
**Entwicklung von Methoden zum Nachweis von *Cocos nucifera*
im Hinblick auf Kokosnussallergien
sowie im Kontext der Echtheitsprüfung von Kokosblütenzucker**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
Doctor rerum naturalium
Dr. rer. nat.

Universität Hamburg
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Chemie
Institut für Lebensmittelchemie
&
GALAB Laboratories GmbH, Hamburg

vorgelegt von
Jasmin Wrage

Hamburg, 2020

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2016 bis August 2019 unter der Leitung von Dr. Jürgen Kuballa bei der Firma GALAB Laboratories GmbH angefertigt und wissenschaftlich von Prof. Dr. Sascha Rohn des Instituts für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg betreut.

1. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Sascha Rohn
2. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Bernward Bisping

Tag der Disputation: 11. September 2020

Tag der Druckfreigabe: 05. Oktober 2020

Diese Arbeit wurde in Teilen im Rahmen des Projekts
„FOODOMICS“
angefertigt.

Die Förderung dieses Vorhabens erfolgte aus Mitteln des Bundesministeriums für
Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) aufgrund eines Beschlusses des deutschen
Bundestages.

Die Projektträgerschaft erfolgte über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und
Ernährung (BLE) im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung.

(FKZ 281601914)

Hiermit versichere ich ehrenwörtlich, dass die vorliegende Dissertationsschrift von mir selbstständig verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Außerdem erkläre ich, dass ich keinen Promotionsversuch an einer anderen Hochschule oder Fakultät unternommen habe und ich die vorliegende Arbeit noch nicht an einer anderen Stelle in gleicher oder in wesentlichen Teilen ähnlicher Abhandlung als Prüfung eingereicht habe.

Hamburg, den 16. Juni 2020

Jasmin Wrage

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Wrage J., Burmester (geb. Uthmann) S., Kuballa J., Rohn S.,
Coconut sugar (*Cocos nucifera* L.): Production process, chemical characterization, and
sensory properties,
LWT – Food Science and Technology, 112, 2019.

Wrage J., Kleyner O., Rohn S., Kuballa J.,
Development of a DNA-Based Detection Method for *Cocos Nucifera* Using TaqMan™
Real-Time PCR,
Foods, 9, 332, 2020.

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich für die vielfältig erfahrene Unterstützung bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit bedanken:

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. Rohn für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit unter seiner wissenschaftlichen Betreuung am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg anfertigen zu können.

Auch möchte ich mich bei Dr. Jürgen Kuballa für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Geräte bedanken. Ich danke ihm außerdem für die mir übertragene Verantwortung und wissenschaftliche Freiheit.

Ebenso danke ich Frau Carola Biesemann und Herrn Michael Hebandanz von der Delphi Organic GmbH, Frau Dürten Möllgaard und Herrn Rudolf Meincke von Voicevale Ltd. sowie Frau Dr. Steinecke vom Palmengarten Frankfurt und Herrn Eberhardt Kirchner von Elevate Social Businesses Ltd. für die Bereitstellung der Probenmaterialien und ihre kritische Diskussionsbereitschaft.

Ein großer Dank gebührt Oxana Kleyner und Petra Knies-Platte für die Einführung in das molekularbiologische Arbeiten und ihre wertvollen Ratschläge.

Neben ihnen danke ich ebenso Stephanie Burmester für die Organisation und Durchführung zahlreicher sensorischer Verkostungen.

Ein weiterer Dank gilt den Kollegen/innen Kathrin Hofmann, Henning Zaun, Carina Niemann, Enya Ebel, Franziska Schmelter und Christin Claassen sowie vielen anderen GALAB-Mitarbeitern für die erbrachte Unterstützung und viele schöne Momente – auch abseits der Arbeitszeit.

Auch möchte ich mich bei Maike Arndt und Marina Creydt für unsere netten Treffen mit immer ausgiebigen (wissenschaftlichen) Gesprächen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt schließlich neben vielen Freunden (insbesondere Familie Teubner und Familie Cassel) meiner Familie, die mich mein gesamtes Studium hinweg immer moralisch unterstützt hat und jederzeit für mich da ist. Der größte Dank gebührt Timo Hörburger, ohne dessen unermüdlichen Rückhalt, die vielen aufbauenden Worte, wenn mal wieder alles wie verhext war, sowie das stets offene Ohr für meine Gedanken, die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Größen und Maßeinheiten	3
Kapitel 1 Vorwort	5
Kapitel 2 Kurzfassung/Abstract	7
Kapitel 3 Theoretische Grundlagen	11
3.1 Kokospalme, <i>Cocos nucifera</i>	11
3.1.1 Botanische Einordnung, Morphologie und Verwendungszweck	11
3.1.2 Herstellung von Kokosblütenzucker und rechtlicher Hintergrund	12
3.2 Lebensmittelallergie.....	15
3.2.1 Definition und rechtlicher Hintergrund	15
3.2.2 Kokosnussallergie.....	17
3.3 DNA als Analyt	17
3.3.1 DNA-Isolierung und -Charakterisierung	19
3.3.2 Konventionelle PCR und Visualisierung der DNA-Amplifikate.....	21
3.3.3 Real-time PCR und Sondendesign	23
3.3.4 DNA-Sequenzierung.....	24
3.4 Metabolite als Analyten.....	25
3.4.1 Trennung von Metaboliten mittels Flüssigkeitschromatographie	26
3.4.2 Detektion von Metaboliten mittels Massenspektrometrie	28
3.4.3 Auswertung von non-targeted Metabolic-Fingerprinting-Experimenten.....	30
3.5 Weitere analytische Verfahren	32
3.5.1 ELISA	32
3.5.2 ¹³ C/ ¹² C-Stabilisotopenanalyse	32
Kapitel 4 Methodenentwicklung zum DNA basierten Nachweis von	35
<i>Cocos nucifera</i>	
4.1 Zielsetzung und analytische Herangehensweise.....	35
4.2 Material und Methoden.....	35
4.2.1 Probenmaterial.....	35

4.2.2	Primer und Sonden für die PCR	36
4.2.3	Probenvorbereitung und DNA-Isolierung	36
4.2.4	Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der DNA-Isolate.....	36
4.2.5	Konventionelle PCR.....	37
4.2.6	Gelelektrophorese	37
4.2.7	DNA-Sequenzierung.....	37
4.2.8	Real-time PCR.....	38
4.2.8.1	Spezifitätstest.....	38
4.2.8.2	Sensitivitätstest.....	39
4.2.8.3	Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	39
4.3	Ergebnisse	40
4.3.1	Isolierung von DNA aus Palmenblättern	40
4.3.2	Verifizierung der botanischen Herkunft der Palmenblätter	41
4.3.3	Design und Spezifität kokosspezifischer Primer	42
4.3.4	Amplifikation von DNA aus Kokosnuss, Kokoschips und Kokosblütenzucker.....	43
4.3.5	Entwicklung einer TaqMan™-Sonde für die real-time PCR.....	44
4.3.6	Spezifität und Sensitivität des real-time PCR-Assays	45
4.4	Diskussion.....	47
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	47
Kapitel 5 Entwicklung einer Methode zur Echtheitsprüfung von		49
Kokosblütenzucker		
5.1	Zielsetzung und analytische Herangehensweise.....	49
5.2	Probenmaterial.....	50
5.3	DNA basierte Methode.....	50
5.3.1	Methoden.....	50
5.3.1.1	Probenvorbereitung und DNA-Isolierung	50
5.3.1.1.1	CTAB-Methode.....	50
5.3.1.1.2	Modifizierte CTAB-Methode	50
5.3.1.1.3	Wizard-Methode	51

5.3.1.1.4	DNeasy Plant Maxi Kit	51
5.3.1.1.5	PME Food DNA Extraction Kit.....	51
5.3.1.2	Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der DNA-Isolate.....	52
5.3.1.3	Real-time PCR	52
5.3.2	Ergebnisse.....	53
5.3.3	Diskussion.....	57
5.3.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	58
5.4	Metabolomics basierte Methode	59
5.4.1	Methoden.....	59
5.4.1.1	Extraktion.....	59
5.4.1.2	Parameter des UPLC-QToF-MS-Systems	59
5.4.1.3	Parameter zur Datennachverarbeitung mittels UNIFI	61
5.4.2	Ergebnisse.....	62
5.4.3	Diskussion.....	67
5.4.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	67
Kapitel 6	Charakterisierung von Kokosblütenzucker in Hinblick auf.....	69
	dessen Herstellungsprozess	
6.1	Zielsetzung und analytische Herangehensweise.....	69
6.2	Material und Methoden.....	69
6.2.1	Probenmaterial	69
6.2.2	Beschreibung sensorischer Eigenschaften.....	69
6.2.3	Mikroskopische Analyse	70
6.2.4	Bestimmung des Gehalts an Gluten	71
6.2.5	Feuchtigkeitsbestimmung.....	71
6.2.6	Enzymatische Zuckerbestimmung.....	71
6.2.7	¹³ C/ ¹² C-Stabilisotopenanalyse	71
6.3	Ergebnisse	72
6.3.1	Beschreibung sensorischer Eigenschaften.....	72
6.3.2	Bestimmung des Gehalts an Gluten und mikroskopische Analyse.....	73

6.3.3	¹³ C/ ¹² C-Stabilisotopenanalyse	74
6.3.4	Feuchtigkeitsbestimmung und enzymatische Zuckerbestimmung.....	75
6.4	Diskussion.....	76
6.5	Schlussfolgerung und Ausblick	78
Kapitel 7 Zusammenfassende Diskussion.....		81
Kapitel 8 Anhang		85
8.1	Darstellung weiterer Ergebnisse.....	85
8.2	Probenmaterial.....	91
8.3	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software.....	98
8.3.1	DNA basierter Nachweis von <i>Cocos nucifera</i>	98
8.3.2	Analyse unpolarer Metabolite	105
8.3.3	Beschreibung sensorischer Eigenschaften	109
8.3.4	Mikroskopische Analyse	109
8.3.5	Bestimmung des Gehalts an Gluten	111
8.3.6	Feuchtigkeitsbestimmung.....	114
8.3.7	Enzymatische Zuckerbestimmung.....	115
8.3.8	¹³ C/ ¹² C Stabilisotopenanalyse.....	116
Abbildungsverzeichnis		117
Tabellenverzeichnis.....		119
Literaturverzeichnis		121
Lebenslauf		131
Publikationen.....		133

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide</i>
BHQ	<i>Black Hole Quencher</i>
C	Cytosin
¹² C	Kohlenstoff-Isotop mit der Massenzahl 12
¹³ C	Kohlenstoff-Isotop mit der Massenzahl 13
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CH ₂ O ₂	Ameisensäure
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRM	Modell des geladenen Rückstands
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddNTP	Didesoxyribonukleotid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
ELISA	Festphasen-Enzymimmunoassay
ESI	Elektrosprayionisation
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
FAO	Welternährungsorganisation
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEP	Fluorethylenpropylen
for	Vorwärts
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
G	Guanin
GHS	Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien
HACCP	Gefahrenanalyse und kritische Kontrollpunkte
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEM	Ionenemissions-Modell
IgE	Immunglobulin-E
IMS	Ionen-Mobilitäts-Spektrometer
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
IUIS	<i>International Union of Immunological Societies</i>
LC	Flüssigkeitschromatographie
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
MS	Massenspektrometrie
MS ^E	<i>Mass Spectrometry with Elevated Collision Energy Ramp</i>
Na ₂ EDTA	Dinatrium-ethylendiamintetraessigsäure
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NH ₄ HCO ₂	Ammoniumformiat
NMR	Kernresonanzspektroskopie

PC	Hauptkomponente
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Polyethylen
pH	<i>Pondus Hydrogenii</i>
PME	Polymervermittelte Anreicherung
PP	Polypropylen
prk	Phosphoribulokinase
PS	Polystyrol
Q	Quadrupol
QC	Qualitätskontrollprobe
QToF-MS	Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer
RC	Regenerierte Cellulose
rDNA	Ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rev	Rückwärts
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Umkehrphase
RPC	Umkehrphasen-Chromatographie
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
T	Thymin
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBE	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-borat-ethylendiamintetraessigsäure
TE	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-ethylendiamintetraessigsäure
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
ToF-MS	Flugzeit-Massenspektrometer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Größen und Maßeinheiten

%	Prozent
‰	Promille
€	Euro
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
Ct-Wert	Schwellenwert-Zyklus der real-time PCR
d	Kleinster ablesbarer Gewichtswert der Waagen
Da	Dalton
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
bp	Basenpaare
cL	Zentiliter
cm	Zentimeter
counts	Zähleinheit pro Zeitintervall
eV	Elektronenvolt
g	Gramm
h	Stunde
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
L	Liter
log	Dekadischer Logarithmus
m	Meter
mDa	Millidalton
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
n	Anzahl einer Grundgesamtheit
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
pg	Pikogramm
ppm	Anteil pro Million
R ²	Bestimmtheitsmaß
s	Sekunde
T	Temperatur
V	Volt
V	Volumen
X	Vielfaches
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung

Kapitel 1 Vorwort

Die Kokospalme und ihre Früchte, die Kokosnüsse, sind ein Symbol für Exotik. Nicht selten wird die Palme mit unberührten, weißen Sandstränden umgeben von türkisblauen Wasser in einer tropischen Inselwelt in Verbindung gebracht. Der Name leitet sich vom spanischen Wort „coco“ für Schädel, Kopf oder Kinderschreck ab. Es wurde von spanischen Seeleuten eingeführt und beruht auf der Ähnlichkeit des äußeren Erscheinungsbildes der Kokosnuss – ihre faserige, braune Schale und den drei dunklen Keimlöchern – mit einem Affenkopf. Kokosnüsse und Affen können jedoch noch auf eine weitere Art in Verbindung gebracht werden [1]. So werden einigen Orts Affen zu sogenannten Pflückaffen, welche Kokosnüsse ernten, ausgebildet [2].

In Form von Kokosraspeln gibt es Kokosnüsse auch in Europa schon seit langem das gesamte Jahr über im Backregal im Supermarkt zu kaufen. Den Einzug in unsere tägliche Nahrung hat sie damit aber nicht geschafft. Erst in den letzten Jahren ist die Nachfrage nach Kokosnuss oder daraus hergestellten Produkten stark gestiegen und ein regelrechter Kokos-Hype entstanden [3]. Dabei werden der Frucht viele positive Eigenschaften nachgesagt, die Einfluss auf die Gesundheit und die Bekämpfung von Krankheiten haben sollen [4]. Für Kokosnuss-Allergiker stellt dieser Trend jedoch auch ein gesundheitliches Risiko dar. So beschäftigt sich die vorliegende Arbeit in Kapitel 4 mit der Methodenentwicklung zum DNA basierten Nachweis von *Cocos nucifera*. Neben recht bekannten Produkten, wie Kokosöl, Kokoswasser und Kokosmilch, hat auch Kokosblütenzucker in den letzten Jahren den europäischen Markt erobert. Dieses hochpreisige Produkt, über das in Europa bisher wenig bekannt ist, wird von gezieltem Lebensmittelbetrug bedroht. Kapitel 5 widmet sich darum der Entwicklung einer Methode zur Echtheitsprüfung von Kokosblütenzucker, während in Kapitel 6 eine Charakterisierung von Kokosblütenzucker im Hinblick auf dessen Herstellungsprozess erfolgt. Die genannten Kapitel gliedern sich dabei jeweils in eine Zielsetzung und analytische Herangehensweise, gefolgt von einem Abschnitt zu verwendeten Materialien und Methoden, einer Darstellung der Ergebnisse, die anschließend diskutiert werden, sowie einer Schlussfolgerung und einem Ausblick. Kapitel 7 bietet schließlich eine zusammenfassende Diskussion der genannten Kapitel.

Kapitel 2 Kurzfassung/Abstract

Die Kokospalme gehört zu den wirtschaftlich wichtigsten Palmenspezies der Welt und wird nicht ohne Grund auch als „tree of life“ bezeichnet. Während vor allem in tropischen Regionen schon seit Tausenden von Jahren die Früchte vom Menschen als Lebensmittel, zur Körperpflege und als Heilmittel verwendet werden sowie die Blätter und das Holz als Werkstoff für Dächer, Möbel und auch Musikinstrumente dienen, erfreut sich die exotische Frucht nun auch in westlichen Ländern steigender Beliebtheit. Hier ist vor allem auch der Kokosblütenzucker, über dessen Herstellungsprozess in Europa noch wenig bekannt ist, zu nennen. Als Alternative zum herkömmlichen raffinierten Haushaltszucker gewinnt er zunehmend an Begehrtheit. Verbunden mit dem steigenden Konsum kokosnusshaltiger Lebensmittel nimmt allerdings auch das Risiko auftretender Kokosnussallergien zu. Um für Betroffene schwerwiegende gesundheitliche Folgen zu vermeiden, ist eine angemessene Kennzeichnung und Überprüfung der Lebensmittel wichtig.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein DNA basiertes Nachweisverfahren für *Cocos nucifera* zu entwickeln. Zu diesem Zweck wurden zunächst drei kokosspezifische Primerpaare designt und getestet. Um einen Nachweis mittels real-time PCR zu ermöglichen, wurde, passend zum ausgewählten Primerpaar, eine TaqMan™-Sonde entworfen. Das Primer-/Sondensystem wurde sowohl hinsichtlich der Spezifität als auch der Sensitivität geprüft. Dabei zeigten die 27 getesteten Pflanzen- und Tierarten keinerlei Kreuzreaktivität mit dem System. In einer Verdünnungsreihe wurde eine Nachweisgrenze von 1 pg/μL abgeschätzt.

Der entwickelte Assay sollte im Anschluss auch dazu genutzt werden, die Echtheit von Kokosblütenzucker zu kontrollieren. Hierfür musste jedoch zunächst eine geeignete Extraktionsmethode ausgewählt werden. Dazu wurden verschiedene Methoden eingehend geprüft und miteinander verglichen. Zur Erhöhung der Präzision waren außerdem Modifikationen des Extraktionsprotokolls nötig. Die benötigte Genauigkeit der Methode konnte jedoch unter Berücksichtigung der Material- und Arbeitskosten nicht erzielt werden.

Alternativ wurde ein Metabolomics basierter Ansatz zur Differenzierung verschiedener Zucker getestet. Hierbei wurde festgestellt, dass sich der Herstellungsprozess von Kokosblütenzucker regional unterscheidet. Aufgrund dieses Einflussfaktors erwies sich die hier verwendete Methode als nicht dazu geeignet, Kokosblütenzucker von anderen Zuckern zu unterscheiden.

Es folgte schließlich eine Charakterisierung von Kokosblütenzucker, um Rückschlüsse auf den Herstellungsprozess ziehen zu können. Hierfür wurden etablierte Methoden, wie die enzymatische Zuckerbestimmung, ¹³C/¹²C-Stabilisotopenanalyse, Glutenbestimmung mittels ELISA, mikroskopische Analysen sowie sensorische Beschreibungen, verwendet. Insgesamt standen der Studie 107 Kokosblütenzuckerproben zur Verfügung. Während in 10 von 59 (= 17 %) getesteten

Proben ein signifikanter C₄-Zusatz (≥ 10 g/100 g) nachgewiesen werden konnte, enthielten 3 von 36 (= 8 %) Proben Gluten (≥ 20 mg/kg). Bei der Beurteilung der Ergebnisse mussten sowohl verfahrenstechnische Gründe als auch Versuche der Ertragssteigerung durch Streckung berücksichtigt werden. Außerdem mussten stets natürliche Schwankungen des Naturprodukts sowie Unterschiede aufgrund des nicht standardisierten Herstellungsprozesses beachtet werden.

The coconut palm is one of the economically most important palm species in the world and is also called "tree of life". In tropical regions, humans have used the fruits as food, medicine, and cosmetics for thousands of years. Even the leaves and the wood have served as material for roofs, furniture, and musical instruments. Nowadays, the exotic fruit also gains popularity in occidental countries. In this context, coconut blossom sugar should also be mentioned. Not much is known about its manufacturing process in Europe, but it is increasingly gaining popularity as an alternative sweetener to conventionally refined sugar.

However, due to the growing consumption of coconut-containing foods, the number of coconut allergies may also increase. To prevent serious health consequences appropriate food labeling and food control is particularly important.

The aim of this study was to develop a DNA-based detection method for *Cocos nucifera*. For this purpose, three sets of coconut-specific primers were designed and tested. To identify coconut by real-time PCR a TaqMan™ probe was then developed. Specificity and sensitivity of the primer/probe system were tested. The assay did not show any cross reactivity with 27 other plants and animals. In a dilution series, a limit of detection of 1 pg/ μ L was determined.

The developed assay should also be used to check the authenticity of coconut sugar. Therefore, it was first necessary to select a suitable extraction method. Various methods were tested in detail and compared with each other. In order to increase the precision modifications of the extraction protocol had to be done. However, the required accuracy of the method could not be achieved by taking material and labor costs into account.

Alternatively, a metabolomics-based approach was tested to differentiate between various sugars. It was found that the sugar production process differs from region to region. Due to this influencing factor, the method used here proved to be unsuitable for distinguishing coconut blossom sugar from other sugars.

Finally, coconut blossom sugar was characterized in order to draw conclusions about the manufacturing process. Established methods such as enzymatic sugar determination, ¹³C/¹²C stable isotope analysis, gluten determination using ELISA, microscopic analyses and sensory

descriptions were used. A total of 107 coconut blossom sugar samples were available for the study. While a significant C₄ addition (≥ 10 g/100 g) was detected in 10 of 59 (= 17 %) tested samples, 3 of 36 (= 8 %) samples contained gluten (≥ 20 mg/kg). When evaluating the results, both technological reasons and attempts to increase the yield by dilution/substitution had to be considered. In addition, fluctuations of the natural product and differences associated with the non-standardized manufacturing process had to be taken into account all the time.

Kapitel 3 Theoretische Grundlagen

3.1 Kokospalme, *Cocos nucifera*

3.1.1 Botanische Einordnung, Morphologie und Verwendungszweck

Die Kokospalme (*Cocos nucifera*) gehört taxonomisch zur Familie der *Palmae*, auch *Arecaceae* genannt, in die Gattung *Cocos*. Diese ist seit der letzten Klassifizierung monotypisch. Sie besteht mit *Cocos nucifera* somit nur aus einer Art [5].

Die monokotyledonen Palmen können 20-30 m hoch werden. Ihr Stamm ist, wie in Abbildung 1 a) gezeigt, typischerweise schlank und unverzweigt. An seiner Spitze befindet sich der Blattschopf aus bis zu 30-40 Fiederblättern von 3-6 m Länge. Aus den Blattachseln entspringen die rispenartigen Blütenstände, die bis zu 50 weibliche und mehrere Tausend männliche Blüten tragen können. Diese werden durch Insekten sowie den Wind bestäubt und es kommt zur Fruchtbildung. Botanisch gesehen handelt es sich bei den Früchten der Kokospalme nicht um Nüsse, sondern Steinfrüchte. Wie in Abbildung 1 c) schematisch dargestellt, besteht die Außenschicht aus einem grünen bis gelben, ledrigen Exokarp, unter dem sich ein faseriges Mesokarp befindet. Unterhalb des Mesokarps folgt das verholzte Endokarp, das den Samen umgibt. Dieser ist mit Endosperm und Wasser gefüllt. Die Frucht braucht circa zwölf Monate, um heranzureifen. Währenddessen trocknet das zunächst noch fleischige Mesokarp. Gleichzeitig verdickt sich das Endosperm und härtet entlang der Samenschale, dem sogenannten Testa, aus. Im Zuge der Dehydratisierung nimmt das Gewicht der Kokosnuss schließlich von 3-4 kg auf 1,5-2 kg ab. Eingebettet in Endosperm reift unterhalb einer der drei Keimporen der Embryo heran [6].

Der ungewöhnliche Fruchtaufbau sorgt dafür, dass Kokosnüsse schwimmfähig sind und Tausende Kilometer im Meer zurücklegen können. So sind die Kokospalmen heute entlang tropischer Küsten auf der ganzen Welt verbreitet. Ihr Ursprungszentrum wird auf den südwestlichen Inseln des pazifischen Ozeans vermutet [7].

Kokospalmen können über 100 Jahre alt werden und im Alter von 12-40 Jahren bis zu 80 Früchte gleichzeitig tragen. In Plantagen, in denen sie seit Mitte des 19. Jahrhunderts angebaut werden, werden sie jedoch nur etwa 30 Jahre lang genutzt. Danach sind die Palmen meist zu hoch.

Schon seit Jahrtausenden werden die Früchte als Nahrungsmittel, in der Kosmetik oder auch Medizin verwendet. Die Blätter und das Holz dienen als Werkstoff für Dächer, Möbel und auch Musikinstrumente. Kokosnüsse finden in Form von Kokosmilch, Kokosraspeln, Kokosfett und vielem mehr weltweit Absatz [7]. Die Kokospalme ist eine der wirtschaftlich bedeutendsten Palmenarten der Welt. Nach Statistiken der Welternährungsorganisation (*Food and Agriculture*

Organization, FAO) der Vereinten Nationen liegt ihr Hauptanbaugebiet in Indonesien, auf den Philippinen und in Indien [8].

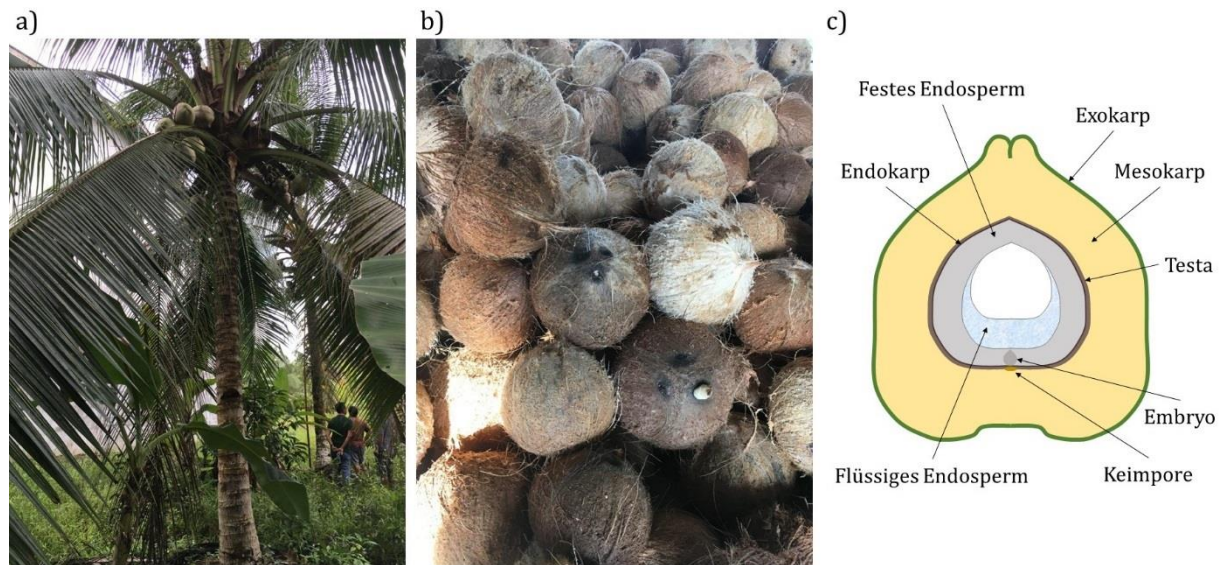


Abbildung 1: Die Kokospalme (*Cocos nucifera*) und ihre Frucht. a) Die unverzweigte, schlanke Palme. b) Die Kokosnuss – der eigentliche Steinkern der Frucht. c) Schematischer Längsschnitt durch die Frucht in Anlehnung an [7] (Fotos: Delphi Organic GmbH, Münster, Deutschland).

3.1.2 Herstellung von Kokosblütenzucker und rechtlicher Hintergrund

Kokosblütenzucker ist ein Süßungsmittel, das traditionell in der süd- und südostasiatischen Küche verwendet wird [9].

Der Zucker wird aus dem Phloemsaft der Kokosblüte gewonnen [10], indem Erntehelfer die Palmen hinaufklettern, die noch ungeöffneten Blütenstände mit einer Sichel anschneiden und den austretenden Saft über 8-12 h in Kunststoff- oder Bambusbehältern sammeln. Um eine Gärung des Safts zu verhindern, enthalten die Behältnisse oft bereits antifermentative Zusätze, wie Kalk, Rinden und Blätter [9; 11; 12]. Der gesammelte Saft, häufig auch Nektar genannt, wird anschließend über offenem Feuer, unter ständigem Rühren erhitzt bis er sich schließlich verdickt und kristallisiert [9; 10; 12]. Der fertige Zucker wird gesiebt und handverlesen, um ein möglichst feinkörniges Produkt zu erhalten. In Abhängigkeit vom Herstellungsprozess kann die Farbe des Endprodukts von hell- bis dunkelbraun variieren [13].

Abbildung 2 zeigt Ausschnitte aus der Kokosblütenzuckerherstellung.



Abbildung 2: Herstellungsprozess von Kokosblütenzucker. a) Ernte des Phloemsafts, der b) über offenem Feuer erhitzt wird bis er c) verdickt und kristallisiert (Fotos: Delphi Organic GmbH, Münster, Deutschland).

Jede Kokospalme bildet durchschnittlich einen Blütenstand pro Monat. Jeder Blütenstand ergibt etwa 1,5 L Saft pro Tag, der zweimal täglich – einmal morgens und einmal abends – geerntet werden kann. 100 g frischer Phloemsaft enthalten ca. 15 g Zucker, sodass pro Tag und Blütenstand ca. 200 g Zucker produziert werden können [11].

Kokospalmen können bereits im Alter von sieben Jahren zur Saftgewinnung angezapft und über 20 Jahre hinweg genutzt werden. Um den Saftfluss jedoch durchgängig aufrecht zu erhalten, müssen vor jeder Ernte 1-2 mm des Blütenstandes abgeschnitten werden. Auf diese Weise reduziert sich der Blütenstand allmählich zu einem kurzen Stumpf, sodass ein einzelner Blütenstand nur 40-45 Tage genutzt werden kann. Ungefähr drei Wochen vor Erreichen dieses Endpunktes wird bereits der nächste Blütenstand zur Ernte vorbereitet. Pro Palme können so 2-3 Blütenstände gleichzeitig angezapft werden [9; 11].

Neben Kokosblütenzucker können aus dem Phloemsaft noch viele weitere Produkte hergestellt werden, z. B. Essig, Wein oder Sirup [12].

Noch vor wenigen Jahren war Kokosblütenzucker in Europa nahezu unbekannt. Doch im Zuge des neuen Bewusstseins für eine gesunde Ernährung erobert der Zucker auch dort die Verkaufsfelder. Auf der Suche nach alternativen Süßungsmitteln zum herkömmlichen raffinierten Haushaltszucker werden Verbraucher vor allem dadurch gelockt, dass Kokosblütenzucker traditionell von Kleinbauern produziert wird, die Palmen im Mischanbau mit weiteren Nutzpflanzen biologisch wachsen und der Zucker einen niedrigeren glykämischen Index aufweist als herkömmlicher raffinierter Rohr- oder Rübenzucker. Aus diesem Grund sind Verbraucher oft bereit, hohe Preise für Kokosblütenzucker zu zahlen. Der Preis für ein Kilogramm variierte 2016

zwischen 15-46 €. Zum Vergleich: Ein Kilogramm herkömmlicher, raffinierter Haushaltszucker kostete 2016 durchschnittlich nur 0,70 € [14].

Aufgrund der Neuheit auf dem europäischen Markt fehlt allerdings eine rechtlich vorgeschriebene Bezeichnung des Produkts. Weder auf nationaler Ebene in Deutschland noch innerhalb der Europäischen Union gibt es in horizontalen oder vertikalen Rechtstexten, wie der Verordnung (EU) Nr. 1308/2013 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. Dezember 2013 über eine gemeinsame Marktorganisation für landwirtschaftliche Erzeugnisse [15] oder der Zuckerartenverordnung vom 23. Oktober 2003 [16], eine Definition für das Produkt. Nach Art. 9 Abs. 1 Bst. a der EU-Lebensmittelinformationsverordnung Nr. 1169/2011 ist die Bezeichnung des Lebensmittels jedoch eine verpflichtende Angabe und muss, sofern es keine rechtlich vorgeschriebene Bezeichnung gibt, gemäß Art. 17 Abs. 1 dieser Verordnung durch eine verkehrsübliche oder, falls auch eine solche nicht vorliegt, durch eine beschreibende Bezeichnung ersetzt werden. Dabei ist wichtig, dass das Produkt durch seine Bezeichnung ausreichend von anderen Erzeugnissen abgegrenzt werden kann und Irreführungen des Verbrauchers ausgeschlossen sind [17].

Derzeit wird das Produkt sowohl als Kokosblütenzucker, Kokoszucker oder auch Palmzucker in Deutschland in den Verkehr gebracht. Besonders letztere Bezeichnung liefert dem Verbraucher jedoch keine Rückschlüsse über die botanische Herkunft. Da Palmzucker auch aus vielen anderen Palmarten, wie der Zuckerpalme (*Arenga pinnata*), Palmyrapalme (*Borassus flabellifer*) oder Nipapalme (*Nypa fruticans*), gewonnen werden kann, ist hier die beschreibende Bezeichnung nicht eindeutig genug gewählt worden und eine Verwechslung nicht ausgeschlossen [12; 14]. Die botanische Herkunft sollte aus diesem Grund zwingender Bestandteil der Bezeichnung sein. Mit der Ergänzung der Bezeichnung um den Begriff „Blüte“ erhält der Verbraucher außerdem eine Auskunft über die Gewinnungsart, welche maßgeblich zur Kaufentscheidung beitragen kann. So erfolgt die Gewinnung von Kokoszucker nicht zwangsläufig aus den Blütenständen. In Westafrika ist es üblich, Kokospalmen zu fällen, um den Saft zu zapfen. Diese Gewinnung ist nicht nachhaltig [7] und kann auf Ablehnung beim Verbraucher stoßen. Es ist darum zu empfehlen, das Produkt mit seiner Bezeichnung so genau wie möglich zu beschreiben. Dies ist bei der beschreibenden Bezeichnung Kokosblütenzucker gegeben.

3.2 Lebensmittelallergie

3.2.1 Definition und rechtlicher Hintergrund

Eine Lebensmittelallergie ist eine immunologische Überempfindlichkeitsreaktion des Körpers auf bestimmte allergene Proteine. Dabei sind vor allem Immunglobulin-E (IgE)-vermittelte Reaktionen, die auch als Sofortreaktion (Typ-I-Reaktion) bezeichnet werden, weit verbreitet. Sie führen bereits innerhalb weniger Stunden zu einer allergischen Reaktion in Form von Hautausschlag, Schwellungen der Mundschleimhäute, Magen-Darm-Beschwerden oder auch Herz-Kreislaufversagen [18; 19].

Bevor es jedoch zu einer allergischen Reaktion kommt, findet zunächst eine Sensibilisierung (Abbildung 3 a)) statt. In dieser noch beschwerdefreien Phase bilden die B-Zellen des Immunsystems der Betroffenen IgE-Antikörper gegen das eigentlich harmlose allergene Protein. Kommt es dann zu einer wiederholten Aufnahme des Allergens, wird dieses an die IgE-Antikörper gebunden. Hierdurch werden, wie in Abbildung 3 b) dargestellt, Botenstoffe, wie Histamin, aus den zuvor sensibilisierten Mastzellen freigesetzt. Diese verursachen dann die beschriebene klinische Symptomatik [20].

