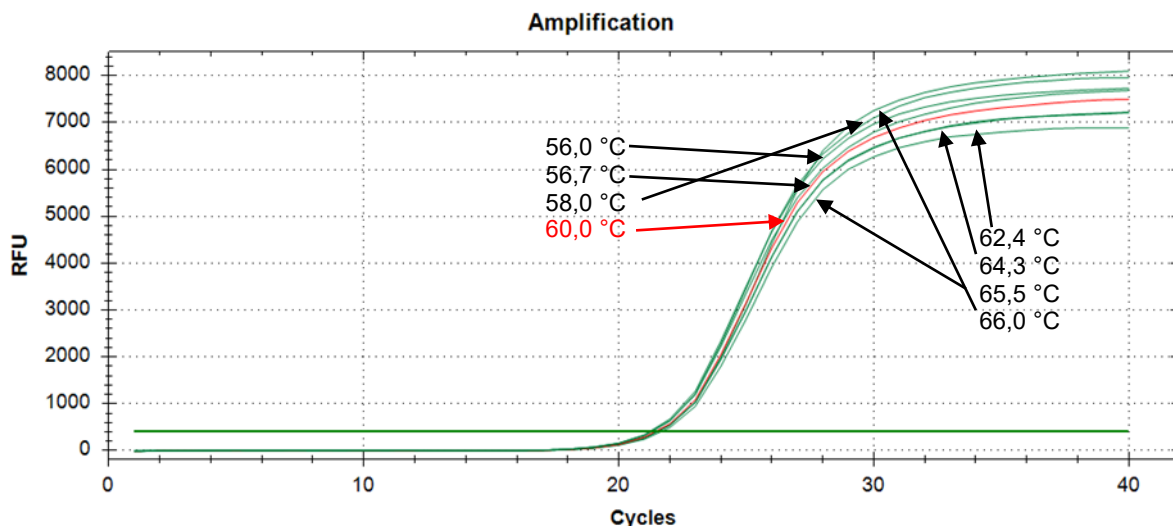


Abbildung 26: Amplifikationskurven der Kartoffel-DNA mit dem Primerpaar PP2A-I bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen.

Abbildung 27 zeigt, dass die mit dem Primerpaar PP2A-II bei verschiedenen Annealing-Temperaturen erhaltenen Amplifikationskurven sehr ähnlich waren. Es konnten keine Unterschiede in den C_q-Werten festgestellt werden, allerdings wurden Unterschiede in der Intensität der Fluoreszenz beobachtet. Die Intensität der Fluoreszenz war bei Temperaturen über 60,0 °C niedriger, ebenso bei 58,0 °C. Aus diesem Grund wurde auch für dieses Primerpaar die Annealing-Temperatur von 60,0 °C ausgewählt, denn zu niedrige Temperaturen könnten dazu führen, dass die Primer unspezifisch binden. Die Schmelztemperatur der gebildeten Produkte lag unabhängig von der Annealing-Temperatur bei 83,0 °C. Bei keiner Annealing-Temperatur kam es zur Bildung von Primer-Dimeren.

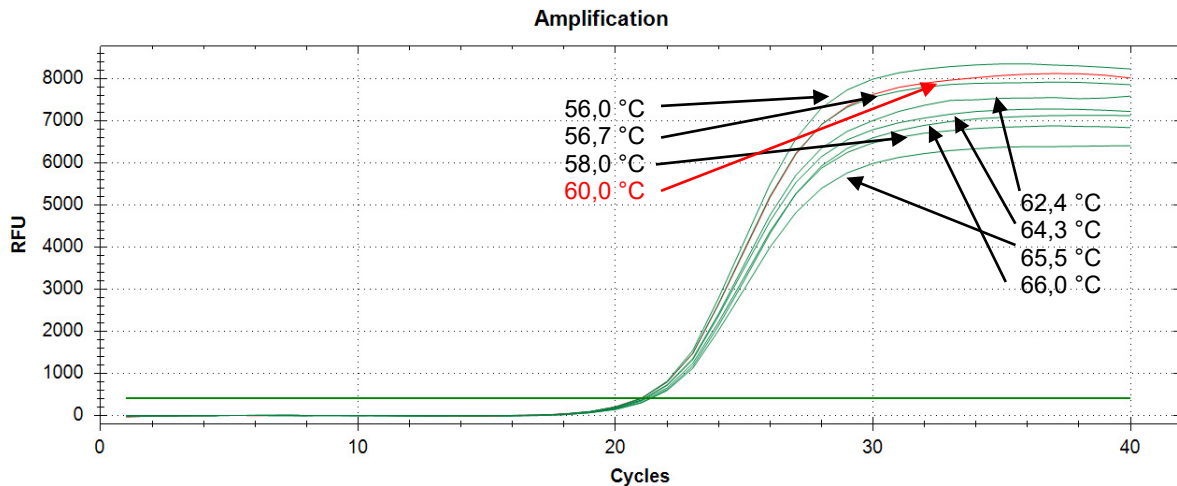


Abbildung 27: Amplifikationskurven der Kartoffel-DNA mit dem Primerpaar PP2A-II bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen.

Abbildung 28 zeigt die Amplifikationskurven, welche mit dem Primerpaar PI-I erhalten wurden. Die Cq-Werte der einzelnen Kurven unterscheiden sich $\Delta Cq \pm 0,5$. Bei einer Temperatur von 60 °C wurde die höchste Fluoreszenz erhalten und wurde somit als Annealing-Temperatur für dieses Primerpaar ausgewählt. Die Schmelztemperatur des Amplikons lag bei allen Annealing-Temperaturen bei 79,5 °C, es bildete sich nur ein Produkt und keine Primer-Dimere.

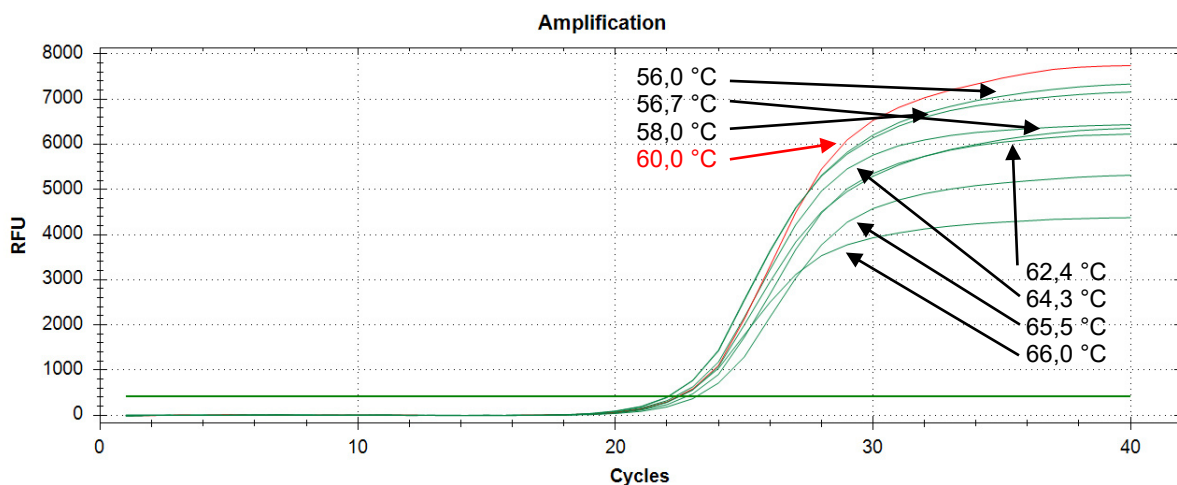


Abbildung 28: Amplifikationskurven der Kartoffel-DNA mit dem Primerpaar PI-I bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen.

Abbildung 29 zeigt die Amplifikationskurven, welche mit dem Primerpaar PI-II erhalten wurden. Ab einer Annealing-Temperatur von 62,4 °C kam es zu einer wesentlichen Erhöhung des Cq-Wertes und zu einer verringerten Fluoreszenzintensität.

Aufgrund der höheren Wahrscheinlichkeit der Bildung unspezifischer Produkte bei zu niedrigen Annealing-Temperaturen wurden alle zukünftigen Versuche mit diesem Primerpaar bei einer Annealing-Temperatur von 60 °C durchgeführt. Die Schmelzkurvenanalyse zeigte, dass bei allen Annealing-Temperaturen nur ein Produkt erhalten wurde, dessen Schmelztemperatur 80,5 °C betrug.

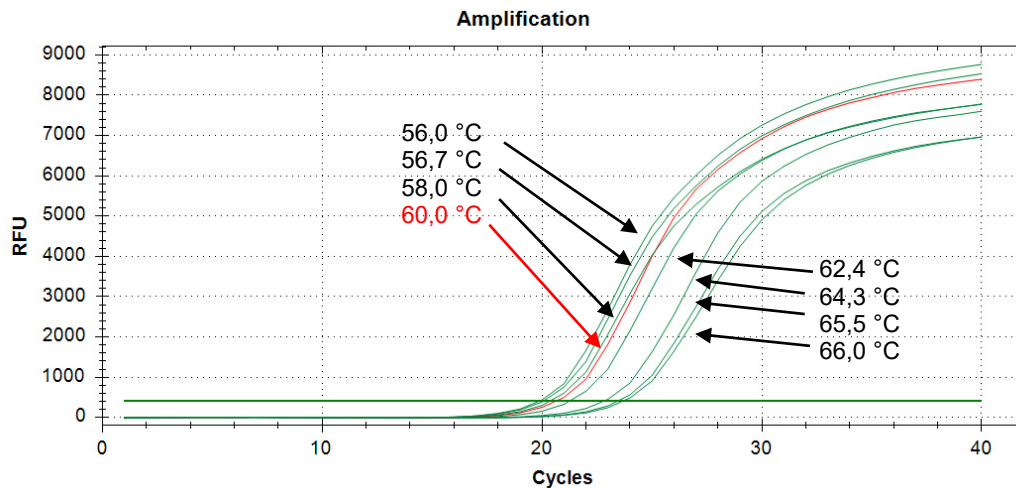


Abbildung 29: Amplifikationskurven der Kartoffel-DNA mit dem Primerpaar PI-II bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen.

5.4.3 Schmelzkurvenanalyse (Spezifität der Primer)

Mit der Schmelzkurvenanalyse (Durchführung siehe Abschnitt 4.11.1.2) wurde die Spezifität der verschiedenen Primerpaare überprüft. Dabei sollte mit Hilfe der Primer nur ein spezifisches PCR Produkt erhalten werden und keine Primer-Dimere gebildet werden. Parallel wurden die für verschiedene Nachtschattengewächse (Tabelle 17) erhaltenen PCR Produkte einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen um zu überprüfen, ob sie ein ähnliches PCR Produkt zu der der Kartoffel bildeten.

Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse der Amplikons, welche mit dem Primerpaar PP2A-I erhalten wurden. Sowohl das Amplikon, welches für die aus der Kartoffel isolierte DNA erhalten wurde als auch das Amplikon, welches für DNA aus Proteinpulver erhalten wurde, hatte eine Schmelztemperatur von 82,5 °C.

Des Weiteren entstanden bei beiden DNA-Proben keine Nebenprodukte wie z.B. Primer-Dimere. Dieselbe Schmelztemperatur hatte das Amplikon der Tamarillo-DNA, allerdings mit einer geringeren Intensität des Fluoreszenzsignals. Die PCR Produkte aller weiteren Arten hatten eine Schmelztemperatur von < 82,5 °C. Ebenso waren die jeweiligen Peaks der Schmelzkurven deutlich niedriger als die, die für die Kartoffel erhalten wurden.

5. Ergebnisse

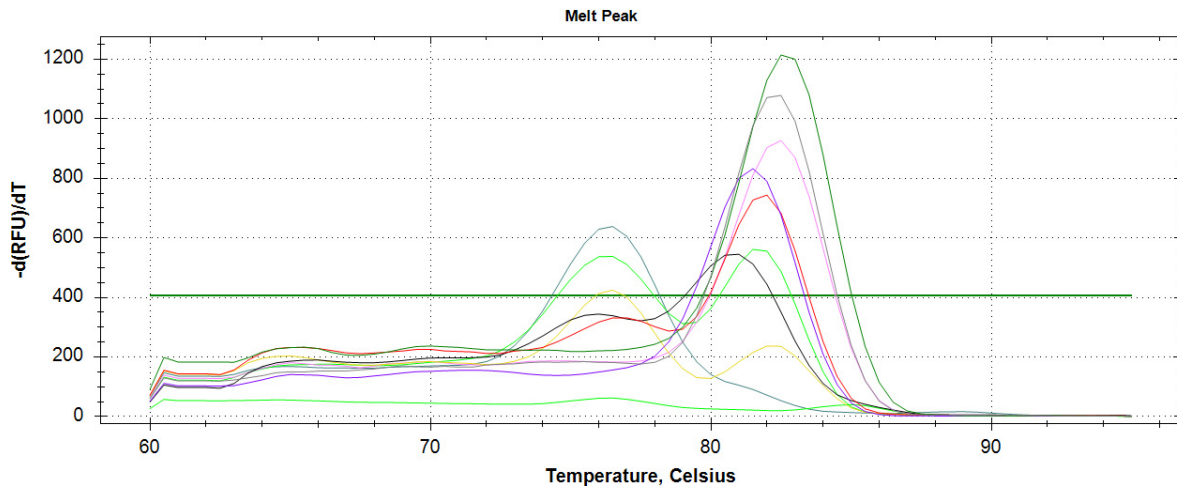


Abbildung 30: Ableitung der Schmelzkurven der PCR Produkte des Primerpaars PP2A-I der DNA-Proben : Kartoffel (dunkelgrün), Kartoffelproteinpulver (grau) Tomate (rot), Paprika (hellgrün), Aubergine (blau), Physalis (gelb), Tamarillo (rosa), Tabak (türkis), Goji-Beere (schwarz).

In Abbildung 31 sind die Schmelzkurven der PCR Produkte des Primerpaars PP2A-II dargestellt. Auch hier betrug die Schmelztemperatur des Kartoffel und des Proteinpulver PCR Produkts 82,5 °C. Je eines der für Tomaten- und Paprika-DNA erhaltenen PCR Produkte hatte eine Schmelztemperatur von 82,0 °C. Die Schmelztemperatur des Auberginen-Amplikons betrug 81,0 °C. Alle weiteren Arten bildeten Nebenprodukte bzw. führten zu Kurven mit geringeren Fluoreszenzintensitäten.

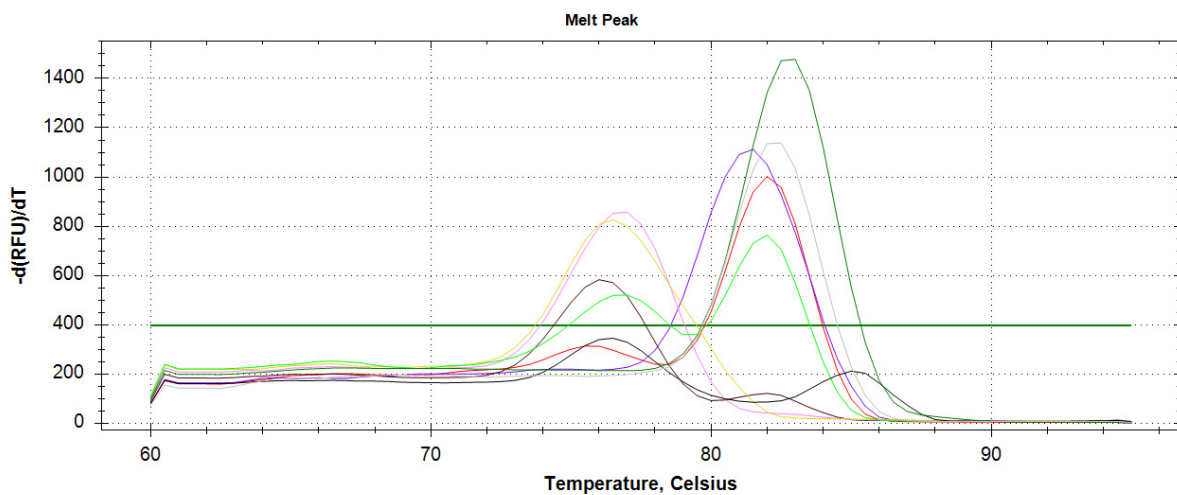


Abbildung 31: Ableitung der Schmelzkurven der PCR Produkte des Primerpaars PP2A-II der DNA-Proben: Kartoffel (dunkelgrün), Kartoffelproteinpulver (grau) Tomate (rot), Paprika (hellgrün), Aubergine (blau), Physalis (gelb), Tamarillo (rosa), Tabak (türkis), Goji-Beere (schwarz). Die Ergebnisse der

Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse der PCR Produkte des Primerpaars PI-I sind in Abbildung 32 zu sehen. Die Schmelztemperatur des Amplikons der Kartoffel betrug 79,5 °C. Es wurden keine Sekundärprodukte gebildet.

5. Ergebnisse

Die Schmelztemperatur des Amplikons des Proteinpulvers betrug 79,5 °C, allerdings auch die des Amplikons der Aubergine und die des Amplikons des Paprikas. Bei allen anderen Proben ergab sich eine Schmelztemperatur des Amplikons < 76,5 °C.

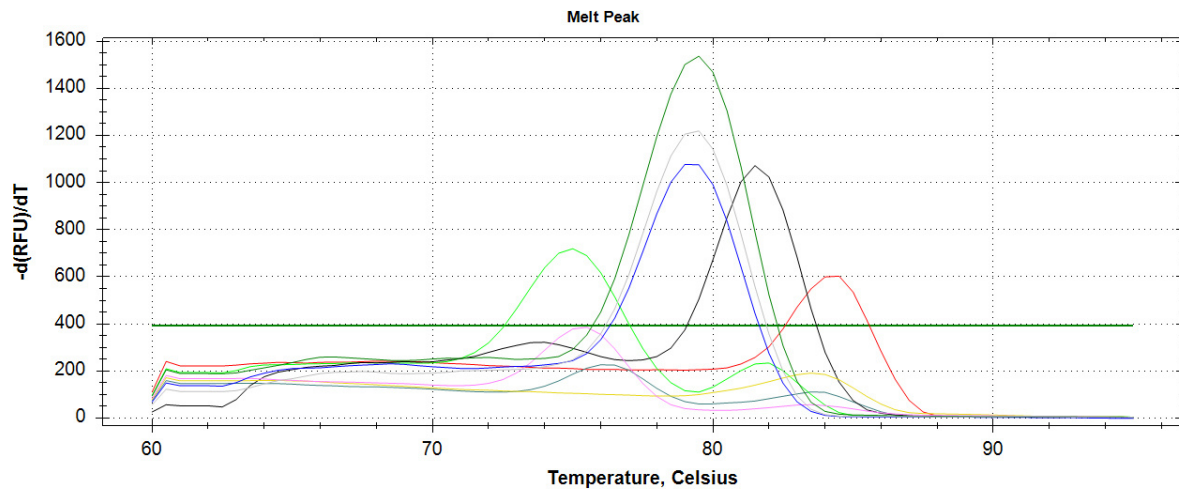


Abbildung 32: Ableitung der Schmelzkurven der PCR Produkte des Primerpaars PI-I der DNA-Proben: Kartoffel (dunkelgrün), Kartoffelpulver (grau) Tomate (rot), Paprika (hellgrün), Aubergine (blau), Physalis (gelb), Tamarillo (rosa), Tabak (türkis), Goji-Beere (schwarz).

Die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse der PCR Produkte des Primerpaars PI-II sind in Abbildung 33 dargestellt. Die Schmelztemperatur des Amplikons der Kartoffel lag hierbei bei 81,0 °C und die des Proteinpulver-Amplikons bei 80,5 °C. Die Schmelztemperatur des Amplikons der Aubergine lag bei 81,5 °C. Die Schmelzkurve wies aber eine Schulter auf. Die Schmelztemperatur der PCR Produkte aller weiteren Proben lag mindestens 1 °C höher als die der Kartoffel oder es bildeten sich lediglich Sekundärprodukte.