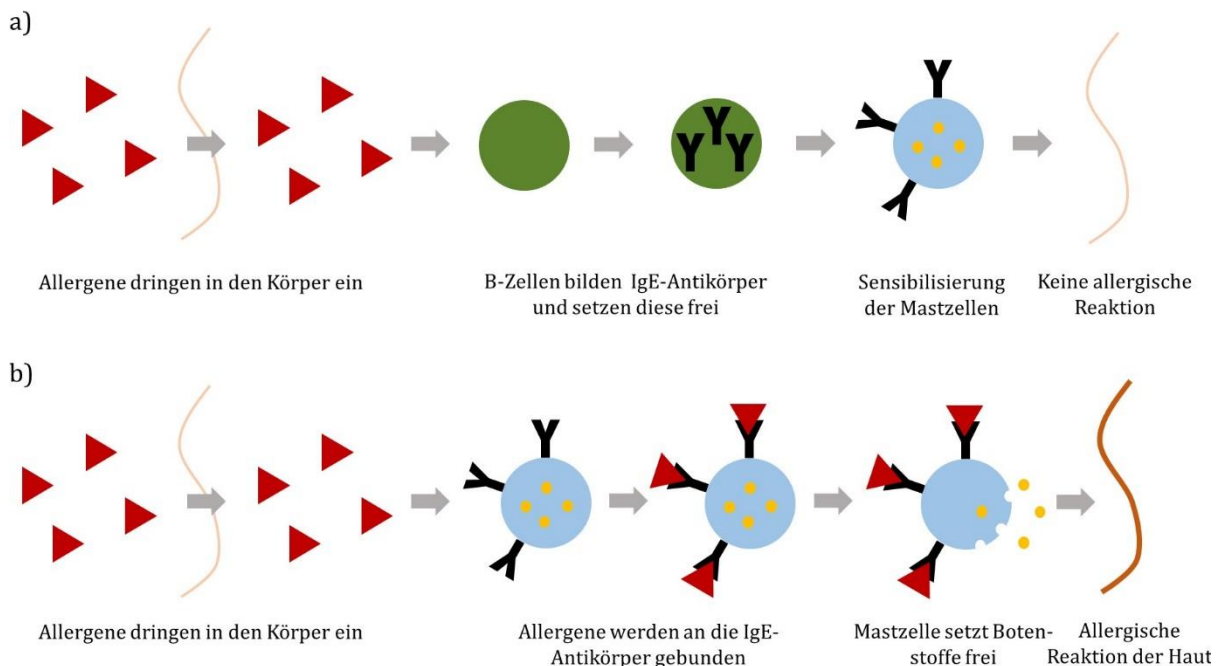


Abbildung 3: Ablauf einer allergischen Reaktion bei a) Erstkontakt und b) Zweitkontakt in Anlehnung an [21].

Die Schwere einer allergischen Reaktion hängt neben individuellen, patientenbezogenen Faktoren, wie Stress, Infektionen oder anderweitigen Allergenbelastungen, auch vom Verarbeitungsgrad des Lebensmittels ab [20]. Insbesondere durch thermische Behandlungen können Proteine denaturiert werden, was wiederum die Schwere der allergischen Reaktion beeinflussen

kann [22; 23]. Vor diesem Hintergrund ist die Einführung eines oft geforderten allgemeinen Schwellenwertes schwierig.

Es wird davon ausgegangen, dass in Europa 1-3 % der Erwachsenen und 4-6 % der Kinder unter Lebensmittelallergien leiden [19]. Dabei variiert die Häufung bestimmter Lebensmittelallergien sowohl in Abhängigkeit von der betrachteten Altersgruppe als auch von der geographischen Region. So sind in Deutschland vor allem Kuhmilch- und Hühnereiallergien unter Säuglingen und Kleinkindern verbreitet. Bei Erwachsenen hingegen treten Allergien gegen Nüsse, Samen, Fisch und Meeresfrüchte häufiger auf. In den USA spielt besonders die Erdnussallergie eine große Rolle, während in Japan Fischallergien dominieren [20; 24; 25].

Nicht unüblich ist außerdem das Auftreten sogenannter Kreuzallergien. Dabei weisen andere Proteine dem eigentlichen Allergen ähnelnde Strukturen auf. Infolgedessen kann es auch bei ihrer Aufnahme zum Auftreten von allergischen Reaktionen kommen. So sind Birkenpollenallergiker häufig auch gegen Kern- und/oder Steinobst allergisch [24].

Da es in der klinischen Routine bisher keine ursächliche Immuntherapie gegen Lebensmittelallergien gibt, sollten sich Betroffene dem allergenen Lebensmittel strikt enthalten, um schwerwiegende gesundheitliche Folgen zu vermeiden.

Dafür ist für die Betroffenen eine angemessene Allergenkennzeichnung der Lebensmittel besonders wichtig. Dies wird mit der EU-Lebensmittelinformationsverordnung Nr. 1169/2011 gewährleistet. Sie enthält eine Liste der 14 wichtigsten allergenen Lebensmittel und regelt deren Kennzeichnung [17]. Davon unberücksichtigt bleiben jedoch Spuren versteckter Allergene, die durch Kreuzkontaminationen unbeabsichtigt in Lebensmittel gelangen können und eine große Gesundheitsgefährdung für Allergiker darstellen. Mit dem Hinweis „kann Spuren von ... enthalten“ können Lebensmittelhersteller vor diesem Risiko warnen. Es handelt sich um eine freiwillige Angabe, die gesetzlich nicht vorgeschrieben ist [26]. Ein pauschaler Gebrauch der Floskel führt jedoch zu unnötigen Einschränkungen betroffener Verbraucher.

Empfindliche und spezifische Verfahren zum Nachweis von Allergenen sind deshalb für ein verlässliches Allergenmanagement in der Lebensmittelindustrie und -überwachung unerlässlich. Dabei sind Festphasen-Enzymimmunoassays (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ELISA), die auf hochspezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen basieren (siehe 3.5.1), nach wie vor die am häufigsten verwendete Methode zum Nachweis von Allergenspuren in Lebensmitteln [19]. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass der ELISA nur eine begrenzte Anzahl von Zielproteinen nachweist. Alleine für die Erdnuss wurden nach der Allergennomenklatur der *Weltgesundheitsorganisation* (*World Health Organisation*, WHO) und der *International Union of Immunological Societies* (IUIS) 17 Allergene beschrieben [27]. Der Hauptnachteil dieses Verfahrens ist jedoch der zwingende Bedarf an Tieren zur Herstellung der Antikörper. Um Tiere, die zu wissenschaftlichen

Zwecken verwendet werden, besser vor Schmerzen, Leiden, Ängsten und dauerhaften Schäden zu schützen, werden Tierversuche in vielen Ländern immer mehr eingeschränkt, wie z. B. durch die Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Demnach sollte nur auf Tierversuche zurückgegriffen werden, wenn es keine tierversuchsfreie Alternative gibt [28].

Eine Alternativmethode stellt die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) dar. Sie ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung Matrix-spezifischer Desoxyribonukleinsäure (*Deoxyribonucleic Acid*, DNA)-Sequenzen (siehe 3.3.3) und ist eine indirekte Methode zum Nachweis von Lebensmittelallergenen [19].

3.2.2 Kokosnussallergie

Die allergische Reaktion, ausgelöst durch Kokosnüssen, wird derzeit auf 7S- und 11S-Globulinproteine zurückgeführt. Letzteres ist auch unter dem Namen Cocosin bekannt. In der Literatur wurden zwar bislang nur wenige Fälle von IgE-vermittelten Kokosnussallergien erwähnt, jedoch wurden 7S-Globuline bereits als Allergene in Walnüssen und Haselnüssen beschrieben. So können Patienten, die gegen Nüsse allergisch sind, Kreuzallergien gegen Kokosnüsse zeigen. Da neben Hautausschlägen auch Anaphylaxien auftreten können, stellt dies eine schwerwiegende Gesundheitsgefahr für Betroffene dar. Selbst nach jahrelanger symptomfreier oraler oder dermalen Exposition von Kokosnüssen, können sich allergische Reaktionen entwickeln [29-32].

Während Kokosnuss nach der EU-Lebensmittelinformationsverordnung Nr. 1169/2011 in der Europäischen Union nicht zu den kennzeichnungspflichtigen allergenen Lebensmittel zählt [17], muss die Zutat nach dem *Food Labeling Guide* vom Januar 2013 der *Food and Drug Administration* (FDA) in den USA deutlich gekennzeichnet werden. Aufgrund der hohen Prävalenz von Erdnuss- und Nussallergien sind hier die Bedenken möglicher Kreuzallergien besonders groß [33].

3.3 DNA als Analyt

Desoxyribonukleinsäure (*Deoxyribonucleic Acid*, DNA) ist in jedem Lebewesen zu finden und trägt die gesamte Information zur Entwicklung und Funktion des Organismus in sich. Der Aufbau der DNA ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt. Es handelt sich um ein doppelsträngiges Polymer, das aus lediglich vier verschiedenen Bausteinen, den sogenannten Desoxyribonukleotiden (dNTPs), zusammengesetzt ist. Ein dNTP wiederum besteht aus einem Zucker mit 5 Kohlenstoffatomen, der 2-Desoxyribose, die am 5'-C-Atom eine Phosphatgruppe gebunden hat und über eine N-glykosidische Bindung des 1'-C-Atoms eine Base trägt. Hierbei lassen sich die Purinbasen Adenin (A) und Guanin (G) von den Pyrimidinbasen Cytosin (C) und Thymin (T) unterscheiden.

Über Phosphorsäurediesterbindungen zwischen dem 5'-C-Atom einer Desoxyribose und dem 3'-C-Atom des nächsten dNTP lassen sich die Bausteine zu einem langen Polymer verknüpfen. Indem sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen zweier Einzelstränge ausbilden, entsteht eine doppelsträngige DNA mit den nach innen gerichteten Basenpaaren und einem außenliegenden Zucker-Phosphat-Rückgrat. Hierbei paart sich immer A mit T über zwei und C mit G über drei Wasserstoffbrückenbindungen. So lässt sich bei Bekanntsein der Sequenz des einen DNA-Strangs die Basenreihenfolge des Gegenstrangs einfach herleiten. Dies wird auch als Komplementarität bezeichnet. Auch wenn die Erbinformation zweier komplementärer DNA-Stränge gleich ist, so ist ihre Sequenz folglich nicht identisch. Obwohl beide Stränge in entgegengesetzte Richtung verlaufen, sie also antiparallel sind, wird die Basenreihenfolge immer in 5'-3'-Richtung angegeben. Im Hinblick auf die Proteinbiosynthese kodieren immer drei aufeinanderfolgende dNTPs eine Aminosäure. Der Abschnitt, der schließlich ein Protein kodiert, wird als Gen bezeichnet und stellt die kleinste Funktionseinheit im Genom dar [34; 35].

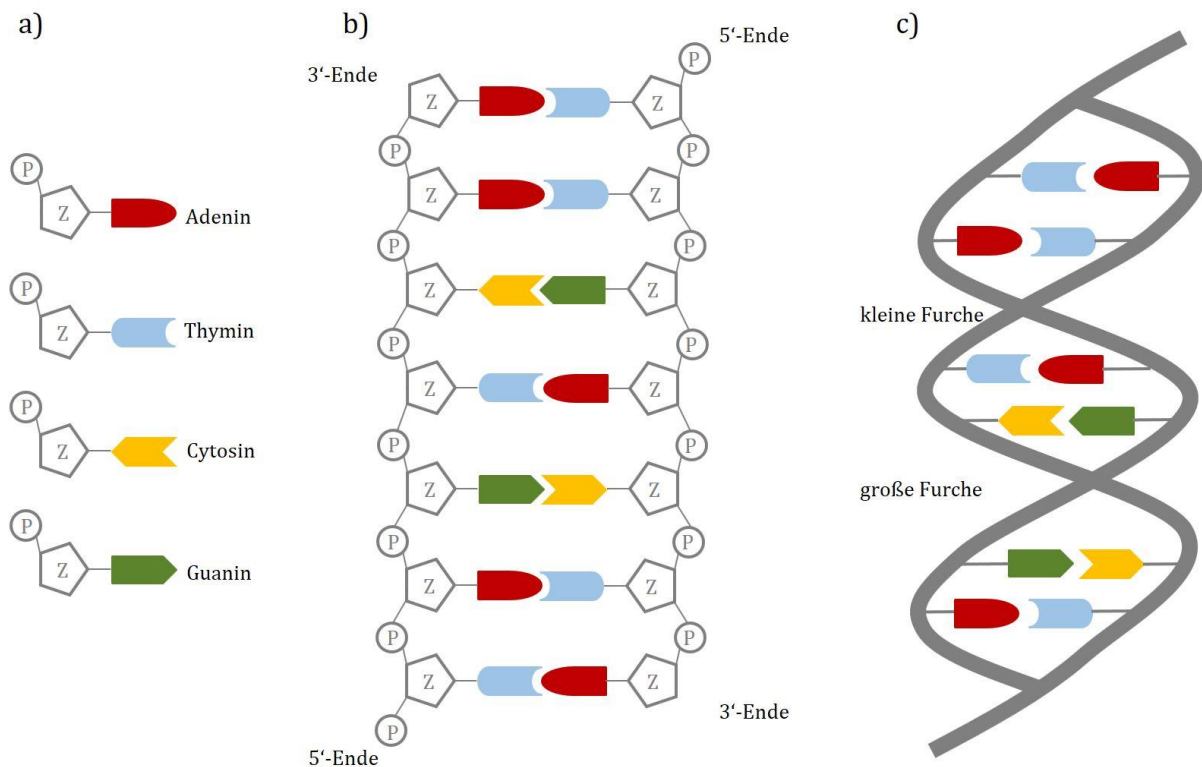


Abbildung 4: Aufbau der DNA aus a) den 4 verschiedenen Desoxynukleotiden. b) Die komplementären DNA-Doppelstränge, die sich c) zur Helix winden, in Anlehnung an [36].

In Abhängigkeit vom Organismus kann eine DNA mehrere Milliarden Basenpaare und somit mehrere Meter lang sein, wobei kein klarer Zusammenhang zwischen der Länge der DNA und der Komplexität des Organismus besteht [35]. Um die DNA im Zellkern verwahren zu können, ist eine starke Komprimierung notwendig. Dazu ist der Doppelstrang meist rechtsgängig zu einer Helix gewunden. Dabei beinhaltet eine Windung 10,5 Basenpaare. Zwischen den Windungen entstehen durch diese Konformation abwechselnd große und kleine Furchen, welche z. B. als regulatorische

Bindungsstellen dienen können, ohne dass die helikale Struktur geöffnet werden muss. Diese sogenannte B-Form wird auch als WATSON-CRICK-Struktur bezeichnet. Zur weiteren Komprimierung wird die Helix um positiv geladene Proteine, sogenannte Histone, gewickelt. Im Zuge der Zellteilung können diese als Chromatin bezeichneten Fasern weiter zu Chromosomen aufkondensieren. Diese stark verkürzte Form der DNA ist schließlich unter dem Mikroskop sichtbar und stellt die Transportform der DNA dar. Die menschliche DNA ist auf 46 Chromosomen aufgeteilt, von denen jedes in doppelter Ausführung vorliegt, was als diploid bezeichnet wird und 23 Chromosomenpaaren entspricht. Im Unterschied dazu gibt es auch sogenannte polyploide Arten, wie den Weichweizen [34]. Er hat insgesamt 42 Chromosomen in einem sechsfachen Chromosomensatz vorliegen [7].

Die Basenabfolge bestimmt die gesamte genetische Erbinformation und ist für jedes Individuum einzigartig, wobei mit steigendem Verwandtschaftsgrad Analogien in den DNA-Sequenzen zunehmen. Im Gegensatz zu Proteinen und Metaboliten wird die DNA kaum von äußeren Faktoren beeinflusst und ist deshalb ein idealer Analyt in der Phylogenetik, Forensik oder auch der Lebensmittelchemie.

3.3.1 DNA-Isolierung und -Charakterisierung

Für die erfolgreiche Durchführung DNA basierter Nachweismethoden ist die Qualität und Quantität der vorliegenden DNA ein ausschlaggebendes Kriterium. So gibt es in Abhängigkeit von der Matrix, der Fragestellung sowie dem zur Verfügung stehenden Budget eine Vielzahl verschiedener konventioneller Extraktionsprotokolle, aber auch kommerziell erhältliche Kits. Im Allgemeinen lässt sich die DNA-Isolierung jedoch in die drei Arbeitsschritte – 1. Lyse der Matrixzellen, 2. Reinigung, 3. Aufnahme in Puffer – unterteilen.

Bei der Lyse werden die Matrixzellen aufgeschlossen. Dies kann auf mechanischem Weg, z. B. durch Mörsern, erfolgen oder durch nicht mechanische Verfahren, wie einen osmotischen Schock, die Zugabe grenzflächenaktiver Detergenzien, Verwendung von Enzymen, Einstellung eines alkalischen pH-Werts oder auch durch thermisches Einwirken. Oftmals wird eine Kombination dieser Verfahren ausgewählt. Wichtig ist hier vor allem auch die Inhibierung von Nukleasen, die die DNA enzymatisch degradieren würden. Hierfür werden häufig Chelatbildner eingesetzt [19].

Im nächsten Schritt muss die DNA isoliert und gereinigt werden. Dazu werden oft die Löslichkeitseigenschaften der DNA ausgenutzt. Bei der in dieser Arbeit angewendeten klassischen Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)-Methode wird der wässrige Überstand mit einem Natriumchlorid (NaCl)-haltigen CTAB-Präzipitationspuffer versetzt. Es kommt zum Aussalzeffekt, bei dem das kationische Detergens mit der DNA ein Präzipitat bildet und inhibitorische Matrixkomponenten als Überstand entfernt werden können.

Durch eine anschließende Erhöhung der NaCl-Konzentration und Zugabe von Trichlormethan/3-Methyl-1-butanol (24/1; V/V) werden verbliebene Proteine, Polysaccharide wie auch sekundäre Inhaltsstoffe komplexiert und verbleiben in der organischen Phase, während die DNA in der wässrigen Phase vorliegt. Nach Abtrennung der organischen Phase folgt eine weitere Reinigung der DNA. Dazu wird die DNA zunächst mit 2-Propanol gefällt und anschließend mit 70%igem Ethanol nachgewaschen. Nachdem der Ethanol vollständig verdampft ist, lässt sich die gereinigte DNA in Puffer aufnehmen [19; 37].

Um das Ausfällen besonders niedrigerer DNA-Konzentrationen zu erleichtern und die Ausbeute zu erhöhen, kann eine Aufkonzentrierung durch Zugabe von Polymeren, wie Glykogen oder Nukleinsäuren, die die spätere Analytik nicht stören, hilfreich sein [19; 35; 38].

Neben diesem Präzipitationsverfahren sind auch Aufreinigungen der DNA mittels Festphasenextraktion weitverbreitet. Dabei bindet die DNA an der Oberfläche von kommerziell erhältlichen Silica-Säulen. Nachdem inhibitorische Substanzen von der Säule gespült wurden, kann die gereinigte DNA mit Puffer eluiert werden [35].

Unabhängig vom ausgewählten Extraktionsprotokoll ist es wichtig, dass die DNA im Laufe der Isolierung weder durch Einwirkung von Scherkräften noch durch zu hohe Temperaturen oder durch zu niedrige pH-Werte zu stark fragmentiert und dadurch für die nachfolgende Analytik unbrauchbar gemacht wird [19; 35].

Nach der DNA-Isolierung erfolgt meist eine spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Qualität und -Quantität. Hierbei werden die Adsorptionseigenschaften der aromatischen Ringe der vier Basen A, C, G und T bei einer Wellenlänge von 260 nm genutzt. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1 einer Konzentration von 50 µg/mL doppelsträngiger DNA. Zur Bestimmung der Reinheit wird der Quotient aus der Adsorption bei 260 nm und 280 nm, dem Adsorptionsmaximum von Proteinen, bestimmt. Der Wert sollte idealerweise zwischen 1,8-2,0 liegen. Werte darüber oder darunter sind meistens ein Zeichen für Verunreinigungen. Da bei dieser Methode allerdings auch freie dNTPs, einzelsträngige DNA sowie Ribonukleinsäure (*Ribonucleic Acid*, RNA) miterfasst werden, handelt es sich eher um eine grobe Abschätzung der DNA-Konzentration. Eine genauere Bestimmung der DNA-Quantität kann mit Hilfe von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen, die spezifisch an die DNA-Doppelhelix binden, vorgenommen werden. Auch eine Entfernung von RNA durch Zugabe von Ribonuklease (RNase) während der DNA-Isolierung kann hilfreich sein [19; 35].

Um die isolierte DNA für molekularbiologische Methoden nutzen zu können, muss in der Regel zunächst eine Vervielfältigung mittels Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) erfolgen.

3.3.2 Konventionelle PCR und Visualisierung der DNA-Amplifikate

Die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ist eine enzymkatalysierte *in-vitro*-Methode zur Vervielfältigung kleinster Mengen definierter DNA-Sequenzen. Das von KARY B. MULLIS 1986 eingeführte Verfahren besteht dabei aus lediglich drei Phasen – Denaturierung, Annealing und Elongation –, die mehrfach hintereinander wiederholt werden, sodass es, wie in Abbildung 5 schematisch gezeigt, zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA-Ausgangsmenge kommt [19].

Während der Denaturierungsphase wird der Reaktionsansatz auf $\geq 95\text{ °C}$ erhitzt, sodass sich die DNA-Doppelstränge voneinander trennen und DNA-Einzelstränge als Template zur Verfügung stehen. Um im weiteren Verlauf neue DNA-Gegenstränge zu synthetisieren, muss das Reaktionsgemisch neben einem Überschuss an dNTPs, eine Polymerase sowie spezifische Primer enthalten. Bei Primern handelt es sich um kurze Oligonukleotide mit einer Länge von 18-30 Basen, die bei $55\text{-}80\text{ °C}$ an die 3'-Enden der einzelsträngigen DNA-Template hybridisieren und den zu amplifizierenden Abschnitt umrahmen. Dieser Schritt wird als Annealing bezeichnet. Hierbei ist es wichtig, dass die ausgewählte Primersequenz möglichst spezifisch für den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt ist, um unerwünschte Amplifikationsprodukte zu vermeiden. Damit die Primer einerseits an das Template binden und andererseits im nächsten Denaturierungsschritt wieder abgelöst werden können, sollte der GC-Gehalt bei 40-60 % liegen. Dabei ist besonders am 3'-Ende das Vorhandensein einer G- oder C-Base wichtig. Gleichzeitig muss darauf geachtet werden, dass homopolymere Regionen mit mehr als vier gleichen Basen nacheinander

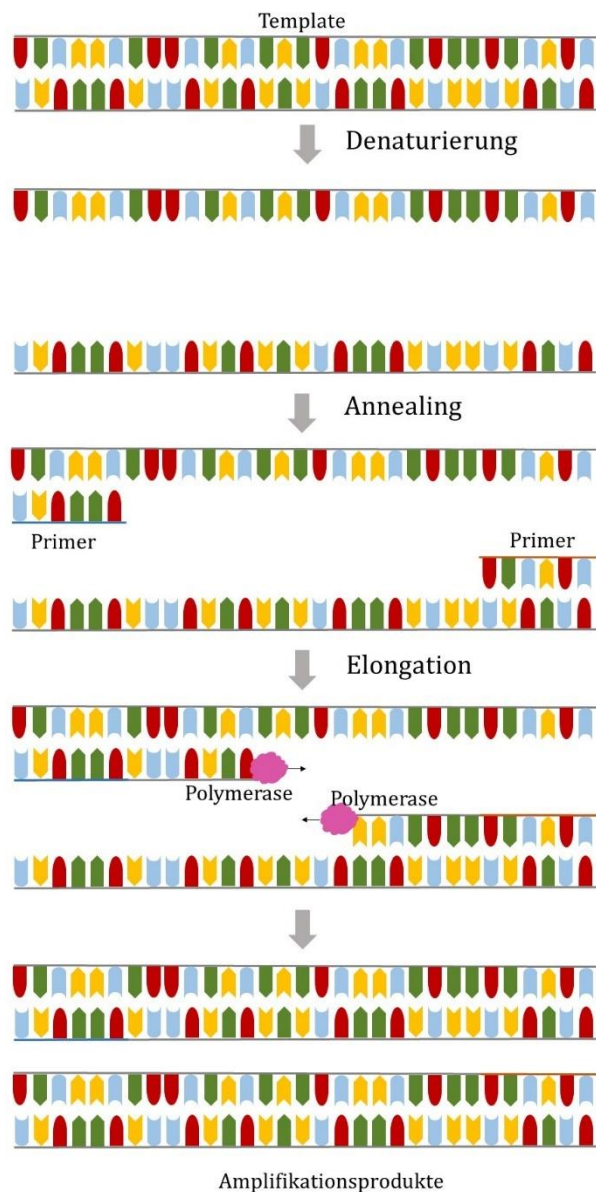


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Polymerasekettenreaktion in Anlehnung an [30].

vermieden werden. Sie könnten ebenfalls zu Fehlhybridisierungen oder Verschiebungen des Leserasters führen. Des Weiteren beeinflusst der GC-Gehalt auch die Schmelztemperatur der Primer, die wiederum zur Bestimmung der geeigneten Annealingtemperatur wichtig ist. Die Annealingtemperatur sollte 5-10 °C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen. Zur Berechnung der Schmelztemperatur können diverse Formeln herangezogen werden [35]. Viele Firmen, die Primersynthese anbieten, stellen hierfür jedoch auch freie Web-Tools zur Verfügung. So wie der Biocalculator von der metabion international AG (Planegg, Deutschland) oder der Tm Calculator von New England BioLabs Inc. (Ipswich, MA, USA), die im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden. Zum Schluss sollte sichergestellt werden, dass die ausgewählten Primersequenzen keine Haarnadelstrukturen, Selbstdimere und Heterodimere bilden [35].

Während der Elongation wird die Temperatur auf das Aktivitätsoptimum der Polymerase erhöht und vom 3'-Ende des Primers der komplementäre Gegenstrang in 5'-3'-Richtung synthetisiert. Dazu werden durch die Polymerase schrittweise dNTPs, unter Abspaltung von Pyrophosphat, an den zu synthetisierenden, komplementären DNA-Abschnitt addiert. Als Polymerase dient häufig die aus *Thermus aquaticus* isolierte, hitzestabile Taq-DNA-Polymerase. Diese Polymerase zeichnet sich besonders durch ihre hohe Synthesegeschwindigkeit von 2.800 dNTPs pro Minute aus. Immer beliebter, jedoch deutlich langsamer, sind auch Polymerasen mit einer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, die durch ihre zusätzliche Korrekturaktivität äußerst genau arbeiten. Häufiger kommen auch Hot-Start-Polymerasen zum Einsatz. Hiermit wird verhindert, dass die Polymerase schon bei niedrigen Temperaturen aktiv wird und infolgedessen unspezifischer Amplifikationsprodukte gebildet werden. Wenn Annealing- und Elongationstemperatur sehr ähnlich sind, lassen sich die beiden Schritte auch zu einem zusammenfassen. Dies kann zu einer erheblichen Verkürzung der Reaktionszeit führen. Neben Primern, Polymerase und dNTPs enthält der Reaktionsansatz außerdem Puffer und Salz. Sind die Komponenten im Reaktionsansatz verbraucht und ist die Polymerase erschöpft, kommt die PCR nach 30-40 Zyklen zum Erliegen [19; 35].

Im Anschluss an eine konventionelle PCR folgt häufig eine Agarosegelelektrophorese zur Visualisierung und Überprüfung der Amplifikationsprodukte. Dazu wird das PCR-Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen und einem elektrischen Feld ausgesetzt. Bedingt durch das negativ geladene Zucker-Phosphat-Rückgrat wandert die DNA dann zur positiv geladenen Anode. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit sowohl von der Agarosekonzentration, der Pufferzusammensetzung als auch von der Größe der DNA-Fragmente ab. Je größer die DNA-Fragmente, umso kürzer ist der zurückgelegte Weg pro Zeiteinheit. Durch das Mitführen eines DNA-Größenmarkers lässt sich so die Größe der PCR-Produkte bestimmen. Gleichzeitig findet eine Auftrennung spezifischer und unspezifischer PCR-Produkte in Form von mehreren Banden statt [39]. Mit Hilfe von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen, wie Ethidiumbromid oder dem in

dieser Arbeit verwendeten Gelred® (Biotium, Inc., Fremont, CA, USA), können die Banden unter Zuhilfenahme einer UV-Transilluminator-Geldokumentationseinheit sichtbar gemacht werden [40]. Anhand der Bandenintensität einer Kalibrierreihe kann schließlich auch eine semi-quantitative Abschätzung der DNA-Konzentration in dem Gel erfolgen [35]. Zur weiteren Überprüfung der PCR-Produkte können die Banden aus dem Gel isoliert und anschließend sequenziert werden.

Da die konventionelle PCR in Verbindung mit einer Agarosegelelektrophorese ein sehr zeitaufwendiges Verfahren ist, werden in der Routineanalytik hauptsächlich real-time PCR-Ansätze verwendet [19].

3.3.3 Real-time PCR und Sondendesign

Die real-time PCR ist eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR. Hierbei wird die DNA-Vervielfältigung in Echtzeit verfolgt. Dazu werden Fluoreszenzsignale genutzt, die mit steigender Menge an PCR-Produkten proportional zunehmen. Während früher interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe verwendet wurden, die jedoch auch an unspezifische Amplifikationsprodukte gebunden und ein Signal erzeugt haben, kommen heute hauptsächlich Sonden zum Einsatz. Das wohl bekannteste Sonden-Prinzip, welches auch in dieser Arbeit genutzt wurde, ist die TaqMan™-Sonde – eine sogenannte Hydrolysesonde. Hierbei handelt es sich um ein Oligonukleotid mit einem Reporter-Fluorophor am 5'-Ende sowie einem Quencher am 3'-Ende. Während des Annealings hybridisiert dieses Oligonukleotid spezifisch an einen Sequenzabschnitt der Template-DNA. Solange das Oligonukleotid intakt ist, findet durch den Quencher eine permanente Auslöschung der vom Fluorophor durch Anregung emittierten Strahlung statt. Infolge der Elongation wird das Oligonukleotid jedoch hydrolysiert. Dabei werden Fluorophor und Quencher voneinander getrennt und es kommt nicht länger zu einer Fluoreszenzlöschung. Folglich kann ein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Dieser Vorgang ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. [35].

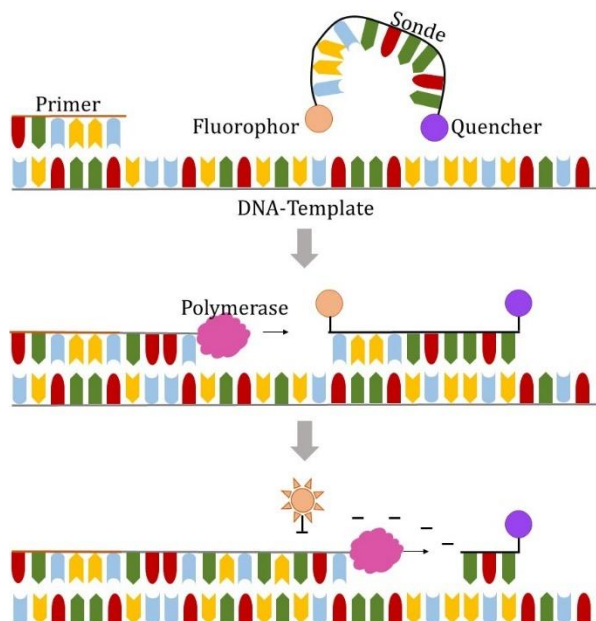


Abbildung 6: Funktionsprinzip einer TaqMan™-Sonde in Anlehnung an [36].

Beim Designen der Sonde gelten im Allgemeinen die gleichen Regeln wie für Primer. Um die Sonde erfolgreich zu hydrolysieren, muss jedoch zusätzlich berücksichtigt werden, dass sich das 5'-Ende der Sonde in relativer Nähe zum 3'-Ende eines Primers befindet und nicht mit G endet. Außerdem sollte die Schmelztemperatur der Sonde 5-10 °C über der Schmelztemperatur der Primer liegen [42]. Durch die spezifische Bindung von Primern und Sonde an die Template-DNA ist bei der real-time PCR demnach sowohl ein qualitativer Nachweis, als auch eine Quantifizierung anhand des Fluoreszenzsignals möglich. Da die Vermehrung der DNA von vielen Faktoren abhängt und nur theoretisch eine Verdopplung stattfindet, kann jedoch nicht direkt vom Signal auf die ursprüngliche Templatemenge zurückgeschlossen werden. Aus diesem Grund wird der Schwellenwert (*Threshold Cycle*, Ct-Wert) herangezogen. Dies ist die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich vom Grundrauschen abhebt. Je mehr Template-DNA vorliegt, umso früher wird dieser Wert erreicht. Anhand einer Kalibrierreihe kann so eine Quantifizierung erfolgen. Da jedoch kein linearer, sondern ein exponentieller Zusammenhang zwischen dem Ct-Wert und der Ausgangsmenge besteht, muss eine Auftragung der Ct-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Ausgangskonzentrationen erfolgen, um einen linearen Zusammenhang darzustellen. Anhand der Steigung der erhaltenen Kalibrierkurve kann die Effizienz des real-time PCR-Assays abgeleitet werden [19; 35].

3.3.4 DNA-Sequenzierung

Das klassische Verfahren zur Bestimmung der Basenabfolge, welches auch in dieser Arbeit genutzt wurde, wurde 1977 von Fred Sanger entwickelt und basiert auf einem Kettenabbruch. Dabei wird ausgehend von der Template-DNA mit Hilfe eines Primers, ähnlich der PCR, unter Verwendung einer Polymerase der komplementäre Gegenstrang synthetisiert. Neben dNTPs werden dem Reaktionsansatz aber auch fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs), die kein freies 3'-OH-Ende zur Strangverlängerung besitzen, zugesetzt. Werden diese im Laufe der DNA-Synthese eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch. Auf diese Weise entstehen unterschiedlich lange Syntheseprodukte, die, früher mittels Polyacrylamidgelelektrophorese, heute mittels Kapillarelektrophorese, nach ihrer Länge getrennt werden. Durch Anregung der Basen-spezifischen Fluorophore wird ein Fluoreszenzsignal detektiert, das auf das eingebaute ddNTP schließen lässt. Aus dem Elektropherogramm, lässt sich dann die DNA-Sequenz des synthetisierten Strangs ablesen. Die Sequenz des Template-Strangs ist entsprechend revers und komplementär [39].

Abbildung 7 veranschaulicht beispielhaft die Sequenzherleitung anhand eines Elektropherogramms.

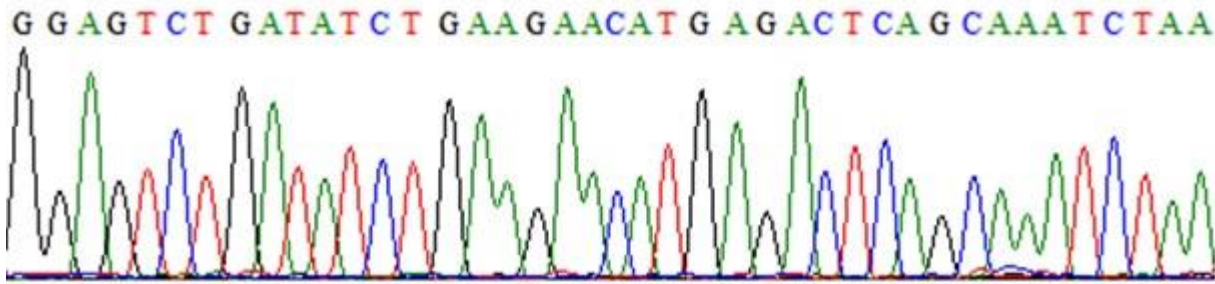


Abbildung 7: Sequenzherleitung anhand eines Elektropherogramms.

3.4 Metabolite als Analyten

Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, ist die DNA der Träger der Erbinformation. Sie wird kaum durch exogene Faktoren beeinflusst, verändert sich entsprechend nur sehr langsam und kann deshalb besonders gut für phylogenetische Untersuchungen herangezogen werden. Ihre codierenden Abschnitte werden als Genotyp zusammengefasst [39].