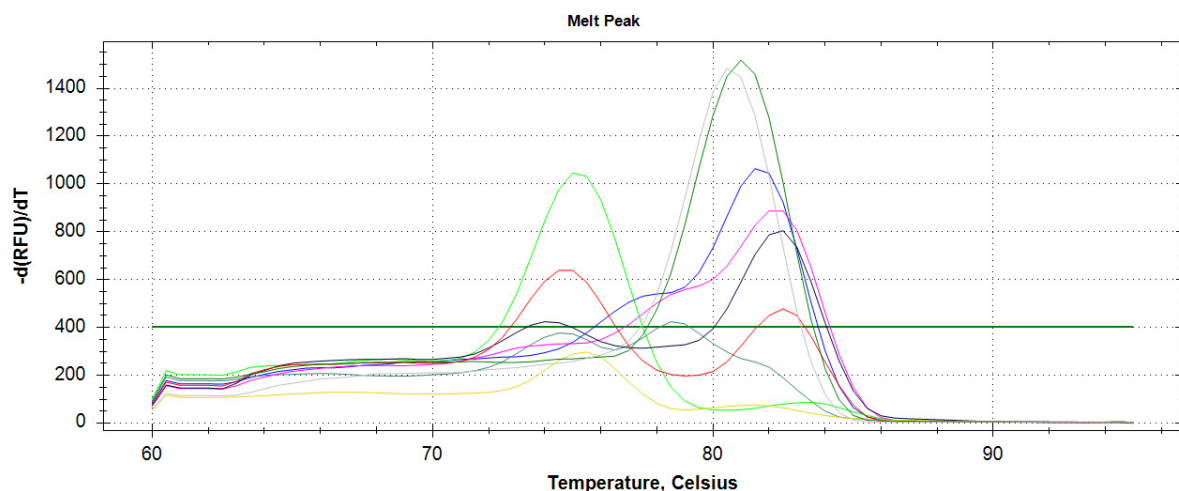


Abbildung 33: Ableitung der Schmelzkurven der PCR Produkte des Primerpaars PI-II der DNA-Proben: Kartoffel (dunkelgrün), Kartoffelpulver (grau) Tomate (rot), Paprika (hellgrün), Aubergine (blau), Physalis (gelb), Tamarillo (rosa), Tabak (türkis), Goji-Beere (schwarz).

Mit keinem der vier Primerpaare wurden für die Kartoffel-DNA Sekundärprodukte erhalten. Mit dem Primerpaar PP2A-I wurde ein Amplikon für die Tamarillo-DNA erhalten, welches die gleiche Schmelztemperatur aufwies wie das Amplikon, welches für die Kartoffel erhalten wurde. Das Primerpaar PP2A-II wurde ausgeschlossen, da sich hier ähnliche Schmelztemperaturen des Amplikons bei der Tomate und der Paprika ergaben. Aufgrund der gleichen Schmelztemperatur des Amplikons der Paprika und des Auberginen-Amplikons wurde Primerpaar PI-I ausgeschlossen. Es wurden die Primerpaare PP2A-I und PI-II weiterverwendet.

5.4.4 Kreuzreaktivität der ausgewählten Primerpaare mit Sonde (PP2A-P und PI-P)

Zunächst wurde das Primerpaar PP2A-I mit der Sonde PP2A-P kombiniert. Zum Testen auf Kreuzreaktivität wurden wieder die in Tabelle 17 angeführten Arten verwendet (Durchführung siehe Abschnitt 4.11.1.3). Hierbei wurden bei den Arten Paprika/Chili fünf Sorten (Sorten: Gleiche Art aber unterschiedliche Züchtungen) verwendet. Von den Arten Tomate, Aubergine, Physalis und Tabak wurden je zwei Sorten verwendet. Von den Arten Goji-Beere und Tamarillo wurde je eine Sorte analysiert. Folgende Primer- und Sonden-Konzentrationen wurden verwendet: for/rev PP2A-I: 0,4 μ M; for/rev PI-II: 0,1 μ M; Sonden: PP2A-P 0,2 μ M und PI-P: 0,05 μ M. Alle restlichen Volumina des Mastermix aus Tabelle 35 wurden entsprechend angepasst

Die Amplifikationskurven in Abbildung 34 zeigen, dass sowohl die Tamarillo-DNA als auch die DNA der beiden Auberginen-Sorten zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals führten. Für die Aubergine wurde ein Cq-Wert von $28,59 \pm 0,42$ und $28,28 \pm 0,01$ erhalten. Für die Tamarillo wurde ein Cq-Wert von $28,07 \pm 0,08$ erhalten und für die Kartoffel ein Cq-Wert von $24,15 \pm 0,07$. Der geringe Δ Cq Wert von +4 weist daraufhin, dass die Primer-Sonden-Kombination nicht spezifisch für Kartoffel ist, sondern eine Kreuzreaktivität für Tamarillo aufweist. Des Weiteren war die für die Aubergine erhaltene Kurve flacher und es war kein exponentieller Fluoreszenzanstieg sichtbar. Alle anderen DNA-Proben führten zu keinem Fluoreszenzanstieg. Ebenso war die NTC negativ. Diese Ergebnisse als auch die der Schmelzkurvenanalyse (Abschnitt 5.4.3) belegen, dass es sowohl im Bereich der Bindestellen für die Primer als auch der Sonde homologe Bereiche zwischen den Sequenzen von Kartoffel und Tamarillo gab.

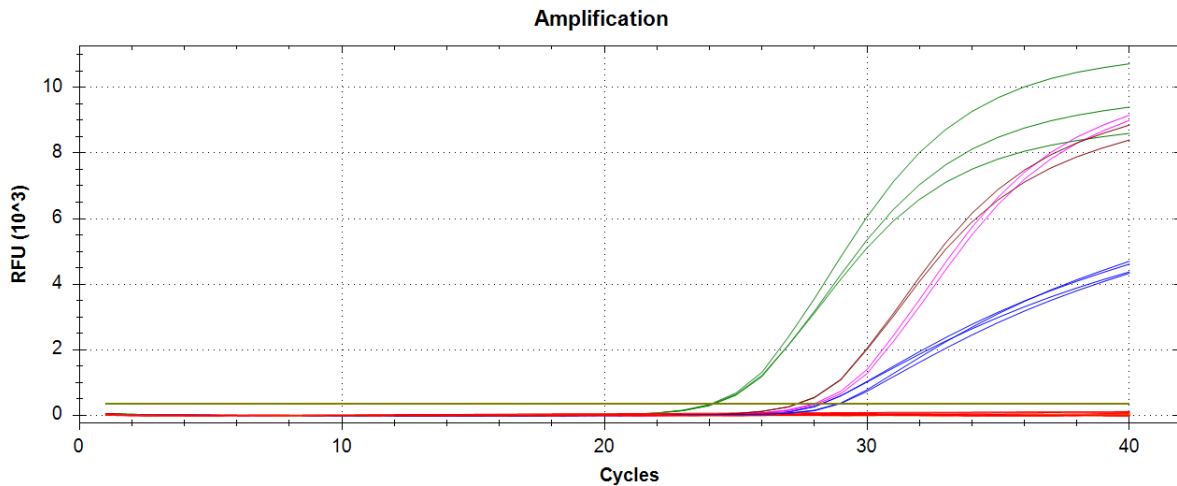


Abbildung 34: Amplifikationskurven der DNA aus Nachtschattengewächsen zur Überprüfung auf Kreuzreaktivität. Verwendung des Primerpaars PP2A-I mit der Sonde PP2A-P. Kartoffel-DNA (dunkelgrün), Proteinpulver (braun), Tamarillo (rosa), Aubergine (blau) (n = 2).

Die Amplifikationskurven für Nachtschattengewächse zur Überprüfung auf Kreuzreaktivität, unter Verwendung des Primerpaars PI-II mit der Sonde PI-P, sind in Abbildung 35 dargestellt. Mit Hilfe dieser Sonde wurde lediglich die DNA der Kartoffel und die DNA des Proteinpulvers nachgewiesen. Auffällig ist auch hier, dass ΔC_q zwischen der Kartoffel ($25,98 \pm 0,02$) und dem Proteinpulver ($32,06 \pm 0,04$) +6 betrug. Die Aubergine führte in einer der beiden Doppelbestimmungen zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals (Cq: 37,53). Dies wurde allerdings vernachlässigt, da der Cq-Wert über 37 lag. Alle anderen Pflanzen wurden mit Hilfe dieser Primer-Sonden-Kombination nicht nachgewiesen.

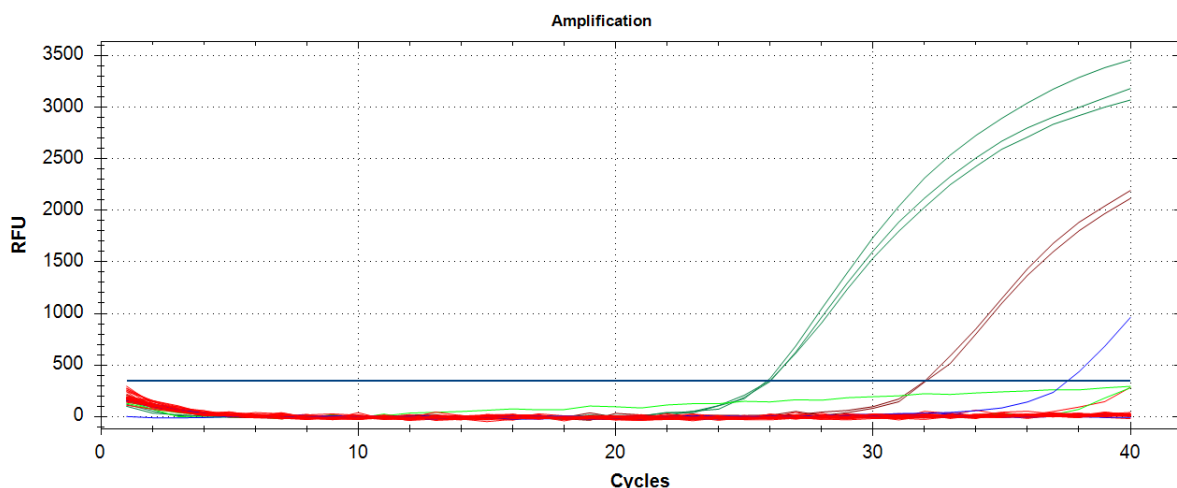


Abbildung 35: Amplifikationskurven der DNA aus Nachtschattengewächsen zur Überprüfung auf Kreuzreaktivität. Verwendung des Primerpaars PI-II mit der Sonde PI-P. Kartoffel-DNA (dunkelgrün), Proteinpulver (braun), Aubergine (blau) (n = 2).

5.4.5 Real-time PCR aller Kartoffelsorten (Primerpaar PI-II mit der Sonde PI-P)

Da keine Kreuzreaktivität mit den untersuchten verwandten Arten festgestellt wurde, konnte das Primerpaar PI-II mit Sonde PI-P an 28 verschiedenen Kartoffelsorten (Tabelle 16) getestet werden.

Abbildung 36 zeigt die für die 28 Kartoffelsorten erhaltenen Amplifikationskurven. Die C_q-Werte lagen im Bereich von 24,75 bis 26,92. Zwei Kartoffelsorten (Sorte 1 und 27) führten nicht zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Die NTC war ebenfalls negativ.

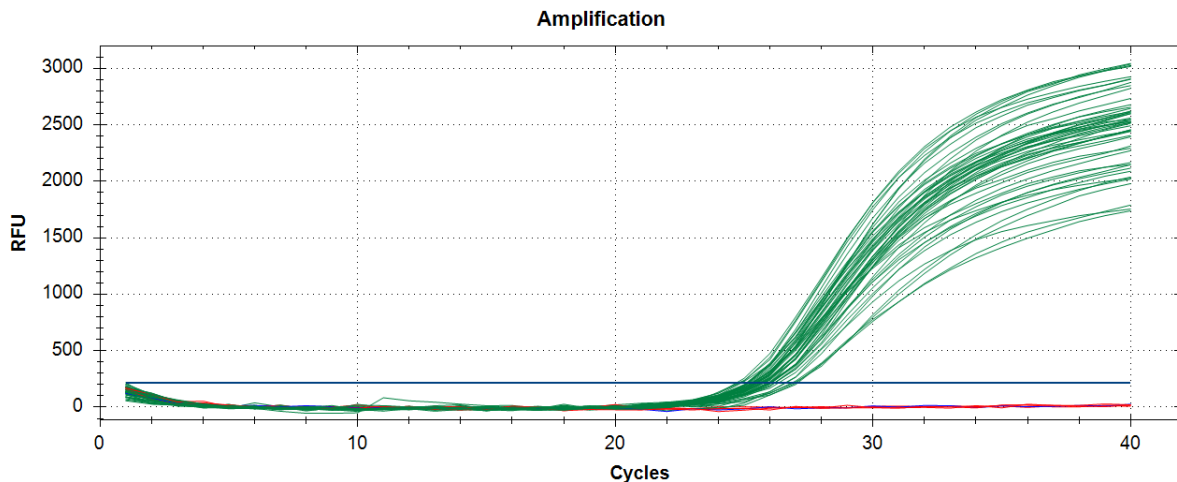


Abbildung 36: Amplifikationskurven der DNA von 28 Kartoffelsorten (dunkelgrün) mit dem Primerpaar PI-II und der Sonde PI-P. Zwei Sorten (1 & 27) wurden nicht amplifiziert (rot). Die NTC war negativ (n = 2).

Da zwei Sorten nicht detektiert wurden, wurden alle Kartoffel-DNA-Proben auf ihre Amplifizierbarkeit getestet. Dazu wurde die 18SRG-Pfl real-time PCR verwendet (siehe Abschnitt 4.10.2). Als Ergebnis kam heraus, dass alle DNA-Proben amplifizierbar waren. Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde eine zweite Extraktion der DNA aus den Kartoffel-Proben durchgeführt. Mit diesen DNA-Proben wurde die gleiche real-time PCR durchgeführt, was zu keinem anderen Ergebnis führte.

5.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund der vorhergegangenen Ergebnisse, beschrieben in Abschnitt 5.4.4 und 5.4.5, wurden jeweils die Amplikons einer Kartoffelsorte (1), einer Auberginen-, und einer Tamarillo-DNA-Probe, die mit dem Primerpaar PP2A I erhalten wurden, extern sequenziert. Des Weiteren wurden die Amplikons der Kartoffelsorte 1 und der Auberginen-DNA-Probe, die mit dem Primerpaar PI-II erhalten wurden, extern sequenziert.

Die Proben wurden zunächst mit einer konventionellen PCR amplifiziert (Durchführung siehe Abschnitt 4.7). Um ein besseres Sequenzierergebnis zu erhalten, wurden die in Tabelle 10 angegebenen M13 Primer verwendet. Anschließend wurde die amplifizierte DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Da bei den meisten Proben nach der Gelelektrophorese und der anschließenden Isolierung der Banden aus dem Gel die DNA-Konzentration zu gering war, wurde anschließend die gleiche PCR und Agarose-Gelelektrophorese noch einmal durchgeführt.

Laut Datenbank sollte das Amplikon, erhalten mit dem Primerpaar M13-PP2A-I, 109 bp lang sein. Das in der Abbildung 37 dargestellte Gel zeigt, dass für Kartoffel, Aubergine und Tamarillo jeweils ein Produkt mit einer Länge von ~ 109 bp erhalten wurde. Je eines der PCR Produkte bei ~ 109 bp wurde nach nochmaliger konventioneller PCR extern sequenziert.

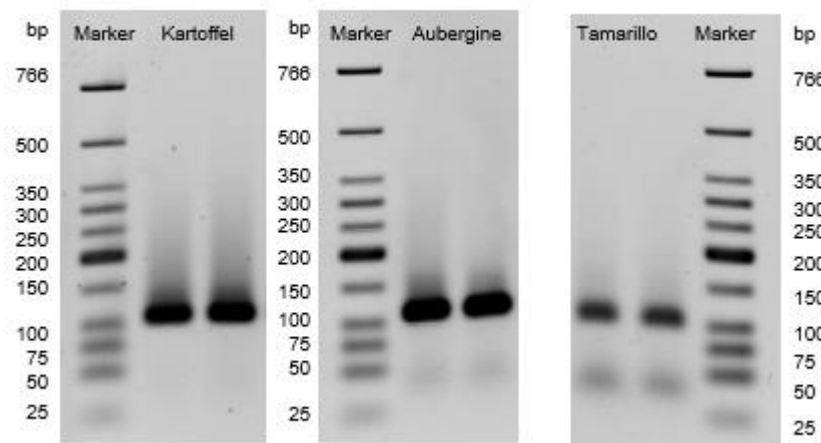


Abbildung 37: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese (2,5 % Gel) der mit den Primern M13-PP2A-I erhaltenen PCR Produkte. Die Zielsequenz war ca. 109 bp lang.

Abbildung 38 zeigt deutlich zwei breite Banden der PCR Produkte der Kartoffel-DNA zwischen 100 bp und 150 bp. Laut Datenbank sollte das Amplikon bei einer Länge von 137 bp liegen. Aufgrund der Überladung des Gels waren die Banden stark verbreitert und besaßen eine Schmier nach oben. Das PCR Produkt der Aubergine zeigte mehrere schwache Banden zwischen 100 und 350 bp. Nur ein Replikat (rot markiert) zeigte eine etwas deutlichere Bande knapp unter 150 bp. Dieses PCR Produkt und eines der Kartoffel wurden, nach nochmaliger konventioneller PCR, extern sequenziert.

5. Ergebnisse

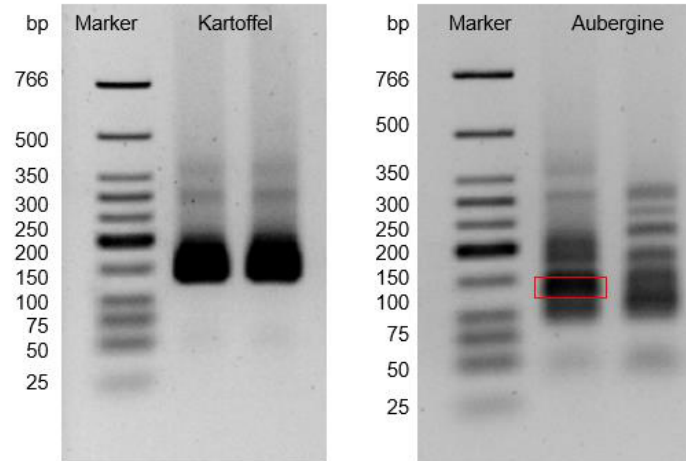


Abbildung 38: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese der mit den Primern M13-PI-II erhaltenen PCR Produkte. Die Zielsequenz war 137 bp lang. Ausgeschnittene Bande der Aubergine rot markiert.

5.4.7 Sequenzierungsergebnisse und Alignments

Die erhaltenen Sequenzen sind in Tabelle 49 zu finden.

Tabelle 49: Ergebnisse der Sequenzierung.

Primer-paar	Pflanze	Sequenz (5'-3')	Anzahl an Nukleotiden
PP2A-I	Kartoffel	TTGTGTGTAATATTTGCGTTTCATCAATTGATCGG	74
		CGTGGAATTTCGAGATCGGTGAGGAAATGCCGT	
		CGAACG	
	Aubergine	TTGTGTGTAATATTTGCGTTTCATCAATTGATGGG	74
		CTTGGAATTTCGAGATCGGTGAGGAAATGCCGTC	
		GAACG	
PI-II	Tamarillo	TTGTGTGTAATATTTGCGTTTCATCAATTGATCGG	74
		CGTGGAATTTCGAGAATCGGTGAGGAATGCCGT	
		CGAACG	
	Kartoffel	TTGGTTACAACCTATTGTATTGCCCTATTACTCGC	104
		CATTTTCTTTGTCCATTTTGTCTGTGATGATAACTTC	
		TGTGCAAAAAGTGGGTGTAGTTATTCAAATGGA	
	Aubergine	TTGGTTACAACCTATTGTCTTGCCCTATTACTCGC	104
		CATATTGTCCATTTTGTCTGTGATGATAACTTCTGT	
		GCAAAAAGTGGGTGTACTTATTCAAATGGA	

* Die Primerbindestellen wurden blau markiert.

5.4.7.1 Sequenzen PP2A-I

Zunächst wurden die erhaltenen Kartoffelsequenzen (PCR Produkt erhalten mit Primerpaar PP2A-I) mit der Software BLAST auf homologe Sequenzen geprüft. Dabei wurde bestätigt, dass es sich um das ursprünglich verwendete Gen *Solanum tuberosum serine/threonine-protein phosphatase PP2A-2 catalytic subunit-like (LOC102595411), transcript variant X1 (Sequence ID (NCBI): XM_006363482.2)* handelte. Anschließend wurde die Sequenz der Kartoffel mit der der Tamarillo und der der Aubergine abgeglichen (Abbildung 39 und 40). Die Bindestellen des Forward-Primers waren bei beiden Pflanzen identisch zu der der Kartoffel. Die Bindestellen des Reverse Primers waren ebenfalls bei der Kartoffel und der Aubergine gleich. Lediglich die Bindestellen des Reverse Primers der Tamarillo unterschieden sich in fünf Basen. Im Vergleich zur Kartoffel-Sequenz unterschieden sich die Bindestellen der Sonden jeweils nur in einer Base. Da die Sequenzunterschiede der Amplikons zwischen der Aubergine und der Kartoffel zu gering waren, wurde dieses Primerpaar nicht mehr weiterverwendet.