Unter dem Einfluss exogener Faktoren, wie z. B. Globalstrahlung, Temperatur und Verfügbarkeit von Nährstoffen, resultiert aus dem Genotyp durch den gerichteten Informationsfluss der genetischen Information das äußere Erscheinungsbild eines Organismus – der sogenannte Phänotyp. Er steht am Ende der Genexpression, bei der ausgehend von der DNA über RNA und Proteinen schließlich Metabolite entstehen. Metabolite sind niedermolekulare Stoffwechselprodukte, die für die Funktion und das Wachstum von Zellen unverzichtbar sind [43]. Hierzu zählen z. B. Aminosäuren, Lipide, Kohlenhydrate, organische Säuren und auch Nucleotide. Es wird davon ausgegangen, dass es im Menschen bis zu 2.000 und im Pflanzenreich sogar mehr als 200.000 verschiedene Metabolite gibt [44; 45]. Die Gesamtheit aller Metabolite eines Organismus wird unter dem Begriff Metabolom zusammengefasst. Ihre Qualifizierung und Quantifizierung ist schließlich Aufgabe der sogenannten *Metabolomics*-Disziplin, die am Ende der *Omics*-Kaskade steht. Hierzu gehört auch das *Metabolic-Fingerprinting*, ein *non-targeted* Ansatz, bei dem versucht wird, so viele Metabolite eines Organismus wie nur möglich zu erfassen. Anhand der erhaltenen Metabolitmuster, der sogenannten Fingerprints, sollen dann Metabolite identifiziert werden, die in Form von Biomarkern als messbare Indikatoren für bestimmte Fragestellungen herangezogen werden können [43]. Im Lebensmittelbereich werden mit diesem Analyseverfahren vor allem Methoden entwickelt, die eine zuverlässige Authentizitätsbestimmung hochpreisiger Lebensmittel ermöglichen, um *Food Fraud* (= Lebensmittelbetrug) aufzudecken [46; 47].

In Abbildung 8 ist der Informationsfluss der Genexpression in Verbindung mit der *Omics*-Kaskade grafisch dargestellt.

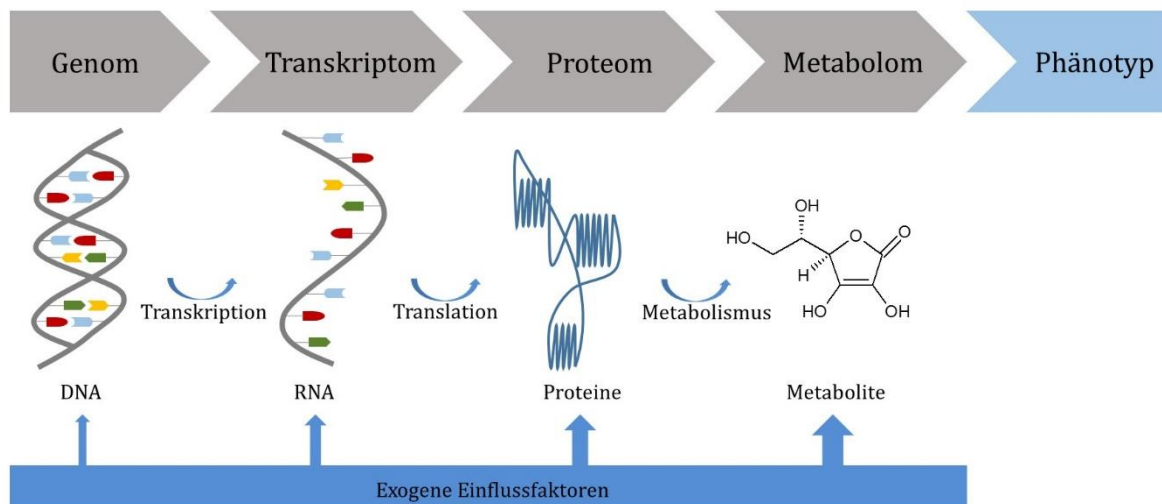


Abbildung 8: Informationsfluss der Genexpression in Anlehnung an [43].

Aufgrund der Heterogenität des Metaboloms in Bezug auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Metabolite aber auch der Konzentrationen der einzelnen Stoffe, ist es nicht möglich, alle Metabolite eines Organismus mit nur einer einzigen Methode simultan zu erfassen. So haben sich in diesem Bereich verschiedene Applikationstechniken, wie z. B. die Massenspektrometrie (MS) oder auch die Kernresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR), etabliert, die sich teilweise gegenseitig ergänzen [48].

In dieser Arbeit wurde ein Massenspektrometer mit vorgeschalteter Flüssigkeitschromatographie (*Liquid Chromatography*, LC) verwendet.

3.4.1 Trennung von Metaboliten mittels Flüssigkeitschromatographie

Die Flüssigkeitschromatographie (*Liquid Chromatography*, LC) ist ein Verfahren zur Trennung von Stoffgemischen. Es beruht auf unterschiedlichen Affinitäten zwischen den in der mobilen Phase gelösten Analyten und der immobilisierten stationären Phase. Folglich werden die einzelnen Stoffkomponenten unterschiedlich schnell eluiert und unterscheiden sich in ihren Retentionszeiten [49]. Die dabei am häufigsten verwendete Trennmethode ist die Umkehrphasen-Chromatographie (*Reversed-phase Chromatography*, RPC), die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde [50]. Sie dient zur Trennung mittel- bis unpolarer Stoffkomponenten, indem sowohl die unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften der Analyten zwischen stationärer und mobiler Phase (Verteilungschromatographie) als auch VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen zwischen den Analyten und der unpolaren stationären Phase (Adsorptionschromatographie) ausgenutzt werden [51]. Als stationäre Phase wird besonders häufig mit Octadecylsilan (C18) derivatisiertes Kieselgel verwendet. Die mobile Phase ist in der Regel eine Kombination aus Wasser und organischen Lösungsmitteln, wie z. B. Methanol, Acetonitril oder 2-Propanol. Durch eine Gradientenelution kann die Polarität der mobilen Phase im Laufe der Chromatographie

angepasst werden, sodass durch eine langsame Erhöhung des unpolaren Lösungsmittelanteils die Elution lipophiler Analyten unterstützt werden kann [50].

Während im Jahre 1906 die stationäre Phase noch aus Korngrößen von 150-200 μm bestand, hat in den letzten Jahren eine Miniaturisierung stattgefunden. Durch immer kleinere Partikeldurchmesser von $< 2 \mu\text{m}$ konnte zum einen die Trennleistung erheblich verbessert werden und zum anderen ließen sich sowohl Analysenzeiten als auch Lösungsmittelmengen reduzieren. Gleichzeitig führten die reduzierten Korngrößen der stationären Phase jedoch auch zu hohen Gegenständen. Um diesen stand halten zu können, wurde erst die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) und später dann die Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UPLC) entwickelt [50].

Die Anlagen bestehen, wie in Abbildung 9 schematisch dargestellt, aus einem Pumpensystem, das die Lösungsmittel der mobilen Phase durch das chromatographische System fördert. Durch ein Mehrwegeventil, das eine Probeninjektion ohne Druckschwankungen in das fließende System erlaubt, gelangt die mobile Phase zusammen mit dem Stoffgemisch über eine Vorsäule auf die Trennsäule. Mit Hilfe eines Säulenofens können die Säulen auf eine definierte Temperatur beheizt werden. Auf diese Weise lässt sich die Viskosität der Lösungsmittel reduzieren und die Chromatographie beeinflussen. Am Ende der Anlage befindet sich schließlich ein Detektor sowie ein Computer als Auswertungseinheit [51].

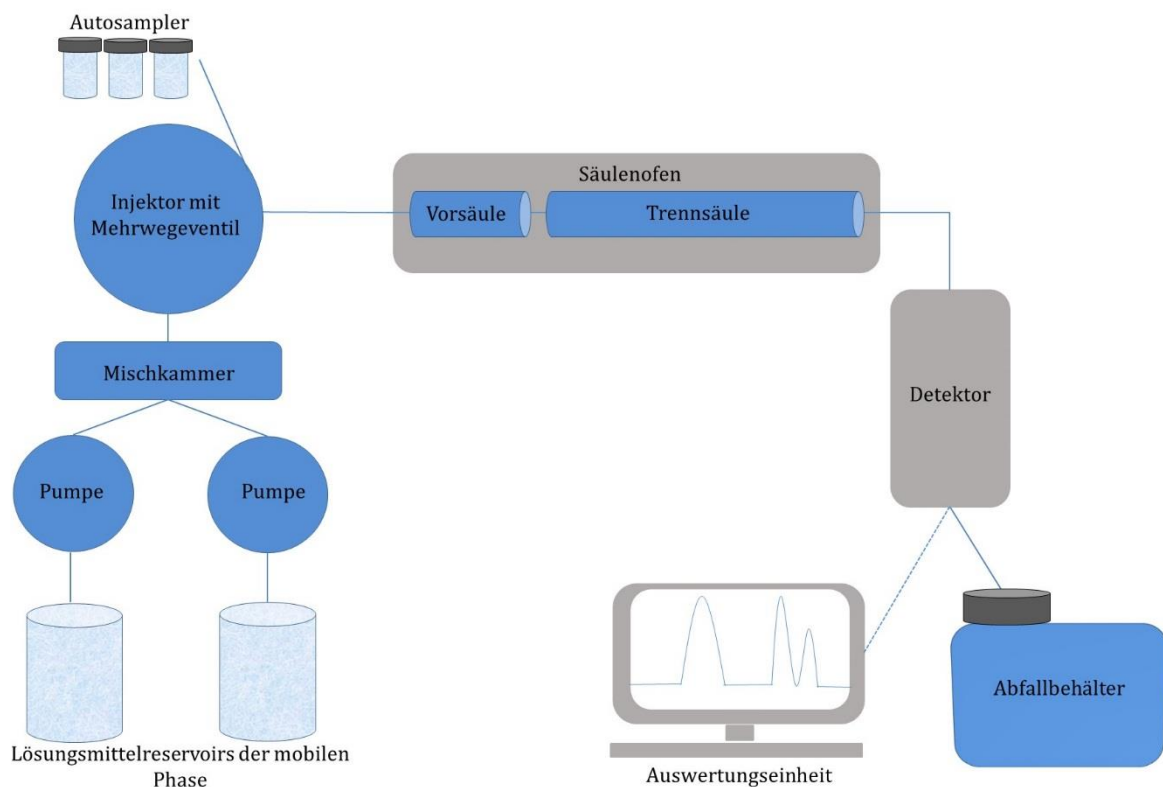


Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines UPLC-Systems in Anlehnung an [50].

Die vorgeschaltete Flüssigkeitschromatographie liefert durch die Auftrennung des Stoffgemisches nicht nur eine Stoff-spezifische Retentionszeit der Analyten, sondern trägt auch zur Reduzierung der Ionensuppression während des Ionisierungsprozesses bei. Die Ionisierung der Analyten ist ein für die Massenspektrometrie notwendiger Schritt, der für eine reproduzierbare Analyse möglichst störungsfrei verlaufen sollte [43].

3.4.2 Detektion von Metaboliten mittels Massenspektrometrie

Zur Detektion der Analyten mittels Massenspektrometrie sind im Allgemeinen drei Arbeitsschritte notwendig: 1. Ionisierung der Analyten, 2. Trennung der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z), 3. Detektion der Ionen.

Besonders geeignet für gelöste Analyten, wie sie durch eine vorgeschaltete Kopplung mit der LC vorliegen, ist die Elektrosprayionisation (ESI). Hierbei wird die Analytlösung mit geringer Flussrate durch eine dünne Kapillare geleitet. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung entsteht zwischen der Kapillare und der Eintrittsöffnung des Massenspektrometers ein elektrisches Feld. Die Kapillare fungiert dabei als Elektrode und in Abhängigkeit des ausgewählten Ionenmodus werden positiv geladene Kationen oder negativ geladene Anionen gebildet. Durch die elektrische Aufladung der Analytlösung kommt es unter dem Einfluss des elektrischen Feldes zur Polarisierung. Dabei werden die geladenen Analyten, wie in Abbildung 10 schematisch dargestellt, zur Gegenelektrode beschleunigt, sodass ein TAYLOR-Kegel ausgebildet wird. In der Spitze des Kegels akkumulieren sich die geladenen Analyten und in Folge der elektrostatischen Abstoßungskräfte bilden sich freie Tröpfchen. Durch das umströmende *Drying*-Gas verdampft das Lösungsmittel. Dadurch steigt die elektrostatische Abstoßung zwischen den Analyten gleicher Ladung an. Sobald diese die Oberflächenspannung übersteigt, kommt es nach dem Ionenemissions-Modell (*Ion Emission Model*, IEM) zur Ausstoßung von einzelnen freien Ionen. Das Modell des geladenen Rückstands (*Charged Residue Model*, CRM) hingegen geht davon aus, dass der gesamte Tropfen im Rahmen einer COULOMB-Explosion in mehrere kleinere Tröpfchen zerplatzt. Unabhängig vom Modell wiederholen sich die Prozesse schließlich so oft bis nur noch freie Ionen in der Gasphase vorliegen. Diese bilden durch die Anwesenheit von Salzen oft Komplexe, wie z. B. Kalium- $[M+K]^+$ oder Natrium-Addukte $[M+Na]^+$. Da es bei dieser Ionisationstechnik jedoch kaum zu Fragmentierungen der Analyten kommt, ist die ESI ein besonders schonender Vorgang und wird auch als weiche Ionisationsmethode bezeichnet[52].

Abbildung 10 zeigt eine schematische Darstellung der Elektrosprayionisation mit CRM bzw. IEM.

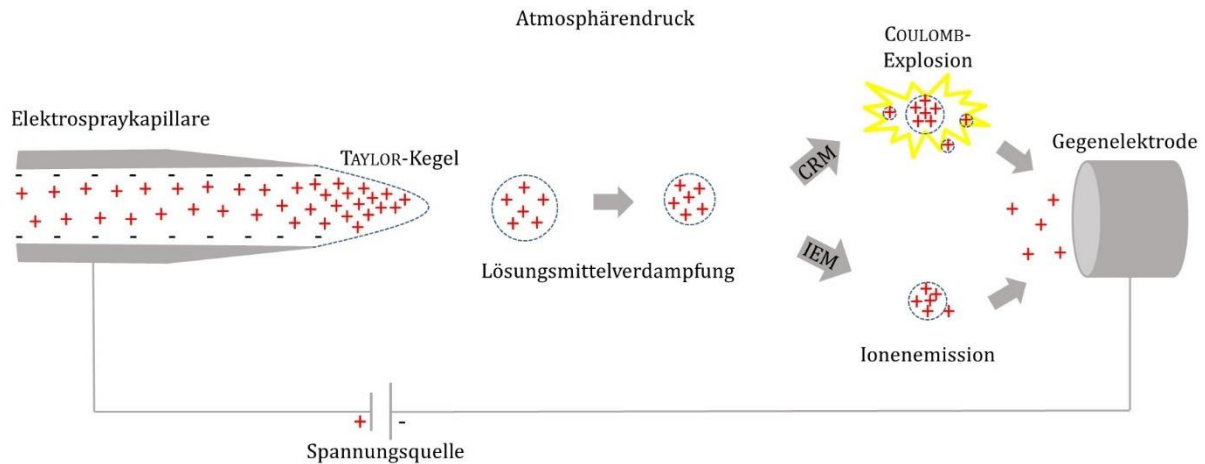


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Elektrosprayionisation in Anlehnung an [52].

Ist eine Strukturaufklärung der Analyten anhand ihrer spezifischen Fragmentmuster gewünscht, kann hinter der Ionisationsquelle ein zusätzlicher Massenfilter folgen. Hierbei werden in der Regel drei Kammern hintereinandergeschaltet. In der ersten befindet sich der sogenannte Quadrupol (Q), in welchem die zu fragmentierenden Ionen selektiert werden. Dafür werden sie zwischen vier Metallstäben mit angelegtem elektrischem Wechselfeld auf eine spiralförmige Flugbahn gezwungen. Ionen mit passendem m/z -Verhältnis passieren den Quadrupol auf einer stabilen Flugbahn, während alle anderen Ionen auf die Elektroden aufschlagen und neutralisiert werden. Dahinter folgt eine Kollisionszelle, in der die Ionen mit Reaktandgas zusammenstoßen und fragmentieren. Anschließend findet eine Bündelung und Fokussierung des Ionenstrahls statt [52].

Zur Detektion der fragmentierten und unfragmentierten Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis findet häufig eine Kopplung mit Flugzeit-Massenspektrometern (*Time of Flight Mass Spectrometer*, ToF-MS) statt. Dazu werden die Ionen zu Paketen gebündelt und mit einem scharfen Impuls orthogonal zu ihrer ursprünglichen Bewegungsrichtung in ein Flugrohr beschleunigt. Dabei findet eine zeitliche Auftrennung der Ionen entsprechend ihrer Geschwindigkeit statt. Während Ionen mit kleineren m/z -Werten hohe Geschwindigkeiten aufweisen, sind Ionen mit größerer m/z -Werten langsamer und treffen entsprechend später auf dem Detektor – einem Sekundärelektronenvervielfacher – auf. Um anfängliche Unterschiede in der kinetischen Energie zwischen Ionen mit gleichen m/z -Werten zu kompensieren und gleichzeitig die Flugstrecke zu verlängern, werden zur Verbesserung der Auflösung vielfach Reflektoren verwendet. Hierbei dringen Ionen mit einer hohen kinetischen Energie tiefer in das Reflektorfeld ein und halten sich dort länger auf, als Ionen mit geringerer kinetischer Energie. So wird sichergestellt, dass Ionen mit gleichen m/z -Werten aber unterschiedlicher Anfangsenergie zeitgleich den Detektor erreichen und schmale Peaks erhalten werden [52].

Moderne Geräte, wie das in dieser Arbeit verwendete Vion IMS QToF (Waters Corp., Milford, MA, USA), verfügen zusätzlich über ein Ionen-Mobilitäts-Spektrometer (*Ion Mobility Spectrometer*, IMS). Dieses befindet sich vor dem QToF-MS und ermöglicht eine Trennung isobarer Ionen nach ihrer räumlichen Anordnung. Dazu werden die Ionen in eine Driftröhre geleitet, in welcher sie einem entgegen ihrer Bewegungsrichtung strömenden Inertgas ausgesetzt werden. Abhängig von ihrer Konformation kommt es zu unterschiedlichen Driftzeiten der Ionen und entsprechend zur Trennung isobarer Analyten [53].

Abbildung 11 zeigt den schematischen Aufbau eines IMS-QToF-MS.

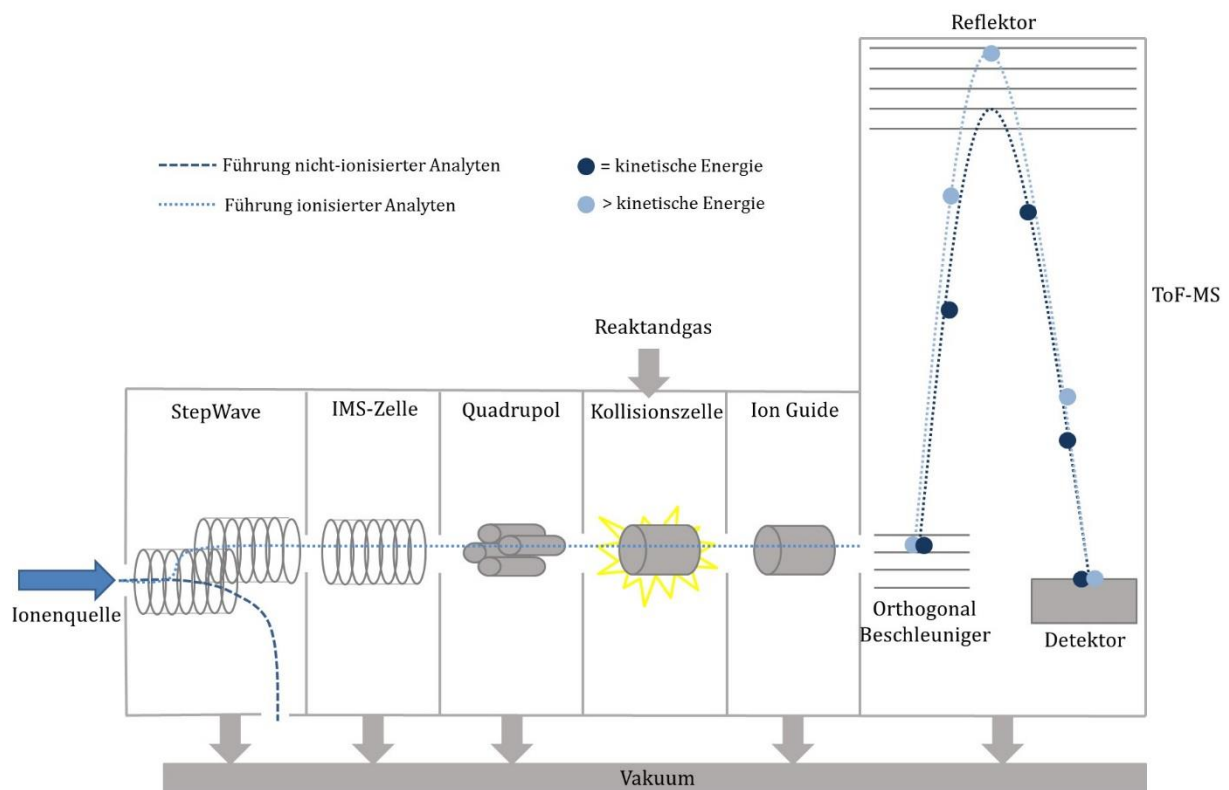


Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines IMS-QToF-MS in Anlehnung an [54].

3.4.3 Auswertung von non-targeted Metabolic-Fingerprinting-Experimenten

UPLC-IMS-QToF-MS basierte non-targeted Metabolomics-Analysen liefern für jede Probe Retentionszeiten, Driftzeiten, m/z -Verhältnisse, dazugehörige Fragmentspektren sowie Intensitäten für mehrere tausend Metabolite. Um aus den großen Datenmengen relevante Zusammenhänge herauszufiltern und Antworten für gezielte Fragestellungen abzuleiten, wird sich häufig der Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*, PCA) bedient [55]. Hierbei handelt es sich um ein *Unsupervised Pattern Recognition* (= ungerichtete Mustererken-

nung) Verfahren der multivariaten Datenanalyse, d. h. es werden im Vorfeld keine Informationen zu Gruppenzugehörigkeiten definiert, sodass eine ungerichtete Suche nach Unterschieden und Gemeinsamkeiten zwischen den Proben stattfindet [56].

Bei der PCA findet eine Reduktion der Daten von einem multidimensionalen auf einen niederdimensionalen Raum unter Darstellung der größten Varianz und möglichst minimalen Informationsverlust statt. So werden in einer Hauptkomponente miteinander korrelierende Variablen zu einer neuen, nicht direkt messbaren Größe – der Hauptkomponente (*Principal Component*, PC) – zusammengefasst. Die erste PC beschreibt definitionsgemäß die größte Varianz [55]. Dies ist schematisch in Abbildung 12 a) dargestellt.

Varianzen, die durch die erste PC unerklärt bleiben, können in weiteren PCs, die orthogonal aufeinander stehen, beschrieben werden. Dabei nimmt der relative Anteil erklärter Varianz ab. Für die Varianz gilt somit: $PC_x > PC_{x+n}$ [55; 57].

Die grafische Veranschaulichung der PCA erfolgt in sogenannten *Scores* und *Loadings Plots*. Im *Scores Plot* wird durch die Lage der einzelnen Proben im Raum der Hauptkomponenten ihre Beziehung zueinander wiedergegeben. Während also sich ähnelnde Proben nah beieinander liegen, nimmt die Entfernung mit steigender Heterogenität zu. Die *Loadings* stellen die Metabolite dar. Ihre Lage im *Loadings Plot* beschreibt den Einfluss auf die Aufspaltung des *Scores Plots*. *Loadings*, die weit entfernt vom Mittelpunkt liegen, sind für eine große Varianz verantwortlich und können je nach Fragestellung potenzielle Biomarker darstellen [57].

Abbildung 12 b) und c) zeigen beispielhaft die grafische Veranschaulichung einer PCA mittels *Scores* und *Loadings Plot*.

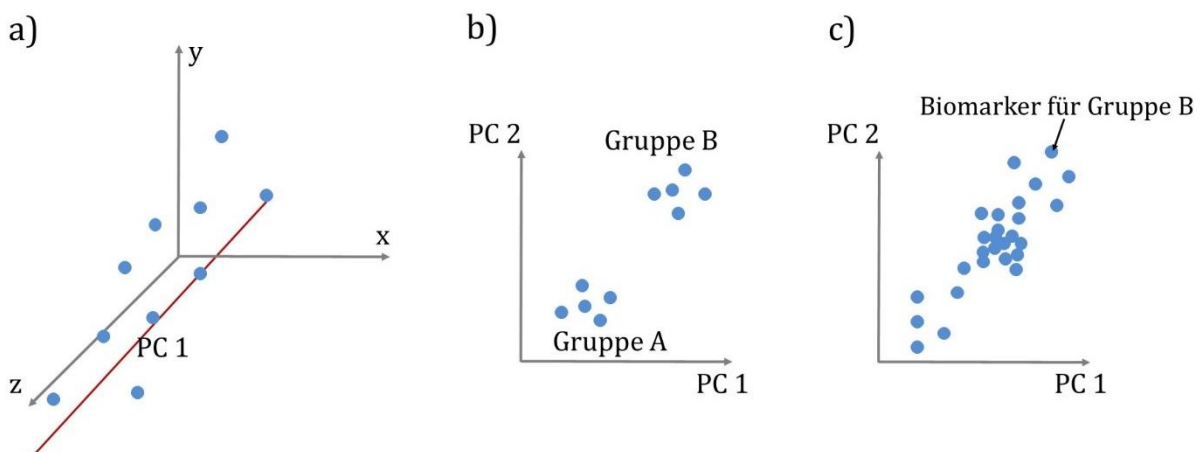


Abbildung 12: Reduktion und Visualisierung der Daten mittels PCA. a) PC1 erklärt die größte Varianz. b) Gruppierung der Proben im *Scores Plot*. c) Lage der *Loadings* im Raum der Hauptkomponenten.

Für eine hohe Aussagekraft der PCA ist eine gute Vorverarbeitung der Rohdaten sowie eine Datennachverarbeitung wichtig. Da mit der PCA jedoch in der vorliegenden Arbeit keine

plausiblen Ergebnisse erzielt werden konnten, um ein Modell zur Echtheitsprüfung von Kokosblütenzucker zu entwickeln, wird im nachfolgenden die Datenvor- und nachverarbeitung nicht weiter vertieft.

3.5 Weitere analytische Verfahren

3.5.1 ELISA

Der Festphasen-Enzymimmunoassay (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen beruht. Obwohl verschiedene Assay-Typen existieren, hat sich vor allem zum Nachweis von Lebensmittelallergenen der Sandwich-ELISA durchgesetzt, welcher auch in dieser Arbeit verwendet wurde.

Hierbei wird der als Antigen fungierende Analyt, wie in Abbildung 13 dargestellt, zunächst an Antikörper, welche auf einer Festphase immobilisiert sind, gebunden. Durch Zugabe eines enzymmarkierten zweiten Antikörpers wird der Analyt schließlich – ähnlich wie ein Sandwich aus Brot, Belag, Brot – von Antikörpern umschlossen. Die Zugabe eines chromogenen Substrats führt schließlich zu einer enzymkatalysierten Farbreaktion. Dabei sind Farbintensität und Analytkonzentration direkt proportional, sodass mit Hilfe einer Kalibrierkurve eine Quantifizierung des Analyten erfolgen kann.

Durch die Bedingung, dass zwei Antikörper an den Analyten binden müssen, damit es zur Farbreaktion kommen kann, ist der Sandwich-ELISA hochspezifisch. Gleichzeitig eignet er sich jedoch nur für größere Analyten [19; 58].

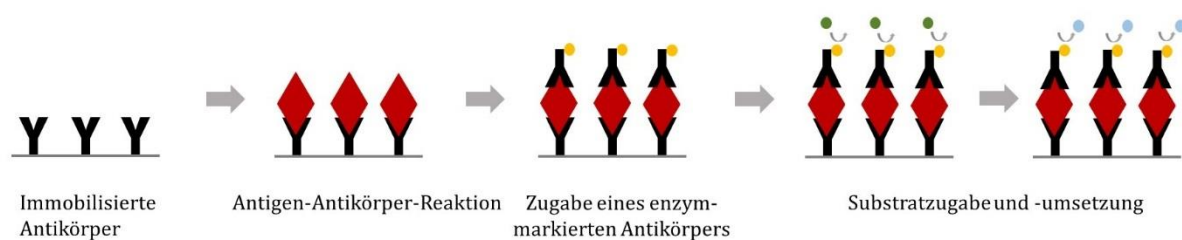


Abbildung 13: Funktionsweise eines Sandwich-ELISAs in Anlehnung an [58].

3.5.2 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Stabilisotopenanalyse

Mit Hilfe der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Stabilisotopenanalyse kann zwischen sogenannte C_3 - und C_4 -Pflanzen differenziert werden. Sie unterscheiden sich in der Art der CO_2 -Fixierung im CALVIN-Zyklus während der Photosynthese. Hierbei fixieren C_3 -Pflanzen CO_2 an das Substrat Ribulose-1,5-bisphosphat, sodass als erstes Produkt ein C_3 -Körper – 3-Phosphoglycerat – entsteht. Dieser Prozess wird durch das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO)

katalysiert. Bei C₄-Pflanzen hingegen wird unter der katalytischen Wirkung der Phosphoenolpyruvat-carboxylase als erstes Produkt der CO₂-Assimilation ein C₄-Körper – Oxalacetat – gebildet [7; 59].

Aufgrund der Bevorzugung des „leichteren“ ¹²CO₂ durch RuBisCO weisen C₃-Pflanzen ein niedrigeres ¹³C/¹²C-Isotopenverhältnis als C₄-Pflanzen auf. Während die δ¹³C-Werte für C₃-Pflanzen im Bereich von -24 bis -32‰ (bezogen auf den PeeDee Belemnite Standard) liegen, schwanken die Werte für C₄-Pflanzen von -10 bis -16‰. Die Isotopendiskriminierung kann somit genutzt werden, um C₃- und C₄-Pflanzen voneinander zu unterscheiden. So kann z. B. Rübenzucker (C₃) von Rohrzucker (C₄) oder Maissirup (C₄) unterschieden werden. Eine Unterscheidung von Honig (C₃) und Rübenzucker (C₃) ist mit dieser Methode hingegen nicht möglich. Auch Kokos- und Ölpalmen gehören zur Gruppe der C₃-Pflanzen [60].

Die Bestimmung der Isotopenverhältnisse erfolgt mit Hilfe eines Isotopenmassenspektrometers und einem vorgeschalteten Elementaranalysator, in welchem das organische Material zum Messgas CO₂ umgesetzt wird [60].

Kapitel 4 Methodenentwicklung zum DNA basierten Nachweis von *Cocos nucifera*

4.1 Zielsetzung und analytische Herangehensweise

Bislang wurden in der Literatur nur wenige Fälle von IgE-vermittelten Kokosnussallergien beschrieben. Angesichts des wachsenden Konsums kokosnusshaltiger Produkte in westlichen Ländern kann jedoch auch die Zahl kokosbedingter Lebensmittelallergien zunehmen. Da es bisher kaum ursächliche Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von Allergien gibt, steht die Meidung des entsprechenden Allergens an erster Stelle. Hierfür ist jedoch eine entsprechende Lebensmittelkennzeichnung, auch in Hinblick auf mögliche Kreuzkontaminationen, für die Betroffenen besonders wichtig, um schwerwiegende gesundheitliche Folgen zu vermeiden.

Bislang wird der Nachweis von Kokosnuss in Lebensmitteln routinemäßig mittels ELISA-Testkits verschiedener Hersteller durchgeführt. Bisherige Methodenentwicklungen haben sich insbesondere auf den Nachweis der 14 in der EU regulierten Allergene, wie z. B. Soja, Lupinen, Erdnüsse und Nüsse, konzentriert [61-64]. Kokosnuss, als potenziell allergenes Lebensmittel, hat bei der Entwicklung von Nachweismethoden noch nicht viel Aufmerksamkeit erhalten.

Ziel dieser Studie war es, ein DNA basiertes Nachweisverfahren für Kokosnuss (*Cocos nucifera*) zu entwickeln. Zu diesem Zweck sollten verschiedene kokosspezifische Primer entworfen und auf ihre Spezifität getestet werden. Hierfür war es wichtig, dass spezifische Sequenzunterschiede zu nahen Verwandten bestanden, die lang genug waren, um Primer platzieren zu können. Anschließend sollte eine TaqMan™-Sonde zur Durchführung einer real-time PCR designet werden. Von dem ausgewählten Primer-/Sondensystem sollte neben der Spezifität auch die Empfindlichkeit überprüft werden. Grundlage der Methodenentwicklung waren DNA-Isolate von ausreichender Konzentration und Reinheit, deren botanische Herkunft durch eine Sequenzierung abgesichert war.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Probenmaterial

Für die Studie standen authentische Blätter der Kokospalme (*Cocos nucifera*), bereitgestellt durch indonesische Farmer, zur Verfügung sowie Blätter der Honigpalme (*Jubaea chilensis*), Ölpalme (*Elaeis guineensis*) und Gelepalme (*Butia capitata*) aus dem Palmengarten Frankfurt/Main. Alle Blattproben wurden bis zur DNA-Extraktion bei -80 °C gelagert.

Außerdem wurde eine Probe Kokoschips aus Sri Lanka und eine Probe Kokosblütenzucker aus Indonesien von herstellenden Unternehmen und Händlern bereitgestellt. Eine Kokosnuss wurde

in einem lokalen Lebensmittelgeschäft erworben. Eine detaillierte Auflistung verwendeter Probenmaterialien ist Tabelle 18 in Abschnitt 8.2 im Anhang zu entnehmen.

4.2.2 Primer und Sonden für die PCR

Die Synthese der Primer erfolgte durch das Dienstleistungslabor Integrated DNA Technologies Inc. (Coraville, IA, USA). Die verwendeten Sonden wurden von TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin, Germany) synthetisiert.

Eine Übersicht aller Primer und Sonden ist in Tabelle 22 in Abschnitt 8.3.1 im Anhang zu finden.

4.2.3 Probenvorbereitung und DNA-Isolierung

Die Palmenblätter wurden mit 70%igem Ethanol gewaschen, in Trockeneis gefroren und in einer Messermühle gemahlen (Grindomix GM 200, Retsch GmbH, Haan, Deutschland). Die Kokosnuss wurde geknackt und das Endosperm mit einem Messer in kleine Stücke geschnitten. Kokoschips und Kokosblütenzucker wurden direkt zur DNA-Isolierung eingesetzt.

Die Durchführung der DNA-Isolierung erfolgte nach den in § 35 LMBG L 00.00-31:2001-07 und in § 64 LFGB L 00.00-119:2014-02 beschriebenen Methoden, denen die DIN EN ISO 21571:2013-08 zugrunde liegt [37; 65; 66]. Zur Extraktion wurden 2-5 g Probenmaterial mit 5-10 mL CTAB-haltigem Lysepuffer versetzt. Dem Extraktionsansatz wurden 10-30 µL Proteinase K-Lösung zugesetzt und die Suspension bei 65 °C über Nacht im Thermoschüttler inkubiert. Entgegen des amtlichen Untersuchungsverfahrens wurde entsprechend der modifizierten Methode der GALAB Laboratories GmbH die CTAB-Präzipitation mit Trichlormethan/3-Methyl-1-butanol (24/1; V/V) durchgeführt. Die DNA-Präzipitation erfolgte unter Zugabe von 2 µL Glykogen. Das isolierte Pellet wurde in Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-ethylendiamintetraessigsäure (TE)-Pufferlösung mit Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-Base gelöst.

4.2.4 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der DNA-Isolate

Die Bestimmung der Reinheit der DNA-Isolate sowie die Abschätzung der DNA-Konzentration erfolgten mit einem Spektrophotometer (BioSpectrometer® basic, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 260 nm und 280 nm. Für eine quantitative Bestimmung der DNA wurde das Fluoreszenzsignal nach Zugabe des DNA-Interkalationsfarbstoffs PicoGreen (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) gegen eine λ-DNA-Kalibrierkurve (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) mit einem Mikrotiterplattenleser (GENios, TECAN Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm gemessen.