5.4.7.2 Sequenzen PI-II

Die DNA-Sequenz der Kartoffel, welche mit dem Primerpaar PI-II erhalten wurde, wurde ebenso mit der Software BLAST auf homologe Sequenzen geprüft (Tabelle 50). Die höchste Homologie von 100 % gab es zu einer Sequenz im Gen *Solanum tuberosum cultivar Intrinskii Kunitz-type proteinase inhibitor precursor (LOC102577468) (Sequence ID: NM_001288014.1)*. Mit dem ursprünglichen Zielgen *Solanum tuberosum cultivar Istrinskii Kunitz-type proteinase inhibitor group A1 (PKPI-A5)* gab es nur eine Übereinstimmung von 83 %. In Abbildung 42 wurden alle Gene aus Tabelle 50 abgeglichen. Des Weiteren wurde die DNA-Sequenz der Kartoffel, welche mit dem Primerpaar PI-II erhalten wurde, mit der DNA-Sequenz der Aubergine (Tabelle 49) abgeglichen und in Abbildung 41 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die Sequenzen sich im Bereich der Primer-Bindestelle nur um je eine Base unterschieden.

5. Ergebnisse

Tabelle 50: Homologe Sequenzen zur sequenzierten Zielsequenz.

Nr.	Name des Gens	NCBI BLAST Sequence ID	Homologe Bereiche [%]
1	Solanum tuberosum cultivar Intrinskii Kunitz-type proteinase inhibitor precursor (LOC102577911)	NM_001288536.1	97
2	Predicted_Solanum tuberosum aspartic proteinase inhibitor 3	XM_006362606.2	97
3	Solanum tuberosum cultivar Intrinskii Kunitz-type proteinase inhibitor precursor (LOC102577468)	NM_001288014.1	100
4	Solanum tuberosum cultivar Istrinskii Kunitz-type proteinase inhibitor group A1 (PKPI-A5) gene	JN983810.1	83
5	Solanum tuberosum aspartic proteinase inhibitor P2B4	AY083349.1	97
6	Solanum tuberosum cultivar Intrinskii Kunitz-type proteinase inhibitor group A1 (PKPI-A4)	JN983809.1	97
7	Solanum tuberosum cultivar Intrinski PKPI-A2 pseudogene	JN983812.1	99
8	Solanum tuberosum cultivar Intrinskii Kunitz-type proteinase inhibitor group A1 (PKPI-A1)	JN983808.1	99
9	Solanum tuberosum cultivar Intrinskii Kunitz-type proteinase inhibitor group A1 (PKPI-A6)	JN983811.1	87
10	Solanum tuberosum cultivar Intrinskii Kunitz-type proteinase inhibitor precursor (PKPI-B10)	AF536175.1	78

Aus den zuvor genannten Gründen wurden zwei neue Sonden designt. Diese sollten an die DNA aller Kartoffelsorten binden, aber nicht an die DNA anderer Nachtschattengewächse. Dabei wurde vor allem auf die Aubergine geachtet. Für eine erhöhte Spezifität wurde eine MGB-Sonde designt (PI-MGB-P). Ebenso wurde eine längere Hybridisierungssonde designt (Tabelle 13). Als Ziel-Kartoffel-Sequenz wurde die sequenzierte Sequenz, erhalten mit dem Primerpaar PI-II, aus Tabelle 49 verwendet. Die beiden Sonden wurden zunächst mit der Software Beacon Designer auf ihre theoretische Spezifität überprüft (Tabelle 51).

Tabelle 51: Theoretische Spezifität der neu designten Sonden PI-MGB-P und PI-Kunitz-P.

Sonde	Länge [bp]	Tm [°C]	GC [%]	GC Clamp	Self Dimer [ΔG]	Hairpin [ΔG]	Cross Dimer [ΔG]
PI-Kunitz-P	30	61	33	1	-0,5	-0,5	Mit PI-for: -2,1; mit PI-rev2: -1,3
PI-MGB-P	16	-	31	-	-	-	-

5. Ergebnisse

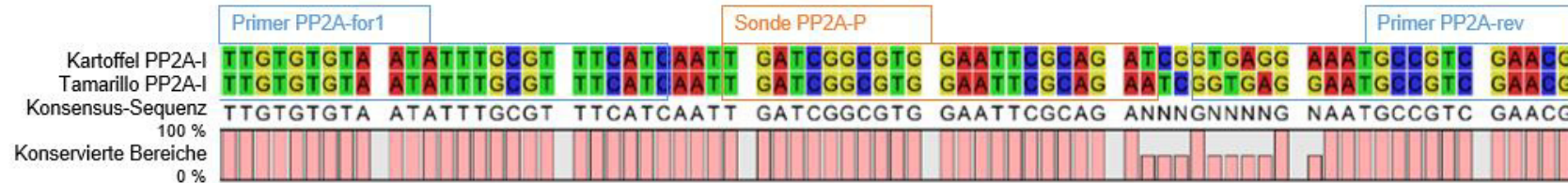


Abbildung 39: Alignment der Sequenz des Kartoffel-PCR-Produkts, erhalten mit dem Primerpaar PP2A-I, mit der Sequenz des Tamarillo-PCR Produktes erhalten mit dem Primerpaar PP2A-I, unter Angabe der Primer- und Sonden Bindestellen.

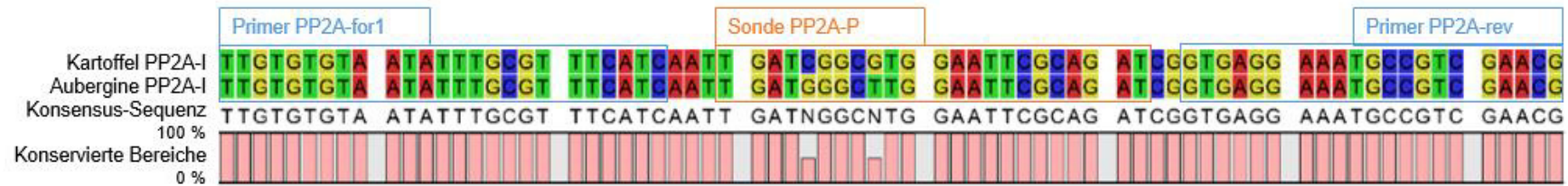


Abbildung 40: Alignment der Sequenz des Kartoffel-PCR-Produkts, erhalten mit dem Primerpaar PP2A-I, mit der Sequenz des Auberginen-PCR Produktes erhalten mit dem Primerpaar PP2A-I, unter Angabe der Primer- und Sonden Bindestellen.

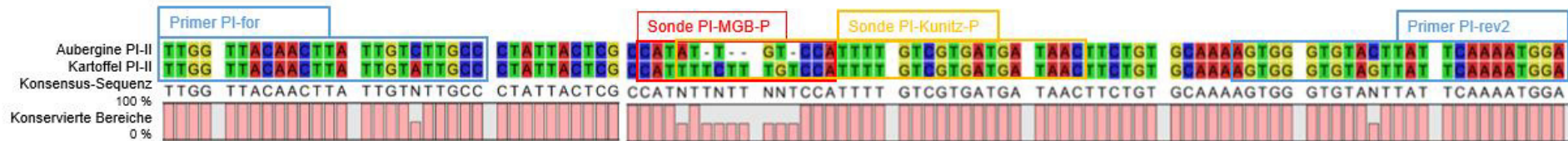


Abbildung 41: Alignment der Sequenz des Kartoffel-PCR-Produkts, erhalten mit dem Primerpaar PI-II, mit der Sequenz des Auberginen-PCR Produktes erhalten mit dem Primerpaar PI-II, unter Angabe der Primer- und Sonden Bindestellen.

5. Ergebnisse

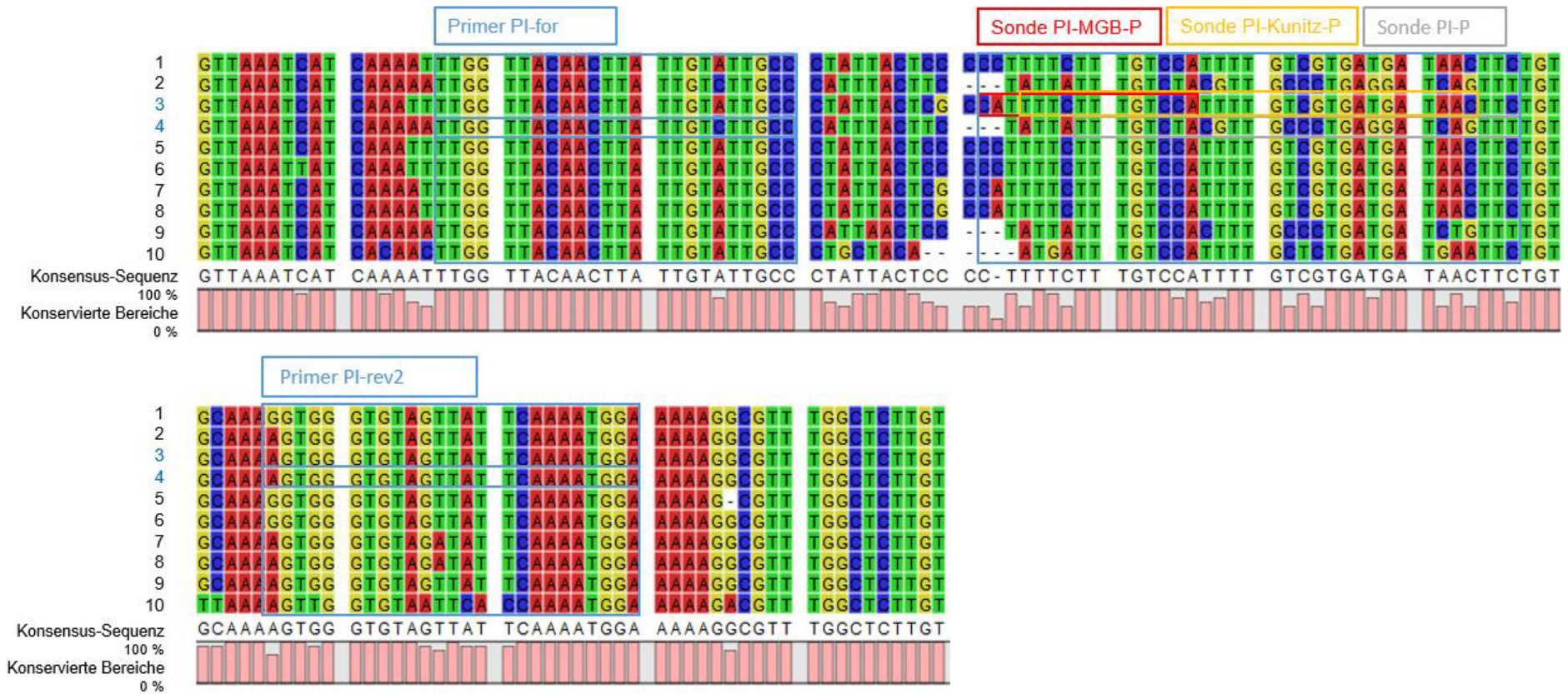


Abbildung 42: Mehrfach-Alignment homologer Kartoffel-Sequenzen (siehe Tabelle 50) unter Angabe der Primer- und Sonden Bindestellen. Beschriftung 1-10 siehe Tabelle 50. Extra blau umrandet (Nr. 4) ist die ursprüngliche Zielsequenz. Nr. 3 ist die neue Zielsequenz.

5.4.8 Real-time PCR aller Kartoffelsorten mit den Sonden PI-MGB-P und PI-Kunitz-P

Es wurden sowohl 28 Kartoffelsorten (Tabelle 16) als auch zwölf Auberginensorten (Tabelle 17) mit den Sonden PI-MGB-P und PI-Kunitz-P getestet.

Abbildung 43 zeigt die Amplifikationskurven erhalten mit dem Primerpaar PI-II und der Sonde PI-MGB-P. Deutlich zu erkennen ist, dass die für die Kartoffel erhaltenen Kurven je nach Sorte eine unterschiedliche Steigung aufwiesen. Des Weiteren verliefen die Kurven nicht exponentiell und die Cq-Werte waren in einem Bereich von 23,30 bis 29,29. Die drei Auberginensorten führten zu Cq Werten < 37 ($29,44 \pm 0,30$; $35,97 \pm 0,03$; $36,08 \pm 0,59$). Die anderen neun Sorten konnten nicht detektiert werden oder zeigten einen Cq-Wert > 37 .

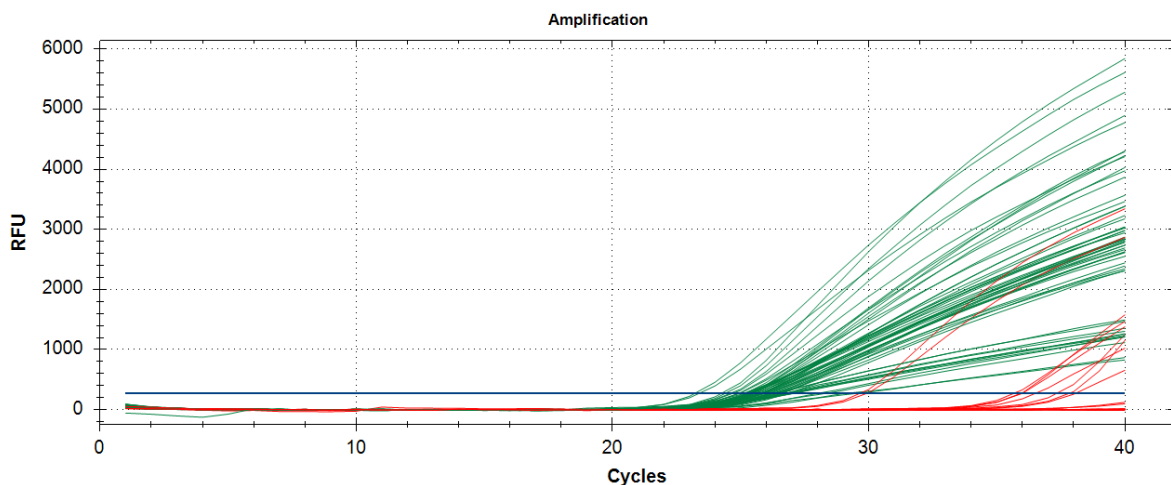


Abbildung 43: Amplifikationskurven der DNA von 28 Kartoffelsorten (dunkelgrün) und zwölf Auberginensorten (rot) erhalten mit dem Primerpaar PI-II und der Sonde PI-MGB-P ($n = 2$).

Die Amplifikationskurven der DNA aus Kartoffeln, erhalten mit der Sonde PI-Kunitz-P (Abbildung 44), zeigten im Vergleich einen exponentiellen Verlauf. Ebenso war die Differenz der Cq-Werte der einzelnen Kartoffelsorten geringer. Die Cq-Werte lagen zwischen 23,03 und 24,94. Für drei Auberginensorten wurde ein Cq-Wert < 37 ($29,65 \pm 0,01$; $35,40 \pm 0,33$; $35,23 \pm 0,29$) erhalten. Die gleichen drei Sorten führten auch mit der Sonde PI-MGB-P zu Cq-Werten < 37 . Alle anderen neun Sorten wurden nicht detektiert oder führten zu einem Cq-Wert > 37 .

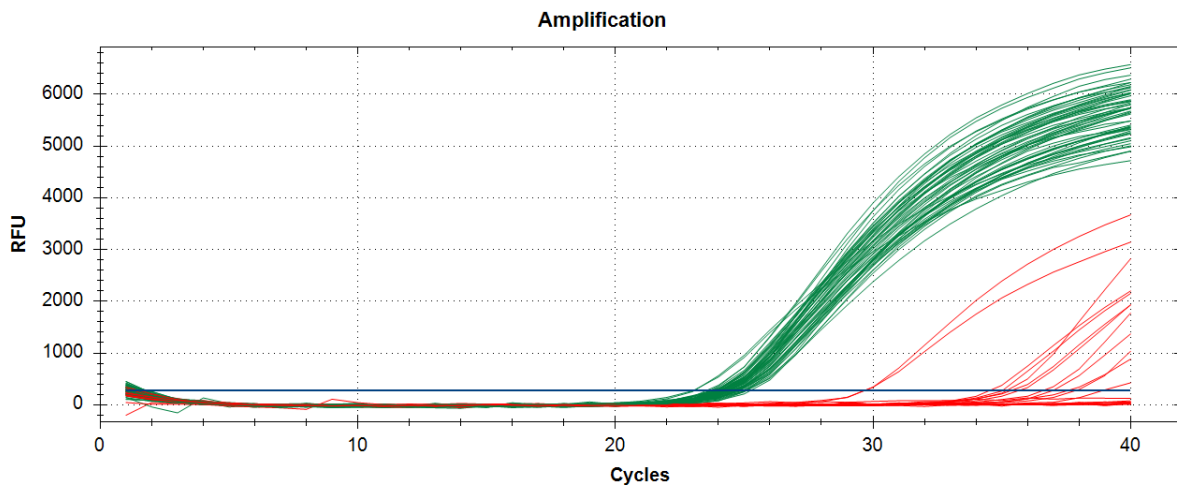


Abbildung 44: Amplifikationskurven der DNA von 28 Kartoffelsorten (dunkelgrün) und zwölf Auberginensorten (rot) erhalten mit dem Primerpaar PI-II und der Sonde PI-Kunitz-P (n = 2).

5.4.9 Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentration und Bestimmung der Effizienz

Durch die Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentration sollte eine optimale Effizienz und somit eine exponentielle Amplifizierung der Kartoffel-DNA gewährleistet werden. Verwendet wurden die Sonden PI-MGB-P und PI-Kunitz-P. Ausgewählt wurde die Primer- und Sonden-Kombination mit dem niedrigsten Cq-Wert bei 10 ng DNA/Ansatz, einer Effizienz zwischen 90 - 110 % und einem R² von mindestens 0,98 (siehe Abschnitt 4.11.4).

5.4.9.1 PI-MGB-P

Zur Analyse wurden jeweils die Kartoffelsorten, die zu den höchsten Cq-Werten (Sorte 1) bzw. niedrigsten (Sorte 28) Cq-Werten führten, dargestellt in Abbildung 29 und 30, verwendet. Die Kartoffel-DNA Konzentration betrug 10 ng DNA/Ansatz.

Die Optimierung des Primerpaars PI-II mit der Sonde PI-MGB-P führte bei keiner Konzentration zu einem exponentiellen Kurvenverlauf für beide Sorten. Es konnte lediglich ein exponentieller Fluoreszenzanstieg für die Sorte 1 erreicht werden, welche bereits in Abbildung 43 die höchste Fluoreszenzintensität hatte. Des Weiteren wurde wieder ein ΔCq -Wert von +5 erhalten, bei gleichen Messbedingungen wie zuvor (gezeigt in Abbildung 43). Daher wurden die Effizienz und R² nicht bestimmt. Diese Sonde wurde nicht weiterverwendet. Exemplarisch zeigt Abbildung 45 die beiden Amplifikationskurven bei einer Konzentration von for-Primer: 0,6 μM ; rev-Primer 0,4 μM ; Sonde: 0,4 μM . Alle anderen getesteten Kombinationen führten zu ähnlichen Ergebnissen.

5. Ergebnisse

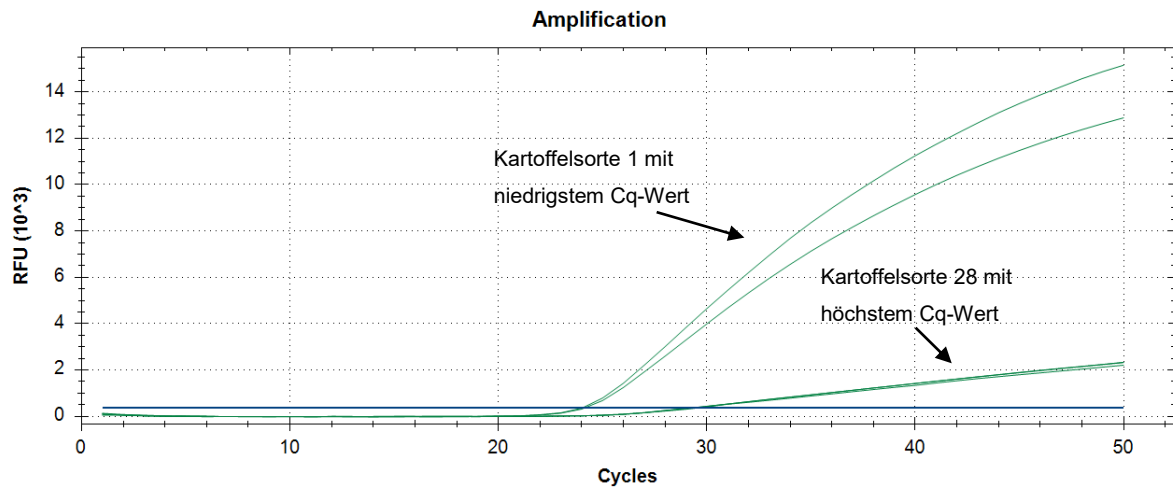


Abbildung 45: Amplifikationskurve der Kartoffel-DNA erhalten mit der optimierten Primer (PI-II)- und Sonden-Konzentrationen (Sonde PI-MGB-P) ($n = 2$).

5.4.9.2 PI-Kunitz-P

Zur Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentration wurden die Kombinationen aus Tabelle 38 verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 52 zu finden. Der niedrigste Cq-Wert wurde mit den Primer- und Sonden-Konzentrationen 0,4 μM ; 0,2 μM ; 0,3 μM erhalten (Cq-Wert: 23,42; Effizienz: 95,2 %; R^2 : 0,998). Diese Kombination wurde für alle weiteren Analysen verwendet.

Tabelle 52: Ergebnisse der getesteten Primer- und Sonden-Kombination unter Angabe der Effizienz, des R^2 und des Cq-Wertes bei 10 ng DNA/Ansatz ($n = 2$).

Konzentrationen: (for; rev; Sonde) [μM]	Effizienz [%]	R^2	Cq-Wert (10 ng DNA/Ansatz)
0,1; 0,2; 0,1	101,8	0,994	25,89 $\pm$ 0,27
0,2; 0,1; 0,1	94,7	0,998	25,82 $\pm$ 0,28
0,2; 0,2; 0,1	90,7	0,981	25,59 $\pm$ 0,18
0,2; 0,2; 0,2	97,8	0,998	24,35 $\pm$ 0,24
0,3; 0,3; 0,1	106	0,986	24,93 $\pm$ 0,28
0,2; 0,4; 0,2	93,9	0,994	24,41 $\pm$ 0,10
0,4; 0,2; 0,1	90,9	0,999	24,03 $\pm$ 0,06
0,4; 0,2; 0,2	91,1	0,998	23,51 $\pm$ 0,12
0,4; 0,2; 0,3	95,2	0,998	23,42 $\pm$ 0,06
0,4; 0,2; 0,4	94,3	0,994	23,71 $\pm$ 0,29
0,4; 0,4; 0,2	86,8	0,996	24,29 $\pm$ 0,06
0,4; 0,4; 0,4	98,3	0,999	25,07 $\pm$ 0,37
0,4; 0,6; 0,4	92,3	0,990	23,78 $\pm$ 0,08
0,6; 0,4; 0,4	101,5	0,989	23,78 $\pm$ 0,24
0,6; 0,6; 0,4	104,3	0,990	24,66 $\pm$ 0,41

5. Ergebnisse

Die mit der ausgewählten Kombination erhaltene Standardgerade ist in Abbildung 46 dargestellt. Es sind die jeweiligen C_q-Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten DNA-Mengen, zu Beginn der real-time PCR, aufgetragen. Die Amplifikationskurven sind in Abbildung 47 zu finden.

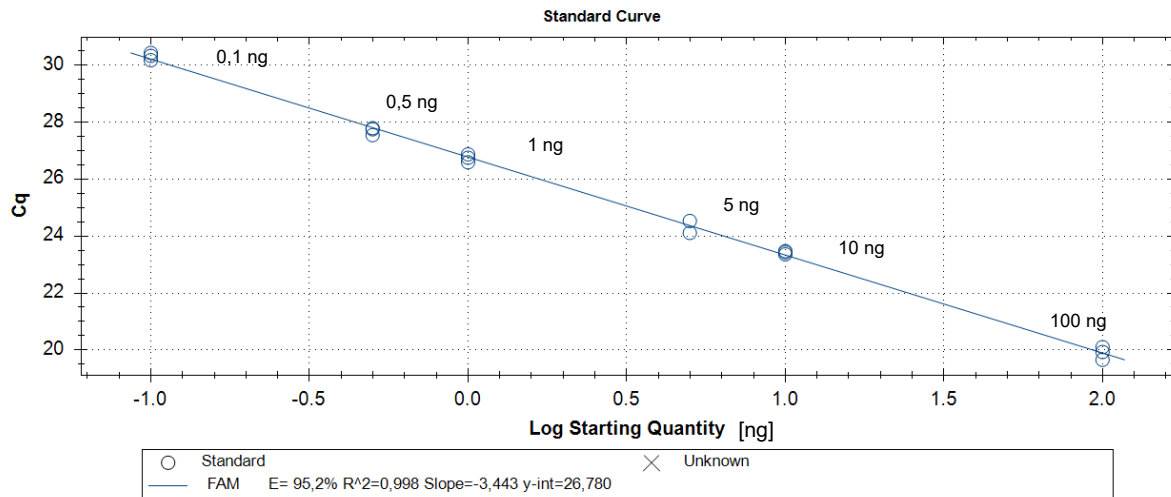


Abbildung 46: Standardgerade der Kartoffel-DNA erhalten mit der ausgewählten Primer- und Sonden-Kombination 0,4; 0,2; 0,3 μ M (Sonde PI-Kunitz-P).

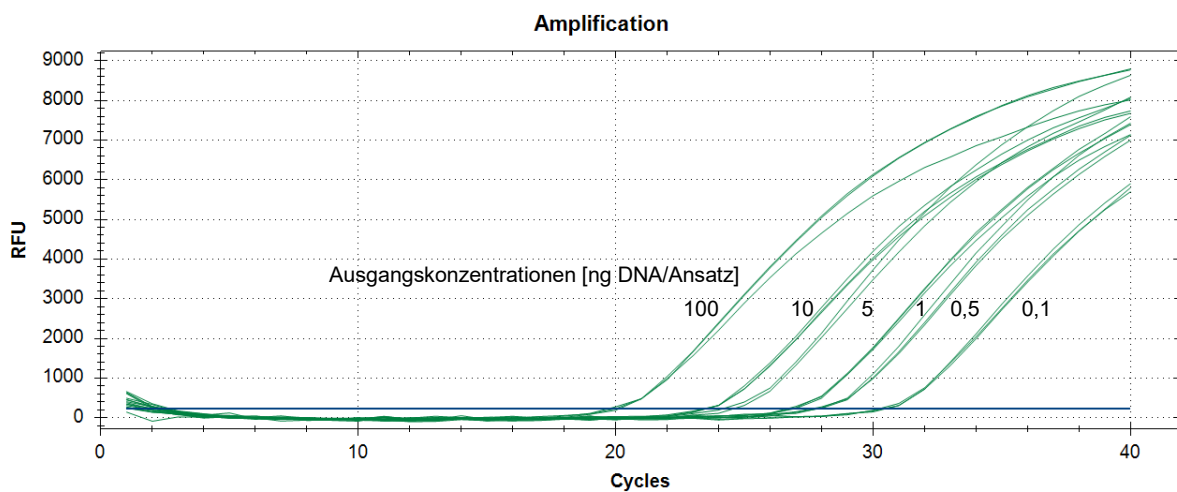


Abbildung 47: Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe der Kartoffel-DNA erhalten mit der ausgewählten Primer- und Sonden-Kombination Primerpaar PI-II und der Sonde PI-Kunitz-P (0,4; 0,2; 0,3 μ M) (n = 3).

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Primerpaares PI-II mit der Sonde PI-Kunitz P wurden vier weitere real-time PCR Läufe mit der gleichen Verdünnungsreihe durchgeführt. Verwendet wurden dazu wieder die Konzentrationen von 0,1 - 100 ng DNA/Ansatz. Mit dieser Primer-Sonden-Kombination wurden eine Effizienz von 91,9 - 95,9 %, ein R² von 0,998 - 0,999 und eine Steigung von -3,425 - -3,532 erreicht.

5.4.10 Anwendung der Sonde PI-Kunitz-P an 28 Kartoffelsorten und zwei Proteinpulvern

Die Amplifikationskurven aller 28 Kartoffelsorten sind in Abbildung 48 dargestellt. Mit Hilfe der Sonde PI-Kunitz-P konnte die DNA aller Kartoffelsorten detektiert werden. Die C_q-Werte reichten dabei je nach Sorte von 22,83 bis 24,73. Die real-time PCR Produkte aller Kartoffelsorten wurden anschließend auf ein 2,5 % Agarosegel aufgetragen. Bei allen Sorten war eine deutliche Bande bei ~ 100 bp zu sehen (Abbildung 49), was darauf schließen lässt, dass das richtige Produkt mit einer Länge von 104 bp gebildet wurde. Des Weiteren war bei allen Sorten eine leichte, unspezifische Bande bei 200 bp zu sehen.

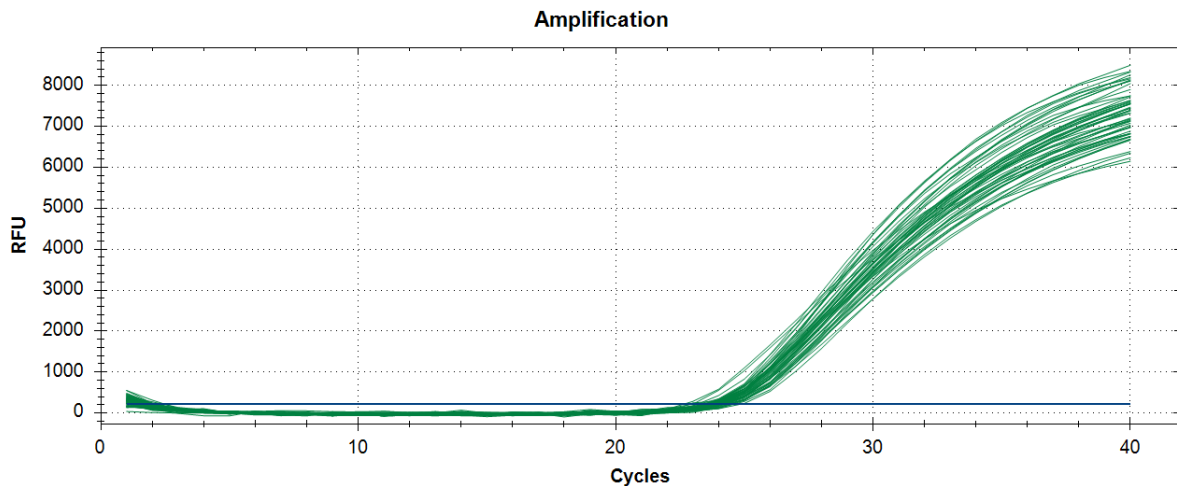


Abbildung 48: Amplifikationskurven aller 28 Kartoffelsorten erhalten mit dem Primerpaar PI-II und der Sonde PI-Kunitz-P (dunkelgrün) (n = 2).

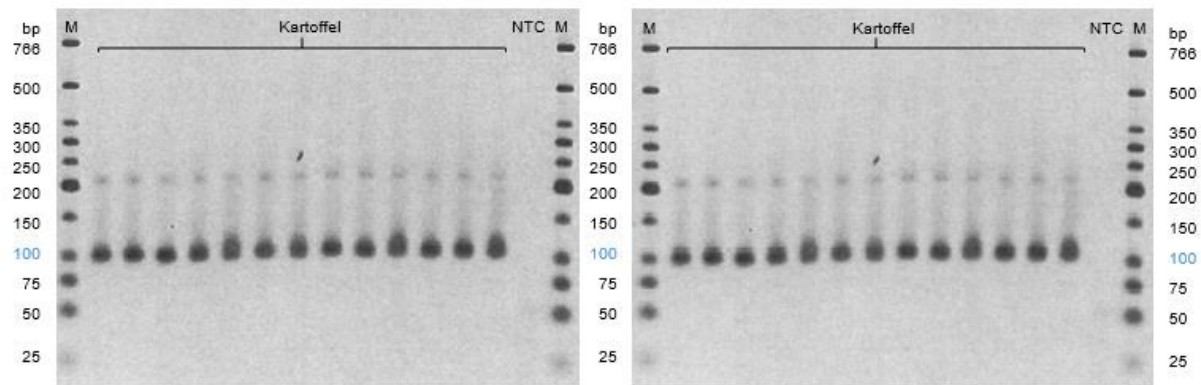


Abbildung 49: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese der real-time PCR Produkte von 28 Kartoffelsorten erhalten mit dem Primerpaar PI-II und der Sonde PI-Kunitz-P. Zielsequenz: 104 bp.

Des Weiteren wurden zwei Kartoffelproteinpulver analysiert (Abbildung 50). Wie in vorherigen Analysen bereits deutlich wurde, bestand ein ΔC_q von +6 zwischen der frischen Kartoffel-DNA und der Proteinpulver-DNA (Pulver in Lebensmittelqualität; PP1) und ein ΔC_q von +12 zur Proteinpulver-DNA in Futtermittelqualität (PP2).

5. Ergebnisse

Die Banden des PCR Produktes der beiden Proteinpulver sind in den Gelbildern in Abbildung 51 dargestellt. Dabei führte das PCR Produkt des Pulvers in Lebensmittelqualität zu einer etwas stärkeren Bandes als die des Pulvers in Futtermittelqualität.

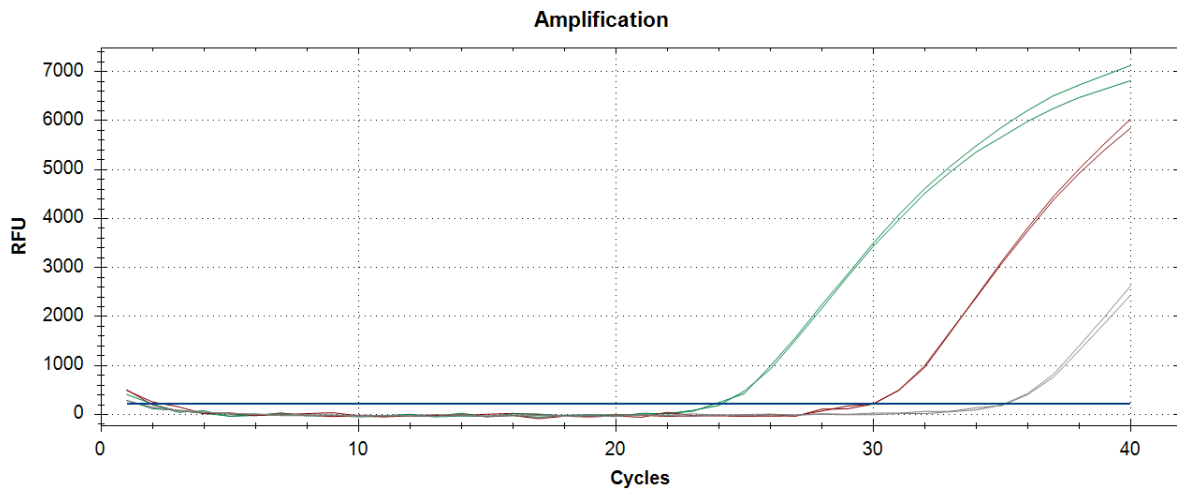


Abbildung 50: Amplifikationskurven der DNA aus Kartoffeln (dunkelgrün), aus einem Proteinpulver in Lebensmittelqualität (braun) und aus einem in Futtermittelqualität (grau) erhalten mit dem Primerpaar PI-II und der Sonde PI-Kunitz-P (n = 2).

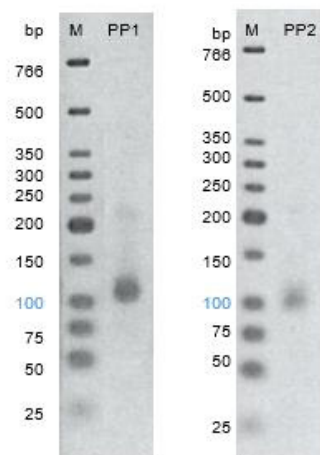


Abbildung 51: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese der real-time PCR Produkte von zwei Kartoffelproteinpulvern (Lebensmittelqualität: PP1, Futtermittelqualität PP2) erhalten mit dem Primerpaar PI-II und der Sonde PI-Kunitz-P. Zielsequenz: 104 bp.

5.4.11 Überprüfung des Proteinpulvers

5.4.11.1 Überprüfung auf Amplifizierbarkeit

Die DNA des Proteinpulvers wurden zunächst auf ihre Amplifizierbarkeit hin überprüft. Dazu wurde die Eukarya real-time PCR 18SRG-Pfl aus Abschnitt 4.10.2.1 verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 dargestellt. Diese zeigen deutlich, dass zwar alle drei DNA-Extrakte amplifizierbar waren, aber die Cq-Werte der frischen Kartoffel-DNA im Vergleich zu den der Proteinpulver ein ΔCq von +5 bzw. +10 hatten.

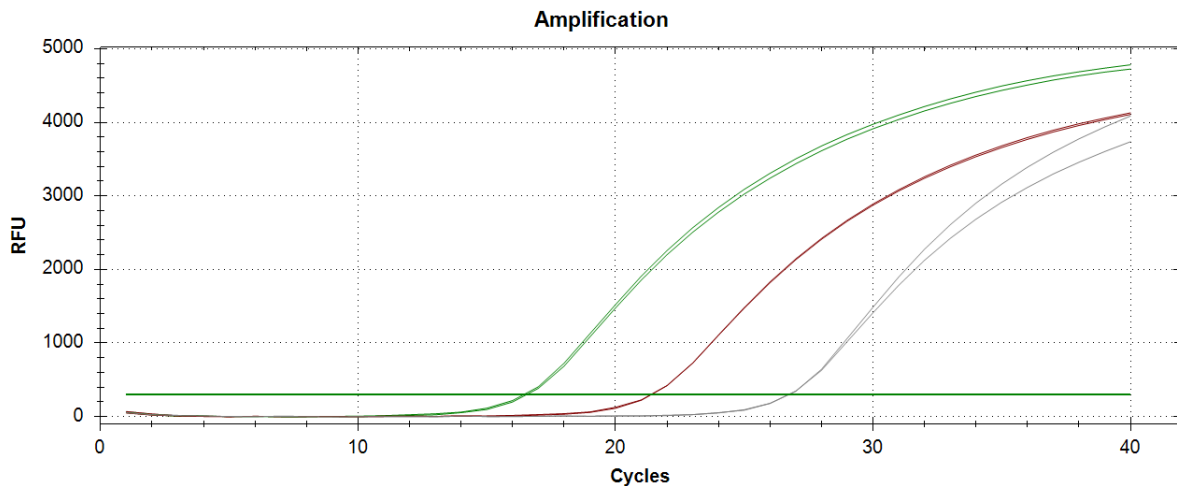


Abbildung 52: Amplifikationskurven der DNA aus Proteinpulver erhalten mit den 18SRG-Primern. Die dunkelgrüne Kurve zeigt die Kartoffel-DNA, die braune das Proteinpulver in Lebensmittelqualität und die graue das Kartoffelproteinpulver in Futtermittelqualität (n = 2).

5.4.11.2 Inhibitoren

Die DNA-Extrakte beider Proteinpulver wurden auf Inhibitoren getestet (Durchführung siehe Abschnitt 4.10.2.2). Die jeweiligen Cq-Werte der einzelnen Verdünnungen sind in Tabelle 48 zu finden. Die Effizienz der real-time PCR Methode für das Pulver PP1 betrug 97,7 %, R^2 : 0,993 und die Steigung der Standardgerade betrug -3,377. Die Effizienz der real-time PCR Methode für das Pulver PP2 betrug 99,5 %, R^2 : 0,986 und die Steigung -3,334. Die Differenz ΔCq zwischen den jeweiligen 10er Verdünnungen veränderte sich nicht merklich. Dies spricht dafür, dass keine Inhibitoren in den DNA-Extrakten vorlagen.

Tabelle 53: Ergebnisse der Verdünnungsreihe zur Überprüfung auf Inhibitoren (n = 3).

Ausgangskonzentration DNA [ng DNA/Ansatz]	PP1 Cq-Werte	PP1 ΔCq	PP2 Cq-Werte	PP2 ΔCq
100	26,57 $\pm$ 0,26	+3,07	31,92 $\pm$ 0,10	+3,33
10	29,64 $\pm$ 0,17	+3,63	35,25 $\pm$ 0,18	+3,46
5	30,95 $\pm$ 0,13	+3,35	36,49 $\pm$ 0,08	+3,66
1	33,06 $\pm$ 0,19	+3,11	38,71 $\pm$ 0,44	-
0,5	34,01 $\pm$ 0,34	+3,52	40,15 $\pm$ 0,21	-
0,1	36,38 $\pm$ 0,61	-	-	-
0,05	37,82 $\pm$ 0,39	-	-	-

5.4.11.3 Überprüfung des Proteinpulvers auf DNA-Fragmentierung

Des Weiteren wurden die DNA-Extrakte der beiden Proteinpulver auf Fragmentierung der DNA überprüft. Verwendet wurde dazu die Agarose-Gelelektrophorese. Aufgegeben wurde die isolierte und aufgereinigte DNA nach der Konzentration- und Reinheitsbestimmung mit einem 1 % Gel und einem 2 % Gel. Zum Vergleich wurde auch die DNA einer frischen Kartoffel aufgegeben. Die jeweiligen Konzentrationen der aufgetragenen DNA-Lösungen sind in Tabelle 54 zu finden. Die Gelbilder sind in Abbildung 53 dargestellt.

Tabelle 54: Konzentration- und Reinheitsbestimmung einer Kartoffel und zweier Kartoffelproteinpulver (n = 2).