4.2.5 Konventionelle PCR

Die Durchführung der konventionellen PCR erfolgte mit einem handelsüblichen Mastermix (Q5® Hot Start High-Fidelity Master Mix (2X), New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, USA) in einem Thermocycler (Mastercycler® nexus gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend der Herstellerangaben ausgewählt.

So wurden für einen Reaktionsansatz von 25 µL 1,25 µL Vorwärtsprimer (10 µM), 1,25 µL Rückwärtsprimer (10 µM), 5 µL DNA-Template (1-5 ng/µL) und 5 µL destilliertes Wasser zu 12,5 µL Mastermix gegeben. Für die Negativkontrolle wurden weitere 5 µL destilliertes Wasser anstelle des DNA-Templates verwendet. Das Temperaturprogramm ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Temperaturprogramm der konventionellen PCR.

	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	10 min	98 °C	1
Denaturierung	10 s	98 °C	45
Annealing	25 s	variabel ^a	
Elongation	15 s	72 °C	
Finale Elongation	2 min	72 °C	1

a: Primerspezifische Annealingtemperaturen: euk18S: 68 °C, palmPRK: 63 °C, cocosPRK: 60 °C, cocosITS109: 68 °C, cocosITS197: 68 °C.

4.2.6 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der konventionellen PCR erfolgte eine gelelektrophoretische Trennung aller PCR-Produkte. Hierfür wurde ein 2%iges Agarosegel mit Tris(hydroxymethyl)-aminomethanborat-ethylendiamintetraessigsäure (TBE)-Pufferlösung (1X) hergestellt. Zur Sichtbarmachung der DNA-Amplifikate wurden dem Gel 5 µL des Fluoreszenz-Nukleinsäurefarbstoffs GelRed® 10000X (Biotium, Inc., Fremont, CA, USA) vor dem Gießen beigemischt. Die Probenaschen wurden mit jeweils 4 µL der DNA-Lösung und 3 µL DNA-Ladepuffer (FastDigest Green Buffer (10X), Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) gefüllt. Anschließend wurden die Proben für 1,5 h bei 90 V der Elektrophorese unterzogen. Die Entwicklung und Auswertung der Gele erfolgte anschließend mit Hilfe einer Ultraviolett (UV)-Transilluminator-Geldokumentationseinheit (Dark Hood DH-40/50, Biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland). Zur Bestimmung der DNA-Größe wurde ein DNA-Größenmarker (Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder, New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, USA) mitgeführt.

4.2.7 DNA-Sequenzierung

Zur Verifizierung der PCR-Produkte erfolgte ein Sequenzabgleich mit Hilfe des Web-Programms *Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide* (BLASTn) gegen die *National Center for*

Biotechnology Information (NCBI)-Datenbank. Hierfür wurden die PCR-Produkte zunächst mit einem PCR-Clean-up- und Gel-Extraktionskit (NucleoSpin® Gel und PCR Clean-up, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) aus dem Agarosegel isoliert und nachfolgend mittels SANGER-Sequenzierung durch ein externes Dienstleistungslabor (Eurofins Genomics Germany GmbH, Köln, Deutschland) sequenziert.

4.2.8 Real-time PCR

Zur Durchführung der real-time PCR wurden pro PCR-Ansatz jeweils 10 µL innuMIX qPCR MasterMix Probe (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland), 3,8 µL destilliertes Wasser, 0,5 µL Vorwärtsprimer (20 µM), 0,5 µL Rückwärtsprimer (20 µM), 0,2 µL Sonde (20 µM) und 5 µL DNA-Template miteinander vermischt. Die PCR erfolgte mit dem nachfolgenden Temperaturprogramm (Tabelle 2) an einem qTower³-Thermocycler (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland).

Tabelle 2: Temperaturprogramm des real-time PCR-Assays zum Nachweis von *Cocos nucifera*.

	Zeit	Temperatur	Zyklen
Vorwärmen	2 min	50 °C	1
Initiale Denaturierung	10 min	95 °C	1
Denaturierung	15 s	95 °C	45
Annealing und Elongation	1 min	60 °C	

4.2.8.1 Spezifitätstest

Um Kreuzreaktivitäten des Primer-/Sondensystems auszuschließen, erfolgte ein Spezifitätstest mit folgenden Tier- und Pflanzenarten (10 ng/µL):

- Aprikose (*Armeniaca vulgaris*)
- Chili (*Capsicum frutescens*)
- Erdnuss (*Arachis hypogaea*)
- Geleopalme (*Butia capitata*)
- Haselnuss (*Corylus avellana*)
- Honigpalme (*Jubaea chilensis*)
- Huhn (*Gallus gallus*)
- Lupine (*Lupine* spp.)
- Mandel (*Prunus dulcis*)
- Mango (*Mangifera indica*)
- Ölpalme (*Elaeis guineensis*)
- Pangasius (*Pangasianodon hypophthalmus*)
- Papaya (*Carica papaya*)

- Paranuss (*Bertholletia excelsa*)
- Pfeffer (*Capsicum annuum*)
- Pistazie (*Pistacia vera*)
- Pute (*Meleagris gallopavo*)
- Rind (*Bos taurus*)
- Roggen (*Secale cereale*)
- Rotbarsch (*Sebastes norvegicus*)
- Sellerie (*Apium graveolens*)
- Sesam (*Sesamum indicum*)
- Soja (*Glycin max*)
- Sonnenblume (*Helianthus annuus*)
- Walnuss (*Juglans regia*)
- weißer Senf (*Sinapis alba*)
- Weizen (*Triticum aestivum*)

4.2.8.2 Sensitivitätstest

Zur Beurteilung der Sensitivität des real-time PCR-Assays wurden verdünnte DNA-Extrakte im Konzentrationsbereich von 100 ng/μL bis 0,1 pg/μL auf ihre Amplifizierbarkeit überprüft.

4.2.8.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Neben den unter 4.2.8 beschriebenen Bedingungen für die real-time PCR wurden in Anlehnung an die Empfehlungen des Manuals innuMix qPCR MasterMix Probe der Analytik Jena AG (Jena, Deutschland) [67] diverse Primer- und Sondenkonzentrationen sowie Temperaturen für Annealing und Elongation getestet und deren Auswirkung auf den Ct-Wert für DNA-Extrakte von 0,1 ng/μL und 0,01 ng/μL analysiert, mit dem Ziel die Sensitivität des Assays zu erhöhen.

Die verschiedenen Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Variierte Reaktionsbedingungen des real-time PCR-Assays.

Annealing- temperatur [°C]	Elongations- temperatur [°C]	Primer- konzentration [μM]	Sonden- konzentration [μM]
60	60	0,5	0,2
55	55	0,5	0,2
53	53	0,5	0,2
53	68	0,5	0,2
53	53	0,5	0,1
53	53	0,5	0,3

Fortsetzung Tabelle 3: Variierte Reaktionsbedingungen des real-time PCR-Assays.

Annealing-temperatur [°C]	Elongations-temperatur [°C]	Primer-konzentration [µM]	Sonden-konzentration [µM]
53	53	0,4	0,2
53	53	0,6	0,2
53	53	0,7	0,2
53	53	0,8	0,2
53	53	0,9	0,2
53	53	1,0	0,2

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Isolierung von DNA aus Palmenblättern

In einer Vierfachbestimmung (A, B, C, D) wurde aus den Blättern der Kokos-, Gelee-, Honig- und Ölpalme DNA isoliert, deren Reinheit und Konzentration spektralphotometrisch überprüft wurde. Anhand einer konventionellen PCR und anschließender gelelektrophoretischer Trennung der PCR-Produkte wurde die Amplifizierbarkeit der DNA-Isolate getestet. Hierfür wurden die in der Routineanalytik etablierten Primer euk18S-for und euk18S-rev verwendet, welche ein 137 bp langen Abschnitt des für Eukaryoten spezifischen 18S ribosomalen Ribonukleinsäure (rRNA)-Gens amplifizieren [68; 69]. Die Ergebnisse der DNA-Isolierung sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Aus allen vier Blattproben ließ sich amplifizierbare DNA von guter Reinheit und ausreichender Konzentration für die weitere Analytik isolieren.

Tabelle 4: Eigenschaften der aus Gelee-, Honig-, Kokos- und Ölpalme gewonnenen DNA-Isolate. Eigene Darstellung nach [70].

<i>Palmae</i> -Spezies	Probe	DNA-Konzentration [µg/µL]	Reinheit A260/A280	Amplifizierbarkeit*
Geleepalme (<i>Butia capitata</i>)	A	2,71	1,94	+
	B	2,80	1,94	
	C	2,35	1,93	
	D	2,49	1,93	
Honigpalme (<i>Jubaea chilensis</i>)	A	1,64	2,00	+
	B	2,21	2,07	
	C	1,60	2,01	
	D	1,47	2,01	
Kokospalme (<i>Cocos nucifera</i>)	A	1,88	1,98	+
	B	1,86	1,92	
	C	1,86	1,92	
	D	1,77	1,97	

*" +" zeigt ein positives Ergebnis an

Fortsetzung Tabelle 4: Eigenschaften der aus Gelee-, Honig-, Kokos- und Ölpalme gewonnenen DNA-Isolate. Eigene Darstellung nach [70].

<i>Palmae</i> -Spezies	Probe	DNA-Konzentration [µg/µL]	Reinheit A260/A280	Amplifizierbarkeit*
Ölpalme (<i>Elaeis guineensis</i>)	A	2,73	1,97	+
	B	2,98	1,97	
	C	2,60	1,98	
	D	1,91	2,01	

*" +" zeigt ein positives Ergebnis an

4.3.2 Verifizierung der botanischen Herkunft der Palmenblätter

Zur Verifizierung der botanischen Herkunft der Palmenblätter wurden *Palmae*-spezifische Primer designt. Hierfür wurde auf die DNA-Sequenz des Phosphoribulokinase (prk)-Gens des nuklearen Genoms zurückgegriffen. Es kodiert ein Chloroplastenzym, das für den photosynthetischen Prozess der CO₂-Assimilation des CALVIN-Zyklus unerlässlich ist [71] und bereits vielfach in der phylogenetischen Analyse von *Palmae*-Arten verwendet wurde [72; 73].

Die DNA-Sequenzen des prk-Gens der Gelee-, Honig-, Kokos- und Ölpalme wurden der NCBI-Datenbank entnommen und unter Zuhilfenahme von BioEdit 7.0.5 (Ibis Therapeutics Inc., Carlsbad, CA, USA) align (siehe Abbildung 29 in Abschnitt 8.1 im Anhang). Für den Vorwärtsprimer palmPRK-for wurde der Sequenzabschnitt CTA GCA AAG AAT CTG ATC GAT AAG T mit einer Länge von 25 bp, einem GC-Gehalt von 36 % sowie einer Schmelztemperatur von 62 °C ausgewählt. Als Rückwärtsprimer palmPRK-rev wurde die Sequenz CAT ATT GCT TCT GTG GGT CTG mit einer Länge von 21 bp, einem GC-Gehalt von 48 % und einer Schmelztemperatur von 63 °C gewählt. Mit Hilfe des Web-Tools OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies Inc., Coraville, IA, USA) wurden die ausgewählten Sequenzen auf die Bildung von Haarnadelstrukturen, Selbstdimeren und Heterodimeren überprüft. Die anschließende Synthese der Primer wurde beim Dienstleistungslabor Integrated DNA Technologies Inc. (Coraville, IA, USA) beauftragt.

Die im Anschluss durchgeführte konventionelle PCR ergab je nach Palmenart 271 bis 279 bp lange PCR-Produkte, welche gelelektrophoretisch getrennt (siehe Abbildung 30 in Abschnitt 8.1 im Anhang) und für eine anschließende Sequenzierung aus dem Gel isoliert wurden. Zur Sequenzierung wurden die PCR-Produkte an das externe Dienstleistungslabor Eurofins Genomics Germany GmbH (Köln, Deutschland) versandt. Die dort mittels SANGER-Sequenzierung bestimmten Sequenzen wurden mit BLASTn gegen die NCBI-Datenbankeinträge verglichen. Die Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigte den botanischen Ursprung der Palmenblätter als *Cocos nucifera*, *Jubaea chilensis*, *Elaeis guineensis* und *Butia capitata*. Die Ergebnisse des Sequenzvergleichs sind in Tabelle 14 in Abschnitt 8.1 im Anhang dargestellt.

4.3.3 Design und Spezifität kokosspezifischer Primer

Das Designen kokosspezifischer Primer erfolgte unter Verwendung des *prk*- sowie des *Internal Transcribed Spacer-2* (ITS2)-Gens. ITS2 befindet sich zwischen den kodierenden Regionen der 5.8S und der 28S rRNA der eukaryotischen nuklearen ribosomalen Desoxyribonukleinsäure (rDNA). Aufgrund seiner hohen Divergenz zwischen den Arten ist es ein häufig verwendetes Gen für die phylogenetische Analyse von Pflanzen, welches auch eng verwandte Spezies unterscheiden kann [74-76].

Die DNA-Sequenz des ITS2-Gens der Kokospalme (*Cocos nucifera*) wurde der NCBI-Datenbank entnommen und mit Hilfe des Web-Tools Primer-BLAST auf geeignete Primerpaare analysiert. Von den insgesamt zehn Vorschlägen für Primerpaare, wurden zwei Paare ausgewählt: CocosITS109 und cocosITS197. Während das Primerpaar bestehend aus cocosITS109-for (GGC CTC CTG AGG TAT ATC CG; Länge: 20 bp; GC-Gehalt: 60 %; Schmelztemperatur: 67 °C) und cocosITS109-rev (CAT CCA CCA TCC ACC GTG TC; Länge: 20 bp; GC-Gehalt: 60 %; Schmelztemperatur: 68 °C) ein 109 bp langes PCR-Produkt amplifiziert, ist das mit dem Primerpaar cocosITS197-for (TAT CCG GAT GTG GAT GCT GC; Länge: 20 bp; GC-Gehalt: 55 %; Schmelztemperatur: 67 °C) und cocosITS197-rev (CAT CCG ATG GCT GGG GTG; Länge: 18 bp; GC-Gehalt: 67 %; Schmelztemperatur: 69 °C) erhaltene Amplikon 197 bp lang.

Zur Auswahl eines Primerpaars, welches einen kokosspezifischen Sequenzabschnitt des *prk*-Gens amplifiziert, wurde auf das Sequenzalignment aus Abschnitt 4.3.2 zurückgegriffen und die Sequenz ACA AGA CCT ACT GGA CTG G (Länge: 19 bp; GC-Gehalt: 53 %; Schmelztemperatur: 63 °C) als Vorwärtsprimer cocosPRK-for und TCT GAT ATG TAT AAG ACT CAG CA (Länge: 23 bp; GC-Gehalt: 35 %; Schmelztemperatur: 59 °C) als Rückwärtsprimer cocosPRK-rev ausgewählt. Das durch dieses Primerpaar amplifizierte PCR-Produkt umfasst 164 bp.

Um die Spezifität der designten Primerpaare cocosITS109, cocosITS197 und cocosPRK zu prüfen, wurde eine konventionelle PCR mit den DNA-Isolaten der Gelee-, Honig-, Kokos- und Ölpalme durchgeführt und nach gelelektrophoretischer Trennung die Größe der erhaltenen PCR-Produkte bestimmt. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese. Darin ist zu erkennen, dass das Primerpaar cocosPRK in a) helle Banden bei 200-300 bp für die DNA-Isolate der Honigpalme (1) und eine sehr intensive Bande bei 164 bp für die DNA-Isolate der Kokospalme (3) aufwies. Aufgrund der unterschiedlichen Basenpaarlänge der PCR-Produkte ist eine gute Unterscheidung der PCR-Produkte möglich und das Primerpaar kann somit zum Nachweis von Kokospalme herangezogen werden. Die Primer cocosITS109 in b) und cocosITS197 in c) haben auch DNA-Template der Honig- (1) und Geleepalme (4) amplifiziert. Die erhaltenen PCR-Produkte lassen sich anhand ihrer Größe kaum von denen der Kokospalme unterscheiden. Folglich wurde das Primerpaar cocosPRK für weiterführenden Experimente ausgewählt.

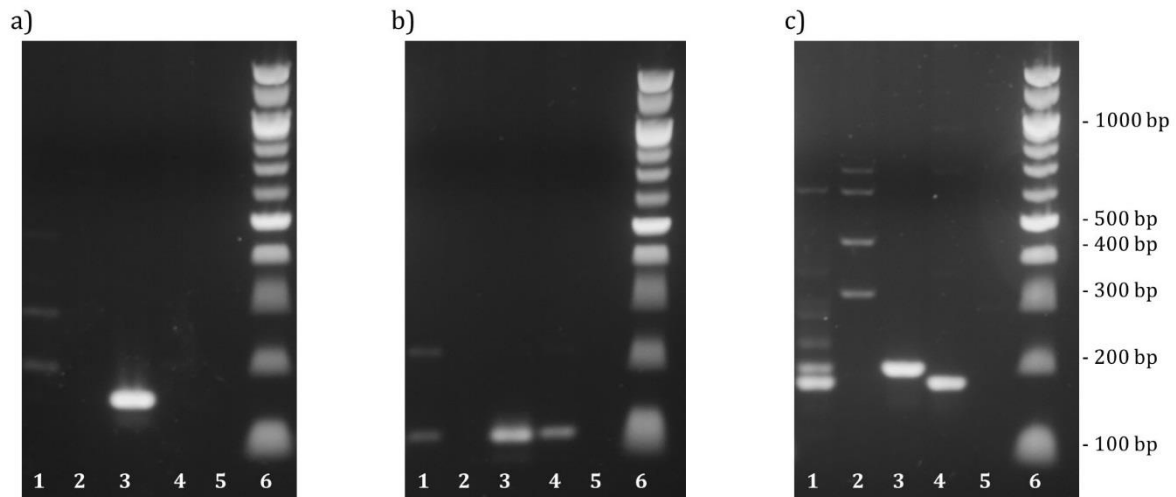


Abbildung 14: Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der Spezifität der Primerpaare cocosPRK a), cocosITS109 b) und cocosITS197 c) anhand der PCR-Produkte der DNA-Isolate der Honigpalme (1), Ölpalme (2), Kokospalme (3), Gelepalme (4) sowie einer Negativkontrolle (5) und eines DNA-Größenmarkers (6) visualisiert mit dem Programm argus X1 an der Geldokumentationseinheit „Dark Hood 40/50“ [70].

4.3.4 Amplifikation von DNA aus Kokosnuss, Kokoschips und Kokosblütenzucker

Zur Überprüfung, ob das Primerpaars cocosPRK auch zur Amplifikation von DNA aus Kokosnuss, Kokoschips und Kokosblütenzucker verwendet werden kann, wurde aus den genannten Produkten DNA isoliert. Aus allen Proben wurde mit dem eukaryotenspezifischen Primerpaar euk18S amplifizierbare DNA von guter Reinheit und ausreichender Konzentration gewonnen. Die Ergebnisse der spektrophotometrischen Reinheits- und Konzentrationsbestimmung sowie der Überprüfung der Amplifizierbarkeit der DNA-Isolate mit dem eukaryotenspezifischen Primerpaar euk18S sind in Tabelle 15 in Abschnitt 8.1 im Anhang zusammengefasst. Es folgte eine konventionelle PCR der DNA-Isolaten mit dem Primerpaar cocosPRK sowie eine gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, wurden mit den DNA-Isolaten der Kokosnuss und der Kokoschips PCR-Produkte erhalten. Für die DNA-Template des Kokosblütenzuckers konnte keine Amplifikation mit dem Primerpaar cocosPRK beobachtet werden.

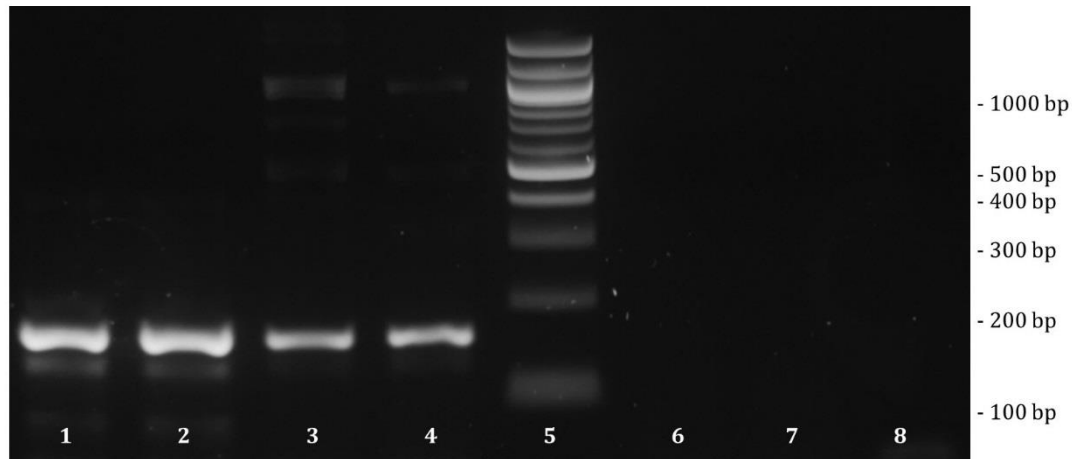


Abbildung 15: Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit von DNA-Templaten aus Kokosnuss (1-2), Kokoschips (3-4) und Kokosblütenzucker (6-7) mit einem DNA-Größenmarker (5) sowie einer Negativkontrolle (8) visualisiert mit dem Programm argus X1 an der Geldokumentationseinheit „Dark Hood 40/50“ [70].

4.3.5 Entwicklung einer TaqMan™-Sonde für die real-time PCR

Für die Entwicklung eines real-time PCR-Assays zum Nachweis von *Cocos nucifera* wurde eine TaqMan™-Sonde designt. Hierfür wurde ein Sequenzabschnitt des *prk*-Gens ausgewählt, der von den Primern *cocosPRK-for* und *cocosPRK-rev* umschlossen wird (Abbildung 16).

Außerdem wurde berücksichtigt, dass das 5'-Ende der Sonde in relativer Nähe des 3'-Endes eines Primers liegt, der GC-Gehalt zwischen 40-60 % beträgt, am 5'-Ende der Sonde kein G vorkommt und auch innerhalb der Sondensequenz möglichst keine homopolymeren Regionen vorliegen. Des Weiteren wurde beachtet, dass die Schmelztemperatur der Sonde nur 5-10 °C oberhalb der Schmelztemperatur der Primer liegt.

Aufgrund dieser Bedingungen wurde der 30 bp lange Sequenzabschnitt AAT TGT CTC ATT ATC TCA ATG AAC CGG GTG (GC-Gehalt: 40 %; Schmelztemperatur: 68 °C) für die TaqMan™-Sonde ausgewählt. Mit dem Web-Tool OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies Inc., Coraville, IA, USA) wurde die Bildung von Haarnadeln, Selbstdimeren und Heterodimeren überprüft. Als Fluorophor wurde 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) mit einer Absorptionswellenlänge von 495 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm verwendet. Hierbei handelt es sich um einen in den Biowissenschaften langjährig etablierten und weit verbreiteten Fluoreszenzfarbstoff [77; 78]. Als Quencher wurde der BlackHole™ Quencher (BHQ)-1 von LGC Biosearch Technologies Inc. (London, UK) ausgewählt. Dieser löscht die Emission im Wellenlängenbereich von 480-580 nm aus und bietet gegenüber dem bisher oft verwendeten Tetramethylrhodamin (TAMRA)-Quencher den Vorteil, dass keine Eigenfluoreszenz freigesetzt wird [79; 80]. Die Synthese der Sonde wurde bei der TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH (Berlin, Deutschland) beauftragt.

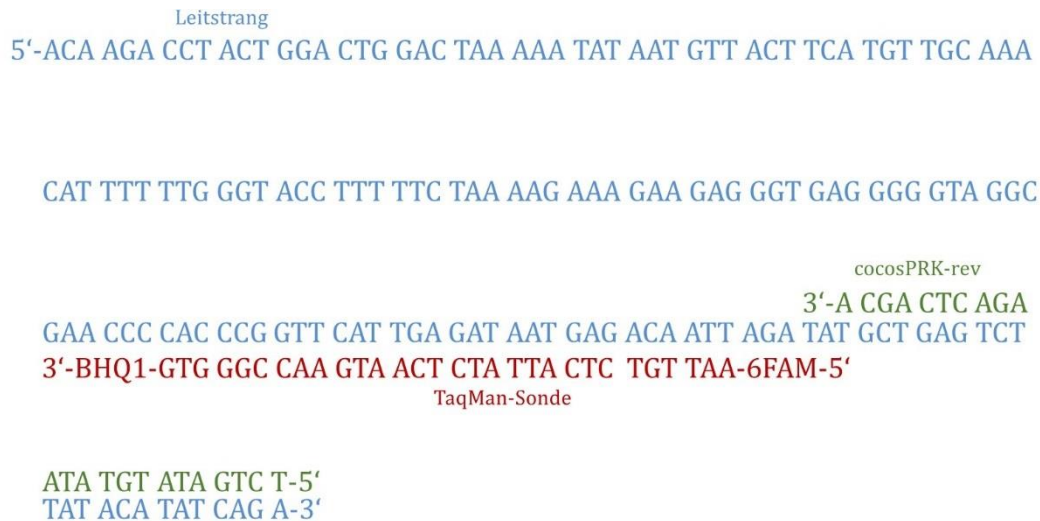


Abbildung 16: Platzierung und Sequenz der TaqMan™-Sonde innerhalb des prk-Gens von *Cocos nucifera* (GenBank: AY601235.1).

4.3.6 Spezifität und Sensitivität des real-time PCR-Assays

Um die Spezifität des Primer-/Sondensystems abzusichern, wurde in einer real-time PCR die Amplifizierbarkeit von 28 verschiedenen Tier- und Pflanzenarten (siehe Abschnitt 4.2.8.1) überprüft. Wie in Abbildung 17 dargestellt, wurde nur eine Amplifikationskurve für *Cocos nucifera* erhalten. Das Ergebnis zeigt, dass das Primer-/Sondensystem spezifisch für die Identifizierung von *Cocos nucifera* ist und keine Kreuzreaktivitäten mit den anderen getesteten Arten vorliegen.

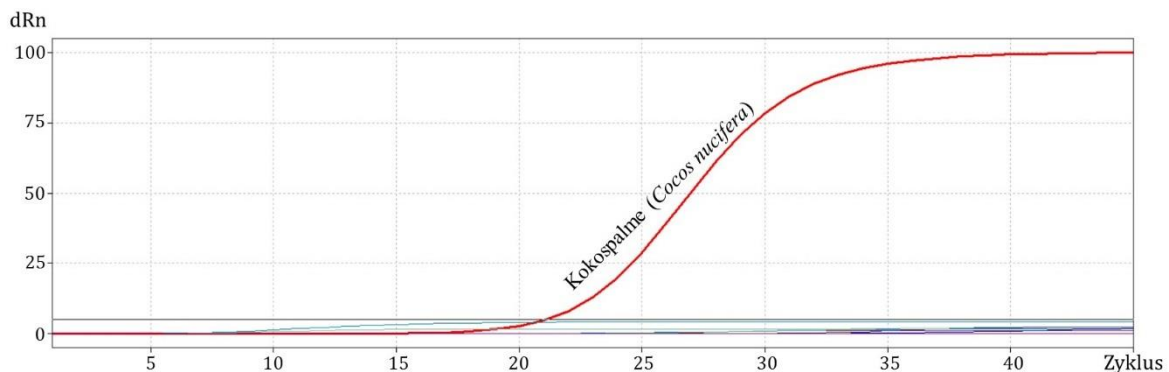


Abbildung 17: Spezifitätstest des Primer-/Sondensystems zum Nachweis von *Cocos nucifera* mittels real-time PCR. Eigene Darstellung nach [70].

Zur Beurteilung der Sensitivität des real-time PCR-Assays wurden DNA-Extrakte von *Cocos nucifera* im Konzentrationsbereich von 100 ng/μL bis 0,1 pg/μL in einer Doppelbestimmung auf ihre Amplifizierbarkeit überprüft. Die in Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Proben mit einer DNA-Konzentration von 0,1 pg/μL nicht amplifiziert wurden. Die niedrigste DNA-Konzentration, bei der noch eine Amplifizierung beobachtet werden konnte, betrug 1 pg/μL bei einem Ct-Wert von 35.

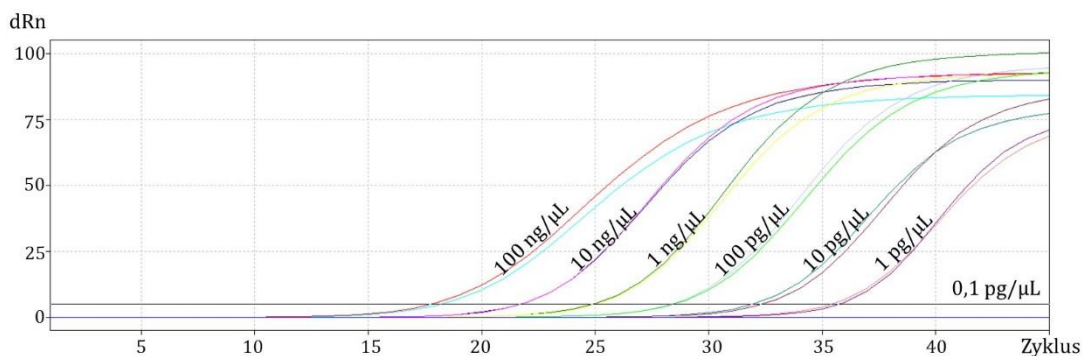


Abbildung 18: Sensitivitätstest des real-time PCR-Assays zum Nachweis von *Cocos nucifera* mit DNA-Extrakten im Konzentrationsbereich von 100 ng/µL bis 0,1 pg/µL. Eigene Darstellung nach [70].

Durch das Auftragen der Ct-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Ausgangskonzentration der DNA-Extrakte ($\log(c)$) wurde eine Kalibrierkurve erstellt (Abbildung 19). Im Idealfall sollte die Effizienz eines real-time PCR Assay in einem Bereich von 90-110 % liegen, was einer Steigung zwischen -3,58 und -3,10 entspricht [81]. Mit -3,50 lag die Steigung in der vorliegenden Studie im optimalen Bereich.

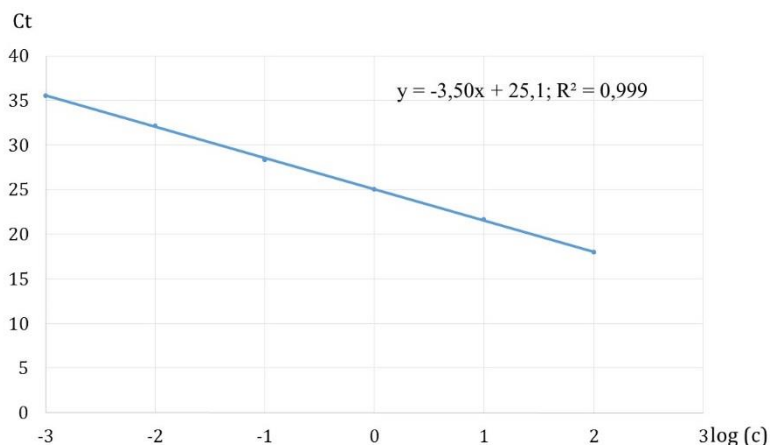


Abbildung 19: Auftragung der Ct-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Ausgangskonzentration der DNA-Extrakte [70].

Es sollte überprüft werden, ob sich der real-time PCR-Assay hinsichtlich seiner Sensitivität optimieren lässt. Dazu wurden die Reaktionsbedingungen variiert (siehe Abschnitt 4.2.8.3) und deren Einfluss auf die Ct-Werte der DNA-Extrakte mit Konzentrationen von 0,1 ng/µL und 0,01 ng/µL analysiert. Die veränderten Reaktionsbedingungen führten jedoch zu keiner deutlichen Verschiebung der Ct-Werte hin zu kleineren Werten und somit nicht zur Verbesserung der Sensitivität. Selbst die als optimal angesehene Annealingtemperatur von 53 °C, berechnet mittels Biocalculator (metabion international AG, Planegg, Deutschland), hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis der real-time PCR. Aufgrund dieser Ergebnislage wurden die ursprünglichen Parameter des real-time PCR-Assays beibehalten. Das gewählte Temperaturprogramm ist in der Routineanalytik der GALAB Laboratories GmbH weit verbreitet. Somit ist der entwickelte PCR-

Assay mit anderen PCR-Ansätzen kompatibel und es ist eine parallele Durchführung verschiedener Assays möglich. Dies führt im Routinebetrieb zu erheblichen Zeitersparnissen.

Eine detaillierte Auflistung aller Ct-Werte ist Tabelle 16 in Abschnitt 8.1 im Anhang zu entnehmen.

4.4 Diskussion

Mit dem designten Primerpaar cocosPRK ließen sich DNA-Template aus Kokosnuss, Kokoschips sowie den Blättern der Kokospalme amplifizieren. Für die DNA-Template, die aus Kokosblütenzucker isoliert wurden, konnte jedoch keine Amplifikation beobachtet werden (siehe Abbildung 15). Die spektrophotometrischen Eigenschaften der DNA-Isolate des Kokosblütenzuckers (DNA-Konzentration = 210 ng/µL; A260/A280 = 1,95) deuteten allerdings nicht auf eine unzureichende oder schlechte DNA-Qualität hin. Mit dem eukaryotenspezifischen Primerpaar euk18S konnte die Amplifizierbarkeit der DNA-Template letztlich auch bestätigt werden und PCR-Produkte erhalten werden. Damit konnten generelle PCR inhibierende Verunreinigungen in den DNA-Extrakten als Ursache ausgeschlossen werden. Da Kokosblütennektar ein schnell fermentierendes Produkt ist [11; 82], besteht die Hypothese, dass die aus dem Kokosblütenzucker isolierte DNA aus Hefen stammt und die kokosspezifische DNA in zu niedriger Konzentration und Qualität vorlag, um ein positives PCR-Ergebnisse zu erhalten.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Es wurde ein real-time PCR-Assay, bestehend aus Primern und TaqMan™-Sonde, entwickelt, um Spuren von Kokosnuss nachzuweisen. Das Primer-/Sondensystem zeigte sich gegenüber 27 weiteren Pflanzen- und Tierarten spezifisch für *Cocos nucifera*, sodass Kreuzreaktivitäten ausgeschlossen werden konnten. In einer Verdünnungsreihe wurde eine Nachweisgrenze von 1 pg/µL abgeschätzt.

Der DNA basierte Nachweis von *Cocos nucifera* als allergenes Lebensmittel liefert zwar im Gegensatz zum ELISA keinerlei Informationen über den tatsächlichen Allergengehalt in Form von Proteinen, viele Studien zeigten jedoch, dass ELISA- und real-time PCR-Assays, unabhängig vom tatsächlichen Allergengehalt, vergleichbare Ergebnisse erzielen und dass die real-time PCR daher ein wichtiges Werkzeug für den schnellen Nachweis allergener Lebensmittelspuren in der Lebensmittelindustrie ist [64; 83].

In künftigen Studien sollte die Anwendbarkeit des real-time PCR-Assays auf weitere Matrices, vor allem zusammengesetzte und prozessierte Lebensmittel, wie Kokosspuren in feinen Backwaren oder Schokolade, geprüft werden und gegebenenfalls die Methode zur Isolierung der DNA in Abhängigkeit der Lebensmittelmatrix optimiert werden. Hierfür sollten zunächst eigens gespikete

Proben verwendet werden. Im weiteren Verlauf der Methodvalidierung sollten dann zur Selbstkontrolle verdeckte Proben analysiert werden, bevor eine Bestätigung der Leistungsfähigkeit und Messgenauigkeit in Ringversuchen erfolgt. Zusätzlich sollten die Ergebnisse des DNA basierten Nachweises von *Cocos nucifera* mit Ergebnissen eines kommerziell erhältlichen ELISA-Testkits verglichen werden.