Probe	Konzentration [ng/μL]	A260/280	A260/230
Kartoffel, frisch	170,1 ± 1,3	1,8	2,0
PP1	641,0 ± 2,4	1,9	2,1
PP2	73,6 ± 1,6	1,9	2,1

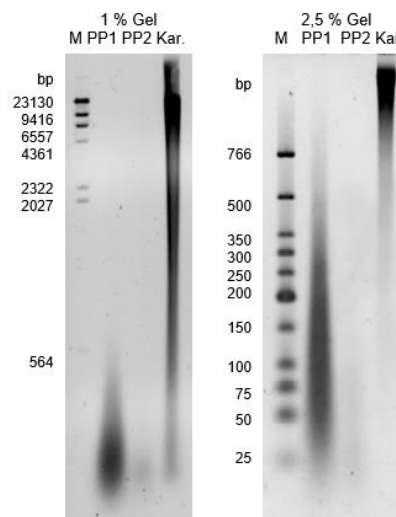


Abbildung 53: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese der isolierten und gereinigten DNA der Proteinpulver PP1 und PP2 sowie einer frischen Kartoffel (Kar.).

Die DNA des für Lebensmittel geeigneten Proteinpulvers (PP1) zeigte eine deutliche Schmier unterhalb von 564 bp. Die DNA des Proteinpulvers in Futtermittelqualität (PP2) zeigte nur eine sehr schwache Schmier. Hingegen zeigte sich bei der isolierten DNA aus einer frischen Kartoffel eine deutlichere Schmier von 23130 bp bis 564 bp und darüber hinaus. Das 2,5 % Gel verdeutlicht dies noch einmal. Hierbei war beim Pulver PP1 eine leichte Schmier ab 766 bp zu erkennen, welche sich ab 350 bp verdichtet. Bei dem Proteinpulver PP2 war eine nur sehr leichte Schmier zwischen 25 und 250 bp zu erkennen.

Die DNA der frischen Kartoffel zeigte eine deutliche Schmier bei über 766 bp. Dies bedeutet, dass bei beiden Proteinpulvern deutlich mehr fragmentierte DNA vorhanden war als bei der frischen Kartoffel. Besonders das Proteinpulver in Futtermittelqualität, wies ausschließlich sehr kleine Fragmente auf, welche kleiner als die Zielsequenz von 104 bp waren.

5.4.12 Kreuzreaktivität der Sonde PI-Kunitz-P

Auf Kreuzreaktivität wurden abschließend alle Arten aus Tabelle 17 getestet. Ebenso wurden die lebensmittelrelevanten Pflanzen und Gewürze aus Tabelle 18 getestet. Verwendet wurde dazu das Pipettierschema aus Tabelle 34 und das Temperaturprogramm aus Tabelle 36. Alle DNA-Proben, welche einen Cq-Wert über 37 hatten, wurden als nicht kreuzreaktiv gewertet.

Keine der getesteten verwandten Arten und der entsprechenden Sorten wurden als kreuzreaktiv analysiert. Dabei wurde die DNA einiger Sorten überhaupt nicht amplifiziert, die anderer lediglich mit einem Cq-Wert von über 37. Ebenso wiesen die getesteten Gewürze und lebensmittelrelevanten Pflanzen-Proben keine Kreuzreaktivität auf. Die Gelbilder in Abbildung 54 veranschaulichen dies. Das PCR Produkt jeder Sorte wurde einmal aufgetragen. Die jeweiligen Banden bei 100 bp kamen dadurch zustande, weil mögliche Basenunterschiede in der Sequenz vorlagen. Diese Unterschiede führen dazu, dass mit der gewählten Primer-Sonden-Kombination die DNA dieser Proben nicht optimal amplifiziert werden kann. Diese ergaben in der real-time PCR Cq-Werte im Bereich > 37.

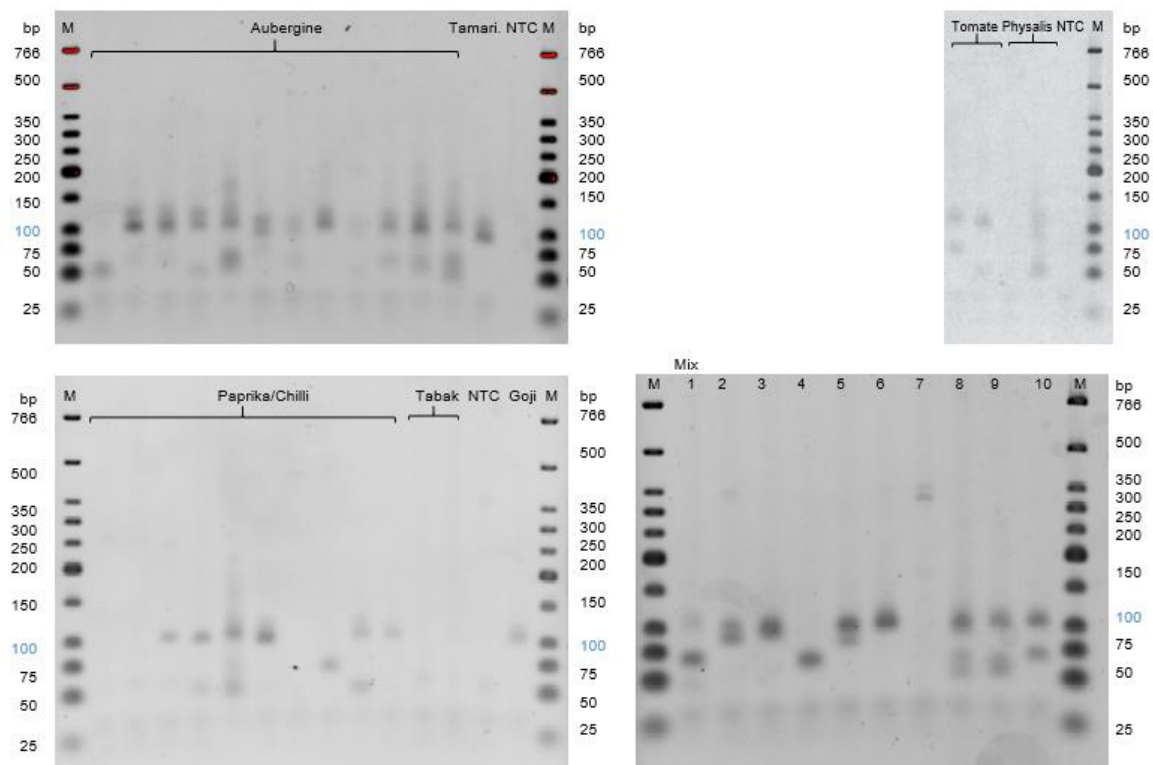


Abbildung 54: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese der real-time PCR Produkte erhalten mit dem Primerpaar PI-II und der Sonde PI-Kunitz-P. Ziel-Produkt Kartoffel: 101 bp. Marker (M), Negativkontrolle (NTC).

5.4.13 Nachweisgrenze ($LOD^{95\%}$)

Die Bestimmung der Nachweisgrenze wurde wie in Abschnitt 4.11.5 beschrieben durchgeführt. Zur Auswertung wurden die Kopien/Ansatz der PCR, die Anzahl der Replikate als auch die Zahl der positiven Ergebnisse verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 55 zu finden. Als „positiv“ wurden alle Amplifikationen mit einem Cq-Wert unter 37 gewertet.

Tabelle 55: Ergebnisse der $LOD^{95\%}$ Bestimmung ($n = 12$).

Nominale Kopien/Ansatz	Anzahl der positiven Tests/Gesamtzahl der Tests
20	12/12
10	12/12
5	12/12
2	10/12
1	5/12
0,1	0/12

Der $LOD^{95\%}$ betrug 4,037 Nominale Kopien mit einem 95 % - Konfidenzintervall von 2,609 - 6,361. Das heißt, es wurden vier Kopien der Ziel-DNA benötigt, um mit einer 95 %igen Wahrscheinlichkeit ein positives Signal zu bekommen. Abbildung 55 fasst die Ergebnisse zusammen. Die blauen Rauten kennzeichnen die laborspezifischen RODs. Die blaue Kurve bezeichnet die mittlere POD-Kurve zusammen mit dem entsprechenden 95% - Konfidenzbereich, der als graues Band hervorgehoben ist. Die POD-Kurve unter idealen Bedingungen wird als schwarz gestrichelte Kurve dargestellt.

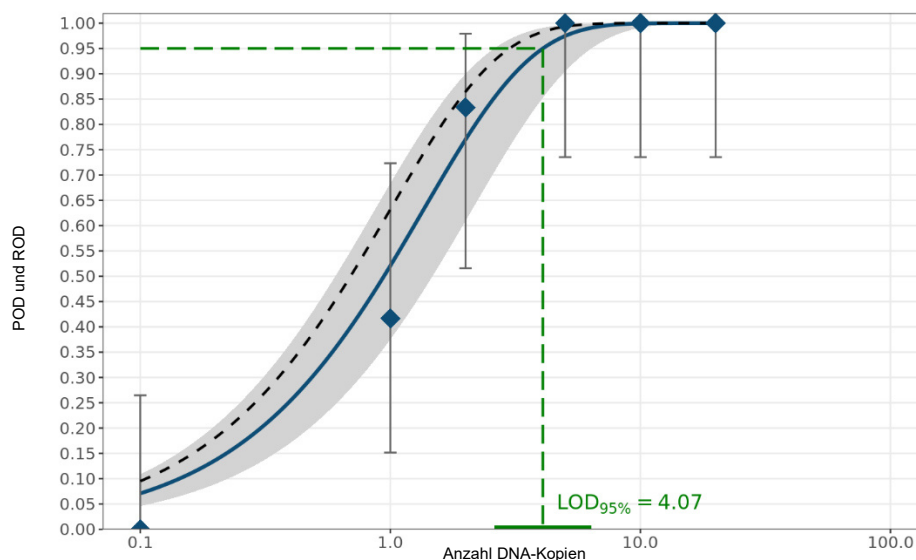


Abbildung 55: Statistische Auswertung des $LOD^{95\%}$. Die blauen Rauten kennzeichnen die laborspezifischen RODs. Die blaue Kurve kennzeichnet die mittlere POD-Kurve zusammen mit dem entsprechenden 95%-Konfidenzbereich, der als graues Band hinterlegt ist. Als schwarz gestrichelte Line ist die POD-Kurve unter idealen Bedingungen gekennzeichnet.

5.4.14 Robustheit

Die Robustheit der real-time PCR Methode wurde getestet, um festzustellen, ob die Ergebnisse der Methode durch leicht unterschiedliche Versuchsbedingungen beeinflussbar sind. Die Durchführung ist in Abschnitt 4.11.6 beschrieben.

Die Ergebnisse des Robustheitstests sind in Tabelle 56 aufgelistet. Die Ziel-DNA wurde in einer Konzentration von 20 Kopien/Ansatz eingesetzt. Als Kombination 0 wird die Standard-Kombination aus Tabelle 34 und Tabelle 36 bezeichnet, welche als Ausgangsbedingungen verwendet wurde. Der Cq-Wert der Kombination 0 wurde zum Vergleich herangezogen. Alle Replikate waren positiv.

Tabelle 56: Ergebnisse des Robustheitstests (n = 6). Kombinationsschlüssel siehe Tabelle 40.

	Kombination								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Cq-Wert	32,27 ± 0,06	32,08 ± 0,09	31,77 ± 0,37	33,03 ± 0,30	31,85 ± 0,22	31,17 ± 0,12	32,14 ± 0,16	33,34 ± 0,16	31,42 ± 0,14
ΔCq	0,19	0,50	0,76	0,41	1,10	0,12	0,85	0,19	1,07

Die Cq-Werte der einzelnen Kombinationen reichen von 31,77 bis 33,34. Der ΔCq-Wert war im Vergleich zu den Standardbedingungen zwischen +0,12 und +1,10.

5.5 Anwendung der real-time PCR Methode

Abschließend wurde die entwickelte real-time PCR Methode an den Fleischerzeugnissen aus Tabelle 15 getestet. Zuvor konnte mit dem Wizard® Kit DNA im Konzentrationsbereich von 158,6 - 243,6 ng/μL (A260/280: 1,8 - 2,4 und A260/230: 1,8 - 1,9) aus den Brät- und Wurstproben isoliert werden. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden zwei unabhängige real-time PCRs durchgeführt, mit jeweils DNA-Extrakten isoliert an unterschiedlichen Tagen.

Für die real-time PCRs wurden das Primerpaar PI-II und die Sonde PI-Kunitz-P verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 57 und Tabelle 58 zu finden. Pro Lauf wurde eine Positivkontrolle von 10 ng Kartoffel DNA/Ansatz mitgeführt. Der Cq-Wert der ersten Bestimmung betrug $24,96 \pm 0,02$, der der zweiten Bestimmung $24,19 \pm 0,01$. Die Differenz der beiden Bestimmungen lag bei ΔCq +0,77.

5. Ergebnisse

Tabelle 57: Ergebnisse der real-time PCR Analyse der Brät- und Wurstproben aus dem Vorversuch (n = 2).

Erste Bestimmung										
	VA0	VB0	VA1	VB1	VA2	VB2	VA3	VB3	VA4	VB4
Cq-	39,14	38,50	32,29	31,50	29,13	29,01	27,08	26,58	25,10	26,92
Werte	± 0,16	± 0,10	± 0,03	± 0,26	± 0,06	± 0,35	± 0,01	± 0,01	± 0,02	± 0,31
Zweite Bestimmung										
	VA0	VB0	VA1	VB1	VA2	VB2	VA3	VB3	VA4	VB4
Cq-	39,24	- *	33,27	31,83	30,31	29,22	26,14	27,01	27,36	26,69
Werte	± 0,87		± 0,30	± 0,01	± 0,22	± 0,20	± 0,08	± 0,20	± 0,91	± 0,57

*keine Amplifikation

Tabelle 58: Ergebnisse der real-time PCR Analyse der Brät- und Wurstproben aus dem Hauptversuch (n = 2).

Erste Bestimmung								
	HA0	HB0	HA1	HB1	HA2	HB2	HA3	HB3
Cq-	39,08	38,92	29,56	30,00	29,69	28,71	26,61	27,36
Werte	± 0,59	± 0,48	± 0,40	± 0,83	± 0,91	± 0,13	± 0,18	± 0,12
Zweite Bestimmung								
	HA0	HB0	HA1	HB1	HA2	HB2	HA3	HB3
Cq-	38,44	- *	29,80	29,75	30,68	29,40	28,34	27,38
Werte	± 0,11		± 0,35	± 0,80	± 0,31	± 0,25	± 0,17	± 0,11

* keine Amplifikation

Die Kontroll-Proben (ohne Kartoffelprotein) von Brät und Wurst wiesen sowohl im Vorversuch als auch im Hauptversuch einen Cq-Wert größer 37 auf oder es wurde keine DNA amplifiziert.

In den Fleischerzeugnissen, welchen Kartoffelproteinpulver zugesetzt wurde konnte mit dieser real-time PCR Methode Kartoffel-DNA qualitativ nachgewiesen werden. Bei den Proben des Vorversuches wurden die Cq-Werte mit steigendem Kartoffelprotein-Prozentsatz kleiner. Im Hauptversuch konnte keine eindeutige Tendenz festgestellt werden. Auch die Differenz zwischen der Brätprobe und der Wurstprobe mit dem gleichen Prozentsatz an Protein betrug ΔCq +0,12 bis +0,91 im Vorversuch und ΔCq +0,06 bis +2,28 im Hauptversuch. Die Differenz zwischen der Doppelbestimmung der Vorversuchsproben betrug ΔCq +0,21 bis +2,00, die der Hauptversuchsproben ΔCq +0,03 bis +1,73.

5. Ergebnisse

Abbildung 56 zeigt die Ergebnisse der mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten real-time PCR Produkte aller Fleischerzeugnisse. Die DNA-Proben des Bräts ohne Kartoffelproteinpulver (alle Proben mit der Kennzeichnung 0) zeigten keine oder eine schwache Bande. Die DNA-Proben der Würste zeigten eine Bande ~ 100 bp und in der real-time PCR einen Cq-Wert von über 37, weshalb sie trotzdem als negativ gewertet wurden. Zusätzlich war bei allen Proben eine Schmier zusehen. Des Weiteren war eine schwache, unspezifische Bande bei ~ 200 bp zu sehen (wie bei den DNA-Proben der Kartoffeln). Insgesamt spiegelten die Ergebnisse der real-time PCR die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese wider.

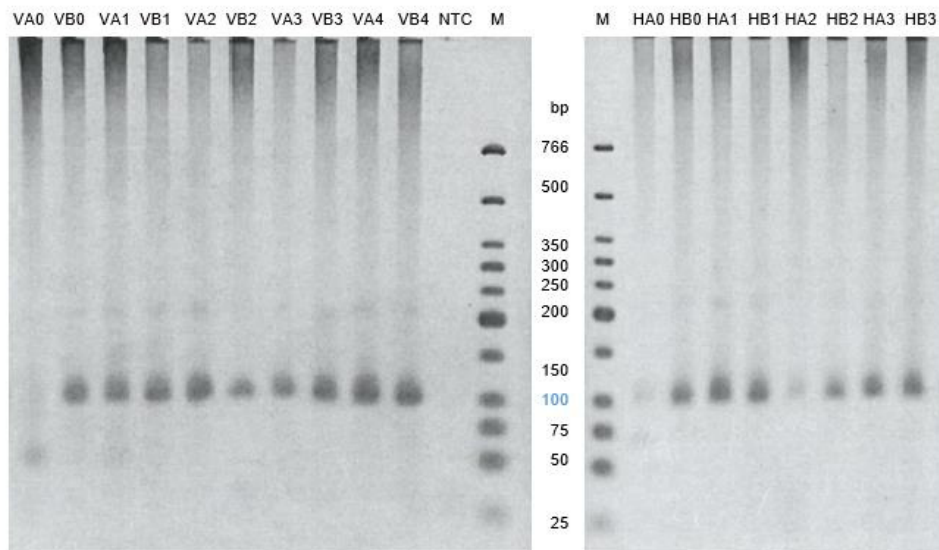


Abbildung 56: Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese der real-time PCR Produkte der untersuchten Fleischerzeugnisse auf Kartoffelprotein. Abbildung links zeigt die Ergebnisse des Vorversuches. Abbildung rechts die des Hauptversuches. Zielsequenz der Kartoffel: 104 bp. Marker (M), Negativkontrolle (NTC).

6. Diskussion

6.1 Herstellung einer Brühwurst mit Kartoffelprotein

Ausschlaggebend dafür, welche Konzentrationen an Kartoffelprotein für den Hauptversuch verwendet werden sollten, waren die Ergebnisse der Analysen des Vorversuches. Da in allen Analysen die Würste mit 1 % Kartoffelprotein kein bzw. ein gering signifikant unterschiedliches Ergebnis zu den Würsten ohne Kartoffelprotein ergaben, wurde im Hauptversuch analysiert, wie hoch der Prozentsatz an Kartoffelprotein sein kann, um ein akzeptables Ergebnis zu erhalten und gleichzeitig so viel pflanzliches Protein zu verwenden wie möglich. Zusätzlich wurde beachtet, dass der Prozentsatz unter 5 % lag, da ab diesem Anteil bei keiner Analyse akzeptable Ergebnisse festzustellen waren. Aufgrund dessen wurden die Prozentsätze 1 %, 2 % und 3 % verwendet.

6.1.1 pH-Wert

Der pH-Wert der im Rahmen des Vorversuches entwickelten Würste sank signifikant, ab einer Zugabe von 1 - 10 % Kartoffelprotein. Die Ursache dafür lag vermutlich in der Zusammensetzung der Proteine (Laut Hersteller Kartoffelproteinpulver in Lösung: pH-Wert in 10 % Lösung 4 - 5). Durch die Zugabe des pflanzlichen Kartoffelproteins wurde der pH-Wert gesenkt, was für die Haltbarkeit von Vorteil ist (Hofmann, 1987). Dieser Unterschied wird allerdings weniger deutlich, wenn wie im Hauptversuch nur 1 - 3 % durch Kartoffelprotein ersetzt werden. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zu den Würsten ohne Kartoffelprotein festgestellt werden. Der pH-Wert wurde weder erhöht noch gesenkt. Alle Würste lagen dabei im üblichen pH-Wert Bereich von 6,0 - 6,5. Somit ist im Rahmen des pH-Wertes die Haltbarkeit gewährleistet, da die meisten pathogenen Mikroorganismen, welche Fleischiweiß zersetzen, ein pH-Optimum von 7,0 haben (Branscheid et al., 2007). Bei der Herstellung anderer hybrider Fleischprodukte (Hühnchen Nuggets) wurde eine Erhöhung des pH-Wertes festgestellt (Baune et al., 2020). Dies liegt möglicherweise daran, dass größere Mengen an pflanzlichem Protein verwendet wurden und diese pflanzlichen Proteine z.B. von Erbsen einen höheren pH-Wert haben als das Fleisch und durch die höhere Zugabemenge eine pH-Wert Erhöhung verursachen.

6.1.2 Textur-Profil-Analyse

Die instrumentelle Analyse der Textur zeigte, dass mit zunehmendem Anteil an Kartoffelprotein bei gleichbleibender Grundrezeptur die Parameter Bruchfestigkeit, Härte und Kaufähigkeit erst ab einem zugeben Kartoffelproteingehalt von 1 % und 5 % signifikant anstiegen. Die Würste mit 10 % Kartoffelprotein konnten aufgrund ihres hohen Proteinanteils mit der verwendeten Methode nicht mehr gemessen werden und wurden deshalb bei der instrumentellen Texturanalyse nicht berücksichtigt.

Durch ihre hohe Elastizität bzw. Gummiartigkeit brachen die Wurst-Zylinder der 10 % Würste nicht mehr, sondern gingen nach der Belastung in ihre ursprüngliche Form zurück. Die signifikante Erhöhung der Bruchfestigkeit und Härte bereits bei 1 % Kartoffelprotein lässt sich vermutlich auf die gute emulgierende Wirkung des Kartoffelproteins zurückführen. Die Gummiartigkeit und die Kohäsion erhöhten sich erst signifikant ab einer Zugabe von 5 % Kartoffelprotein, ebenso die Kaufähigkeit. Insgesamt sind alle diese Werte der Textur-Profil-Analyse auf die hohen Mengen an zugegebenem Kartoffelprotein zurückzuführen, da die Rezeptur im Vorversuch gleich blieb und somit nicht genügend Wasser für die Emulsion vorhanden war, was zu einer zu harten und gummiartigen Textur führte.

Im Hauptversuch wurde entsprechend tierisches Protein durch pflanzliches Protein ersetzt und der entstehende Rest mit Wasser auf 100 % aufgefüllt. Dies führte dazu, dass die Bruchfestigkeit mit zunehmendem Anteil an Kartoffelprotein signifikant abnahm und ein signifikanter Unterschied zu den Würsten ohne pflanzliches Protein entstand. Die Bruchfestigkeit markiert den Zusammenbruch der Textur, dieser Zusammenbruch fand bei den hybriden Würsten bei einer geringeren Kraftaufwendung statt. Des Weiteren nahm die Härte der Würste mit Kartoffelprotein im Vergleich zur Kontrolle signifikant ab, sie sind somit weicher. Allerdings gab es keinen Unterschied zwischen den Würsten mit 1 - 3 % Kartoffelprotein. Ebenso nahm die Gummiartigkeit mit zunehmendem Anteil an pflanzlichem Protein ab. Bei der Kohäsion hingegen war keine eindeutige Tendenz zu erkennen. Die Kaufähigkeit nahm ebenso mit zunehmendem Anteil an Kartoffelprotein ab. Ursache für diese Ergebnisse ist womöglich die Rezeptur mit einem höheren Wasseranteil, welcher somit nicht optimal auf die emulgierende Wirkung des Proteins abgestimmt ist, wobei das Mischverhältnis eine entscheidende Rolle spielt. Dieses müsste bei weiteren Versuchen angepasst werden. Des Weiteren bewirken Kartoffelproteinanteile Veränderungen in der Art der gebildeten Aggregate. Diese sind im allgemein unregelmäßiger als solche, die nur aus tierischem Fleischprotein bestehen. Während Fleischproteine aufgrund ihrer pH-Abhängigkeit das makroskopische Phasenverhalten in Mischungen eher dominieren, stören Kartoffelproteine die mikrostrukturelle Assoziation und Aggregation von Fleischproteinen unterhalb ihres isoelektrischen Punktes (Ebert et al., 2021). Ein ähnlicher Effekt wurde für Gemische aus Fleisch- und Sojaproteinen beobachtet (Lanier, 1991) (Sofos et al., 1977). Als Grund wird hierbei eine mangelnde Wechselwirkung zwischen Fleischproteinen und solchen Proteinen, die nicht in Fleisch vorkommen, vermutet, welche die Bildung von kohärenten Netzwerken behindern könnte.

6.1.3 Instrumentelle Farbanalyse

Durch die Analyse der Farbe zeigte sich im Vorversuch, dass mit zunehmendem Anteil an Kartoffelprotein die Wurstscheiben dunkler wurden (Abnahme L^* -Wert). Des Weiteren sank der Rotanteil (Abnahme a^* -Wert) und der Gelbanteil (Zunahme b^* -Wert) stieg mit zunehmendem Prozentsatz an Kartoffelprotein an. Vor allem die Würste mit 5 % und 10 % Kartoffelprotein unterschieden sich signifikant von den Würsten ohne Kartoffelprotein. Einen für die Verbraucher*innen wahrnehmbaren Unterschied gab es ab einem Prozentsatz von 1 % Kartoffelprotein. Nach der Belichtung, welche das Offenliegen der Wurstscheiben im Verkaufsraum simuliert, zeigten sich die gleichen Ergebnisse, wobei der Rotanteil signifikant sank und der Gelbanteil im Vergleich zu vor der Belichtung weiter signifikant zunahm.

Durch das Ersetzen von Schweinefleischprotein durch Kartoffelprotein im Hauptversuch konnte festgestellt werden, dass die hybriden Würste im Vergleich zu den Würsten ohne Kartoffelprotein signifikant heller waren (Zunahme L^* -Wert). Allerdings unterschieden sich die Würste mit den verschiedenen Prozentsätzen (1 - 3 %) nicht signifikant in ihrer Helligkeit. Diese hellere Erscheinung der Wurst ist vermutlich auf die Rezeptur zurückzuführen, da das Schweinefleischprotein (u.a. Myoglobin) durch Kartoffelproteinpulver und auch Wasser ersetzt wurde. Dies führt zu einem helleren Farbeindruck und einer geringeren Rotfärbung, da das Myoglobin im Zusammenhang mit der Zugabe von Nitrit für die rote Farbe der Wurst verantwortlich ist (Potthast, 1987) und somit durch den Ersatz weniger vorhanden war. Ebenso wie im Vorversuch nimmt der Rotanteil mit zunehmendem Anteil an Kartoffelprotein ab (sinkender a^* -Wert) und der Gelbanteil nimmt zu (steigender b^* -Wert). Diese Farbunterschiede sind für den Verbraucher deutlich visuell wahrnehmbar (ΔE^*_{ab} über 2). Nach der Belichtung durch Tageslicht, sind die Farbunterschiede allerdings erst ab einem Anteil von 3 % Kartoffelprotein wahrnehmbar.

Des Weiteren führten vermutlich auch die Farbpigmente des Kartoffelproteinpulvers zu Farbveränderung. Das Pulver hatte bereits beim Kauf eine gelblich/grünliche Färbung und war nicht neutral weiß. Diese Pigmente führen mit zunehmendem, verwendetem Anteil zu einem höheren Grün- und Gelbanteil der Würste. Baune *et. al.* stellten ebenfalls bei hybriden Hähnchen Nuggets fest, dass das verwendete Kürbisprotein zu einer Abnahme des a^* -Wertes und einer Zunahme des b^* -Wertes und somit zu einer grünlicheren und gelblicheren Farbe der Produkte führte (Baune et al., 2020). Dieser Farbeindruck wurde durch die Einwirkung von Licht und möglicherweise auch durch Sauerstoff verstärkt (Einfluss von Sauerstoff in dieser Arbeit nicht getestet). Laut Böhner *et. al.*, kommt es bereits bei Sauerstoffgehalten von 0,5 % innerhalb weniger Stunden zu einem Absinken der Rotanteile auf etwa 50 % der Ausgangswerte (Böhner et al., 2014). Für zukünftige Analysen wäre es daher sinnvoll, den parallelen Einfluss von Sauerstoff auf den Farbeindruck der Würste mit Kartoffelprotein zu analysieren.

6.1.4 Lebensmittelsensorik (Verkostung)

Zunächst ist anzumerken, dass es sich bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Verkostung um eine individuelle, aber möglichst objektive Bewertung von Wurstwaren mit Kartoffelprotein handelte, wobei den Testpersonen (geschult und ungeschult) bewusst war, welche Art von Produkt verkostet wurde. Welche Wurst Kartoffelprotein enthielt und in welchem Prozentsatz, war allerdings nicht bekannt.

Durch die lebensmittelsensorische Verkostung im Vorversuch stellte sich beim 9-Punkte-Skala Beliebtheitstest heraus, dass die Würste ohne Kartoffelprotein, mit 0,1 % und mit 1 % Kartoffelprotein im Durchschnitt bei den Testpersonen gleich gut, in allen vier Kategorien (Aussehen, Textur, Geschmack und Gesamteindruck), ankamen. Sehr deutliche und signifikante Unterschiede gab es zu den Würsten mit 5 % und 10 % Kartoffelprotein. Diese wurden signifikant in allen Kategorien am schlechtesten bewertet, wobei die Würste mit 10 % Kartoffelprotein am schlechtesten abschnitten. Auf freiwilliger Basis konnten zu den Bewertungen individuelle Bemerkungen angegeben werden. Die Würste mit 10 % Kartoffelprotein wurden im Aussehen als „gelblich“, „bräunlich“ oder „gräulich“ bezeichnet. Der Geschmack wurde als „dumpf und muffig“ angemerkt und die Textur als „brüchig, bröslig, mehlig“ oder auch als „gummiartig“ beschrieben. Der Gesamteindruck wurde als „kein Eindruck von Wurst“ bezeichnet.

Beim Ersatz von Fleischprotein durch pflanzliches Protein im Hauptversuch zeigte sich, dass in allen Kategorien (Aussehen, Textur, Geruch, Geschmack und Gesamteindruck) die Würste ohne Kartoffelprotein am signifikant besten bewertet wurden. In den Kategorien Aussehen und Geruch wurden nur die Würste mit 3 % Kartoffelprotein signifikant niedriger bewertet als die Würste mit 1 % und 2 %. In den Kategorien Textur, Geschmack und Gesamteindruck sank die Bewertung mit zunehmendem Anteil an Kartoffelprotein. Der Geruch der Würste mit 1 % wurde zudem als „etwas dumpf“ und der Geschmack als „etwas stärkehaltig“ beschrieben. Das Aussehen der Würste mit 3 % Kartoffelprotein wurde dabei als zu „blass“, „grau“ oder „gelblich“ und der Geruch als „dumpf, muffig, erdig“ aber auch als „neutral“ bezeichnet. Die Textur wurde als „mehlig, krümlig“ aber auch als „weich bzw. schwammig“ beschrieben. Der Geschmack wurde als „stärkeartig, gewürzartig“ oder „erdig“ beschrieben und der Gesamteindruck als „nicht produkttypisch“. Die Bezeichnungen sind auf das Kartoffelprotein zurückzuführen, welches in Pulverform hinzugegeben wurde und einen Eigengeschmack in die Wurst mit einbringt. Vergleicht man die Ergebnisse der Verkostung mit der instrumentellen Textur-Profil-Analyse wird deutlich, dass Würste schlechter bewertet wurden, welche als weich und leichter kaubar analysiert wurden. All diese Ergebnisse bestätigen bereits frühere Studien, die zeigten, dass Konsumenten ein hybrides Produkt bevorzugen, welches dem originalen Produkt sehr ähnlich ist (Hoek et al., 2011). Dabei sind vor allem die Textur als auch der Geschmack ausschlaggebend (Hoek et al., 2013), was sich im Rahmen dieser Arbeit ebenso bestätigte.

6.1.5 Nährwerte

Die Nährwertanalysen ergaben in Bezug auf den Fettgehalt und den Aschegehalt keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den einzelnen Chargen. Dies war beim Fettgehalt zu erwarten, da die Grundrezeptur und Zugabe von Speck im Vorversuch bei allen Würsten gleich war. Dass es keine Unterschiede im Aschegehalt gab, ist womöglich darauf zurückzuführen, dass im Kartoffelproteinpulver keine großen Mengen an Mineralstoffen vorhanden sind (laut Hersteller max. 5 g/100 g), welche einen signifikanten Einfluss nehmen könnten. Signifikante Unterschiede wurden bei den Werten des Wassergehaltes deutlich. Dabei zeigte sich, dass die Würste ohne Kartoffelprotein und mit 0,1 % und 1 % Kartoffelprotein einen signifikant höheren Wassergehalt aufwiesen als die Würste mit 5 % und 10 %. Da bei allen Chargen das gleiche Fleisch und die gleiche Menge Wasser verwendet wurden, liegt dies möglicherweise an der Zugabe der höheren Mengen an Proteinpulver. Diese Pulvermenge bindet somit auch mehr Wasser.

Der Proteingehalt der Würste steigt mit zunehmendem Anteil an Kartoffelprotein an. Ein signifikanter Unterschied war allerdings erst ab einem Kartoffelproteinanteil von 5 % zu erkennen. Eine Ursache dafür könnte sein, dass bei einer geringen Zugabe von Kartoffelprotein bis 1 %, sich nicht signifikant erkennen lässt, ob es sich dabei um die natürliche Schwankung des Proteingehaltes des Schweinefleisches handelt oder um die Zugabe von Protein. Deutlich wurde dies vor allem im Hauptversuch. Durch die Berechnung der exakten Menge an Fleischprotein, welches durch Kartoffelprotein ersetzt werden konnte bestand kein signifikanter Unterschied im Proteingehalt zwischen den Würsten ohne Kartoffelprotein und solchen mit 1 %, 2 % und 3 % Kartoffelprotein. Auch der Fettgehalt, der Wassergehalt oder der Aschegehalt lassen keine Vermutungen über den Zusatz von pflanzlichem Kartoffelprotein, bei keinem der drei Prozentsätze, zu. Alle drei Chargen wiesen somit die gleichen Nährwerte wie eine herkömmliche Brühwurst auf.

6.1.6 Aminosäuren Zusammensetzung

Ziel der Aminosäuren Analytik war es, herauszufinden, ob die Zugabe von Kartoffelproteinpulver die Konzentration gewisser Aminosäuren erhöht. Speziell wurde dabei auf die Erhöhung nicht essentieller Aminosäuren geachtet. Die Ergebnisse des Vorversuches zeigten, dass sich signifikante Unterschiede in den Konzentrationen der Aminosäuren erst ab 5 % Kartoffelprotein ergaben. Zugegebene Mengen unter 1 % bewirkten keine signifikante Veränderung. Im Hauptversuch konnte durch den Ersatz von Fleischprotein die Konzentration von Serin, Valin und Isoleucin signifikant erhöht werden. Die Konzentration von Histidin ging mit dem zunehmend geringeren Anteil an Fleischprotein ebenfalls zurück. Bei allen 16 weiteren Aminosäuren zeigte sich keine signifikante Veränderung. Somit führte der Zusatz von Kartoffelprotein nicht zu einer quantitativen Erhöhung aller Aminosäuren.

6.2 DNA- basierte Methodenentwicklung zum Nachweis von Kartoffelprotein

6.2.1 Optimale Extraktionsmethode

Im ersten Schritt wurde die optimale DNA-Isolierungsmethode für Kartoffeln entwickelt. Dazu wurden drei DNA-Extraktionsmethoden (Wizard® Kit, DNeasy® mericon® Food Kit, modifizierte CTAB-Methode) mit verschiedenen Teilen der Kartoffel (Keimling, frische Knolle, getrocknete Knolle) getestet. Mit der modifizierten CTAB-Methode wurde die höchste DNA-Konzentration aus der getrockneten und der frischen Knolle isoliert. Dies wurde auch bereits in einer anderen Studie gezeigt (Smith et al., 2005). Ein Vorteil der CTAB-Methode sind die geringen Kosten im Vergleich zu kommerziellen Kits (Smith et al., 2005). Ebenso kann die DNA direkt aus der getrockneten Knolle isoliert werden, womit größere Mengen an Probe zur Verfügung stehen als bei der Isolierung aus den Keimlingen. Ein Nachteil der Methode ist allerdings, dass der Arbeitsaufwand durch die vielen Arbeitsschritte sehr hoch war. Gleichzeitig bestand die Gefahr, durch das Abkippen des Überstandes und das Präzipitieren der DNA größere Mengen an DNA zu verlieren und somit am Ende eine geringere Konzentration als bei der Isolierung mit dem Wizard® Kit zu erhalten. Aus diesen Gründen wurde diese DNA-Isolierungsmethode nicht weiterverwendet.

Mit Hilfe des DNeasy® Kits, welches zur Isolierung das Prinzip der CTAB-Methode verwendet, wurden die geringsten Konzentrationen an DNA isoliert (bei allen Pflanzenbestandteilen). Allerdings wurden auch reinere DNA-Lösungen als bei den anderen Methoden erhalten. Dies liegt daran, dass bei diesem Kit bereits ein Aufreinigungs-Schritt mit integriert ist. Theoretisch kombiniert daher diese Methode die Vorteile des Wizard® Kits und der CTAB-Methode: direkte Isolierung aus der Knolle und ein bereits integrierter Aufreinigungsschritt. Allerdings zeigten sich diese Vorteile nicht in der Praxis und daher wurde die Methode nicht weiter verwendet.

Die höchsten DNA-Konzentrationen konnten mit dem Wizard® Kit aus den Keimlingen der Kartoffel isoliert werden. Jedoch war dabei die Reinheit nicht zufriedenstellend. Durch einen weiteren Arbeitsschritt (Aufreinigung) konnte die gewünschte Qualität, Quotient A260/280 von mindesten 1,8 und ein Quotient A260/230 zwischen 2,0 und 2,2 (Kang, 2019) der isolierten DNA erreicht werden. Der Vorteil des Wizard® Kits ist es, dass es auch hoch prozessierte DNA isoliert, welche häufig fragmentiert vorliegt (Smith et al., 2005). Dies liegt möglicher Weise an dem spezifischen Wizard® Harz (*resin*) (Zimmermann et al., 1998) welches laut Hersteller dafür ausgelegt ist, DNA-Fragmente von 200–50.000 bp zu binden. Angewendet an Proteinpulver-Proben zeigte sich, dass nach der Extraktion mit dem Wizard® Kit und der anschließenden Aufreinigung mit dem QIAquick® Kit, ausreichende DNA-Mengen extrahiert werden konnten.

Ein weiterer Vorteil der Methode war die einfache Anwendung und Durchführung. Die Nachteile bestanden darin, dass die effektive Zellyse über Nacht stattfinden musste und somit zeitintensiv ist. Ebenso sind die Kosten pro Probe höher im Vergleich zur modifizierten CTAB-Methode (Smith et al., 2005).

6.2.2 Entwickelte real-time PCR Methode

Für die bereits durch die Arbeitsgruppe ausgewählten Zielsequenzen der Gens PP2A und PI wurden bei der theoretischen Überprüfung keine homologen Bereiche zu anderen verwandten Pflanzen oder Tieren, die im Bereich der Lebensmittel von Bedeutung sind, gefunden. Lediglich zur Zielsequenz PI konnten zwei 100 % homologe DNA-Abschnitte in der Datenbank BLAST gefunden werden. Bei dieser theoretischen Überprüfung kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass alle Pflanzen und Sorten mit entsprechenden Sequenzen in der Datenbank BLAST vorhanden waren. Wie bereits Chaouachi et. al. beschrieben, wurden auch im Rahmen dieser Arbeit nur wenige Einträge für die Art *Solanum melongena* (Aubergine) in der Datenbank BLAST gefunden (Chaouachi et al., 2008).

Die Schmelzkurvenanalyse der PCR Produkte der Primer der Zielsequenz PP2A zeigte bereits, dass vereinzelt nicht nur ein PCR Produkte der Kartoffel-DNA gebildet wurde, sondern auch PCR Produkte von anderen Nachtschattengewächsen mit einer ähnlichen Schmelztemperatur und damit mit einer ähnlichen Sequenzlänge und Basenzusammensetzung. Vor allem die PCR Produkte der DNA von Tamarillo und der Aubergine hatten eine ähnliche Schmelztemperatur. Durch die Verwendung einer Sonde wird in der Regel die Spezifität des Nachweises erhöht, doch auch unter Verwendung der Sonde PP2A-P konnte die Kreuzreaktivität nicht unterbunden werden. Die Sequenzierung der entsprechenden PCR Produkte zeigte anschließend, dass die Sequenzen der Tamarillo und die der Aubergine bis auf einzelne Basen mit der der Kartoffel übereinstimmten. Somit wurde festgestellt, dass einzelne Fehlerpaarungen zwar zu einem Nachweis führten, jedoch die DNA mit einer geringeren Effizienz amplifiziert wurde, so dass der Cq-Wert bei gleicher eingesetzter Konzentration an Ausgangs-DNA höher war. Ebenso konnte praktisch gezeigt werden, dass die Datenbank (BLAST) nicht vollständig war, vor allem in Bezug auf Tamarillo und Aubergine.

Die Zielsequenz des Gens PI hatte bereits in der theoretischen Überprüfung homologe Bereiche zu anderen *Solanum tuberosum* Protease-Inhibitoren. Dieses Problem der Spezifität trat dann bei der analytischen Überprüfung von 28 Kartoffelsorten auf. Mit der Sonde PI-P konnten drei Kartoffelsorten nicht nachgewiesen werden. Die Überprüfung der DNA-Extrakte der Kartoffelsorten auf Amplifizierbarkeit ergab, dass sie amplifizierbar sein müssten.