Kapitel 5 Entwicklung einer Methode zur Echtheitsprüfung von Kokosblütenzucker

5.1 Zielsetzung und analytische Herangehensweise

Im Zuge des wachsenden Interesses an einer gesunden Ernährung versuchen die Verbraucher, den herkömmlichen raffinierten Haushaltszucker zu ersetzen. Folglich steigt die Nachfrage nach alternativen Süßungsmitteln. Kokosblütenzucker profitiert von diesem Trend und erobert nach und nach die europäischen Lebensmittelgeschäfte und Küchen. Der Preis von bis zu 60 €/kg ist jedoch im Vergleich zu 0,70 €/kg für raffinierten Haushaltszucker hoch und bietet so Anreiz für gezielten *Food Fraud*. Umso wichtiger ist die Entwicklung einer Methode zur Aufdeckung von Etikettenschwindel.

Bisherige Studien, die sich mit der Verfälschung und Echtheitsprüfung von Lebensmitteln beschäftigten, fokussierten sich dabei hauptsächlich auf Produkte wie Olivenöl [84], Trüffel [85], Honig [86], Spargel [87], Orangensaft [88] und Wein [89] sowie der Tierartenbestimmung von Fleisch- und Milchprodukten [90; 91]. Kokosblütenzucker taucht im Zusammenhang mit *Food Fraud* bisher nicht in wissenschaftlichen Publikationen auf. Importeure und Händler greifen derzeit auf die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Stabilisotopenanalyse zurück, um die Echtheit ihrer Ware analytisch abzusichern [92]. Wie in 3.5.2 beschrieben, hat diese Methode jedoch nur eine beschränkte Aussagekraft. So kann z.B. eine Streckung von Kokosblütenzucker (C_3) mit Rohrzucker (C_4) aufgedeckt werden. Eine Differenzierung zwischen Rübenzucker (C_3), Palmzucker der Zuckerpalme (*Arenga pinnata*) (C_3) und Kokosblütenzucker (C_3) ist hingegen nicht möglich.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur Authentizitätsprüfung von Kokosblütenzucker zu entwickeln.

Zur Entwicklung einer DNA basierten Methode sollten verschiedene Verfahren zur Isolierung von DNA getestet und miteinander verglichen werden. Die DNA sollte möglichst rein und in ausreichender Menge vorliegen, um anschließend eine real-time PCR zum Nachweis von *Cocos nucifera* durchführen zu können.

In einem zweiten Ansatz sollte eine LC-MS basierte Methode entwickelt werden, die anhand des metabolischen Fingerabdrucks eine Unterscheidung verschiedener Zucker zulässt. Hierfür sollten die unpolaren Metabolite verglichen werden, da hier die größten Unterschiede in Abhängigkeit der botanischen Herkunft erwartet wurden [93; 94].

5.2 Probenmaterial

Die Kokosblütenzuckerproben wurden in lokalen Lebensmittelgeschäften und Drogeriemärkten sowie im Onlinehandel erworben. Außerdem wurden Muster von herstellenden Unternehmen und Händler bereitgestellt. So standen der Studie insgesamt 107 Kokosblütenzuckerproben in einer Preisspanne von 9,16 € bis 59,60 € pro Kilogramm zur Verfügung. 79 Proben waren mit der Herkunftsangabe „Indonesien“ deklariert, 6 stammten von den Philippinen und 22 Proben waren ohne Herkunftsangabe.

Unter Berücksichtigung der sensorischen Eigenschaften, des Preisniveaus sowie der Verfügbarkeit, wurden vor allem Rohrzucker, Vollrohrzucker und Palmzucker als geeignete Streckungsmittel von Kokosblütenzucker für die Studie in Betracht gezogen. Um deren Unterschiede und Gemeinsamkeiten in einem LC-MS basierten Ansatz herauszuarbeiten, wurden 4 Rohr-, 17 Vollrohr-, 11 Palm- sowie 1 Rübenzucker analysiert.

Außerdem standen der Studie diverse authentische pflanzliche Öle und Fette, Kokosblütensirup sowie unverarbeiteter Kokosblütennektar als Referenzmaterial zur Verfügung.

Eine detaillierte Auflistung aller Proben ist Tabelle 19 und Tabelle 20 in Abschnitt 8.2 im Anhang zu entnehmen.

5.3 DNA basierte Methode

5.3.1 Methoden

5.3.1.1 Probenvorbereitung und DNA-Isolierung

Im Rahmen der Methodenentwicklung zum DNA basierten Nachweis von *Cocos nucifera* aus Kokosblütenzucker wurden die nachfolgenden Extraktionsmethoden zur Isolierung der DNA getestet. Sehr grobkörnige oder verklumpte Proben wurden zuvor in einer Messermühle (Grindomix GM 200, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) vermahlen.

5.3.1.1.1 CTAB-Methode

Die Isolierung der DNA nach der CTAB-Methode erfolgte nach der Beschreibung in Abschnitt 4.2.3.

5.3.1.1.2 Modifizierte CTAB-Methode

Zur Isolierung der DNA wurde das in § 64 LFGB L 16.04.03-1:2012-07 beschriebene Extraktionsverfahren durchgeführt [95]. Hierbei handelt es sich um eine modifizierte CTAB-Methode. Um die DNA-Ausbeute zu erhöhen, wurden entgegen des amtlichen Untersuchungsverfahrens entsprechend der modifizierten Methode der GALAB Laboratories GmbH in Schritt 7.2.1 je 2 x 5 g

Probenmaterial eingewogen und parallel aufgearbeitet. In Schritt 7.2.11 erfolgte dann eine Zusammenführung der beiden Extraktionsansätze. Das isolierte Pellet wurde in TE-Pufferlösung mit Tris-Salzsäure (Tris-HCl) gelöst. Diese Methode wird in der Routineanalytik zur Isolierung von DNA aus chemisch nicht modifizierter Maisstärke zum anschließenden Nachweis gentechnisch veränderter DNA-Sequenzen angewandt.

5.3.1.1.3 Wizard-Methode

Die Isolierung der DNA erfolgte nach der in § 64 LFGB L 44.00-8:2010-01 beschriebenen CTAB-Methode mit anschließender DNA-Aufreinigung mittels Festphasenextraktion [96]. Zur Aufreinigung wurde die DNA-Lösung mit TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 100 µL verdünnt. Nach Zugabe von 5 µL RNase A erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 60 °C im Thermoschüttler. Anschließend wurde die Probelösung mit 1 mL Wizard-Resin-Gemisch versetzt und kräftig geschüttelt. Das weitere Vorgehen erfolgte nach dem Vakuum Protokoll des Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems unter Verwendung von Wizard® Minisäulen (Promega Corp., Madison, WI, USA). Als Waschlösung wurden 2 mL 2-Propanol (c = 80 %) verwendet. Die gereinigte DNA wurde anschließend mit 2 x 25 µL warmer (T = 60 °C) TE-Pufferlösung mit Tris-Base eluiert. Das Verfahren findet zur Isolierung und zum qualitativen Nachweis von Haselnuss (*Corylus avellana*) in Schokolade in der Routineanalytik Anwendung.

Die Extraktionsmethode wurde sowohl mit 2 g als auch mit 5 g Ausgangsmaterial durchgeführt.

5.3.1.1.4 DNeasy Plant Maxi Kit

Die Isolierung und Aufreinigung der DNA mit dem DNeasy Plant Maxi Kit wurden nach den Anweisungen des Kit-Herstellers Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden sowohl 0,2 g als auch 1 g Probenmaterial verwendet.

Die Durchführung beinhaltete eine schnelle und vollständige Lyse des Ausgangsmaterials, um eine hohe DNA-Ausbeute zu gewährleisten. Im Anschluss folgte zunächst eine Reinigung der DNA mittels Präzipitation von Proteinen und Polysacchariden und deren Abtrennung durch Filtration sowie eine weitere Reinigung mittels Festphasenextraktion an der sogenannten DNeasy-Membran. Das DNeasy Plant Maxi Kit ist zur Isolierung von DNA aus Blattgewebe optimiert, kann jedoch auch zur DNA-Isolierung aus pflanzlichen Samen und Pilzsporen verwendet werden. SOVOVÁ et al. führten damit bereits erfolgreich DNA-Isolierungen aus Fruchtkonfitüre durch [97].

5.3.1.1.5 PME Food DNA Extraction Kit

Das PME Food DNA Extraction Kit wurde vom Hersteller Analytik Jena AG (Jena, Deutschland) mit dem Ziel entwickelt, DNA aus flüssigen sowie speziell für Säuglingen hergestellten Lebensmitteln zu isolieren, die typischerweise sehr wenig und zudem noch stark beanspruchte DNA enthalten.

Das Prinzip der DNA-Isolierung beruht dabei auf der Erhöhung der Nukleinsäurekonzentration durch Zugabe eines Carrier RNA/DNA Mixes sowie einer polymervermittelten Anreicherung (*Polymer Mediated Enrichment*, PME), um das Ausfällen der DNA zu erleichtern. Nach anschließender Lyse erfolgt auch hier eine Reinigung der DNA mittels Festphasenextraktion.

Die Durchführung erfolgte sowohl nach der Kit-Anleitung für feste wie auch für flüssige Proben. Außerdem wurde durch einzelne Änderungen in der Durchführung versucht, die DNA-Ausbeute weiter zu optimieren. Dazu wurde einerseits ein doppelter Extraktionsansatz bei der Festphasenextraktion wieder vereint und andererseits der Waschschrift mit Wasser durch eisgekühlten, 70%igen Ethanol ersetzt sowie die Inkubation nach Zugabe des *Enrichment Reagent* über Nacht im Kühlschrank durchgeführt.

5.3.1.2 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der DNA-Isolate

Die Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der DNA-Isolate erfolgte wie in Abschnitt 4.2.4 beschrieben.

5.3.1.3 Real-time PCR

Bei ausreichender Reinheit und Konzentration der DNA-Isolate wurde die Amplifizierbarkeit mittels real-time PCR mit den eukaryotenspezifischen Primern euk18S (vergl. 4.3.1 sowie Tabelle 22) geprüft. Dazu wurden pro PCR-Ansatz inklusive Inhibitionskontrolle 25,0 µL innuMIX qPCR MasterMix Probe (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland), 9,6 µL destilliertes Wasser, 1,5 µL Vorwärtsprimer (20 µM), 1,5 µL Rückwärtsprimer (20 µM) und 0,4 µL Sonde (20 µM) miteinander vermischt. Der Ansatz wurde halbiert, sodass folglich 2 Ansätze mit jeweils 19 µL des allgemeinen Mastermixes vorlagen. Während der eine Ansatz mit 1 µL destilliertem Wasser sowie 5 µL DNA-Template versetzt wurde, wurde die andere Hälfte als Inhibitionskontrolle mit 1 µL Spike-DNA (10 ng/µL; Quinoa) sowie 5 µL DNA-Template vermischt. Als Sonde diente hier ein 28 bp langes Oligonukleotid mit der Sequenz 6FAM-ATG GTG GTG ACG GGT GAC GGA GAA TTA G-TAMRA, welches in der Routineanalytik etabliert ist [69]. Zur Überprüfung der real-time PCR wurde eine aus Quinoa (1 ng/µL) und eine aus Kokosnuss (0,001 ng/µL) isolierte DNA als Positivkontrolle und destilliertes Wasser als Negativkontrolle verwendet. Die PCR erfolgte mit dem nachfolgenden Temperaturprogramm (Tabelle 5) an einem qTower³-Thermocycler (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland).

Tabelle 5: Temperaturprogramm des real-time PCR-Assays zum Nachweis von Eukaryoten.

	Zeit	Temperatur	Zyklen
Vorwärmen	2 min	50 °C	1
Initiale Denaturierung	10 min	95 °C	1
Denaturierung	15 s	95 °C	45
Annealing und Elongation	1 min	60 °C	

Bei gelungener Amplifikation erfolgte im Anschluss ein Nachweis von *Cocos nucifera* nach den in Abschnitt 4.2.8 beschriebenen Bedingungen mittels real-time PCR. Als Positivkontrolle wurde eine aus Kokospalmenblättern isolierte DNA verwendet, während als Negativkontrolle destilliertes Wasser diente.

5.3.2 Ergebnisse

Die DNA-Isolierung aus Kokosblütenzucker unter Anwendung der verschiedenen Extraktionsmethoden erfolgte jeweils in Doppelbestimmung (A, B) aus der Probe 2017109730. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass die mit Hilfe des DNeasy Plant Maxi Kits gewonnenen DNA-Extrakte bei Verwendung von 0,2 g Probenmaterial von schlechter bis sehr schlechter Reinheit waren. Zwar konnte durch eine Erhöhung des Ausgangsmaterials von 0,2 g auf 1 g die Qualität und Menge der isolierten DNA gesteigert werden, dies führte jedoch nur zu einem positiven Nachweis von Eukaryoten und nicht zu einem von *Cocos nucifera*. Auch die Wizard-Methode lieferte DNA-Extrakte von geringer Reinheit. Hier konnte eine Inhibition der real-time PCR beobachtet werden. Weder für Eukaryoten noch für *Cocos nucifera* konnte ein positiver Nachweis erfolgen. Im Gegensatz dazu lieferten die CTAB- sowie die modifizierte CTAB-Methode DNA von guter Reinheit. Insbesondere mit der modifizierten CTAB-Methode wurde eine sehr hohe DNA-Ausbeute erzielt. Während der Nachweis von Eukaryoten positiv ausfiel, konnte *Cocos nucifera* jedoch mittels real-time PCR nicht nachgewiesen werden. Die verschiedenen Extraktionsvarianten auf Grundlage des PME Food DNA Extraction Kits führten allesamt zu einem positiven Nachweis von Eukaryoten. Es war zu beobachten, dass die aus flüssigen Proben gewonnenen DNA-Extrakte von höherer Reinheit und Konzentration waren als die aus festen Proben. Durch einzelne Änderungen in der Durchführung, wie die Inkubation nach Zugabe des *Enrichment Reagents* über Nacht im Kühlschrank, die Durchführung des Waschschriffs mit eisgekühltem, 70%igem Ethanol anstelle von Wasser oder die Verdopplung des Extraktionsansatzes, ließ sich zusätzlich die DNA-Ausbeute erhöhen, sodass ein positiver Nachweis von *Cocos nucifera* mittels real-time PCR möglich war. Ein reproduzierbares Ergebnis konnte jedoch nur durch die Inkubation über Nacht im Kühlschrank oder durch die Verdopplung des Extraktionsansatzes erreicht werden.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der DNA-Isolierung aus Kokosblütenzucker unter Anwendung verschiedener Methoden.

Methode	Probe	DNA-Konzentration [ng/μL]	Extraktions-effizienz [μg/g]	Reinheit A260/A280	Nachweis Eukaryoten*	Nachweis <i>C. nucifera</i> Ct-Wert*
<i>CTAB-Methode (30 μL TE-Puffer)</i>						
2 g Probe/5 mL CTAB-Lysepuffer	A	35,7	0,54	1,90	+	-
	B	38,1	0,57	1,93	+	-
5 g Probe/5 mL CTAB-Lysepuffer	A	163,8	0,98	1,73	+	-
	B	178,1	1,07	1,94	+	-
<i>Modifizierte CTAB-Methode (120 μL TE-Puffer + 1/100 verdünnt)</i>						
2 x 5 g Probe/25 mL CTAB-Lysepuffer	A	73,9	88,7	1,83	+	-
	B	76,4	91,7	1,84	+	-
<i>Wizard-Methode (2 x 25 μL TE-Puffer)</i>						
2 g Probe/5 mL CTAB-Lysepuffer	A	33,8	0,85	1,41	-	-
	B	35,8	0,90	1,61	-	-
5 g Probe/5 mL CTAB-Lysepuffer	A	80,2	0,80	1,56	-	-
	B	84,6	0,85	1,54	-	-
<i>DNeasy Plant Maxi Kit (2 x 0,5 mL Elutions-Puffer)</i>						
0,2 g Probe/5 mL Puffer	A	2,4	12	1,03	-	-
	B	2,7	14	1,09	-	-
1 g Probe/5 mL Puffer	A	18,9	19	1,65	+	-
	B	8,8	8,8	1,79	+	-
<i>PME Food DNA Extraction Kit (2 x 25 μL Elutions-Puffer)</i>						
Als feste Probe (100 mg Probe)	A	0,2	0,10	0,21	+	-
	B	0,8	0,40	0,31	+	-
Als flüssige Probe (1 g Probe/500 μL destilliertem Wasser)	A	4,2	0,21	1,52	+	36,21
	B	3,9	0,20	1,49	+	-
Als flüssige Probe (1 g Probe/500 μL destilliertem Wasser): Inkubation über Nacht im Kühlschrank	A	8,8	0,44	1,78	+	39,11
	B	7,3	0,37	1,91	+	37,37
Als flüssige Probe (1 g Probe/500 μL destilliertem Wasser): Waschschritt mit eisgekühltem, 70%igem Ethanol	A	10,2	0,51	1,78	+	-
	B	8,8	0,44	1,50	+	38,3
Als flüssige Probe (1 g Probe/500 μL destilliertem Wasser): Doppelter Ansatz pro Säule	A	8,1	0,20	1,74	+	36,78
	B	10,7	0,27	1,77	+	37,71

*"+ " zeigt ein positives Ergebnis an; "- " zeigt ein negatives Ergebnis an

Auf Grundlage der Ergebnisse der DNA-Isolierung unter Anwendung verschiedener Methoden wurde sich für die Extraktion mittels PME Food DNA Extraction Kit mit Inkubation über Nacht im Kühlschrank sowie des Waschschriffs mit eisgekühltem, 70%igem Ethanol entschieden. Beide Modifikationen führten zu einer deutlichen Steigerung der Extraktionseffizienz um jeweils ca. 100 % bei minimaler Erhöhung der Material- und Arbeitskosten.

Das ausgewählte Extraktionsprotokoll wurde an 16 verschiedenen Kokosblütenzuckerproben, jeweils in Doppelbestimmung (A, B), getestet. Dazu wurde von jedem DNA-Isolat spektrophotometrisch die DNA-Konzentration und Reinheit bestimmt. Außerdem wurde in real-time PCR-Assays die Amplifizierbarkeit der DNA mittels des eukaryotenspezifischen Primerpaars euk18S und des kokosspezifischen Primerpaars cocosPRK überprüft.

Während 5 der 16 Kokosblütenzuckerproben direkt von Farmern aus Indonesien (2017109730, 2018122989, 2018122990, 2018122992, 2018122996) stammten, wurden die anderen 11 Kokosblütenzuckerproben im Vorwege mittels ¹³C/¹²C-Stabilisotopenanalyse und stichprobenartig mittels ELISA auf Zusätze von Gluten und C₄-Zucker untersucht (siehe Tabelle 19 in Abschnitt 8.2 im Anhang sowie Abschnitt 6.3.2 und 6.3.3). Lediglich in den Proben 2018113720 (40 % C₄-Zusatz; 15,93 mg/kg Gluten) und 2018122976 (65 % C₄-Zusatz) konnten Fremdanteile nachgewiesen werden. Somit wurde erwartet, dass nur für diese beiden Proben, aufgrund des hohen Anteils an Beimischungen, der Nachweis von *Cocos nucifera* mittels real-time PCR negativ ausfallen könnte.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der DNA-Isolierung aus Kokosblütenzucker unter Verwendung des PME Food DNA Extraction Kits.

Probe	DNA-Konzentration [ng/μL]	Reinheit A260/A280	Nachweis Eukaryoten*	Nachweis <i>C. nucifera</i> Ct-Wert*
2017109730				
A	7,9	1,96	+	36,52
B	7,4	1,99	+	37,28
2017111196				
A	7,3	1,30	+	-
B	8,0	1,22	+	-
2018111888				
A	95,9	1,93	+	-
B	76,9	1,96	+	-
2018112556				
A	8,5	1,55	+	-
B	2,3	0,81	+	-

*" +" zeigt ein positives Ergebnis an; "-" zeigt ein negatives Ergebnis an

Fortsetzung Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der DNA-Isolierung aus Kokosblütenzucker unter Verwendung des PME Food DNA Extraction Kits.

Probe	DNA-Konzentration [ng/µL]	Reinheit A260/A280	Nachweis Eukaryoten*	Nachweis <i>C. nucifera</i> Ct-Wert*
2018113719				
A	59,8	1,85	+	-
B	46,5	1,73	+	-
2018113720				
A	15,7	1,55	+	-
B	16,9	1,58	+	-
2018119189				
A	38,3	1,74	+	35,28
B	31,8	1,75	+	37,83
2018119190				
A	30,2	1,77	+	-
B	32,3	1,83	+	-
2018122976				
A	6,1	1,29	+	-
B	6,6	1,36	+	-
2018122978				
A	43,9	1,76	+	36,71
B	34,3	1,92	+	37,27
2018122981				
A	29,8	1,85	+	-
B	21,7	1,52	+	-
2018122989				
A	37,3	2,08	+	35,83
B	44,9	2,09	+	34,14
2018122990				
A	27,6	1,96	+	36,85
B	19,4	1,98	+	37,14
2018122991				
A	75,6	1,87	+	-
B	77,6	1,85	+	-
2018122992				
A	35,3	1,92	+	31,59
B	27,6	1,95	+	32,16
2018122996				
A	13,4	1,86	+	36,43
B	20,0	1,86	+	37,11

*" +" zeigt ein positives Ergebnis an; "-" zeigt ein negatives Ergebnis an

Unter Verwendung des PME Food DNA Extraction Kits konnte mit Hilfe der beschriebenen Modifikation in 44 % der analysierten Kokosblütenzuckerproben reproduzierbar *Cocos nucifera* mittels real-time PCR-Assay nachgewiesen werden. Dies entspricht nicht den oben genannten Erwartungen. Dabei ist auffällig, dass die bestimmten Ct-Werte im Bereich der abgeschätzten Nachweisgrenze (siehe Abschnitt 4.3.6) liegen. Damit ist nicht auszuschließen, dass die Proben,

welche ein negatives Ergebnis bei der Amplifikation zeigten, von der Kokospalme stammen. Stattdessen ist aufgrund der Kenntnisse über das Probenmaterial viel mehr davon auszugehen, dass die Ergebnisse falsch negativ sind und die Ct-Werte knapp unterhalb der abgeschätzten Nachweisgrenze liegen.

5.3.3 Diskussion

Kokosblütenzucker wird durch das Einkochen des süßen Nektars der Kokosblüte gewonnen (siehe Abschnitt 3.1.2). Dieser zuckerhaltige Phloemsaft ist ein DNA armes Ausgangsmaterial. Durch das täglich frische Anschneiden des Blütenstandes werden jedoch DNA haltige Zellen, die zum Nachweis von *Cocos nucifera* herangezogen werden können, in den Phloemsaft abgesondert. Bedingt durch den Herstellungsprozess – die Hitzeeinwirkung beim Einkochen sowie die mechanische Einwirkung beim Umrühren – unterliegt die DNA allerdings starken Beanspruchungen, sodass Fragmentierungen zu Sequenzabschnitten < 200 bp auftreten können. Liegen diese Strangbrüche im zu amplifizierenden Sequenzabschnitt, können diese DNA-Template nicht zum Nachweis von *Cocos nucifera* herangezogen werden. Dies schmälert den Erfolg DNA basierter Nachweisverfahren.

Des Weiteren ist auch durch die zuckerhaltige Matrix die Isolierung von DNA ausreichender Quantität und Qualität beeinträchtigt. Denn das zuckerhaltige Medium ist ein optimaler Nährboden für osmophile Hefen, wie *Saccharomyces chevalieri* [82]. Selbst wenn diese Hefen während des Einkochprozesses abgetötet werden und nicht mehr als Lebendzellen nachweisbar sind, so ist das Produkt stark mit Fremd-DNA kontaminiert. Dies sorgt zwar für DNA-Extrakte hoher Reinheit und Konzentration, in denen Eukaryoten nachweisbar sind, jedoch kein Nachweis auf *Cocos nucifera* gelingt.

Zusätzlich ist eine Isolierung der DNA aufgrund der sehr ähnlichen Löslichkeitseigenschaften wie die des Zuckers erschwert. Genau wie Saccharose zeigt auch DNA gute Löslichkeitseigenschaften in Wasser. Beide sind jedoch nur begrenzt in Alkohol löslich [19; 98]. Dies macht eine Entfernung von Kontaminationen und Inhibitoren besonders schwierig. Hier eignen sich vor allem Methoden mit Festphasenextraktion, wie die Wizard-Methode, das DNeasy Plant Maxi Kit oder das PME Food DNA Extraction Kit, bei denen die DNA durch Adsorption an das Säulenmaterial bindet, gewaschen und anschließend eluiert wird. Die Wizard-Methode erwies sich jedoch als sehr schwierig und aufwendig in der Handhabung. Die erhaltenen Extrakte zeigten starke Inhibitionen, sodass diese Methode ungeeignet ist. Extrakte, die hingegen mit dem DNeasy Plant Maxi Kit isoliert wurden, zeigten zwar keine Inhibition, allerdings konnte mit der empfohlenen Menge an Ausgangsmaterial nicht ausreichend amplifizierbare DNA isoliert werden. Das DNeasy Plant Maxi Kit ist schließlich nur für ein maximales Probenvolumen von 0,2 g Trockengewicht geeignet. Eine größere Probeneinwaage brachte somit nur begrenzt Erfolg mit sich. Es hat den Nachteil, dass dadurch

letztlich nicht nur der Anteil an Target-DNA erhöht wird, sondern auch der Anteil an Fremd-DNA vergrößert wird. Es wird außerdem riskiert, dass die Lyse nur unzureichend stattfindet und dass die Bindungskapazität der Säule überschritten wird [99].

Gegenüber diesen beiden Methoden bietet das PME Food DNA Extraction Kit den Vorteil, durch Zugabe eines Carrier RNA/DNA Mixes sowie eines *Enrichment Reagents* die Ausfällung sehr geringer DNA-Konzentrationen zu begünstigen. Durch Modifikationen konnte diese Methode weiter optimiert werden, sodass reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden konnten. Dennoch ist die isolierte Menge an Target-DNA immer noch sehr gering, sodass die erhaltenen Ct-Werte nur knapp oberhalb der abgeschätzten Nachweisgrenze lagen und falsch negative Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden konnten.

Als weitere Schwierigkeit kam hinzu, dass der Herstellungsprozess von Kokosblütenzucker nicht standardisiert ist und sich teilweise regional unterscheidet (siehe Abschnitt 5.4.2). Dies sorgt für starke Unterschiede zwischen den Proben und macht eine halbquantitative Abschätzung des Kokosblütenzuckeranteils anhand einer Kalibrierreihe derzeit unmöglich.

5.3.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Studie wurden verschiedene Extraktionsmethoden für eine DNA basierte Echtheitsprüfung von Kokosblütenzucker getestet und miteinander verglichen. Dabei wurde das PME Food DNA Extraction Kit unter Modifikation des Extraktionsprotokolls als beste Methode evaluiert. Die erhaltenen Ergebnisse zeugten aufgrund ihrer Reproduzierbarkeit von hoher Präzision. Da die erhaltenen Ct-Werte jedoch nur knapp oberhalb der abgeschätzten Nachweisgrenze lagen, können derzeit falsch negative Ergebnisse bei einer qualitativen Aussage nicht ausgeschlossen werden. Auch eine halbquantitative Abschätzung des Kokosblütenzuckeranteils ist momentan noch nicht möglich.

Um die Genauigkeit der Methode zu erhöhen und Fehler 1. Art, bei denen Kokosblütenzucker fälschlicher Weise nicht als solcher erkannt wird, zu vermeiden, muss die Methode jedoch weiter optimiert werden. Hierfür wäre eine weitere Erhöhung der Probenmenge in Erwägung zu ziehen. Da jedoch auch das PME Food DNA Extraction Kit nur für sehr kleine Mengen an Ausgangsmaterial ausgelegt ist, sollten die Extraktionsansätze zunächst separat die Säulenaufreinigung durchlaufen und erst hinterher vereinigt und aufkonzentriert werden.

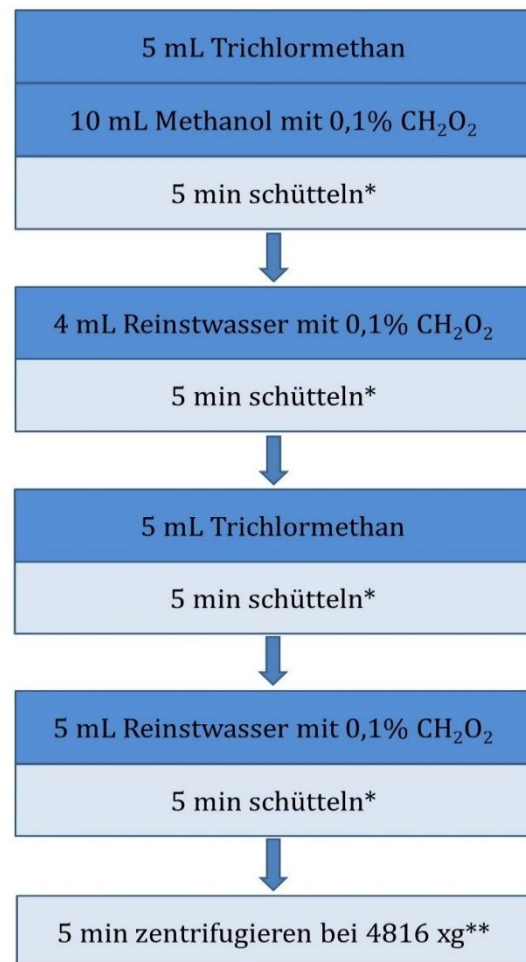
Aufgrund der bei diesem Ansatz anfallenden Material- und Arbeitskosten, wäre dies zum jetzigen Zeitpunkt lediglich ein akademischer jedoch kein wirtschaftlicher Ansatz.

5.4 Metabolomics basierte Methode

5.4.1 Methoden

5.4.1.1 Extraktion

Zur Analyse des Lipidprofils wurden die Zuckerproben sowie die Öl- und Fettproben in Anlehnung an die von BLIGH und DYER beschriebene Methode extrahiert [100]. Dazu wurden 1 g Zucker bzw. 0,1 g Fett/Öl eingewogen und wie in Abbildung 20 dargestellt, schrittweise Methanol, Wasser und Trichlormethan zugesetzt. Es wurde ein Zweiphasensystem erhalten, von dem die untere, unpolare Phase mit einem Spritzenfilter (CHROMAFIL® Xtra RC-20/25, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) membranfiltriert und zur Messung eingesetzt wurde. Außerdem wurden zur Überprüfung der Extraktion und anschließenden Messung eine Extraktionsblindprobe sowie jeweils vier Zuckerproben (1 Rohr-, 1 Vollrohr-, 1 Palm- und 1 Kokosblütenzucker), deren Spektren bekannt sind, als Qualitätskontrollprobe (*Quality Control Sample*, QC-Probe) mitgeführt.



*VIBA 330, Collomix GmbH, Gaimersheim, Deutschland

**Heraeus Multifuge X3, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Abbildung 20: Schema zur Probenextraktion.

5.4.1.2 Parameter des UPLC-QToF-MS-Systems

Zur Verringerung der Ionensuppression während der Ionisation, erfolgte zunächst eine flüssigkeitschromatographische Trennung der Analyten in Anlehnung an die RP-UPLC-MS-Methode von VORKAS et al. mittels UPLC [101]. Die Chromatographiebedingungen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Parameter der flüssigkeitschromatographischen Trennmethode.

Parameter	Ausgewählte Einstellung		
Sample Manager			
Probentemperatur	10 °C		
Injektionsvolumen	0,1-10 µL		
Spüllösungsmittel	2-Propanol/Acetonitril (3/1; V/V)		
Column Manager			
Säule	ACQUITY UPLC BEH C18 Länge: 150 mm, Innendurchmesser: 2,1 mm, Partikelgröße: 1,7 µm		
Ofentemperatur	55 °C		
Binary Solvent Manager			
Methodendauer	27 min		
Flussrate	0,300 mL/min		
Eluent A	Wasser + 10 mM NH ₄ HCO ₂ + 0,1 % CH ₂ O ₂		
Eluent B	2-Propanol/Acetonitril (3/1; V/V) + 10 mM NH ₄ HCO ₂ + 0,1 % CH ₂ O ₂		
Gradient	Zeit [min]	Anteil an Eluent A [%]	Anteil an Eluent B [%]
	0	30	70
	3	30	70
	18	0	100
	23	0	100
	24	30	70
	27	30	70

Für die massenspektrometrische Analyse wurde ein QToF-MS mit einer ESI-Quelle (Vion IMS QToF, Waters Corp., Milford, MA, USA) verwendet. Die Parameter des massenspektrometrischen Systems im positiven Ionenmodus sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Parameter des massenspektrometrischen Systems im positiven Ionenmodus.

Parameter	Ausgewählte Einstellung
Analysis Screening Type	Accurate Mass Screening on IMS data
Analyzer mode	Sensitivity, High Definition MS ^E
Mass range	100-1.000 <i>m/z</i>
Scan time	0,150 s
Capillary voltage	3,50 kV
Source temperature	120 °C
Desolvation temperature	550 °C
Cone gas	50 L/h
Desolvation gas	1.000 L/h
Low collision energy	6,00 eV
High collision energy	10,00-60,00 eV

Um die Massengenauigkeit des Massenspektrometers in dem gewünschten Massenbereich zu gewährleisten, erfolgte eine Kalibrierung des Massenspektrometers mit dem Major Mix IMS/Tof Calibration Kit (Waters Corp., Milford, MA, USA) vor Beginn jeder Messreihe. Zusätzlich wurde über die gesamte Messdauer im Intervall von 1,00 min eine Leucin-Enkephalin-Lösung (Waters Corp., Milford, MA, USA), bestehend aus 0,1 µg/mL Leucin-Enkephalin gelöst in einem Lösungsmittelgemisch aus Reinstwasser/Acetonitril (1/1; V/V) mit 0,1 % Ameisensäure, zur Lockmassenkorrektur injiziert.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit des chromatographischen sowie massenspektrometrischen Systems wurden über die gesamte Sequenz vier QC-Proben sowie eine Extraktionsblindprobe mitgeführt (siehe 5.4.1.1), die nach jeweils fünf Injektionen analysiert wurden. Diese wurden darüber hinaus zur Equilibrierung des Systems mindestens zehnmal vor Messbeginn injiziert. Die Injektion der zu analysierten Proben fand in randomisierter Reihenfolge statt.

5.4.1.3 Parameter zur Datennachverarbeitung mittels UNIFI

Die Visualisierung, Nachverarbeitung und Dokumentation der Messdaten erfolgte mit Hilfe der UNIFI Scientific Information System Software (Waters Corp., Milford, MA, USA). Die ausgewählten Parameter zum Peak Processing sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Parameter zur Durchführung des Peak-Processings.

Parameter	Ausgewählte Einstellung	
2D Peak detection		
Chromatographic peak width		automatic
Peak detection threshold		automatic
Peak integration	Liftoff	0,0 %
	Touchdown	0,5 %
Peak rejection	Minimum height	0,0
	Minimum area	0,0
Maximum allowed number of peaks per chromatogram		1.000
Smoothing algorithm		Mean
	Half width	2
	Iterations	2
4D Peak detection		
Apply lock mass correction		enabled
High energy intensity threshold		100,0 counts
Low energy intensity threshold		250,0 counts
Background filter		high
Maximum number of peaks to keep per channel		100.000

Fortsetzung Tabelle 10: Parameter zur Durchführung des Peak-Processings.

Parameter	Ausgewählte Einstellung
4D Isotope clustering	
Fraction of the chromatographic peak width to apply during cluster creation	0,5
Fraction of the chromatographic peak width to apply during high and low energy association	0,5
Fraction of the drift peak width to apply during cluster creation	0,5
Fraction of the drift peak width to apply during high and low energy association	0,5
Intensity threshold to apply during high to low energy association	50
Maximum considered charge for cluster	1
Maximum number of isotopes per cluster	5
Minimum allowed monoisotopic/largest isotope intensity ratio	0,7
Allow wider chromatographic tolerance for saturated data	enabled
Quantitation Settings	
Peak detection	use 3D peaks
Ions used to quantify	most intense monoisotopic

5.4.2 Ergebnisse

Es wurde angenommen, dass sich Rohrzucker, Vollrohrzucker, Palmzucker, Kokosblütenzucker sowie Rübenzucker in ihren Hauptbestandteilen nicht signifikant unterscheiden. Der Hauptbestandteil von handelsüblichen Haushaltszucker ist reine Saccharose, die durch Abtrennung der Melasse aus Zuckerrohr oder Zuckerrüben gewonnen wird [102].

Um charakteristische Merkmale der einzelnen Produktgruppen – Rohrzucker, Vollrohrzucker, Palmzucker, Kokosblütenzucker und Rübenzucker – herauszuarbeiten, wurde deshalb auf die unpolaren Metabolite der Melasse abgezielt. Melasse ist ein dickflüssiger, dunkelbrauner Zuckersirup, der noch reich an sekundären Pflanzenstoffen ist und einen Fettgehalt von ca. 0,3 % aufweist [102; 103]. Hier wurden Metabolite erwartet, die eine Differenzierung zwischen den oben genannten Produktgruppen erlauben.

Das hierfür ausgewählte Extraktionsverfahren nach BLIGH und DYER ist eine Methode, die zur Extraktion von Lipiden aus biologischem Material, welches zu ca. 80 % aus Wasser und 1 % aus Fett besteht, entwickelt wurde [100].

Die Analyse der unpolaren Extrakte ergab im Wesentlichen fünf verschiedene Typen von Chromatogrammen, die sich im Retentionszeitbereich von 10-19 min unterschieden und für die verschiedenen Produktgruppen charakteristisch zu sein schien. Die Chromatogramme sind in Abbildung 21 gezeigt.

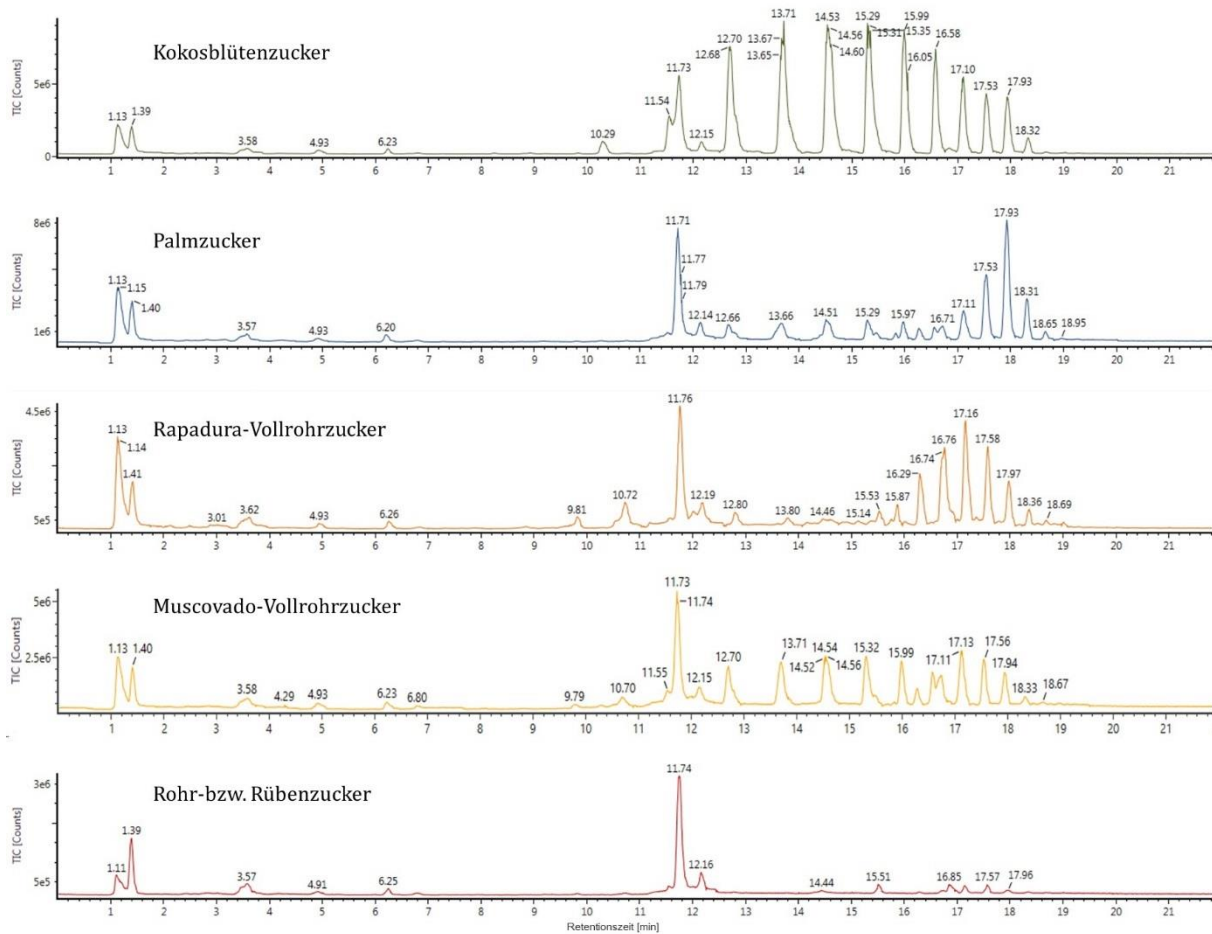


Abbildung 21: Total Ion Chromatogram (TIC) der Produktgruppen Kokosblütenzucker, Palmzucker, Vollrohrzucker, Rohr- und Rübenzucker. Das TIC zeigt die summierte Intensität aller detektierten Signale des Massenspektrums.

Es wurde angenommen, dass anhand der charakteristischen Chromatogramme die Produktgruppen unterschieden und Streckungen von Kokosblütenzucker, wie z. B. mit Vollrohrzucker (siehe Abbildung 22), anhand der Peakverhältnisse aufgedeckt und quantifiziert werden könnten. Die Chromatogramme der Produktgruppen Rohr- und Rübenzucker waren nahezu identisch. Sie wiesen am wenigsten Peaks auf und glichen dem Chromatogramm der Extraktionsblindprobe. Rohr- und Rübenzucker sind weiße, kristalline Produkte, deren Melasse im Raffinationsprozess vollständig entfernt wird [7; 102]. Dementsprechend ließen sich hier mit der ausgewählten Extraktionsmethode keine unpolaren Metabolite aus dem Zucker extrahieren.

Für die Produktgruppe Vollrohrzucker waren vor allem die Verhältnisse der Peaks im Retentionszeitbereich von 16-18 min charakteristisch. Lediglich 3 von 17 untersuchten Proben wiesen eine andere Verteilung der Peaks im Chromatogramm auf. Dabei war auffällig, dass es sich bei den abweichenden Proben um sogenannten Muscovado- oder Mascobado-Zucker handelte. Muscovado, Mascobado, Rapadura und Panela sind die in den Herstellungsländern traditionellen Bezeichnungen für Vollrohrzucker. Während der hier analysierte Muscovado-Zucker von Mauritius stammte, kommt Mascobado von den Philippinen. Rapadura und Panela hingegen sind

in Süd- und Mittelamerika verbreitete Bezeichnungen für Vollrohrzucker [104; 105]. Somit scheint hier die geographische Herkunft einen Einfluss auf das Profil unpolarer Metabolite zu haben.

Die Produktgruppe Palmzucker wies im Retentionszeitbereich von 17-19 min ein charakteristisches Peakmuster auf. Dabei wurden insbesondere in dieser Gruppe sehr heterogene Chromatogramme erwartet, denn Palmzucker ist ein Sammelbegriff für Zucker, der aus Palmen gewonnen wird. Dabei wird jedoch weder die Palmenspezies noch der Herstellungsprozess genauer definiert [14]. Entgegen den Erwartungen wies jedoch lediglich eine von 11 analysierten Proben von dem abgebildeten Chromatogramm ab.

Bei der abweichenden Palmzuckerprobe, dessen Chromatogramm wie eines von Rohrzucker aussah, handelte sich mit 46 €/kg um ein sehr hochpreisiges Produkt, welches jedoch als Einziges die Herkunftsangabe „Kambodscha“ trug.

In der Produktgruppe Kokosblütenzucker wurden insgesamt drei verschiedene Metabolitprofile erhalten. Hierbei konnte abermals eine Abhängigkeit des Metabolitprofils von der geographischen Herkunft festgestellt werden. Sechs Kokosblütenzuckerproben trugen die geographische Herkunftsangabe „Philippinen“. Ihre Chromatogramme glichen denen des Rohr- bzw. Rübenzuckers. Die restlichen 93 % der Proben mit bekannter Herkunft, waren mit „Indonesien“ als Herkunft deklariert. Diese Proben konnten in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Chromatogramme der einen Gruppe glichen denen des Palmzuckers. Sie stammten hauptsächlich aus der Region um Purwokerto. Die andere Gruppe unterschied sich von allen bisherigen Chromatogrammen und zeigte ein sehr intensives Peakmuster im Retentionszeitbereich von 10-19 min. Diese Proben kamen hauptsächlich von Farmern rund um Yogyakarta.

Damit wurde zunächst angenommen, dass nicht alle Kokosblütenzuckerproben richtig gekennzeichnet waren und sich unter den Proben auch Palmzucker- und Rohr- bzw. Rübenzuckerproben befanden. Eine Erweiterung der Studie um die Produktgruppe Kokosblütensirup zeigte gleiche Ergebnisse. Auch hier wiesen philippinische Proben keine unpolaren Metabolite im Chromatogramm auf und glichen denen von Rohr- bzw. Rübenzucker.

Zur Absicherung der Hypothese, dass es sich bei philippinische Proben um Rohrzucker handeln könnte, wurden die Kokosblütenzuckerproben mittels $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Stabilisotopenanalyse hinsichtlich einer Verfälschung mit C_4 -Zucker untersucht (siehe Abschnitt 6.2.7 sowie Tabelle 19 im Anhang). Das Ergebnis fiel jedoch für alle Proben negativ aus. Es konnte kein C_4 -Zucker nachgewiesen werden. Eine Verfälschung mit Rübenzucker wurde unter Berücksichtigung der Anbaugelände und Warenströme als unwahrscheinlich angesehen. Auch weitere Analysen lieferten für Kokosblütenzucker philippinischer Herkunft keine besonderen Auffälligkeiten (siehe Abschnitt 6).

Die Analyse eines unverarbeiteten, indonesischen Kokosblütennektars zeigte, dass dieser keine unpolaren Metabolite enthielt. Damit wuchs die Annahme, dass Kokosblütenzucker natürlicherweise keine Lipide enthält, sondern diese beim Herstellungsprozess zugesetzt werden.

Ein Vergleich mit Chromatogrammen von pflanzlichen Referenzölen und -fetten lieferte schließlich große Übereinstimmungen mit Kokos- und Palmenfett. Die dazugehörigen Chromatogramme sind in Abbildung 23 gezeigt.

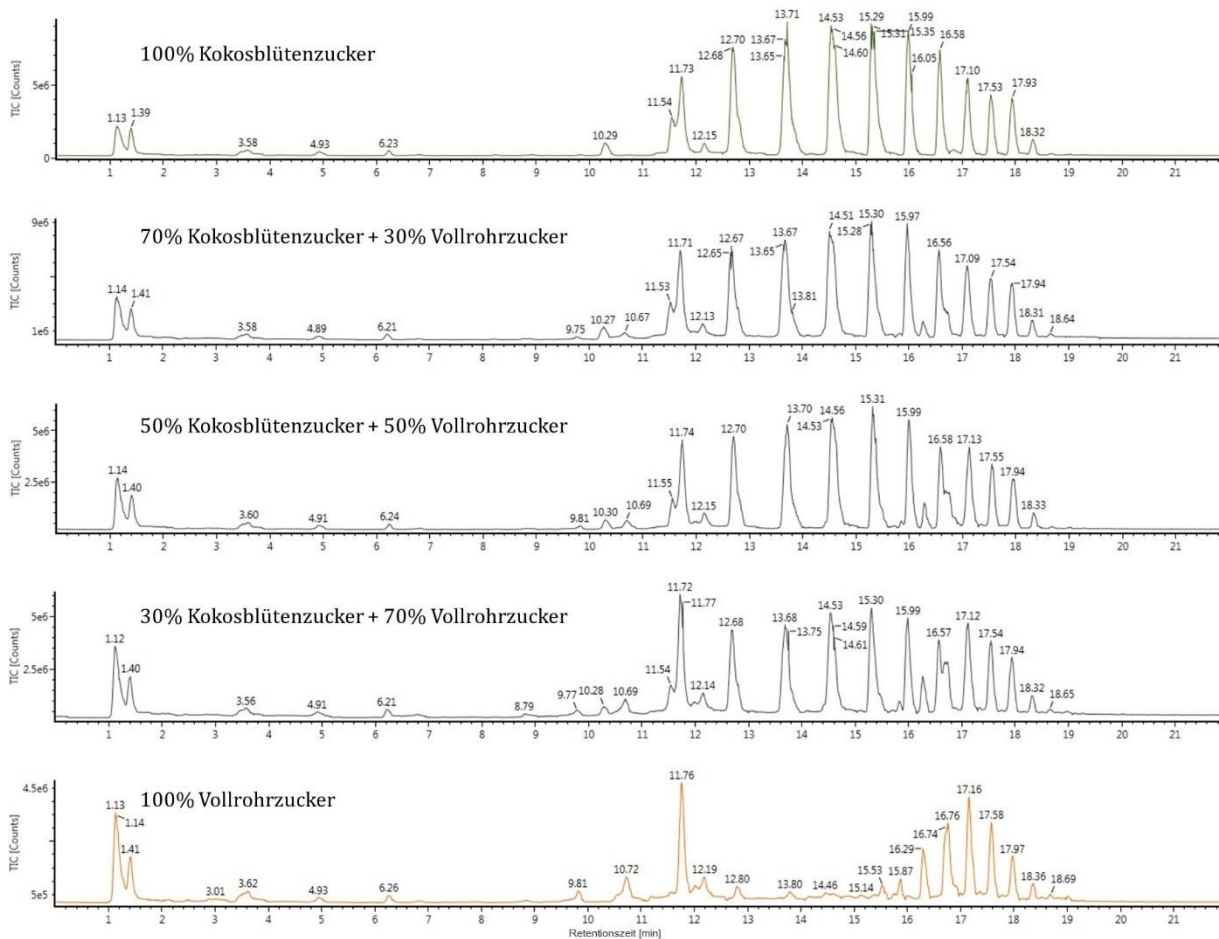


Abbildung 22: Chromatogramme verschiedener Mischungen von Kokosblütenzucker und Rapadura-Vollrohrzucker.

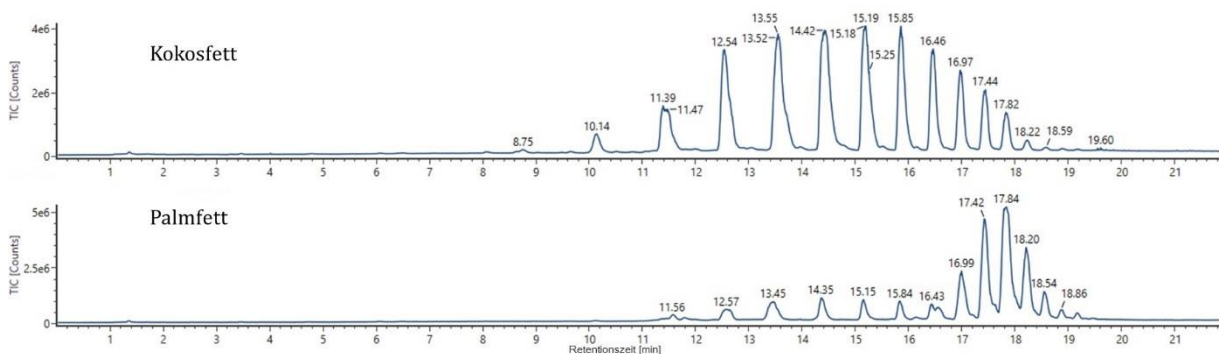


Abbildung 23: Chromatogramme von Kokos- und Palmfett.

Somit scheint es regionale Unterschiede im Herstellungsprozess von Kokosblütenzucker zu geben (siehe Abbildung 24). Während in Kokosblütenzucker aus der Region um Purwokerto Palmfett nachgewiesen wurde, enthielt Zucker aus der Umgebung um Yogyakarta Kokosfett. Dies konnte teilweise auch in Audits der Großhändler vor Ort bestätigt werden.

Auf Anfrage bei Händlern und Herstellern philippinischen Kokosblütenzuckers wurde bestätigt, dass diesem Zucker während des gesamten Herstellungsprozesses weder Fett noch Öl zugesetzt wird. Dies spiegelte sich ebenfalls in den Chromatogrammen der Proben wider.

Es wird die Annahme gemacht, dass auch die Verschiedenheit der Chromatogramme innerhalb der Produktgruppen Palmzucker und Vollrohrzucker in regionalen Unterschieden der Herstellungsprozesse begründet ist.

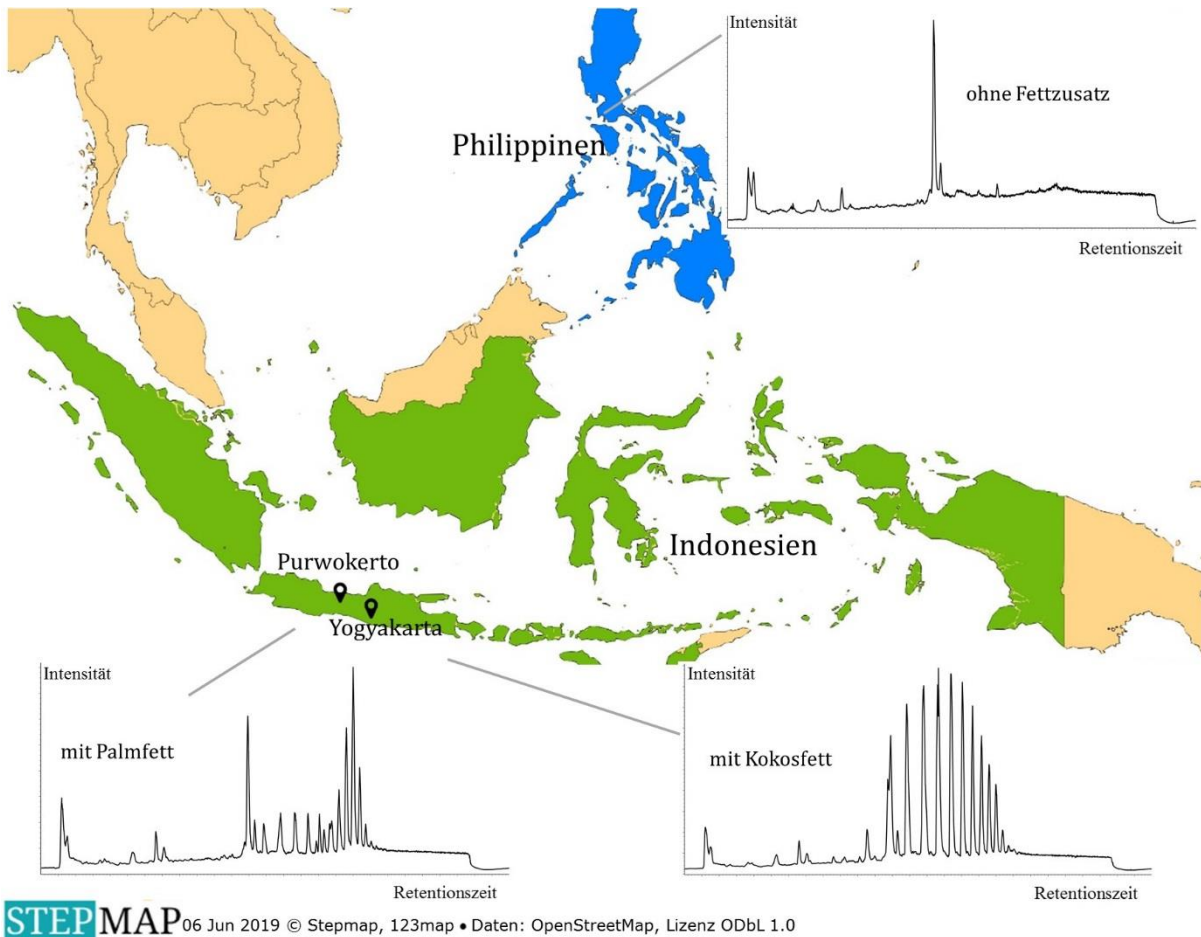


Abbildung 24: Chromatogramme von Kokosblütenzucker in Abhängigkeit der geographischen Herkunft. Eigene Darstellung nach [106].

5.4.3 Diskussion

Aus anderen Bereichen der Lebensmittelproduktion ist bekannt, dass Öl hinzugefügt wird, um ein Überkochen während des Herstellungsprozesses zu verhindern. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn in der Suspension natürlicherweise oberflächenaktive Substanzen enthalten sind, die zur Schaumbildung neigen. Zum Beispiel bilden Proteine in der Rüben- oder Rohrzuckerproduktion einen durch Zucker stabilisierten Schaum. Ein Überschäumen der Suspension beim Kochen würde zu einem erheblichen Ertragsverlust führen. Auch eine physikalische Entfernung des Schaums, z. B. durch Abschöpfen, würde zu einer verminderten Ausbeute führen. Anti-Schaummittel sind daher notwendige Zusatzstoffe in der Zuckerproduktion [107]. Aus der Literatur ist bekannt, dass dem Kokosblütennektar Kokosnussviertel zugesetzt werden können, um ein Überkochen während des Herstellungsprozesses zu verhindern [9]. Kokosnüsse enthalten ca. 36,5 g Öl in 100 g [108]. Die gängige Praxis scheint jedoch in Abhängigkeit von Produktionsland bzw. -standort zu variieren. Bedingt durch den nicht standardisierten Herstellungsprozess unterscheiden sich somit verschiedene Kokosblütenzucker je nach geographischer Herkunft. Damit zeigt dieses Experiment umso mehr, wie wichtig warenkundliche Kenntnisse und die Aufnahme von Metadaten sind, damit es im Laufe von Metabolomics basierten Studien durch die große Vielzahl möglicher exogener Einflussfaktoren nicht zu Fehlinterpretationen von Ergebnissen kommt.

5.4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Studie hat gezeigt, dass die hier verwendete Methode nicht dazu geeignet ist, Kokosblütenzucker von anderen Zuckern zu unterscheiden, um so Verfälschungen aufzudecken und zu quantifizieren. Die hier gezeigten Unterschiede in den Chromatogrammen sind auf regionale Unterschiede im Herstellungsprozess zurückzuführen und können nicht zur Unterscheidung der vier Produktgruppen – Kokosblütenzucker, Palmzucker, Vollrohrzucker und Rohrzucker – herangezogen werden. Hierfür muss eventuell auf eine andere Metabolitgruppe abgezielt und entsprechend die Extraktionsmethode angepasst werden.

Nichtsdestotrotz hat sich die Methode als geeignet erwiesen, um Fette und Öle zu unterscheiden und könnte herangezogen werden, um die Echtheit von Kokosfett zu prüfen. Hierfür ist bisher die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) weitverbreitet [109-111].

Kapitel 6 Charakterisierung von Kokosblütenzucker in Hinblick auf dessen Herstellungsprozess

6.1 Zielsetzung und analytische Herangehensweise

Während die Herstellung von Zucker aus dem süßen Nektar der Kokospalme in Süd- und Südostasien eine lange Tradition hat, ist bisher in Europa nicht viel über den Herstellungsprozess bekannt. Damit der Lebensmitteleinzelhandel, trotz fehlender rechtlicher Definition von Kokosblütenzucker, Anforderungen an das Produkt formulieren kann, die nicht nur Wünsche des Kunden berücksichtigen, sondern auch den Herstellungsprozess einbeziehen, ist im Vorwege eine allgemeine Charakterisierung des Produkts sinnvoll.

Bisherige Arbeiten konzentrierten sich hauptsächlich auf den Fermentationsprozess von Kokosblütennektar, den daran beteiligten Mikroorganismen [82] sowie den daraus resultierenden Veränderungen von pH-Wert, Zuckergehalt [11] und der Zusammensetzung flüchtiger Verbindungen [112]. Es gibt nur wenige Arbeiten, die sich mit dem Produkt Kokosblütenzucker als solches beschäftigen [113; 114].

Ziel der vorliegenden Studie war es darum, das Produkt genauer zu beschreiben, um Rückschlüsse auf den Herstellungsprozess ziehen zu können, auch im Hinblick auf die Möglichkeiten der Authentizitätsprüfung. Dazu wurden etablierte Methoden, wie die enzymatische Zuckerbestimmung, die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenanalyse, die Glutenbestimmung mittels ELISA, eine mikroskopische Analyse sowie eine sensorische Beschreibung, durchgeführt und bewertet.

6.2 Material und Methoden

6.2.1 Probenmaterial

Der Studie standen, wie bereits in den vorangegangenen Experimenten, 107 Kokosblütenzuckerproben aus lokalen Lebensmittelgeschäften, Drogeriemärkten, dem Onlinehandel sowie von herstellenden Unternehmen und Händlern zur Verfügung. Eine Übersicht aller Kokosblütenzuckerproben kann Tabelle 19 in Abschnitt 8.2 im Anhang entnommen werden.

6.2.2 Beschreibung sensorischer Eigenschaften

Für die Beschreibung der sensorischen Eigenschaften von Kokosblütenzucker wurde eine einfach beschreibende Prüfung nach der in § 64 LFGB L 00.90-6:2015-06 beschriebenen Methode auf der Grundlage der DIN 10964:2014-11 durchgeführt [115; 116]. Für diese Prüfung wurde ein Panel von 18 ausgebildeten Prüfpersonen, bestehend aus 13 Frauen und fünf Männern, mit einem Alter

von 20 bis 45 Jahren zusammengestellt. Das Panel wurde gebeten, Aussehen, Geruch, Geschmack und Konsistenz der Proben mit frei wählbaren Attributen zu beschreiben.

Um die organoleptischen Eigenschaften von Kokosblütenzucker zu beschreiben und ihn von anderen Süßungsmitteln zu unterscheiden, wurden 24 Proben getestet, welche in Tabelle 11 zusammengefasst sind.

Tabelle 11: Probenübersicht für die einfach beschreibende Prüfung von Kokosblütenzucker.

Matrix	Probencode	Preis [€/kg]
Agavendicksaft	019	13,01
Apfeldicksaft	444	7,97
Apfeldicksaft	796	9,31
Birnendicksaft	633	9,53
Dattelsirup	888	13,56
Dattelsüße	777	13,96
Gerstenmalzextrakt	447	11,76
Kokosblütensirup	577	17,00
Kokosblütensirup	599	25,42
Kokosblütensirup	578	23,96
Kokosblütensirup	168	27,11
Kokosblütenzucker	158	28,54
Kokosblütenzucker	255	19,96
Kokosblütenzucker	151	29,96
Palmzucker	118	46,00
Palmzucker	887	22,24
Palmzucker	145	7,94
Reissirup	765	9,98
Rohrzucker	228	2,29
Vollrohrzucker	836	7,58
Waldblütenhonig	963	13,56
Zuckerrohrmelasse	111	9,97
Zuckerrübensirup	028	3,78
Zuckerrübensirup	015	N/A

Alle Proben wurden den Prüfern in klaren, durchsichtigen Kunststoffbechern mit einem dreistelligen Zufallscode präsentiert.

6.2.3 Mikroskopische Analyse

Wasser-, Iod-Kaliumiodid sowie Chloralhydratpräparate von Kokosblütenzuckerproben wurden bei 100-400facher Vergrößerung lichtmikroskopisch (Lichtmikroskop Zeiss Primo Star, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) analysiert. Zur Dokumentation wurde die Mikroskopkamera Axio Cam ERc 5s (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) eingesetzt.

6.2.4 Bestimmung des Gehalts an Gluten

Der Glutengehalt von Kokosblütenzucker wurde mit Hilfe des RIDASCREEN® Gliadin-Kits (R-biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) bestimmt. Die Proben wurden dazu jeweils in einer Doppelbestimmung analysiert. Der Test basiert auf einem Sandwich R5 ELISA, welcher vom Codex Alimentarius als Typ 1 Methode anerkannt ist und von der *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) INTERNATIONAL als *Official Methods of Analysis 2012.01* registriert ist [117; 118]. Als Positivkontrolle diente eine glutenhaltige Mehlmischung, während als Negativkontrolle glutenfreies Quinoa verwendet wurde.

6.2.5 Feuchtigkeitsbestimmung

Die Bestimmung des Feuchtigkeitsgehalts von Kokosblütenzucker erfolgte nach der in § 64 LFGB L 39.00-1:1981-04 beschriebenen Methode zur Bestimmung des Masseverlusts durch Trocknung bei Halbweißzucker, Zucker oder Weißzucker, raffiniertem Zucker oder raffiniertem Weißzucker [119]. Die Proben wurden dazu in einer Doppelbestimmung bei 103 ± 2 °C im Trockenschrank (DRY-Line DL 53, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) getrocknet.

6.2.6 Enzymatische Zuckerbestimmung

Der Gehalt an Glucose, Fructose und Saccharose wurde mit den enzymatischen Testkits Enzytec™ Liquid D-Glucose, Enzytec™ Liquid Sucrose/D-Glucose und Enzytec™ Liquid D-Glucose/D-Fructose (R-biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) bestimmt. Die Assays wurden nach den Anweisungen des Herstellers mit Hilfe eines vollautomatischen Analysegeräts (ChemWell® 2910, Awareness Technology Inc., Palm City, FL, USA) durchgeführt.

6.2.7 ¹³C/¹²C-Stabilisotopenanalyse

Zur Stabilisotopenanalyse wurden Kokosblütenzuckerproben an die auf Isotopen-Analytik spezialisierte Agrosolab GmbH (Jülich, Deutschland) geschickt. Dort wurden die Proben in einer Doppelbestimmung mit einem Elementaranalysator (NA 1500 series II, Carlo Erba Instruments S.r.l., Milano, Italy) gekoppelt an ein Isotopenmassenspektrometer (Horizon, Nu Instruments Ltd., Wrexham, UK) nach der von WINKLER und SCHMIDT beschriebenen Methode analysiert [60].

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Beschreibung sensorischer Eigenschaften

Bei Kokosblütenzucker handelt es sich um braunen Zucker, dessen Aussehen je nach Preis variieren kann. Während teurere Produkte hellbraun und feinpulvrig sind, wurden preiswerte Produkte von den Testern als braun bis mittelbraun und grobkörnig beschrieben. Darüber hinaus zeichneten sich die teureren Produkte durch eine höhere Rieselfähigkeit aus.

Der Geruch von Kokosblütenzucker wurde mit den Attributen karamellig, malzig, süß und röstig beschrieben (Abbildung 25 a)). Während jedoch bei günstigen Produkten der süße Geruch dominierte, war der Geruch nach Karamell bei den teuren Produkten besonders dominant.

Der Geschmack von Kokosblütenzucker wurde hauptsächlich als süß beschrieben (Abbildung 25 b)). Bei den teuren Produkten wurde die Beschreibung durch die Attribute karamellig und malzig ergänzt. Entgegen den Erwartungen der Tester hatte Kokosblütenzucker jedoch weder einen Geruch noch einen Geschmack von Kokosnuss und war im Vergleich zum Kokosblütensirup auch nicht fruchtig.

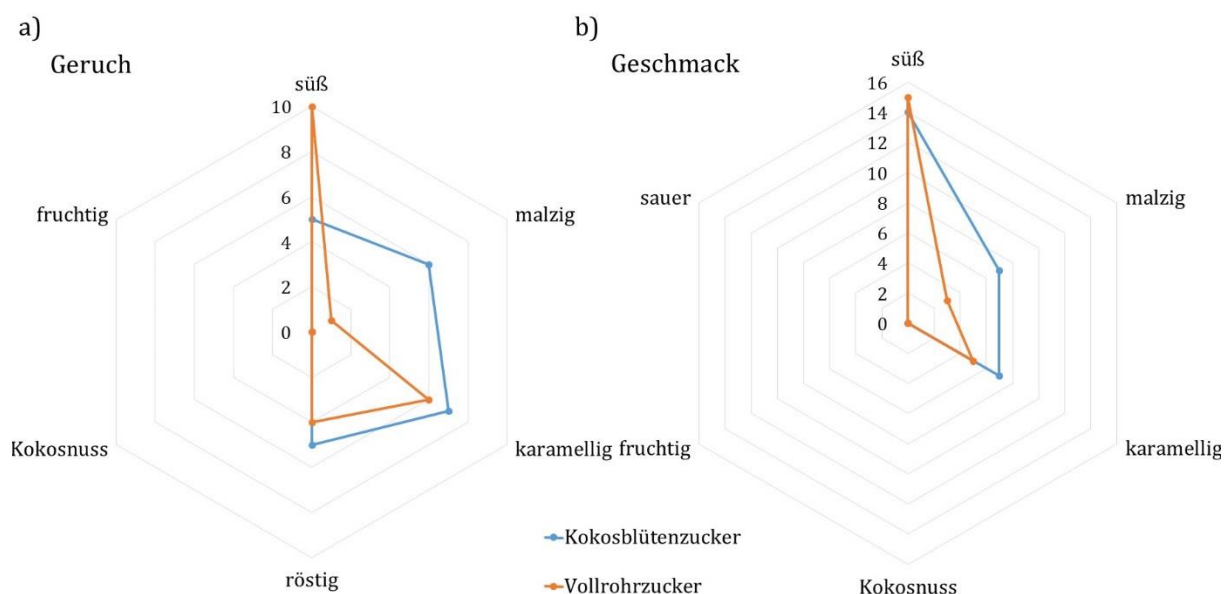


Abbildung 25: Vergleich der sensorischen Eigenschaften a) Geruch und b) Geschmack von Kokosblütenzucker und Vollrohrzucker. Eigene Darstellung nach [106].

Im Gegensatz zum Kokosblütenzucker wurden Apfel- und Birnendicksaft hauptsächlich durch die Attribute sauer, fruchtig und süß beschrieben. Zuckerrohrmelasse und Gerstenmalzextrakt hingegen unterschieden sich vom Kokosblütenzucker durch einen intensiven, bitteren Geschmack. Rohrzucker und Reissirup wurden lediglich als süß beschrieben und hatten sowohl geruchlich wie auch geschmacklich keine markanten Merkmale. Vollrohrzucker war, wie in Abbildung 25 dargestellt, im Vergleich zum Kokosblütenzucker weniger karamellig und malzig in

seinem Geruch und Geschmack. Die meisten Übereinstimmungen im sensorischen Profil zeigte Kokosblütenzucker mit Palmzucker.

6.3.2 Bestimmung des Gehalts an Gluten und mikroskopische Analyse

Gluten ist eine Proteinfraktion, die natürlicherweise in Weizen, Roggen, Gerste, Hafer oder deren Kreuzungen vorkommt. Die Codex Alimentarius Kommission definiert Glutengehalte für glutenfreie, glutenarme und glutenthaltige Lebensmittel. Demnach dürfen glutenfreie Lebensmittel einen Glutengehalt von 20 mg/kg nicht überschreiten. Ein Gehalt ≥ 20 bis < 100 mg/kg gilt als glutenarm und ein Gehalt über 100 mg/kg als glutenthaltig. Kokosblütenzucker ist von Natur aus glutenfrei [117].

Tabelle 12 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Glutenbestimmung für 36 Kokosblütenzuckerproben. So wiesen 92 % der getesteten Proben einen Glutengehalt unter 20 mg/kg auf und gelten somit als glutenfrei. 3 % der Proben hatten einen Glutengehalt von ≥ 20 bis < 100 mg/kg und sind demnach glutenarm. Bei 5 % der Proben wurde ein Glutengehalt über 100 mg/kg bestimmt. Sie sind somit glutenthaltig.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestimmung des Glutengehalts. Eigene Darstellung nach [106].