Durch die Sequenzierung einer dieser Kartoffelsorten stellte sich heraus, dass es sich nicht um die Zielsequenz im Gen *Solanum tuberosum cultivar Istrinskii Kunitz-type proteinase inhibitor group A1 (PKPI-A5) gene* (Sequenz ID (NCBI): JN983810.1) handelte, welche zum Designen der Primer und Sonde verwendet wurde. Stattdessen stimmte die Sequenz zu 100 % mit einem Sequenzabschnitt im Gen *Solanum tuberosum cultivar Intrinskii Kunitz-type proteinase inhibitor precursor* (LOC102577468) (Sequenz ID: NM_001288014.1) überein.

Durch das Mehrfachalignment wurde deutlich, dass die Primerbindestellen in mehreren Protease-Inhibitor Genabschnitten vorhanden waren. Die Bindestelle der Sonde PI-P wies allerdings zu viele Fehlpaarungen im Vergleich zu den anderen Protease-Inhibitor Genen auf. Der Nachteil einer solchen Sequenz ist es, dass jede einzelne Sequenz, welche eine hohe Homologie zu ihr besitzt, selbst wieder Homologien zu anderen verwandten Pflanzen aufweisen kann. Somit müsste jede einzelne Sequenz zusätzlich überprüft werden. Ebenso wäre es möglich, dass bei jedem PCR Lauf eine andere Gensequenz amplifiziert wird.

Des Weiteren stimmten die Primerbindestellen mit Sequenzabschnitten der Aubergine überein. Da der mittlere Bereich der Zielsequenz allerdings in einigen Basenpaarungen abwich, wurde versucht, eine neue Sonde so zu platzieren, dass alle Kartoffelsorten nachzuweisen waren, aber keine Auberginensorten. Dies gelang nicht mit der MGB-Sonde. Es wurden zwar alle Kartoffelsorten nachgewiesen, aber die Vervielfältigung der DNA einzelner Sorten war nicht exponentiell. Auch eine versuchte Optimierung der Primer- und Sonden-Konzentrationen brachte keine Verbesserung. Der Grund liegt möglicherweise darin, dass aufgrund der Spezifität der MGB-Sonde diese nicht in jedem Zyklus an die Zielsequenz band. Bereits einzelne Basenfehlpaarungen können dazu führen, dass eine MGB-Sonde nicht bindet (Kutyavin et al., 2000). Aufgrund dessen wäre es möglich, dass die Primerbindestellen zwar mit den Protease-Inhibitor-Sequenzen übereinstimmten, die Bindestelle der MGB-Sonde aber nur mit der Ausgangssequenz für welche sie designt wurde.

Die zweite designte klassische Hybridisierungssonde (PI-Kunitz-P) wies eine längere Sequenz auf. Ebenso sind diese Sonden aufgrund des fehlenden MGB weniger sensitiv. Dies brachte den Vorteil, dass trotz einzelner DNA-Fehlpaarungen zwischen den verschiedenen Kartoffelsorten die DNA aller Sorten nachgewiesen werden konnte und eine exponentielle Vervielfältigung stattfand. Die DNA verwandter Pflanzen und vor allem die der verschiedenen Auberginensorten wurden nur im geringen Maße amplifiziert ($C_q > 37$). Hierbei war möglicherweise die Anzahl der Fehlpaarungen zu hoch. Zusammenfassend war die Auswahl des Gens PI nicht optimal gewählt, bzw. der Bereich der Zielsequenz, denn es gibt zu viele homologe Sequenzbereiche zu anderen Protease-Inhibitor-Genen der Kartoffel.

Ebenso wurde deutlich, dass Pflanzen derselben Art, hier vor allem der Kartoffel und der Aubergine, sich in ihren einzelnen Sorten unterscheiden können. Dies kann wie im Fall der Sonde PI-P und PI-MGB-P dazu führen, dass einzelne Sorten nicht nachzuweisen waren.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die Spezifität der ausgewählten Sonde PI-Kunitz-P verbesserte, in dem die Primer- und Sonden Konzentrationen optimiert wurden. Dadurch konnte erreicht werden, dass die DNA keiner der verwandten Pflanzen oder anderer lebensmittelrelevanter Pflanzen zu einen Cq-Wert < 37 führte.

Das Kartoffelproteinpulver, welches in den Wurstwaren verarbeitet wurde, wurde bereits bei der Schmelzkurvenanalyse mitgeführt. Das Amplikon wies hierbei die gleiche Schmelztemperatur wie das der frischen Kartoffel-DNA auf. Bei weiteren Analysen mit verschiedenen Sonden zeichnete sich bereits ab, dass bei gleicher eingesetzter Menge an DNA die Cq-Werte der DNA des Proteinpulvers deutlich höher waren ($\Delta Cq +5 - +6$) als die der frischen Kartoffel-DNA. Selbst mit der letztendlich verwendeten Primer- und Sonden-Kombination gab es keine Veränderung. Auch bei einem zweiten verwendeten Proteinpulver in Futtermittelqualität lagen die ΔCq -Werte bei $+12$. Die Untersuchung auf Inhibitoren zeigte bei beiden DNA-Proben keine Inhibition auf. Bei der Analyse der Amplifizierbarkeit konnte gezeigt werden, dass beide DNA-Proben amplifizierbar waren. Die ΔCq -Werte blieben auch bei dieser Analyse gleich zu den vorherigen. Die Untersuchung auf Fragmentierung mittels der Agarose-Gelelektrophorese zeigte deutlich die Fragmentierung der DNA beider Proteinpulver (25 - 350 bp), wobei die Fragmente des Pulvers in Futtermittelqualität noch kleiner waren (25 -250 bp). Diese Fragmentierung war bei der Bestimmung der DNA-Konzentration nicht ersichtlich, da die spektroskopische Messung DNA-Stränge in jeglicher Länge erfasst. Liegen diese Strangbrüche im Sequenzabschnitt der Primer- oder Sondenbindestellen, können diese DNA-Template nicht zum Nachweis des Kartoffelproteins verwendet werden.

Die Ursache der starken Fragmentierung liegt wahrscheinlich im Herstellungsprozess des Proteinpulvers, da die DNA der Kartoffel dort extremen Bedingungen ausgesetzt wird. Die Gewinnung erfolgt aus dem Kartoffelwasser während der Stärkeherstellung. Die DNA der Kartoffel ist dabei vor allem während der Proteinkoagulation entweder Hitzeeinwirkung (Strolle et al., 1973) oder Säureeinwirkung (Knorr, 1977) ausgesetzt. Ebenso kann eine Kombination aus Wärme- und Druckeinwirkung zur Ausfällung der Proteine verwendet werden. Diese Beanspruchungen sind wahrscheinlich noch höher, wenn das Proteinpulver nicht für den menschlichen Gebrauch gedacht ist (Futtermittel) und äußerten sich somit in einer höheren Fragmentierung und einem höheren Cq-Wert.

Für hochprozessierte Lebensmittel wie das Kartoffelproteinpulver wäre es von Vorteil, zum DNA-Nachweis ein Gen zu verwenden, welches als multi-copy bzw. high-copy Gen in möglichst allen Kartoffelsorten vorliegt. In der Literatur wurden dafür zum Beispiel interne transkribierte Spacer (ITS) (López-Calleja et al., 2013) (López-Calleja et al., 2015) (Villa et al., 2017), verwendet. Diese liegen im Vergleich zur Kern-DNA in einer hohen Kopienzahl und hoch konserviert vor (Bartlett & Davidson, 1991). Dadurch wäre die Wahrscheinlichkeit höher, die DNA-Fragmente in ausreichender Konzentration zu erhalten.

Mit der ausgewählten Primer-Sonden-Kombination wurden mit einer Effizienz von 91,9 - 95,9 %, einer Linearität (R^2) von 0,998 - 0,999 und einer Steigung von -3,425 - -3,532 die DNA der Kartoffel nachgewiesen. Alle Werte fallen damit unter die Auswahlkriterien für eine akzeptable Effizienz eines neu entwickelten real-time PCR Systems von 90 - 110 %, korrespondierend zu einer Steigung zwischen -3,1 und -3,6 und einer Linearität von $\geq 0,98$ (European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2015). Die Schwankung der Cq-Werte und damit auch der Effizienz innerhalb mehrerer Analysen ist bei der real-time PCR typisch und wurde in ähnlichen Studien beobachtet (Costa et al., 2017; La Cruz et al., 2013). Die Ursachen dafür könnten minimale Schwankungen in den Amplifikationsbedingungen sein, eine leichte Änderung der DNA-Qualität nach einer gewissen Lagerungszeit oder leichte Signalschwankungen des Detektors.

Des Weiteren konnte eine Nachweisgrenze ($LOD^{95\%}$) von vier Kopien erreicht werden. Dieser Wert spricht dafür, dass die tatsächlich eingesetzte Kopienanzahl der Zielsequenz auch der für die DNA-Lösung berechneten (nominalen) Kopienanzahl entspricht (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2016). Dies ist eine ausreichende Nachweisgrenze, da der Wert unter 25 Kopien liegt (European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2015). Denn es ist zu beachten, dass die theoretische Nachweisgrenze bei low-copy PCRs nicht weniger als drei Kopien sein kann, unter der Annahme der Poisson-Verteilung (Bustin et al., 2009).

Im Zuge der Analyse der Robustheit wurden zwei Mastermixe getestet. Des Weiteren wurde die Annealing-Temperatur um ein Grad Celsius erhöht oder gesenkt. Ebenso wurde das Volumen des Mastermixes um 5 % und die Primer- und Sonden-Konzentration um jeweils 30 % erhöht oder gesenkt. Diese Veränderungen wurden unterschiedlich kombiniert. Dabei konnte gezeigt werden, dass trotz dieser Veränderungen alle Replikate positive Ergebnisse lieferten. Auch die Cq-Werte im Vergleich zu den Standardbedingungen schwankten nur minimal zwischen $\Delta Cq +0,12$ und $+1,10$. Diese Schwankungen sind womöglich auf die zuvor beschriebenen Schwankungen der Cq-Werte zwischen den einzelnen Analysen zurückzuführen. Da alle Replikate positiv waren, kann die qualitative Methode als robust angesehen werden (European Network of GMO Laboratories (ENGL), 2015).

Die entwickelte real-time PCR Methode wurde anschließend an Fleischerzeugnissen mit Kartoffelprotein angewendet. Aufgrund der Fragmentierung der Proteinpulver-DNA konnten die Proben nur qualitativ analysiert werden. Dazu wurden rohe Brätproben und Brühwurstproben untersucht. Die Würste enthielten im Vorversuch 0,1 %, 1 %, 5 % und 10 % Kartoffelproteinpulver pro Charge. Hierbei wurde auf die Grundrezeptur Kartoffelproteinpulver „on top“ hinzugegeben. Sowohl in den Brät- als auch den Wurstproben konnte das Kartoffelprotein bei allen Konzentrationen qualitativ nachgewiesen werden. Ebenso wurde ein Unterschied in den Cq-Werten der einzelnen Chargen ersichtlich.

Auch die Proben des Hauptversuches wurden positiv auf Kartoffelprotein getestet (1 %, 2 % und 3 % Kartoffelproteinpulver pro Charge). Bei dieser Charge wurde tierisches Protein durch pflanzliches ersetzt. Die Cq-Werte der PCR Produkte der einzelnen Chargen unterschieden sich bei diesen Proben weniger als die des Vorversuches. Bei diesen Proben zeigte sich allerdings keine Eindeutige Tendenz bzw. Anstieg der Cq-Werte mit steigendem Anteil an Kartoffelprotein. Dies liegt möglicherweise an den geringen prozentualen Unterschieden zwischen den Chargen.

7. Ausblick

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass mit herkömmlichen technischen Methoden der Fleischwirtschaft die Verarbeitung von Kartoffelprotein in hybriden Brühwürsten möglich ist. Die Zusammensetzung der Nährwerte verändert sich durch den Ersatz von Fleischprotein durch Kartoffelprotein nicht. Des Weiteren gab es auch keinen signifikanten Mehrwert in der Aminosäurezusammensetzung. Zukünftig wäre es sinnvoll, die Qualität der Proteine der hybriden Produkte in Bezug auf ihre biologische Wertigkeit hin zu prüfen, da die gemeinsame Aufnahme von Fleischprotein und Kartoffelprotein zu einer besseren ernährungsphysiologischen Verwertbarkeit führen könnte.

Für ein marktreifes Produkt müssten vor allem die Textur und der Geschmack optimiert werden. Hierbei könnte die Verwendung von texturiertem Protein von Vorteil sein, um ein Produkt typischer Struktur zu erhalten. Der Eigengeschmack des Kartoffelproteinpulvers könnte durch die Zugabe spezieller Gewürze überdeckt werden, wobei dadurch möglicherweise ein Geschmack entsteht, welcher dem der klassischen Brühwurst ähnlicher ist. Die weniger intensive Rotfärbung könnte z.B. mit Rotebeete-Extrakt verbessert werden. Diese Würste sollten anschließend von einem geschulten Panel nach Iso Norm verkostet werden. Diese Veränderungen könnten zu einer höheren Verbraucherakzeptanz führen.

Der Nachweis des Kartoffelproteins ist mit der entwickelten real-time PCR Methode qualitativ möglich. Um die Vermutung der Fragmentierung der Kartoffel-DNA zu überprüfen und zu bestätigen, sollten weitere Kartoffelproteinpulver analysiert werden um zu sehen, wie stark die Fragmentierung bei diesen ist.

Zusammenfassung

Aufgrund der gesteigerten Nachfrage nach alternativen Fleischprodukten konnten im Rahmen dieser Masterarbeit hybride Wurstwaren mit herkömmlichen fleischverarbeitenden Technologien entwickelt werden. Es konnten drei Chargen an Brühwürsten des Typs Lyoner entwickelt werden, bei welchen tierisches Protein aus Schweinefleisch durch pflanzliches Protein, aus Kartoffel, ersetzt wurde. Der Anteil des ersetzten Proteins betrug dabei 1 %, 2 % oder 3 %. Der pH-Wert der hybriden Würste unterschied sich nicht signifikant von dem der herkömmlichen Lyoner. Analysen der Textur, sowohl instrumentell als auch über eine Verkostung, ergaben, dass die Würste mit zunehmendem Anteil an Kartoffelprotein weicher und leichter kaubar wurden, was allerdings nicht der Verbrauchererwartung an eine Brühwurst entsprach. Ebenso überzeugten der Geschmack und der Gesamteindruck im Vergleich zu einer herkömmlichen Brühwurst weniger. Die Farbe der Wurst war weniger rot und mehr grünlich im Vergleich zu einer herkömmlichen Brühwurst und wurde dadurch auch etwas schlechter bewertet. Die Nährwertzusammensetzung unterschied sich nicht signifikant von einer herkömmlichen Lyoner. Die Aminosäurekonzentration erhöhte sich signifikant bei den Aminosäuren Serin, Valin und Isoleucin. Allerdings verringerte sie sich bei der Aminosäure Histidin. Um die Akzeptanz hybrider Fleischprodukte mit Kartoffelprotein zu optimieren, sind zukünftig weitere Verbesserungen besonders im Bereich des Geschmacks und der Textur nötig.

Zum Nachweis von Kartoffelprotein in Fleischprodukten wurde eine real-time PCR Methode zum qualitativen Nachweis von Kartoffelprotein in Fleischerzeugnissen entwickelt. Die DNA wurde mit dem Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System und dem Wizard® DNA Clean-Up System aus den Proben isoliert. Zum Nachweis wurde das Gen *Solanum tuberosum* cultivar *Intrinskii* Kunitz-type proteinase inhibitor precursor (LOC102577468) (Sequenz ID: NM_001288014.1) verwendet. Die optimale Primer-Konzentration lag bei 0,4 µM für den forward Primer und 0,2 µM für den reverse Primer. Ebenso wurde eine Hybridisierungssonde verwendet mit einer Konzentration von 0,3 µM. Diese Methode weist qualitativ spezifisch 28 Kartoffelsorten nach und wies keine Kreuzreaktivität (Cut-off < 37) zu anderen Arten der *Solanaceae* oder häufig verwendeten Gemüsesorten in der Lebensmittelindustrie auf. Mit dieser Methode ist eine Nachweisgrenze von vier DNA-Kopien erreichbar. Die Methode ist zudem robust.

Abstract

Due to the increased demand for alternative meat products, hybrid sausages using conventional meat processing technologies were developed within the scope of this master's thesis. Three batches of cooked sausages (Lyoner type) were developed, in which animal protein from pork could be replaced by vegetable protein from potatoes. The proportion of the protein replaced was 1 %, 2 % or 3 %. The pH value of the hybrid sausages did not differ significantly from that of conventional cooked sausages (Lyoner type). Analyses of the texture, both instrumentally and by tasting, showed that the sausages became softer and easier to chew with increasing potato protein content, which, however, did not correspond to consumer expectations of a cooked sausage. The taste and the overall impression were also less convincing compared to a conventional cooked sausage. The colour of the sausage was less red and more greenish compared to a conventional cooked sausage and was therefore rated worse. The nutritional composition did not differ significantly from a conventional Lyoner. The amino acid concentration increased significantly for the amino acids serine, valine and isoleucine. However, it decreased for the amino acid histidine. In order to optimize the acceptance of hybrid meat products with potato protein, further improvements are needed in the future, particularly in the area of taste and texture.

For the detection of potato protein in meat products, a real-time PCR method was developed. The DNA of all samples was isolated from the samples using the Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System and the Wizard® DNA Clean-Up System. *Solanum tuberosum cultivar Intrinskii Kunitz-type proteinase inhibitor precursor* (LOC102 577 468) gene was used as the target sequence (Sequence ID: NM_001 288 014. 1). The optimal primer concentration was 0.4 µM for the forward primer and 0.2 µM for the reverse primer. Furthermore, a hybridization probe with a concentration of 0.3 µM was used. This method qualitatively, specifically identified 28 potato varieties and did not show cross-reactivity (cut-off 37) to other species of *Solanaceae* or vegetables commonly used in the food industry. With this method, a detection limit of four DNA-copies is achievable. The method is also robust.

References

- Aiking, H. (2011). Future protein supply. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 112–120.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2017). *Molekularbiologie der Zelle*. (6. Auflage). Weinheim: Wiley-VCH.
- Alexy, U., Janz, N., & Kersting, M. (2017). Food and Meals in Vegetarian Children and Adolescents. In *Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention* (pp. 549–564): Elsevier.
- Alting, A. C., Pouvreau, L., Giuseppin, M., & van Nieuwenhuijzen, N. H. (2011). Potato proteins. In G. O. Phillips, & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of Food Proteins* (pp. 316–334): Elsevier.
- Andrews, D. L., Beames, B., Summers, M. D., & Park, W. D. (1988). Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochemical Journal*, 252, 199–206.
- Arumuganathan, K., & Earle, E. D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9, 208–218.
- Bartlett, S. E., & Davidson, W. S. (1991). Identification of Thunnus tuna species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 309–317.
- Baune, M. C., Baron, M., Profeta, A., Smetana, S., Weiss, J., Heinz, V., & Terjung, N. (2020). Einfluss texturierter Pflanzenproteine auf Rohmassen hybrider Chicken Nuggets: Herstellung unter Berücksichtigung technologischer und sensorischer Eigenschaften hybrider Fleischprodukte. *Fleischwirtschaft*, 7, 82–88.
- Biesalski, H.-K., B. Stähelin, H., Fürst, P., Kasper, H., Kluthe, R., Puchstein, C., & Pölert, A. (2004). *Ernährungsmedizin*. (3., erweiterte Auflage). Stuttgart: THIEME.
- Bio-Rad Laboratories, Inc. (2006). Real-Time PCR Applications Guide. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf. Accessed 22.02.2021.
- Bio-Rad Laboratories, Inc. (2010). CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System Brochure: (Nr. 6093). https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6093.pdf. Accessed 22.02.2021.
- Bio-Rad Laboratories, Inc. (2021). Optical Detection System. <https://www.bio-rad.com/de/applications-technologies/introduction-qpcr-instrumentation?ID=LUSO5YMNI>. Accessed 21.02.2021.