Glutengehalt	0 bis < 5 mg/kg	≥ 5 bis < 20 mg/kg	≥ 20 bis < 100 mg/kg	≥ 100 mg/kg
	< Bestimmungsgrenze	glutenfrei	glutenarm	glutenthaltig
n = 36	29 (81 %)	4 (11 %)	1 (3 %)	2 (5 %)

Eine Übersicht aller analysierten Proben und den dazugehörigen Gehalten an Gluten ist in Tabelle 19 in Abschnitt 8.2 im Anhang zu finden.

Reiner Kokosblütenzucker weist weder im Wasser-, noch im Iod-Kaliumiodid- oder im Chloralhydratpräparat charakteristische, mikroskopische Merkmale auf. Umso auffälliger waren die 15-40 μm großen, rundlichen bis linsenförmigen und die 2-10 μm kleinen, isodiametrischen bis runden, blau gefärbten Stärkekörner im Iod-Kaliumiodidpräparat derer Proben, die glutenpositiv waren. Hierbei konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl der Stärkekörner und dem Glutengehalt festgestellt werden. Je höher der Glutengehalt der Probe war, umso mehr Stärkekörner konnten lichtmikroskopisch beobachtet werden. Anhand der mikroskopischen Merkmale konnten die Stärkekörner als Weizenstärke identifiziert werden.

Abbildung 26 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Kokosblütenzuckers mit einem Glutengehalt von ≥ 100 mg/kg bei 100-facher Vergrößerung. Der Stärkegehalt wurde anhand von Vergleichsmischungen auf 0,7 g/100 g geschätzt.

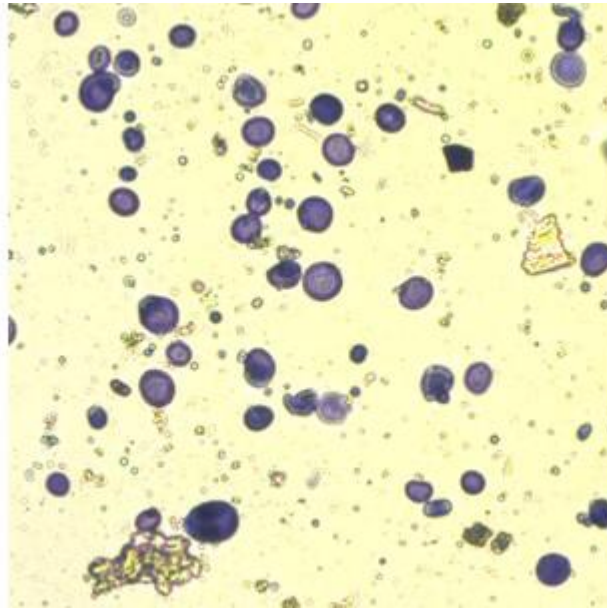


Abbildung 26: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Iod-Kaliumiodidpräparates mit blau gefärbten Stärkekörnern [106].

6.3.3 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Stabilisotopenanalyse

Mit Hilfe der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Stabilisotopenanalyse kann, wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben, zwischen C_3 -Pflanzen, zu denen die Kokospalme gehört, und C_4 -Pflanzen, z. B. Rohrzucker, differenziert werden.

Die Ergebnisse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Stabilisotopenanalyse von insgesamt 59 Kokosblütenzuckerproben sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Demnach wiesen 83 % der Proben $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse auf, welche innerhalb des $\delta^{13}\text{C}$ -Bereichs für C_3 -Pflanzen liegen. Für 7 % der Proben wurden leicht erhöhte $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse bestimmt, die auf einen C_4 -Zusatz von ≥ 10 bis < 20 g/100 g hindeuten. Weitere 7 % der Proben hatte ein signifikant erhöhtes $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis, welches nur durch einen C_4 -Zusatz von ≥ 20 bis < 50 g/100 g erklärbar ist. 3 % der Proben wiesen sogar $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse auf, die bei einem C_4 -Zusatz von ≥ 50 g/100 g wahrscheinlich sind.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Stabilisotopenanalyse. Eigene Darstellung nach [106].

C ₄ -Anteil	0 bis < 10 g/100 g	≥ 10 bis < 20 g/100 g	≥ 20 bis < 50 g/100 g	≥ 50 g/100 g
	< Bestimmungsgrenze			
n = 59	49 (83 %)	4 (7 %)	4 (7 %)	2 (3 %)

Eine Übersicht aller analysierten Proben und den dazugehörigen C_4 -Anteilen ist in Tabelle 19 in Abschnitt 8.2 im Anhang zu finden.

6.3.4 Feuchtigkeitsbestimmung und enzymatische Zuckerbestimmung

Der Anteil an Glucose, Fructose und Saccharose sowie der Feuchtigkeitsgehalt wurde von zehn Kokosblütenzuckerproben analysiert. Die durchschnittliche Zusammensetzung von Kokosblütenzucker ist in Abbildung 27 grafisch dargestellt. Eine tabellarische Übersicht ist in Abschnitt 8.1 im Anhang zu finden.

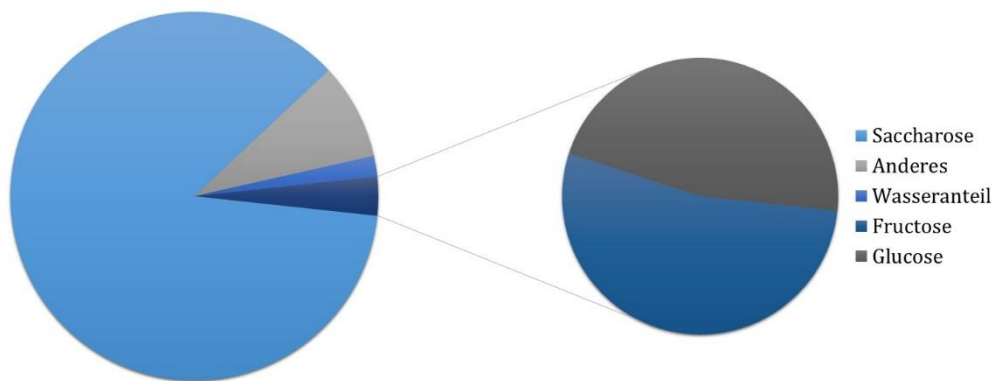


Abbildung 27: Zusammensetzung von Kokosblütenzucker.

Die analysierten Kokosblütenzucker hatten nur einen sehr geringen Wasseranteil von 1,18-2,39 g/100 g und bestehen mit 81,6-91,1 g/100 g hauptsächlich aus Saccharose. Dahinter folgen Fructose (0,66-2,32 g) und Glucose (0,48-2,28 g/100 g) mit nahezu gleichen Anteilen. Wird, wie in Abbildung 28 dargestellt, das Glucose-Fructose-Verhältnis jedoch unter Berücksichtigung des C₄-Anteils betrachtet, fällt auf, dass Kokosblütenzuckerproben, deren $\delta^{13}\text{C}$ -Wert im Bereich von C₃-Pflanzen liegt, einen geringeren Anteil an Glucose enthalten und demnach ein niedrigeres Glucose-Fructose-Verhältnis aufweisen als Proben mit C₄-Anteil. Für Proben mit einem C₄-Anteil von < 10 g/100 g variierte das Verhältnis von 0,5-0,7, während für Proben mit einem C₄-Anteil ≥ 20 g/100 g das Glucose-Fructose-Verhältnis 1,0-1,2 beträgt.

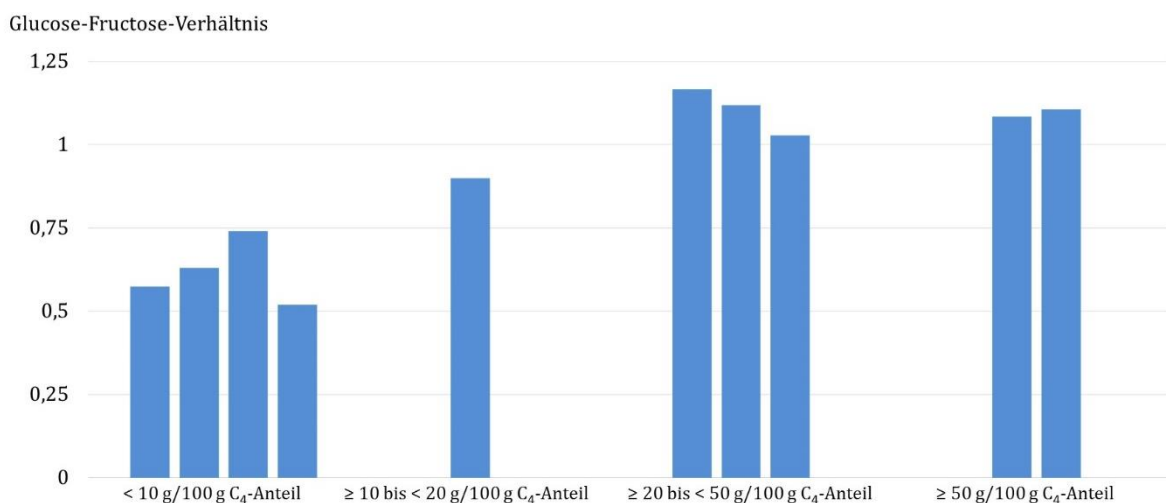


Abbildung 28: Korrelation des Glucose-Fructose-Verhältnisses und des C₄-Anteils. Eigene Darstellung nach [106].

6.4 Diskussion

Nach dem Philippinischen Nationalen Standard ist Kokosblütenzucker als ein festes Süßungsmittel definiert, welches durch Einkochen von reinem, frischen Kokosnektar gewonnen wird [10]. Für den Handel mit Kokosblütenzucker ist die Bestimmung des Saccharosegehalts besonders wichtig. Laut Kennzeichnungscode 1702 90 95 in Kapitel 17 der Verordnung (EG) Nr. 1214/2007 der Kommission vom 20. September 2007 zur Änderung von Anhang I der Verordnung (EWG) Nr. 2658/87 des Rates über die zolltarifliche und statistische Nomenklatur sowie den Gemeinsamen Zolltarif müssen Produkte dieser Warengruppe, denen auch Kokosblütenzucker zuzuordnen ist, bei der Einfuhr aus Drittländern nach ihrem Gewichtsanteil an Saccharose bezogen auf die Trockenmasse mit einem Abgabebetrag von 0,4 €/100 kg/net vertragsmäßig verzollt werden [120]. Während Rohr- und Rübenzucker einen durchschnittlichen Saccharosegehalt von 99,9 g/100 g Trockenmasse haben [108], ist der Wert bei Kokosblütenzucker, wie in Abschnitt 6.3.4 gezeigt, mit durchschnittlich 87,9 g/100 g Trockenmasse deutlich niedriger, sodass hier die anfallenden Einfuhrabgaben entsprechend niedriger sind. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Saccharosegehalt enzymatisch bestimmt, wohingegen nach Änderung der zusätzlichen Anmerkung 4 zu Kapitel 17 der Verordnung (EG) Nr. 1214/2007 mit Wirkung zum 1. Oktober 2017 die Bestimmung des Gehalts an Saccharose in Waren der Unterposition 1702 90 95 refraktometrisch gemäß dem Anhang der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 974/2014 zu erfolgen hat [121; 122]. Diese Methode hat jedoch gegenüber der enzymatischen Zuckerbestimmung den Nachteil, dass nicht zwischen den einzelnen Sacchariden differenziert wird, sondern vielmehr der gesamte lösliche trockene Rückstand, ausgedrückt als Saccharose, bestimmt wird. Dadurch ist der hiermit, unter nicht Berücksichtigung der Anteile anderer löslicher, trockener Rückstände, wie Glucose und Fructose, bestimmte Gehalt an Saccharose deutlich höher als bei der enzymatischen Zuckerbestimmung und spiegelt nicht die tatsächliche Zusammensetzung des Kokosblütenzuckers wider. Importeure zahlen dann zu Unrecht höhere Einfuhrzölle auf ihr saccharosehaltiges Produkt.

Gemäß des Philippinischen National Standards besteht Kokosblütenzucker aus 78-89 g/100 g Saccharose, 1-4 g/100 g Fructose, 2-3 g/100 g Glucose, 0,5-0,8 g/100 g Feuchtigkeit und $\leq 2,4$ g/100 g Asche [10].

Wie bereits in Kapitel 5 Abschnitt 5.4.3 diskutiert, kann Kokosblütenzucker jedoch weitere Bestandteile enthalten. So konnte in den Abschnitten 6.3.2 bis 6.3.4 gezeigt werden, dass Kokosblütenzucker Zusätze von Gluten und Weizenstärke sowie C₄-Pflanzenanteile enthalten kann. Diese Zusätze können, wie auch das pflanzliche Öl, verfahrenstechnische Gründe haben.

Gluten und Weizenstärke können einerseits durch unbeabsichtigte Kontamination in das Produkt gelangen oder andererseits bewusst hinzugesetzt werden. Besonders bei Glutengehalten über 100 mg/kg ist davon auszugehen, dass es sich um einen beabsichtigten Zusatz handelt. So kann

die Zugabe von Weizenstärke dazu beitragen, die Rieselfähigkeit des Produkts zu erhalten. Aus anderen Bereichen der Lebensmittelproduktion ist bekannt, dass pulverförmige Produkte, die dazu neigen, Feuchtigkeit aus der Umgebung aufzunehmen, mit sogenannten Trennmitteln versetzt werden.

Auch Kokosblütenzucker neigt dazu, Feuchtigkeit aus der Umgebungsluft aufzunehmen und zu verklumpen. Klumpiger Kokosblütenzucker ist schwer zu dosieren. Die zugegebene Stärke soll die Feuchtigkeit aufnehmen, den Zucker dadurch trocken halten und das Verklumpen verhindern. Durch die Zugabe von Weizenstärke wird dem Produkt jedoch auch Gluten zugesetzt. Dies kann für glutenempfindliche Verbraucher (z. B. bei Zöliakie) zu Problemen führen, sofern keine Allergenkennzeichnung erfolgt.

Damit es zur Kristallisation des Zuckers während des Einkochprozesses kommt, ist es sowohl wichtig, dass kontinuierlich mit einer mittleren, gleichmäßigen Geschwindigkeit gerührt wird, als auch, dass eine übersättigte Zuckerlösung vorliegt. Aus der Rohr- und Rübenzuckerproduktion ist bekannt, dass zur Zeitersparnis und zum Erhalt gleichmäßiger Zuckerkristalle in einheitlicher Größe, die Kristallisation der zuckerhaltigen Suspensionen mit Impfkristallen gefördert wird [102]. Dies kann die Zugabe von C₄-Pflanzen erklären, die in einigen der Kokosblütenzuckerproben nachgewiesen wurden. Hierbei könnte es sich um einen Zusatz von (Voll)Rohrzucker als Impfkristall handeln.

Hohe Anteile an C₄-Pflanzen von ≥ 20 g/100 g werden allerdings als Hinweis auf Lebensmittelstreckung gedeutet. Dies lässt sich damit begründen, dass Kokosblütenzucker ein sehr hochpreisiges Produkt ist, für das die Verbraucher bereit sind, 20-65 Mal mehr Geld zu zahlen als für herkömmlichen Haushaltszucker [14]. Jedoch sind hochpreisige Produkte besonders anfällig für gezielten Lebensmittelbetrug. In Zeiten der Globalisierung und komplexer Lieferketten wird dieser weltweit zu einem zunehmenden Problem. So ist die Streckung hochpreisiger Produkte mit preiswerteren Zutaten oder Produkten minderer Qualität ohne eine korrekte Kennzeichnung längst keine Seltenheit mehr [123]. Es werden z. B. Stärke-basierter Zuckersirup, Maissirup mit hohem Fructosegehalt, Glucosesirup und Saccharosesirup, die aus Zuckerrüben oder Rohrzucker hergestellt werden, zur Verfälschung von Honig verwendet [86]. Der Zusatz fremder Zuckerquellen kann, wie in Abschnitt 6.3.4 in Abbildung 28 dargestellt, sowohl zur Änderung der Verhältnisse von Glucose, Fructose und Saccharose führen als auch das Verhältnis der Kohlenstoffisotope ¹³C und ¹²C beeinflussen. Während die Zugabe von Rohrzucker (C₄) und fructosereichem Maissirup (C₄) mit der ¹³C/¹²C-Stabilisotopenanalyse nachgewiesen werden kann, ist die Zugabe von Rübenzucker (C₃) nicht zu identifizieren und stellt ein großes Problem dar [60].

Um Verfälschungen aufzudecken, kann als ein weiteres Hilfsmittel auch das sensorische Profil von Kokosblütenzucker herangezogen werden. Der malzige und karamellige Geruch und Geschmack

von Kokosblütenzucker sind besonders charakteristisch und können zur Abgrenzung von anderen Süßungsmitteln wie Vollrohrzucker genutzt werden. Dennoch ist zu berücksichtigen, dass der als Ausgangsmaterial für die Kokosblütenzuckerherstellung verwendete Kokosblütennektar ein Naturprodukt ist, dessen Zusammensetzung dem Genotyp sowie ökophysiologischen Faktoren wie Jahreszeiten, Wetter und Boden unterliegt. Darüber hinaus wird der Herstellungsprozess vielerorts noch immer nach einheimischen Kenntnissen und Traditionen durchgeführt [12]. Dies kann ebenfalls zu Unterschieden in Geruch, Geschmack und Aussehen der verschiedenen Kokosblütenzuckerproben führen sowie regionale Unterschiede zwischen den Produkten erklären.

In seinen sensorischen Eigenschaften ist Kokosblütenzucker dem Palmzucker am ähnlichsten. Palmzucker kann aus verschiedenen Palmarten, wie *Borassus flabellifer* (Palmyrapalme), *Nypa fruticans* (Nipapalme) und *Arenga pinnata* (Zuckerpalme), hergestellt werden. Auch Kokosblütenzucker kann als Palmzucker verkauft werden. Dies macht eine Unterscheidung beider Produkte sehr schwierig, zumal beide Produkte sehr ähnlich hergestellt werden [12; 14].

6.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die an zahlreichen Kokosblütenzuckerproben durchgeführten analytischen Untersuchungen haben gezeigt, dass Kokosblütenzucker neben Zusätzen von Öl (siehe Abschnitt 5.4.4) auch Anteile von C₄-Pflanzen sowie Stärke und Gluten enthalten kann. Während in 10 von 59 (= 17 %) getesteten Proben ein signifikanter C₄-Zusatz (≥ 10 g/100 g) nachgewiesen werden konnte, enthielten 3 von 36 (= 8 %) Proben Gluten ≥ 20 mg/kg. Diese Additive können sowohl verfahrenstechnische Gründe haben, als auch der Ertragssteigerung dienen. Des Weiteren ist bei der Beurteilung zu berücksichtigen, dass es sich um ein Naturprodukt handelt, welches natürlichen Schwankungen unterliegt und unter nicht standardisierten, oft traditionellen Bedingungen hergestellt wird. So müssen für eine eindeutige Authentifizierung immer der Herstellungsprozess sowie weitere Metadaten mitberücksichtigt werden.

Um EU-Verbraucher bezüglich der Zusammensetzung und Kennzeichnung von Kokosblütenzucker vor Täuschung und Irreführung zu schützen, ist es ausblickend wichtig, dass das Produkt nach philippinischen Vorbild auch auf EU-Ebene definiert wird und Mindestanforderungen bezüglich der Reinheit sowie der Verwendung von Hilfs- und Zusatzstoffen formuliert werden. Hierbei ist es essentiell, dass sich die europäischen Kundenerwartungen mit den Herstellungsbedingungen in Einklang bringen lassen. Im Dialog ist hierfür einerseits eine warenkundliche Aufklärung der Kunden und Endverbraucher als auch eine Schulung aller Beteiligten entlang der Wertschöpfungskette über europäische Normen und Standards nötig. Letzteres stärkt auch das Bewusstsein von Konsequenzen bestimmter Handlungen und trägt zur Minimierung negativer, wirtschaftlicher Auswirkungen entlang der Wertschöpfungskette bei. So können Bauern im

Vorfelde über die Konsequenzen bezüglich der Verwendung von Gluten als Trennmittel in Hinblick auf die Allergenkennzeichnung und ein *Clean Labeling* informiert werden. Im Sinne des Konzepts zur Gefahrenanalyse und kritischer Kontrollpunkte (*Hazard Analysis and Critical Control Points*, HACCP) sollten bereits am Anfang der Wertschöpfungskette kritische Kontrollpunkte ausgemacht werden, um bei Nichteinhaltung der Vorgaben bereits im Herkunftsland reagieren zu können und verlustbringende Verweigerungen der Warenannahme in europäischen Häfen sowie Rückrufmaßnahmen zu verhindern. In Hinblick auf Gluten kann hier zum Beispiel die *Lateral-Flow*-Technologie, auf der auch die Funktionsweise eines Schwangerschaftstests beruht, als eine schnelle Methode, die kein Laborzubehör bedarf, für die Vor-Ort-Analyse zum Einsatz kommen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gegenseitige Anerkennung von einerseits Qualitätsanforderungen und andererseits Herstellungsbedingungen zu Harmonisierung führen und Kokosblütenzucker zu einem marktfähigen Produkt in Europa machen kann.

Kapitel 7 Zusammenfassende Diskussion

Zur Entwicklung einer Methode zum DNA basierten Nachweis von *Cocos nucifera*, wurden in der vorliegenden Studie drei Primerpaare designt und auf ihre Spezifität geprüft. Während die Primerpaare cocosITS107 und cocosITS197 auch Amplifikate mit DNA-Isolaten anderer Plamenspezies bildeten, die sich anhand ihrer Basenpaarlänge kaum von denen der Kokospalme unterschieden, zeichnete sich das Primerpaar cocosPRK durch eine hohe Spezifität aus und zeigte lediglich für Kokospalme ein charakteristisches PCR-Produkt von 164 bp.

Es wurde eine zum Primerpaar passende TaqMan™-Sonde designt und ein real-time PCR-Assay entwickelt. Das Primer-/Sondensystem zeigte in einem Spezifitätstest gegenüber 27 weiteren Pflanzen- und Tierarten keinerlei Kreuzreaktivitäten, sodass es als sehr spezifisch gegenüber *Cocos nucifera* angesehen wurde. In einem Sensitivitätstest wurde anhand einer Verdünnungsreihe eine Nachweisgrenze von 1 pg/μL abgeschätzt.

Neben DNA-Isolaten aus Kokopalmenblättern konnte auch die DNA aus Kokosnuss und Kokochips mit dem entwickelten Primerpaar amplifiziert werden. Unter Verwendung der CTAB-Methode zur DNA-Isolierung gelang eine Amplifikation von DNA-Isolaten aus Kokosblütenzucker jedoch nicht. Die erhaltenen DNA-Extrakte deuteten allerdings mit einer DNA-Konzentration von 210 ng/μL und einem A260/A280-Verhältnis von 1,95 nicht auf eine schlechte oder unzureichende DNA-Qualität hin. Auch generelle PCR inhibierende Verunreinigungen konnten anhand einer positiven Amplifikation mit dem eukaryotenspezifischen Primerpaar euk18S ausgeschlossen werden.

Bei Kokosblütenzucker besteht das Problem, dass der zur Herstellung verwendete zuckerhaltige Phloemsaft ein sehr DNA armes Ausgangsmaterial ist. Lediglich durch das täglich neue Anschneiden des Blütenstandes wird DNA aus den Zellen in den Phloemsaft abgesondert. Im Zuge der thermischen und mechanischen Einwirkungen beim Einkochen unterliegt die DNA allerdings starken Beanspruchungen, die zu Fragmentierungen führen können. Außerdem ist die zuckerhaltige Matrix ein Nährboden für osmophile Hefen, sodass das Produkt oft mit Fremd-DNA kontaminiert ist. Auch die sehr ähnlichen Löslichkeitseigenschaften der DNA und des Zuckers machen die Isolierung und den Nachweis der DNA aus Kokosblütenzucker besonders schwierig.

Um DNA aus Kokosblütenzucker nachzuweisen und damit die Echtheit von als Kokosblütenzucker gekennzeichneten Produkten zu prüfen, wurden in der vorliegenden Studie verschiedene Extraktionsverfahren getestet und miteinander verglichen. Hierbei wurde neben einer modifizierten CTAB-Methode vor allem auf Methoden mit Festphasenextraktion, wie die Wizard-Methode, das DNeasy Plant Maxi Kit oder das PME Food DNA Extraction Kit, gesetzt.

Mit der modifizierten CTAB-Methode wurde eine sehr hohe DNA-Ausbeute erzielt. Während der Nachweis von Eukaryoten positiv ausfiel, konnte *Cocos nucifera* jedoch mittels real-time PCR nicht

nachgewiesen werden. Die Wizard-Methode erwies sich als sehr schwierig und aufwendig in der Handhabung. So lieferte sie auch nur Extrakte von geringer Reinheit, die weder für Eukaryoten noch für *Cocos nucifera* ein positives Amplifikationsergebnis lieferten und somit ungeeignet waren. Auch die mit Hilfe des DNeasy Plant Maxi Kits gewonnenen DNA-Extrakte waren bei Verwendung von 0,2 g Probenmaterial von schlechter bis sehr schlechter Reinheit. Eine größere Probeneinwaage von 1 g brachte nur begrenzt Erfolg mit sich. Zwar konnte durch eine Erhöhung des Ausgangsmaterials die Qualität und Menge der isolierten DNA gesteigert werden, dies führte jedoch nur zu einem positiven Nachweis von Eukaryoten und nicht zu einem von *Cocos nucifera*. Das kann darin begründet sein, dass das DNeasy Plant Maxi Kit nur für ein maximales Probenvolumen von 0,2 g Trockengewicht geeignet ist. Eine Erhöhung des Ausgangsmaterials führt letztlich nicht nur zu mehr Target-DNA, sondern auch zu mehr Fremd-DNA. Es wird riskiert, dass die Lyse nur unzureichend stattfindet und dass die Bindungskapazität der Säule überschritten wird.

Den bisherigen Methoden gegenüber bietet das PME Food DNA Extraction Kit den Vorteil, durch Zugabe eines Carrier RNA/DNA Mixes sowie eines *Enrichment Reagents* die Ausfällung sehr geringer DNA-Konzentrationen zu begünstigen. So führten die verschiedenen Extraktionsvarianten auf Grundlage des PME Food DNA Extraction Kits allesamt zu einem positiven Nachweis von Eukaryoten. Es war zu beobachten, dass die aus flüssigen Proben gewonnenen DNA-Extrakte von höherer Reinheit und Konzentration waren als die aus festen Proben. Durch einzelne Änderungen in der Durchführung, wie die Inkubation nach Zugabe des *Enrichment Reagents* über Nacht im Kühlschrank, die Durchführung des Waschschritts mit eisgekühltem, 70%igen Ethanol anstelle von Wasser oder die Verdopplung des Extraktionsansatzes, ließ sich zusätzlich die DNA-Ausbeute erhöhen, sodass ein positiver Nachweis von *Cocos nucifera* mittels real-time PCR möglich war.

In einer Versuchsreihe mit 16 Kokosblütenzuckerproben konnte jedoch nur für 44% der Proben reproduzierbar *Cocos nucifera* mittels real-time PCR-Assay nachgewiesen werden. Aufgrund der Kenntnisse über das Probenmaterial entsprach dieses Ergebnis jedoch nicht den Erwartungen. Während nämlich 5 der 16 Kokosblütenzuckerproben direkt von Farmern aus Indonesien stammten, wurden die anderen 11 Kokosblütenzuckerproben im Vorwege mittels $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Stabilisotopenanalyse und stichprobenartig mittels ELISA auf Zusätze von Gluten und C_4 -Zucker untersucht. Lediglich in zwei Proben konnten Fremdanteile nachgewiesen werden. Somit wurde lediglich hier eine Schwierigkeit im Nachweis von *Cocos nucifera* mittels real-time PCR erwartet. Insgesamt war jedoch auffällig, dass die bestimmten Ct-Werte bei den positiven Nachweisen im Bereich der abgeschätzten Nachweisgrenze lagen. Damit ist davon auszugehen, dass die Ct-Werte der nicht amplifizierbaren Proben knapp unterhalb der abgeschätzten Nachweisgrenze lagen und die Ergebnisse falsch negativ sind.

Als weitere Schwierigkeit kommt beim Kokosblütenzucker nämlich hinzu, dass das Naturprodukt nicht nur natürlichen Schwankungen, wie Boden und Klima, unterliegt, sondern auch der Herstellungsprozess nicht standardisiert ist und sich teilweise regional unterscheidet. Dies sorgt für starke Unterschiede zwischen den Proben und macht eine Analytik schwierig.

Diese Einflussfaktoren sind auch die Ursache dafür, dass die Entwicklung einer Metabolomics-basierte Methode anhand unpolarer Metabolite zur Echtheitsprüfung von Kokosblütenzucker in dieser Arbeit keine plausiblen Ergebnisse lieferte. Stattdessen waren die Verschiedenheiten der Chromatogramme unterschiedlicher Zucker auf regionale Unterschiede im Herstellungsprozess zurückzuführen. Während in Kokosblütenzucker aus der Region um Purwokerto Palmfett nachgewiesen wurde, enthielt Kokosblütenzucker aus der Umgebung um Yogyakarta Kokosfett. Philippinischer Kokosblütenzucker dagegen enthielt weder Kokos- noch Palmfett.

In einer Charakterisierung von Kokosblütenzucker, um Rückschlüsse auf den Herstellungsprozess ziehen zu können – auch im Hinblick auf die Möglichkeiten der Authentizitätsprüfung –, wurden in der vorliegenden Studie neben Öl jedoch auch Zusätze von Gluten, Weizenstärke und C₄-Anteile nachgewiesen. So wurde in 10 von 59 (= 17 %) getesteten Proben ein signifikanter C₄-Zusatz (≥ 10 g/100 g) nachgewiesen, während 3 von 36 (= 8 %) Proben Gluten ≥ 20 mg/kg enthielten. Diese Additive können sowohl verfahrenstechnische Gründe haben, als auch der Ertragssteigerung dienen. So können Gluten und Weizenstärke einerseits durch unbeabsichtigte Kontamination in das Produkt gelangen oder andererseits bewusst hinzugesetzt werden, um als Trennmittel die Rieselfähigkeit des Produkts zu erhalten. Öl kann dazu genutzt werden das Überschäumen während des Herstellungsprozesses und damit einhergehende Verluste zu verhindern. Zusätze anderer Zucker können auch als Impfkristall dienen. Aufgrund der Hochpreisigkeit des Produkts werden hohe Anteile von Additiven jedoch als Lebensmittelstreckung im Sinne von *Food Fraud* betrachtet, die es anhand analytischer Methoden aufzudecken und zu bekämpfen gilt. Hierfür ist die in dieser Arbeit durchgeführte Entwicklung von Methoden zur Echtheitsprüfung von Kokosblütenzucker wichtig.

Des Weiteren ist es jedoch auch wichtig, die europäischen Kundenerwartungen mit den Herstellungsbedingungen in Einklang zu bringen. Hierfür ist einerseits eine warentkundliche Aufklärung der Kunden und Endverbraucher als auch eine Schulung aller Beteiligten entlang der Wertschöpfungskette über europäische Normen und Standards nötig. Die vorliegende Arbeit trägt mit ihrer Charakterisierung von Kokosblütenzucker einen Teil dazu bei.

So sollten die Bauern im Vorfeld über die Konsequenzen bezüglich der Verwendung von Gluten als Trennmittel in Hinblick auf die Allergenkennzeichnung und ein *Clean Labeling* informiert werden. Im Sinne des HACCP-Konzepts sollten bereits in den Herkunftsländern kritische

Kontrollpunkte ausgemacht werden und mit geeigneten Methoden, wie der *Lateral-Flow*-Technologie, frühzeitig Vorort eingreifen zu können.

Kapitel 8 Anhang

8.1 Darstellung weiterer Ergebnisse

Abbildung 29 zeigt einen Ausschnitt des Alignments der DNA-Sequenzen des prk-Gens für Öl-, Gelee-, Honig- und Kokospalme. Insgesamt wurden 69 NCBI-Einträge berücksichtigt (*Acrocomia aculeata* (3), *Acrocomia crispera* (2), *Aiphanes horrida* (5), *Aiphanes minima* (1), *Allagoptera caudescens* (2), *Allagoptera leucocalyx* (1), *Astrocaryum gynacanthum* (2), *Astrocaryum paramaca* (2), *Attalea cohune* (1), *Attalea cuatrecasana* (1), *Attalea oleifera* (1), *Attalea phalerata* (1), *Attalea speciosa* (2), *Bactris maraja* (1), *Barcella odora* (3), *Beccariophoenix madagascariensis* (2), *Butia capitata* (2), *Butia eriospatha* (2), *Cocos nucifera* (7), *Desmoncus chinantlensis* (1), *Elaeis guineensis* (3), *Elaeis oleifera* (1), *Jubaea chilensis* (4), *Jubaeopsis coffea* (2), *Lytocaryum weddellianum* (2), *Parajubaea torallyi* (2), *Syagrus amara* (1), *Syagrus romanzoffiana* (2), *Syagrus smithii* (4), *Voaniolala gerardii* (6)).

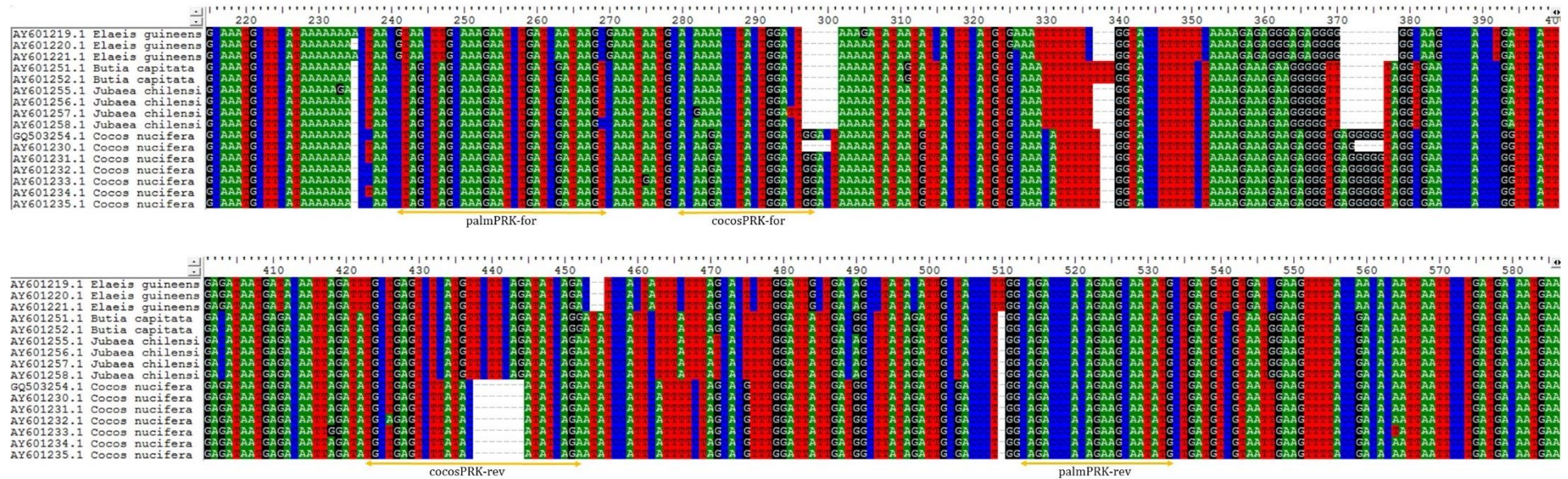


Abbildung 29: Alignment der DNA-Sequenzen des prk-Gens für Öl- (*Elaeis guineensis*), Gelee- (*Butia capitata*), Honig- (*Jubaea chilensis*) und Kokospalme (*Cocos nucifera*) sowie die ausgewählten Positionen der Primer.

Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese zur Verifizierung der botanischen Herkunft der PCR-Produkte aus den Blättern der Honig-, Öl-, Kokos- und Geleepalme.