- Böhner, N., Hösl, F., Rieblinger, K., & Danzl, W. (2014). Effect of retail display illumination and headspace oxygen concentration on cured boiled sausages. *Food Packaging and Shelf Life*, 1, 131–139.
- Bohs, L., & Olmstead, R. G. (1997). Phylogenetic Relationships in *Solanum* (Solanaceae) Based on *ndhF* Sequences. *Systematic Botany*, Vol. 22, 5–17.
- Branscheid, W., Honikel, K. O., Lengerken, G. von, & Troeger, K. (Eds.) (2007). *Qualität von Fleisch und Fleischwaren*. (2nd ed.). Edition Fleisch. Frankfurt am Main: Deutscher Fachverlag.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) (2014a). *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (vormals § 35 LMBG 1980) Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung des Gesamtfettgehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen - Gravimetrisches Verfahren nach Weibull-Stoldt - Referenzverfahren: BVL L 06.00-6:2014-08*.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) (2014b). *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (vormals § 35 LMBG 1980) Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung des Rohproteingehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen – Titrimetrisches Verfahren nach Kjeldahl - Referenzverfahren: BVL L 06.00-7:2014-08*.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) (2014c). *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (vormals § 35 LMBG 1980) Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung des Wassergehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen - Gravimetrisches Verfahren - Referenzverfahren: BVL L 06.00-3:2014-08*.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) (2016). Leitlinien zur Einzellabor-Validierung qualitativer real-time PCR Methoden.
https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/07_Untersuchungen/Leitlinien%20zur%20Einzellabor%20Validierung.pdf?__blob=publicationFile&v=5. Accessed 11.04.2021.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) (2017). *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (vormals § 35 LMBG 1980) Untersuchung von Lebensmitteln - Bestimmung der Asche in Fleisch und Fleischerzeugnissen- Gravimetrisches Verfahren- Referenzverfahren: BVL L 06.00-4:2017-10*.
- Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (2005). *Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch): LFGB*.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2015). Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse: Neufassung vom 25.11.2015 (BANZ AT 23.12.2015 B4, GMBI 2015

- S. 1357). https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Ernaehrung/Lebensmittel-Kennzeichnung/LeitsaetzeFleisch.pdf?__blob=publicationFile&v=4. Accessed 04.03.2021.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611–622.
- Buta, M. B., Emire, S. A., Posten, C., Andrée, S., & Greiner, R. (2019). Reduction of β -ODAP and IP6 contents in *Lathyrus sativus* L. seed by high hydrostatic pressure. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 120, 73–82.
- C. Gerhardt GmbH & Co. KG (2010). *Gerhardt Applikation Note B. 1. 3. HT Gesamtfett in Fleisch und Fleischprodukten: Hydrotherm + Soxtherm*.
- Callow, E. H. (1948). Comparative studies of meat. II. Changes in the carcass during growth and fattening and their relation to the chemical composition of the fatty and muscular tissues. *Journal of Agricultural Science*, 38, 174–199.
- Cardullo, R. A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P. C., & Wolf, D. E. (1988). Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 8790–8794.
- Castro, F., Marina, M. L., Rodríguez, J., & García, M. C. (2005). Easy determination of the addition of soybean proteins to heat-processed meat products prepared with turkey meat or pork-turkey meat blends that could also contain milk proteins. *Food additives and Contaminants*, 22, 1209–1218.
- CC BY-SA 4.0 (2020). Schematic mechanism of PCR (Deutsch): Polymerase chain reaction-de.svg. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction.svg#/media/File:Polymerase_chain_reaction-de.svg. Accessed 17.04.2021.
- Chaouachi, M., El Malki, R., Berard, A., Romaniuk, M., Laval, V., Brunel, D., & Bertheau, Y. (2008). Development of a real-time PCR method for the differential detection and quantification of four solanaceae in GMO analysis: potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), eggplant (*Solanum melongena*), and pepper (*Capsicum annum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1818–1828.
- Codex Alimentarius Commission (2010). Guidelines on the performance criteria and validation of methods for detection, identification and quantification of specific DNA sequences and specific proteins in food: CAC/GL 74-2010. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/gmfp/resources/CXG_074e.pdf. Accessed 17.05.2021.

- Costa, J., Amaral, J. S., Grazina, L., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2017). Matrix-normalised real-time PCR approach to quantify soybean as a potential food allergen as affected by thermal processing. *Food Chemistry*, 221, 1843–1850.
- Criado, M., Castro-Rubio, F., García-Ruiz, C., García, M. C., & Marina, M. L. (2005). Detection and quantitation of additions of soybean proteins in cured-meat products by perfusion reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 28, 987–995.
- Culioli, J., Boyer, C., Vignon, X., & Ouali, A. (1993). Heat-induced gelation properties of myosin - Influence of purification and muscle type. *Sciences des Aliments*, 249–260.
- Darwish, S., Fretzdorff, B., Flaschel, E., & Betsche, T. (2003). Statusseminar Welternährung 2003 Beiträge zur globalen Ernährungssicherung: Ressourcenschonung und Pflanzenprotein: Enzymatische Modifikation von Kartoffelprotein für die Ernährung. https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/Document_derivate_00012936/Statusseminar-welternaehrung-2003-p42-43.pdf. Accessed 09.03.2021.
- Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union (2011). *Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011*.
- Deutsches Institut für Normung e.V. (1987). *DIN 55350-18:1987-07 Begriffe der Qualitätssicherung und Statistik - Begriffe zu Bescheinigungen über die Ergebnisse von Qualitätsprüfungen; Qualitätsprüf-Zertifikate*. Beuth Verlag GmbH: Berlin.
- Deutsches Institut für Normung e.V. (2007). *DIN 6174:2007-10, Farbmetrische Bestimmung von Farbmaßzahlen und Farbabständen im angenähert gleichförmigen CIELAB-Farbenraum*. Berlin: Beuth Verlag GmbH.
- Deutsches Institut für Normung e.V. (2014). *DIN 5033-7:2014-10 Farbmessung - Teil 7: Messbedingungen für Körperfarben*. Berlin: Beuth Verlag GmbH.
- Deutsches Institut für Normung e.V. (2016). *DIN EN ISO 16140-2:2016-11: Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Verfahrensvalidierung - Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens*. Berlin: Beuth Verlag GmbH.
- Deutsches Institut für Normung e.V. (2018). *DIN 6176:2018-10, Farbmetrische Bestimmung von Farbabständen bei Körperfarben nach der DIN99o-Formel*. Berlin: Beuth Verlag GmbH.
- Deutsches Institut für Normung e.V. (2019). *DIN CEN/TS 17303:2019-06, Lebensmittel - DNA-Barcoding von Fisch und Fischprodukten anhand definierter mitochondrialer Cytochrom-b- und Cytochrom-c-Oxidase-I-Genabschnitte; Deutsche Fassung CEN/TS_17303:2019*. Berlin: Beuth Verlag GmbH.
- Dikeman, M., Devine, C., Devine, C., Dikeman, M., & Jensen, W. K. (Eds.) (2004). *Encyclopedia of Meat Sciences*. Burlington: Elsevier Science.

- Dolch, K., Judas, M., Schwägele, F., & Brüggemann, D. A. (2019). Development and validation of two triplex real-time PCR systems for the simultaneous detection of six cereal species in processed meat products. *Food Control*, 101, 180–188.
- Ebert, S., Kaplan, S., Brettschneider, K., Terjung, N., Gibis, M., & Weiss, J. (2021). Aggregation behavior of solubilized meat - Potato protein mixtures. *Food Hydrocolloids*, 113, 106388.
- Elmadfa, I., & Meyer, A. L. (2019). *Ernährungslehre*. (4., überarbeitete Auflage). Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer; UTB.
- European Network of GMO Laboratories (ENGL) (2015). *Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing*. JRC Technical Report.
- Fernández-Martín, F., Fernández, P., Carballo, J., & Jiménez Colmenero, F. (1997). Pressure/Heat Combinations on Pork Meat Batters: Protein Thermal Behavior and Product Rheological Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 4440–4445.
- Font-I-Furnols, M., & Guerrero, L. (2014). Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: an overview. *Meat Science*, 98, 361–371.
- Gaonkar, A. G., & McPherson, A. (2006). *Ingredient interactions: Effects on food quality*. (2nd ed.). Food science and technology, 154. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis.
- Gewürzmüller, & Fleischereiberatung Hack (GEHA) (2018). GEHA-Verarbeitungsmaterialstandards. https://frutaromsavory.com/sites/frutaromsavory.com/files/anhang/dateien/sf_geha-verarbeitungsmaterialstandards_de_2018_screen_0.pdf. Accessed 11.03.2021.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., & Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6, 995–1001.
- Grasso, S. (2020). Hybrid meat. *Food Science and Technology*, 34, 48–51.
- Hardin B. (1991). Preserving potato plant diversity. In: *Agricultural Research* 1991(4), 7. *Agricultural Research*, 7.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986–994.
- Heinz, G., & Hautzinger, P. (2007). *Meat processing technology for small- to medium-scale producers*. RAP publication, 2007/20. Bangkok: Food and Agriculture Organizations of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio/Technology*, 11, 1026–1030.
- Hoek, A. C., Elzerman, J. E., Hageman, R., Kok, F. J., Luning, P. A., & Graaf, C. de (2013). Are meat substitutes liked better over time? A repeated in-home use test with meat substitutes or meat in meals. *Food Quality and Preference*, 28, 253–263.

- Hoek, A. C., Luning, P. A., Weijzen, P., Engels, W., Kok, F. J., & Graaf, C. de (2011). Replacement of meat by meat substitutes. A survey on person- and product-related factors in consumer acceptance. *Appetite*, 56, 662–673.
- Hoffmann, 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.
- Hofmann, K. (1973). Was ist Fleischqualität? *Fleischwirtschaft*, 53, 485.
- Hofmann, K. (1987). Der Begriff Fleischqualität: Definition und Anwendung. *Fleischwirtschaft*, 67, 44–49.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., & Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 7276–7280.
- Hughes, B. (1958). The amino -acid composition of potato protein and of cooked potato. *The British Journal of Nutrition*, 12, 188–195.
- Jansohn, M., & Rothhämel, S. (2012). *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. (5. Auflage). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Jongsma, M. A. (1995). *The resistance of insects to plant proteinase inhibitors*.
- Kang, T. S. (2019). Basic principles for developing real-time PCR methods used in food analysis: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 574–585.
- Kerth, C. R. (2013). *The Science of Meat Quality*. (1. Aufl.). s.l.: Wiley-Blackwell.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., & Khorana, H. G. (1971). Studies on polynucleotides. *Journal of Molecular Biology*, 56, 341–361.
- Klettner, P. G. (1994). Messung der Textur und Konsistenz mit Prüfmaschinen. *Fleischwirtschaft*, 74, 378–381.
- Klettner, P. G. (1995). Homogene Brühwurst. Bestimmung der Farbe mit Farbmessgeräten. *Fleischwirtschaft*, 75, 263–266.
- Klettner, P. G., & Stiebing, A. (1980). Beitrag zur Bestimmung Farbe bei Fleisch und Fleischerzeugnissen: I. Einführung in die Grundlagen der Farbmessung. *Fleischwirtschaft*, 60, 1970–1976.
- Knorr, D. (1977). Protein recovery from waste effluents of potato processing plants. *International Journal of Food Science & Technology*, 12, 563–580.
- Koch, H., & Fuchs, M. (2009). *Die Fabrikation feiner Fleisch- und Wurstwaren: Das Standardwerk zur traditionellen Herstellung von Fleischerzeugnissen ; über 500 klassische Rezepte*. (23rd ed.). Frankfurt am Main: Deutscher Fachverlag.

- Konica Minolta, I. N. (2002-2013). Chromameter CR-400/410: Benutzerhandbuch. https://www.konicaminolta.com/instruments/download/instruction_manual/color/pdf/cr-400-410_instruction_deu.pdf.
- Kreuzer, K. A., Bohn, A., Lupberger, J., Solassol, J., Le Coutre, P., & Schmidt, C. A. (2001). Simultaneous absolute quantification of target and control templates by real-time fluorescence reverse transcription-PCR using 4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoic acid as a dark quencher dye. *Clinical Chemistry*, 47, 486–490.
- Kumar, S., Reed, M. W., Gamper, H. B., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Foti, M., West, J., Meyer, R. B., & Schweitzer, B. I. (1998). Solution structure of a highly stable DNA duplex conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Research*, 26, 831–838.
- Kunz, B. (1993). *Lexikon der Lebensmitteltechnologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E. S., Singer, M. J., Walburger, D. K., Lokhov, S. G., Gall, A. A., Dempcy, R., Reed, M. W., Meyer, R. B., & Hedgpeth, J. (2000). 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*, 28, 655–661.
- La Cruz, S. de, López-Calleja, I. M., Alcocer, M., González, I., Martín, R., & García, T. (2013). TaqMan real-time PCR assay for detection of traces of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) in food products. *Food Control*, 33, 105–113.
- Lanier, T. C. (1991). Interactions of Muscle and Nonmuscle Proteins Affecting Heat-Set Gel Rheology. In N. Parris (Ed.), *Interactions of food proteins: Developed from a symposium sponsored by the 1989 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii, December 17 - 22, 1989* (pp. 268–284). Washington, DC: American Chemical Society.
- Lebret, B., Lefaucheur, L., Mouro, J., & Bonneau, M. (1996). Influence des facteurs d'élevage sur la qualité de la viande de porc. *Journées Rech. Porcine en France*, 28, 137–156.
- Li-Chan, E., Nakai, S., & Wood, D. F. (1985). Relationship Between Functional (Fat Binding, Emulsifying) and Physicochemical Properties of Muscle Proteins. Effects of Heating, Freezing, pH and Species. *Journal of Food Science*, 50, 1034–1040.
- López-Calleja, I. M., La Cruz, S. de, González, I., García, T., & Martín, R. (2015). Market analysis of food products for detection of allergenic walnut (*Juglans regia*) and pecan (*Carya illinoensis*) by real-time PCR. *Food Chemistry*, 177, 111–119.
- López-Calleja, I. M., La Cruz, S. de, Pegels, N., González, I., García, T., & Martín, R. (2013). High resolution TaqMan real-time PCR approach to detect hazelnut DNA encoding for ITS rDNA in foods. *Food Chemistry*, 141, 1872–1880.

- Matissek, R., Steiner, G., & Fischer, M. (2014). *Lebensmittelanalytik*. (5., vollst. überarb. u. akt. Aufl. 2014). Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Morrison, T. B., Weis, J. J., & Wittwer, C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques*, 24, 954-8, 960, 962.
- Mulder, E. G. (1955). Effect of mineral nutrition of potato plants on respiration of the tubers. *Acta Botanica Neerlandica*, 4, 430–451.
- Müller, H.-J., & Prange, D. R. (2016). *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. (2. Auflage). Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- OECD-FAO (2020). OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/1112c23b-en.pdf?expires=1632068168&id=id&accname=guest&checksum=DD75F20D77BE4F89D5E446ED2F524C36>. Accessed 14.03.2021.
- Pohling, R. (2015). *Chemische Reaktionen in der Wasseranalyse*. Berlin: Springer Spektrum.
- Potthast, K. (1987). Fleischfarbe, Farbstabilität und Umrötung. *Fleischwirtschaft*, 67, 50–55.
- Pouvreau, L., Gruppen, H., Piersma, S. R., van den Broek, L. A., van Koningsveld, G. A., & Voragen, A. G. (2001). Relative abundance and inhibitory distribution of protease inhibitors in potato juice from cv. Elkana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2864–2874.
- Racusen, D., & Foote, M. (1980). A major soluble glycoprotein of potato tubers. *Journal of Food Biochemistry*, 4, 43–52.
- Randhawa, G. J., Singh, M., & Sharma, R. (2009). Duplex, triplex and quadruplex PCR for molecular characterization of genetically modified potato with better protein quality. *Current Science*, 97, 21–23.
- Rho, J. K., Lee, T., Jung, S.-I., Kim, T.-S., Park, Y.-H., & Kim, Y.-M. (2004). Qualitative and quantitative PCR methods for detection of three lines of genetically modified potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3269–3274.
- Rimbach, G., Nagursky, J., & Erbersdobler, H. F. (2015). *Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger*. (2. Aufl. 2015). Springer-Lehrbuch. Berlin: Springer Spektrum.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., & Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 245, 154–160.
- Rödel, W. (1991). Meßgrößen und transportable Meßgeräte für die innerbetriebliche Qualitätskontrolle, Teil II. *Fleischwirtschaft*, 71, 1260–1268.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487–491.

- Şakalar, E. (2015). A molecular assay for quantification and simultaneous detection of soybean and poultry DNA in sausages following multi-extraction. *Food Science and Biotechnology*, 24, 1915–1920.
- Saunders, G. C., & Parkes, H. C. (Eds.) (1999). *Analytical molecular biology: Quality and validation*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Schmidt, O. (2017). *Genetik und Molekularbiologie*. Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Schuphan, W., & Weinmann, I. (1959). Die Kartoffel als hochwertige Eiweißquelle nach Ergebnissen von Ernährungsversuchen und von Bausteinanalysen. *Food / Nahrung*, 3, 857–876.
- Sigma-Aldrich Biotechnology (2010). OligoArchitect™ Online: Glossary of Parameters. https://www.gene-quantification.de/oligo_architect_glossary.pdf. Accessed 03.05.2021.
- Smith, D. S., Maxwell, P. W., & Boer, S. H. de (2005). Comparison of several methods for the extraction of DNA from potatoes and potato-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9848–9859.
- Sofos, J. N., Noda, I., & Allen, C. E. (1977). Effects of soy proteins and their levels of incorporation on the properties of weiner-type products. *Journal of Food Science*, 42, 879–884.
- Song, J.-Y., Kim, J.-H., & Kim, H.-Y. (2017). Detection of unapproved genetically modified potatoes in Korea using multiplex polymerase chain reaction. *Food Control*, 80, 19–22.
- Souci, S. W., Fachmann, W., & Kraut, H. (Eds.) (2004). *Der kleine Souci-Fachmann-Kraut: Lebensmitteltabelle für die Praxis*. (3., völlig neu bearb. und erw. Aufl.). Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Souza, A. H. P., Gohara, A. K., Rotta, E. M., Chaves, M. A., Silva, C. M., Dias, L. F., Gomes, S. T. M., Souza, N. E., & Matsushita, M. (2015). Effect of the addition of chia's by-product on the composition of fatty acids in hamburgers through chemometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 928–935.
- Spörl, J., Speer, K., & Jira, W. (2021). A UHPLC-MS/MS Method for the Detection of Meat Substitution by Nine Legume Species in Emulsion-Type Sausages. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10.
- Statistisches Amt der Europäischen Union (Eurostat) (2021). Tabelle: Pflanzliche Erzeugnisse in nationalem Feuchtigkeitsgehalt, Europäische Union - 28 Länder (2013-2020): Kartoffeln/Erdäpfel (einschließlich Pflanzkartoffeln/-erdäpfel). https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/APRO_CPSH1__custom_1288264/default/table?lang=de. Accessed 09.09.2021.
- Strolle, E. O., Cording, J., & Aceto, N. C. (1973). Recovering potato proteins coagulated by steam injection heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21, 974–977.

- Thermo Scientific (2010). NanoDrop™ Nucleic Acid Handbook: Thermo Scientific NanoDrop™ Spectrophotometers. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/ts-nanodrop-nucleicacid-olv-r2.pdf>. Accessed 11.03.2021.
- Toldrá, F. (2010). *Handbook of meat processing*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Uhlig, S., Frost, K., Colson, B., Simon, K., Mäde, D., Reiting, R., Gowik, P., & Grohmann, L. (2015). Validation of qualitative PCR methods on the basis of mathematical–statistical modelling of the probability of detection. *Accreditation and Quality Assurance*, 20, 75–83.
- Union der Deutschen Kartoffelwirtschaft e.V. (UNIKA) (2019). UNIKA Jahresbericht 2019. https://www.unika-ev.de/images/unika/Jahresberichte/UNIKA_Jahresbericht_2019.pdf. Accessed 25.04.2020.
- Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG (2009). Methodensammlung der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik: Qualitative PCR zum Nachweis transgener Kartoffeln mit verändertem Stärkestoffwechsel oder Schädlingsresistenz (AM022). <https://www.lag-gentechnik.de/dokumente/uam-methoden/022C.pdf>. Accessed 16.06.2020.
- Ustunol, Z. (2015). *Applied food protein chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Inc.
- van Koningsveld, G. A., Walstra, P., Gruppen, H., Wijngaards, G., van Boekel, M. A. J. S., & Voragen, A. G. J. (2002). Formation and stability of foam made with various potato protein preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7651–7659.
- van Koningsveld, G. A., Walstra, P., Voragen, A. G. J., Kuijpers, I. J., van Boekel, M. A. J. S., & Gruppen, H. (2006). Effects of protein composition and enzymatic activity on formation and properties of potato protein stabilized emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6419–6427.
- Villa, C., Costa, J., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2017). Novel quantitative real-time PCR approach to determine safflower (*Carthamus tinctorius*) adulteration in saffron (*Crocus sativus*). *Food Chemistry*, 229, 680–687.
- Wehling, P., LaBudde, R. A., Brunelle, S. L., & Nelson, M. T. (2011). Probability of Detection (POD) as a Statistical Model for the Validation of Qualitative Methods. *Journal of AOAC International*, 94, 335–347.
- Wilhelm, J., & Pingoud, A. (2003). Real-time polymerase chain reaction. *ChemBioChem*, 4, 1120–1128.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., & Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, 22, 130–138.
- Zayas, J. F. (1997). *Functionality of proteins in food*. New York: Springer.
- Zimmermann, A., Lüthy, J., & Pauli, U. (1998). Quantitative and qualitative evaluation of nine different extraction methods for nucleic acids on soya bean food samples. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 207, 81–90.