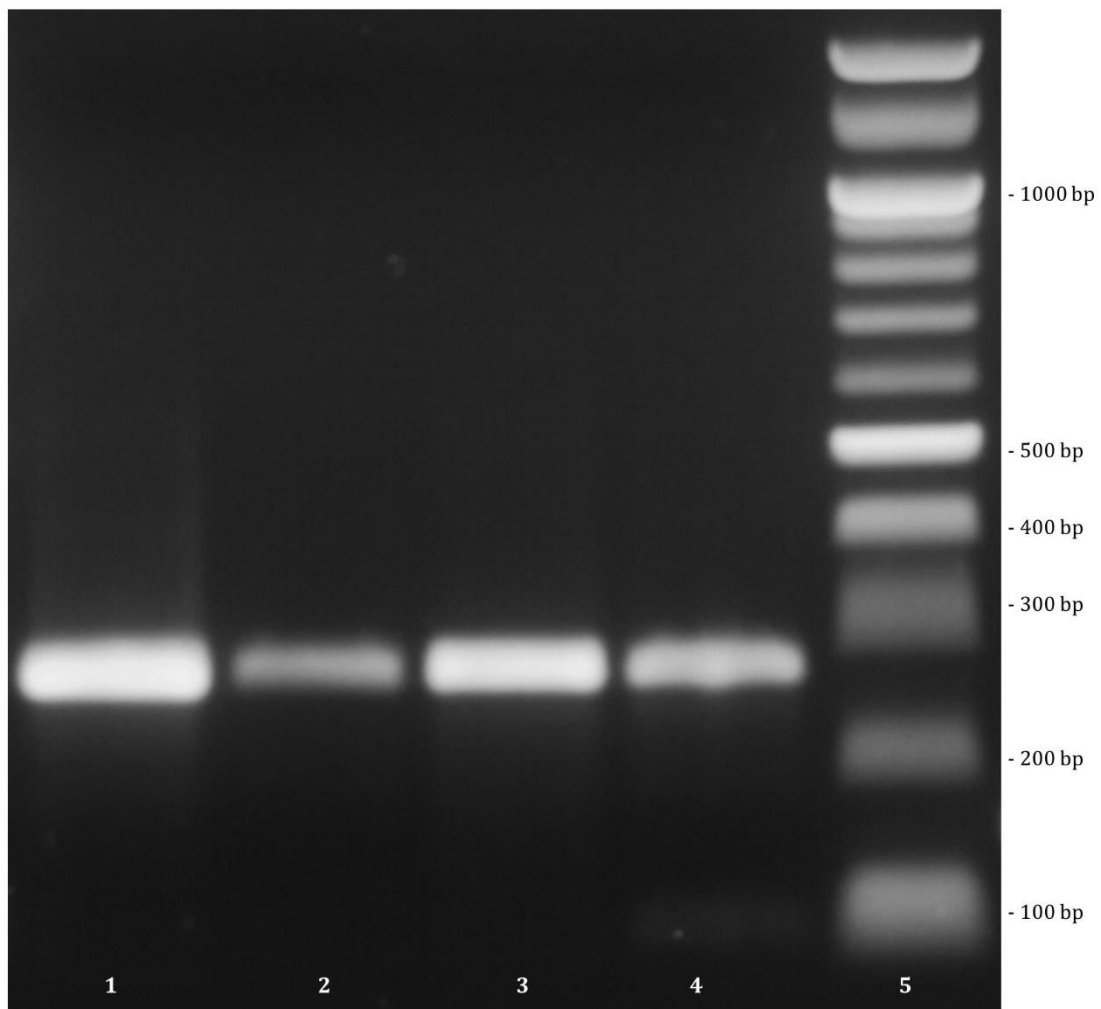


Abbildung 30: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte aus den Blättern der Honigpalme (1), Ölpalme (2), Kokospalme (3) und Geleepalme (4) im Vergleich zu einem DNA-Größenmarker zur Verifizierung der botanischen Herkunft visualisiert mit dem Programm argus X1 an der Geldokumentationseinheit „Dark Hood 40/50“.

Tabelle 14 fasst die Ergebnisse des Sequenzvergleichs zur Verifizierung der botanischen Herkunft der Palmenblätter zusammen. Die Tabelle gibt die Übereinstimmung der vorgegebenen Sequenz (Spalte 3) und des besten NCBI-Treffers (Spalte 4) als Identität in Prozent (Spalte 7) an. Dabei wird berücksichtigt wie viele Nukleotide in den beiden zu vergleichenden Sequenzen übereinstimmen (Spalte 7) und wie viele Lücken (Spalte 5) und Sequenzabweichungen (Spalte 6) es gibt. Der E-Wert gibt die Anzahl möglicher Treffer mit gleicher Übereinstimmung an, die zufällig gefunden werden könnten. Je kleiner der E-Wert ist, umso sicherer ist es, dass es keinen besseren Treffer gibt.

Tabelle 14: Verifizierung der botanischen Herkunft der Palmenblätter durch einen Sequenzabgleich gegen die NCBI-Datenbankeinträge.

<i>Palmae</i> -Spezies	Primer	Sequenz (5' → 3')	NCBI-Treffer	Lücken	Sequenz- abweichungen	Identität	E-Wert
Geleepalme (<i>Butia capitata</i>)	palmPRK-for	CCAATTGCCAAACTACTGGACTAAAATATAGTA TTACTTCATGTGCAAATTTTTTTTTTGGTACCG TTTTTCTAAAAAAGGGGGTTAAGGTAAA CCCCACCAATTCATTGCCTTAAGGAAACAATT AAATATGCTAATCCCAGGTCCTTCAAATATCA GAAAATCCTTTCTTTATTTACCATTTTGAATA ATTGACGGCTAAAAATGGCTACCCGGGCAAAC CCACGGAACAAAAAGGA	<i>Butia capitata</i> AY601252.1	2	32	197/231 (85 %)	1e ⁻⁶⁴
Geleepalme (<i>Butia capitata</i>)	palmPRK-rev	CAACGATCATAGCGTCATAATCCAAAGTGCTAA ATAAAGAATGGATATCCTGATATCTGAAGAACA TGAGACTCAGCATATCTATTGTCTCATTATGTC AATGAATCGGGTGGGGTTCACCTAAACCCCTT CTTTCTTTTAGAAAAAGGTACCAAAAAAAT TTGCACATGAATAAATACAAATTTTTTATCCCA GAAGTTTTGGGCTTTATTTGACTTACCAATAA AATCCTTTGCAGGA	<i>Butia capitata</i> AY601252.1	3	15	214/232 (92 %)	1e ⁻⁸⁵
Honigpalme (<i>Jubaea chilensis</i>)	palmPRK-for	ACAATTTGCAACTACTGGACTACAATATAATAT TACTTCATGTGCAAATTTTTTTGGTACCTTTTT CTAAAAGAAAGAAGGGGGTTAGGTGAACCCCA CCCGATTCAATTGACATAATGAGACAATTAGATA TGCTGAGTCTCATGTTCTTTCAGATATCAGAATA TCCATTCTTTATTTATCACTTTTGGATTATTGA CAGCTTATAGATTGCTACCCTGGCAGACCCACA GAAGCAATATGAGA	<i>Jubaea chilensis</i> AY601258.1	1	1	230/232 (99 %)	1e ⁻¹⁰⁹

Palmae-Spezies	Primer	Sequenz (5' → 3')	NCBI-Treffer	Lücken	Sequenz-abweichungen	Identität	E-Wert
Honigpalme (<i>Jubaea chilensis</i>)	palmPRK-rev	CAGCATCATAGCTGTCATAATCCAAAGTGATAA ATAAAGAATGGATATTCTGATATCTGAAGAACA TGAGACTCAGCATATCTAATTCGTCTCATTATG TCAATGAATCGGGTGGGGTTCACCTAAACCCCC TTCTTTCTTTTAGAAAAAGGTACCAAAAAAATT TGCACATGAAGTAATATTATATTTTGTAGTCCAG TAGGTTTTGTGCATTATTTGACTTATCGATCAG ATTCTTTGCTAGAGA	<i>Jubaea chilensis</i> AY601256.1	3	-	233/236 (99 %)	5e ⁻¹⁰⁸
Kokospalme (<i>Cocos nucifera</i>)	palmPRK-for	CCAAATGCAGACCTACTGGACTGGACTAAAAATA TAATGTTACTTCATGTGCAAACATTTTTTGGTA CCTTTTTCTAAAAGAAAAGAAGAGGGTGAGGGGG TAGGCGAACCCACCCGGTTCATTGAGATAATG AGACAATTAGATATGCTGAGTCTTATACATATC AGAATATCCATTCATTTTCTAGCACGTTTGGAT TATTGATGGCTTATAGATTGCGACCCTGGCAGA CCCACAGAAGCAATATGAGA	<i>Cocos nucifera</i> HQ265608.1	1	-	240/241 (99 %)	1e ⁻¹¹⁵
Kokospalme (<i>Cocos nucifera</i>)	palmPRK-rev	CTCCCGGACTATAGCCTTAATTAATCCAACGTG CTAGAAAATGAATGGATATTCCTGATATGTATAA GACTCAGCATATCTAATTAGTCTCATTATCTCA ATGAACCGGGTGGGGTTCGCCTACCCCTCACCC TCTTCTTTCTTTTAGAAAAAGGTACCAAAAAAT GTTTGCACATGAAGTAACATTATATTTTGTAGTC CAGTCCAGTAGGTCTTGTGCATTATTTGACTTA TCGATCAGATTCTTTGCTAGATA	<i>Cocos nucifera</i> HQ265608.1	5	4	241/250 (96 %)	3e ⁻¹⁰⁵
Ölpalme (<i>Elaeis guineensis</i>)	palmPRK-for	ATGATGCAAACTACTGGACTAAAATATAATAT CACTTCATGTGAAATTTTTTTCGGTACCTTTTT TCAAAAAGAGAGGGAGAGGGGGGCAAGCCCCACC TGATTCATTGAGATAATGATACAATTAGATTTG CTGAGTCTCATGTTCTTCAGATATCAGACTCCA CTATTTCTTTAGCACTCTTGGATTGCTGACAGCC TATACATTGCTACCCTTGGCAGACCCACAGAAG CAATATGA	<i>Elaeis guineensis</i> AY601220.1	1	1	231/233 (99 %)	3e ⁻¹¹⁰

Palmae-Spezies	Primer	Sequenz (5' → 3')	NCBI-Treffer	Lücken	Sequenz-abweichungen	Identität	E-Wert
Ölpalme (<i>Elaeis guineensis</i>)	palmPRK-rev	GTGACCGTATGTAAGGCTGTCAGCATCCAAGAG TGCTAAAGAAAATAGTGGAGTCTGATATCTGAAG AACATGAGACTCAGCAAATCTAATTGTATCATT ATCTCAATGAATCAGGTGGGGCTTGCCCCCTCT CCCTCTCTTTTGAAAAAAGGTACCGAAAAAAT TTCACATGAAGTGATATTATATTTTAGTCCAG TAGGTTTTGTGCATTATTTTCGCTTATCGATCAG ATTCTTTGCTAGA	<i>Elaeis guineensis</i> AY601220.1	2	2	234/238 (98 %)	4e ⁻¹⁰⁹

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der spektrophotometrischen Reinheits- und Konzentrationsbestimmung sowie der Überprüfung der Amplifizierbarkeit der DNA-Isolate mit dem eukaryotenspezifischen Primerpaar euk18S zusammengefasst.

Tabelle 15: Spektrophotometrische Eigenschaften und Amplifizierbarkeit der DNA-Isolate aus Kokoschips, -nuss und -blütenzucker.

Matrix	DNA-Konzentration [ng/μL]	Reinheit A260/A280	Amplifizierbarkeit*
Kokoschips	182	1,76	+
Kokosnuss	191	2,09	+
Kokosblütenzucker	210	1,95	+

*" +" zeigt ein positives Ergebnis an

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse des real-time PCR-Assays unter Änderung der Reaktionsbedingungen zusammengefasst.

Tabelle 16: Ct-Werte der DNA-Extrakte in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen des real-time PCR-Assays.

Reaktionsbedingungen	Ct-Wert (0,1 ng/μL)		Ct-Wert (0,01 ng/μL)	
	A	B	A	B
T _{Annealing/Elongation} = 60 °C; c _{Primer} = 0,5 μM; c _{Sonde} = 0,2 μM	28,69	28,82	32,29	32,70
T _{Annealing/Elongation} = 55 °C; c _{Primer} = 0,5 μM; c _{Sonde} = 0,2 μM	28,25	28,04	32,33	31,84
T _{Annealing/Elongation} = 53 °C; c _{Primer} = 0,5 μM; c _{Sonde} = 0,2 μM	28,02	27,40	31,40	31,02
T _{Annealing} = 53 °C; T _{Elongation} = 60 °C; c _{Primer} = 0,5 μM; c _{Sonde} = 0,2 μM	28,46	28,35	32,68	32,60

Reaktionsbedingungen	Ct-Wert (0,1 ng/μL)		Ct-Wert (0,01 ng/μL)	
	A	B	A	B
T _{Annealing/Elongation} = 53 °C; C _{Primer} = 0,5 μM; C _{Sonde} = 0,1 μM	28,25	28,32	32,46	32,10
T _{Annealing/Elongation} = 53 °C; C _{Primer} = 0,5 μM; C _{Sonde} = 0,3 μM	28,11	28,06	31,98	31,43
T _{Annealing/Elongation} = 53 °C; C _{Primer} = 0,4 μM; C _{Sonde} = 0,2 μM	28,06	28,35	31,53	32,75
T _{Annealing/Elongation} = 53 °C; C _{Primer} = 0,6 μM; C _{Sonde} = 0,2 μM	27,64	27,60	31,52	32,00
T _{Annealing/Elongation} = 53 °C; C _{Primer} = 0,7 μM; C _{Sonde} = 0,2 μM	27,83	27,90	30,82	31,14
T _{Annealing/Elongation} = 53 °C; C _{Primer} = 0,8 μM; C _{Sonde} = 0,2 μM	28,06	28,21	31,69	32,03
T _{Annealing/Elongation} = 53 °C; C _{Primer} = 0,9 μM; C _{Sonde} = 0,2 μM	28,28	27,53	31,41	31,11
T _{Annealing/Elongation} = 53 °C; C _{Primer} = 1,0 μM; C _{Sonde} = 0,2 μM	27,70	27,73	31,15	31,42

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse der enzymatischen Zuckerbestimmung sowie der Feuchtigkeitsbestimmung für die einzelnen Kokosblütenzuckerproben dargestellt.

Tabelle 17: Zusammensetzung untersuchter Kokosblütenzuckerproben.

Probennummer	2017155368	2018111887	2018113723	2018122992	2017155367	2017155091	2017109727	2018113720	2017109728	2018122976	Mittelwert
Saccharose [g/100g]	84,21	81,7	88,72	81,58	84,8	86,83	87,33	90,11	91,07	86,92	86,33
Anderes [g/100g]	9,67	12,44	8,56	13,74	8,71	7,54	7,36	4,41	3,14	9,09	8,47
Wasseranteil [g/100g]	2,31	2,21	1,59	2,39	2,08	1,79	1,56	1,55	1,42	1,18	1,81
Fructose [g/100g]	2,51	2,32	0,66	1,4	2,32	1,78	1,85	1,85	2,1	1,34	1,81
Glucose [g/100g]	1,3	1,33	0,48	0,88	2,09	2,07	1,9	2,07	2,28	1,48	1,59
Glucose/Fructose	0,52	0,57	0,73	0,63	0,90	1,16	1,03	1,12	1,09	1,10	
C₄-Anteil [g/100g]	< 10	< 10	< 10	< 10	≥ 10 bis < 20	≥ 20 bis < 50	≥ 20 bis < 50	≥ 20 bis < 50	≥ 50	≥ 50	

8.2 Probenmaterial

Tabelle 18 enthält eine Übersicht pflanzlicher Bestandteile, die als Probenmaterial für die Entwicklung einer DNA basierten Nachweismethode von *Cocos nucifera* verwendet wurden.

Tabelle 18: Verwendete Pflanzenbestandteile für die Entwicklung einer DNA basierten Nachweismethode von *Cocos nucifera*.

Pflanzensegment	Spezies	Geographische Herkunft	Probennummer
Blatt	Chilenische Honigpalme (<i>Jubaea chilensis</i>)	Palmengarten Frankfurt/Main, Deutschland	2018155507
Blatt	Geleepalme (<i>Butia capitata</i>)	Palmengarten Frankfurt/Main, Deutschland	2018155508
Blatt	Ölpalme (<i>Elaeis guineensis</i>)	Palmengarten Frankfurt/Main, Deutschland	2018155510
Blatt	Kokospalme (<i>Cocos nucifera</i>)	Indonesien	2018155511
Frucht (frisch)	Kokospalme (<i>Cocos nucifera</i>)	N/A	2019126673
Frucht (geraspelt, getrocknet)	Kokospalme (<i>Cocos nucifera</i>)	Sri Lanka	2018128605

Tabelle 19 bietet eine detaillierte Auflistung aller Kokosblütenzuckerproben inklusive der geographischen Herkunft sowie den Ergebnissen der Bestimmung des C₄-Anteils mittels ¹³C/¹²C-Stabilisotopenanalyse sowie den bestimmten Glutengehalt.

Tabelle 19: Analytierte Kokosblütenzuckerproben.

Probennummer	Preis [€/kg]	geographische Herkunft	C ₄ -Zusatz [%]	Gluten [mg/kg]
2017109725	N/A	Indonesien	N/A	N/A
2017109726	N/A	Indonesien	< 10	< 5
2017109727	N/A	Indonesien	40	25,77
2017109728	N/A	Indonesien	50	201,41
2017109729	N/A	Indonesien	N/A	N/A
2017109730	N/A	Indonesien	N/A	N/A
2017109732	N/A	N/A	N/A	N/A
2017109733	N/A	N/A	≥ 10 bis < 20	N/A
2017109734	N/A	N/A	< 10	N/A

Probennummer	Preis [€/kg]	geographische Herkunft	C ₄ -Zusatz [%]	Gluten [mg/kg]
2017111192	N/A	Indonesien	N/A	N/A
2017111193	N/A	Indonesien	< 10	< 5
2017111194	N/A	N/A	N/A	N/A
2017111195	N/A	Indonesien	40	< 5
2017111196	N/A	N/A	< 10	< 5
2017115067	29,66	Indonesien	N/A	N/A
2017121521	19,96	Indonesien	≥ 10 bis < 20	7,28
2017143986	N/A	Indonesien	< 10	< 5
2017143987	N/A	Indonesien	N/A	N/A
2017143988	N/A	Indonesien	< 10	< 5
2017143989	N/A	Indonesien	N/A	N/A
2017154840	N/A	Indonesien	< 10	N/A
2017154841	N/A	Indonesien	< 10	N/A
2017154842	N/A	Indonesien	< 10	N/A
2017154843	N/A	N/A	< 10	N/A
2017154844	N/A	Indonesien	< 10	N/A
2017154845	N/A	Indonesien	< 10	N/A
2017154846	N/A	Indonesien	< 10	N/A
2017155087	N/A	Indonesien	< 10	N/A
2017155088	N/A	Indonesien	< 10	N/A
2017155089	N/A	Indonesien	< 10	N/A
2017155090	15,98	N/A	< 10	N/A
2017155091	12,99	Indonesien	20	N/A
2017155092	14,90	N/A	< 10	N/A
2017155367	15,96	N/A	≥ 10 bis < 20	N/A
2017155368	19,80	Philippinen	< 10	< 5
2017155369	49,97	N/A	< 10	< 5
2017155459	33,36	Philippinen	< 10	< 5
2017155460	13,83	N/A	< 10	N/A
2017155461	11,95	N/A	N/A	N/A

Probennummer	Preis [€/kg]	geographische Herkunft	C ₄ -Zusatz [%]	Gluten [mg/kg]
2017155589	13,89	Philippinen	< 10	< 5
2017155688	N/A	Indonesien	< 10	N/A
2018110396	N/A	Indonesien	< 10	N/A
2018111887	28,54	Philippinen	< 10	< 5
2018111888	19,93	N/A	< 10	< 5
2018112556	19,8	Philippinen	< 10	< 5
2018113719	12,99	N/A	< 10	< 5
2018113720	18,15	N/A	40	15,93
2018113721	59,60	Indonesien	< 10	123,6
2018113722	15,16	Indonesien	< 10	5,65
2018113723	20,79	Indonesien	< 10	< 5
2018116469	N/A	Indonesien	< 10	N/A
2018119189	21,67	N/A	< 10	N/A
2018119190	9,16	N/A	< 10	N/A
2018119191	19,96	N/A	< 10	N/A
2018121425	N/A	N/A	N/A	N/A
2018122965	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018122967	N/A	Indonesien (Pontianak)	N/A	N/A
2018122968	N/A	Indonesien (Purwokerto)	< 10	< 5
2018122969	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	< 5
2018122970	N/A	Indonesien (Purwokerto)	< 10	< 5
2018122971	N/A	Indonesien (Purwokerto)	< 10	< 5
2018122972	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018122973	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018122974	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018122975	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	< 5
2018122976	N/A	Indonesien (Purwokerto)	65	< 5
2018122977	N/A	Indonesien (Yogyakarta)	N/A	N/A
2018122978	N/A	Indonesien (Yogyakarta)	< 10	< 5
2018122979	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A

Probennummer	Preis [€/kg]	geographische Herkunft	C ₄ -Zusatz [%]	Gluten [mg/kg]
2018122980	N/A	Indonesien (Yogyakarta)	N/A	N/A
2018122981	N/A	Indonesien (Purwokerto)	< 10	< 5
2018122982	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018122983	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018122984	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018122985	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018122986	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018122987	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018122988	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	< 5
2018122989	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018122990	N/A	Indonesien (Yogyakarta)	N/A	N/A
2018122991	N/A	Indonesien (Purwokerto)	< 10	< 5
2018122992	N/A	Indonesien (Yogyakarta)	< 10	< 5
2018122993	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018122994	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018122995	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018122996	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018132020	N/A	Indonesien (Purwokerto)	< 10	7
2018132021	N/A	Indonesien (Yogyakarta)	< 10	< 5
2018132022	N/A	Indonesien (Yogyakarta)	N/A	N/A
2018135620	N/A	Indonesien (Yogyakarta)	N/A	N/A
2018135621	N/A	Indonesien (Yogyakarta)	N/A	N/A
2018139578	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018140141	N/A	N/A	< 10	< 5
2018140329	N/A	Indonesien (Yogyakarta)	< 10	< 5
2018146587	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018146588	N/A	Indonesien	N/A	N/A
2018146589	N/A	Indonesien (Purwokerto)	N/A	N/A
2018146590	N/A	Indonesien	N/A	N/A
2018146767	N/A	Indonesien	< 10	N/A

Probennummer	Preis [€/kg]	geographische Herkunft	C ₄ -Zusatz [%]	Gluten [mg/kg]
2018146768	N/A	Indonesien	< 10	N/A
2018146858	N/A	Philippinen	N/A	N/A
2019115014	27,68	N/A	N/A	N/A
2019115013	10,20	Indonesien	N/A	N/A
2019115012	24,98	N/A	N/A	N/A
2019115015	11,96	Indonesien	N/A	N/A
2019115011	N/A	Indonesien	≥ 10 bis < 20	N/A
2019115011	29,66	Indonesien	N/A	N/A

In Tabelle 20 sind weitere Proben- und Referenzmaterialien zusammengefasst.

Tabelle 20: Übersicht weiterer Proben- und Referenzmaterialien.

Matrix	Probennummer	Preis [€/kg]	Geographische Herkunft
Kokosblütennektar	2018155498	N/A	Indonesien
	2018145700	N/A	Indonesien
Kokosblütensirup	2019126633	25,42	Philippinen
	2019126635	23,96	Indonesien
	2019126634	17,00	Philippinen
	2019126632	25,57	Philippinen
	2017111191	N/A	N/A
Rohrzucker	2017121524	2,29	N/A
	2017121575	3,98	N/A
	2018122963	N/A	Sri Lanka
	2017109731	22,00	N/A
Vollrohrzucker	2018111884	9,88	Philippinen
	2018111885	9,50	Philippinen
	2018122964	N/A	Sri Lanka
	2018135350	7,58	Brasilien
	2018135351	18,38	N/A

Vollrohrzucker	2019126636	9,97	N/A
	2019126638	9,70	Peru
	2019126639	9,40	Mauritius
	2019126640	4,90	Costa Rica
	2019126641	25,00	Peru
	2019126642	6,90	Costa Rica
	2019126643	5,38	N/A
	2019126644	5,38	Brasilien
	2019126645	7,58	N/A
	2019126646	13,02	Kolumbien
	2019126647	9,38	N/A
Palmzucker	2017121281	8,36	Indonesien
	2017121282	29,67	N/A
	2017121283	20,76	N/A
	2017121284	7,55	Malaysia
	2017121285	27,10	Indonesien
	2017121286	22,24	Indonesien
	2017121287	10,11	N/A
	2017121288	13,05	N/A
	2018111886	46,00	Kambodscha
	2019105153	N/A	Indonesien
Rübenzucker	2019126637	28,30	Indonesien
	2018117358	15,12	Deutschland
Kokosfett	201911022	9,02	Sri Lanka
	2018155492	N/A	Philippinen
	2018155493	N/A	Philippinen
	2018155494	N/A	Sri Lanka
	2018155495	N/A	Sri Lanka
	2018155496	N/A	Philippinen
	2018155497	N/A	Philippinen
	2019108178	5,25	N/A

Kokosfett	2019108183	3,20	N/A	
	2019108184	29,98	Philippinen	
	2019108187	16,23	N/A	
	2019108188	39,04	N/A	
	2019108191	20,79	Sri Lanka	
	2019108192	14,95	Sri Lanka	
	2019108197	19,33	N/A	
	2019108198	11,23	Philippinen	
	2019108199	13,90	Sri Lanka	
	2019108202	11,50	Sri Lanka	
	2019108757	N/A	Sri Lanka	
	2019108758	N/A	Philippinen	
	2019108759	N/A	Sri Lanka	
	2019108762	N/A	Philippinen	
	2019109086	9,80	Philippinen	
	2019109087	7,99	N/A	
	2019109476	13,42	Sri Lanka	
	2019110066	37,50	Philippinen	
	Palmfett	2019101326	14,56	N/A
		2019108180	1,57	N/A
2019108181		1,57	N/A	
2019109084		14,32	N/A	
2019109085		32,87	N/A	
Sonnenblumenöl	2019108369	3,98	Frankreich	
	2019108370	2,65	N/A	
	2019108371	0,99	N/A	
	2019108650	3,98	N/A	
	2019108651	0,99	N/A	
Pflanzenfett*	2019108179	4,64	N/A	
	2019108182	4,87	N/A	

*Pflanzenfett bestehend aus Palm- und Kokosfett sowie Sonnenblumenöl

8.3 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software

8.3.1 DNA basierter Nachweis von *Cocos nucifera*

Tabelle 21 bietet eine Übersicht der verwendeten Chemikalien. Generell sind analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Chemikalien/Reagenzien zu verwenden. Die Lösungen sind mit bidestilliertem Wasser herzustellen und zu autoklavieren oder mit UV-Licht zu behandeln.

Tabelle 21: Herstellerangaben zu den Chemikalien für den DNA basierten Nachweis von *Cocos nucifera*.

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller	GHS-Symbol	Hazard-Statement	Precaution-Statement
α -Amylase aus <i>Bacillus</i> sp. (10 mg/mL)	9000-90-2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	08, Gefahr	334	261, 342+311
Agarose (BioScience-Grade)	9012-36-6	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
CTAB- Extraktionspufferlösung (pH 8,0)	Eigene Herstellung	20,05 g CTAB, 81,82 g NaCl, 12,12 g Tris-Base, 7,44 g Na ₂ EDTA, mit Wasser auf 1 L auffüllen (der pH-Wert wird mit HCl eingestellt)			
CTAB- Präzipitationspufferlösung (pH 8,0)	Eigene Herstellung	5,10 g CTAB, 2,34 g NaCl, mit Wasser auf 1 L auffüllen (der pH-Wert wird mit Natronlauge eingestellt)			
λ -DNA aus <i>Escherichia coli</i> Bakteriophage (0,3 μ g/ μ L)		Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
DNA-Interkalationsfarbstoff "Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent"		Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
DNA-Polymerase für die RT-PCR "innuMix qPCR MasterMix Probe"		Analytik Jena AG, Jena, Deutschland	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller	GHS-Symbol	Hazard-Statement	Precaution-Statement
DNA-Polymerase Q5 "Q5® Hot Start High-Fidelity Master Mix (2X)"		New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, USA	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
DNA-Größenmarker "Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder"		New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, USA	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
DNA-Ladepuffer "FastDigest Green Buffer (10X)"		Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
DNeasy Plant Maxi Kit		Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	07, 08, Achtung, Gefahr	302, 315, 317, 319, 332, 334	261, 280, 284, 304+340, 342+311
Ethanol absolut (≥ 99,5 %, Ph. Eur., USP)	64-17-5	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	02, 07, Gefahr	225, 319	210, 243, 280, 305+351+338, 403+235
Fluoreszenz- Nukleinsäurefarbstoff "GelRed Nucleic Acid Stain (10000X)"		Biotium, Inc., Fremont, CA, USA	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Glykogen-Lösung (20 mg/mL)	Eigene Herstellung	20 mg Glykogen in 1 mL Wasser lösen			
Natriumchlorid-Lösung (70 mg/mL)	Eigene Herstellung	6,02 g NaCl in 100 mL Wasser lösen			
PCR clean-up and gel extraction kit "NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up"		MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland	07, Achtung	302, 412, 031	260, 273, 301+312, 330
PME Food DNA Extraction Kit		Analytik Jena AG, Jena, Deutschland	02, 07, 08, 09, Achtung, Gefahr	225, 302, 315, 317, 319, 334, 335, 336, 400	101, 102, 103, 210, 241, 261, 264, 273, 280, 284, 303+361+353, 305+351+338, 337+313, 405, 501

Chemikalie	CAS- Nummer	Hersteller	GHS-Symbol	Hazard- Statement	Precaution- Statement
Primer		Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, USA	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
2-Propanol (≥ 99,8 %, ROTISOLV®, Pestilyse®)	67-63-0	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	07, 02, Gefahr	225, 319, 336	210, 280, 305+351+338
Proteinase K aus <i>Tritirachium album</i> . (20 mg/mL)	39450-01-6	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	07, 08, Gefahr	315, 319, 334, 317, 335	260, 280, 342, 311
RNase A aus Rinderpankreas (10 mg/mL)	9001-99-4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Sonde		Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, USA	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2007		
TBE-Puffer (1X)	Eigene Herstellung	10,8 g Tris, 5,5 g Borsäure, 0,93 g Na ₂ EDTA, mit Wasser auf 1 L auffüllen (der pH-Wert wird mit HCl eingestellt)			
TE-Pufferlösung mit Tris-Base (pH 8,0 (1X))	Eigene Herstellung	1,22 g Tris-Base, 0,38 g Na ₂ EDTA, mit Wasser auf 1 L auffüllen (der pH-Wert wird mit HCl eingestellt)			
TE-Pufferlösung mit Tris-HCl (pH 8,0 (1X))	Eigene Herstellung	1,98 g Tris-HCl, 0,46 g Na ₂ EDTA, mit Wasser auf 1 L auffüllen (der pH-Wert wird mit HCl eingestellt)			
Trichlormethan (≥ 99 %, p.a., ROTISOLV® HPLC)	67-66-3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	06, 08, Gefahr	302, 315, 319, 331, 351, 361d, 372	202, 260, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+313
Trichlormethan/3-Methyl-1- butanol (24/1; V/V)	67-66-3	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland	06, 08, Gefahr	302, 331, 315, 319, 336, 351, 361d, 372	301+330+331, 304+340, 311, 302+352, 280
Wizard-Resin-Gemisch		Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA	07, Achtung	302, 315, 319	264, 270, 280, 302+352, 305+351+338, 301+312

Tabelle 22 enthält eine alphabetische Auflistung der verwendeten Primer und Sonden.

Tabelle 22: Verwendete Primer und Sonden in Anlehnung an [70].

Primer-/ Sondename	Beschreibung	Zielgen	Sequenz (5' → 3')	Länge [bp]	Amplikonlänge [bp]
euk18S-for	Eukaryotenspezifischer Vorwärtsprimer	18SrRNA	TCT GCC CTA TCA ACT TTC GAT GGT A	25	137
euk18S-rev	Eukaryotenspezifischer Rückwärtsprimer		AAT TTG CGC GCC TGC TGC CTT CCT T	25	
euk18S-Sonde	Eukaryotenspezifische Sonde	18SrRNA	6FAM-ATG GTG GTG ACG GGT GAC GGA GAA TTA G-TAMRA	28	
cocosITS109-for	Kokosspezifischer Vorwärtsprimer	ITS	GGC CTC CTG AGG TAT ATC CG	20	109
cocosITS109-rev	Kokosspezifischer Rückwärtsprimer		CAT CCA CCA TCC ACC GTG TC	20	
cocosITS197-for	Kokosspezifischer Vorwärtsprimer	ITS	TAT CCG GAT GTG GAT GCT GC	20	197
cocosITS197-rev	Kokosspezifischer Rückwärtsprimer		CAT CCG ATG GCT GGG GTG	18	
cocosPRK-for	Kokosspezifischer Vorwärtsprimer	prk	ACA AGA CCT ACT GGA CTG G	19	164
cocosPRK-rev	Kokosspezifischer Rückwärtsprimer		TCT GAT ATG TAT AAG ACT CAG CA	23	
cocosPRK-Sonde	Kokosspezifische Sonde	prk	FAM-AAT TGT CTC ATT ATC TCA ATG AAC CGG GTG-BHQ1	30	
palmPRK-for	Palmenspezifisch Vorwärtsprimer	prk	CTA GCA AAG AAT CTG ATC GAT AAG T	25	274 ^a 279 ^b
palmPRK-rev	Palmenspezifischer Rückwärtsprimer		CAT ATT GCT TCT GTG GGT CTG	21	277 ^c 271 ^d

a: Honigpalme (*Jubaea chilensis*); b: Kokospalme (*Cocos nucifera*); c: Geleepalme (*Butia capitata*); d: Ölpalme (*Elaeis guineensis*)

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23: Verwendete Verbrauchsmaterialien für den DNA basierten Nachweis von *Cocos nucifera*.

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Spezifikation
Einmalspritzen	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland	Norm-Ject®, zweiteilig, V = 10 mL (12 mL)
Einmalspritzen	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland	Norm-Ject®, zweiteilig V = 2 mL (3 mL)
PCR-Gefäß- und Kappenstreifen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	8 aneinanderhängende Röhrchen/Kappen, PP, steril V = 0,2 mL
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	Biosphere® plus, PP-Spitze mit PE-Filter, transparent, steril V = 100-1000 µL (Farbcode: blau) V = 2-100 µL (Farbcode: gelb) V = 0,5-20 µL (Farbcode: grau)
Reagenz- und Zentrifugenröhren	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	PP, konisch, Schraubverschluss, farblos V = 50 mL
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Safe-Lock Tubes, farblos V = 2,0 mL V = 1,5 mL V = 0,5 mL
Real-time PCR Folie	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland	(Selbsthaftende) Optische Sealingfolie adhäsiv, transparent, Peeling-fähig 77 x 140 mm
Real-time PCR Gefäße	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland	RoboStrip® PP Low Profile white, 8-Well-Strips V = 0,1 mL
Serologische Pipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	PS, steril V = 10 mL
Wizard® Minisäulen	Promega Corp., Madison, WI, USA	

In Tabelle 24 sind die verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 24: Verwendete Geräte für den DNA basierten Nachweis von *Cocos nucifera*.

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Akku-betriebene Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland	"pipetus®"
Biologische Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	"Herasafe KS"
Einkanal-Kolbenhubpipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	"Research® plus" mit variabler Volumeneinstellung V = 100-1000 µL (Farbcode: blau) V = 20-200 µL (Farbcode: gelb) V = 10-100 µL (Farbcode: gelb) V = 0,5-10 µL (Farbcode: grau)
Elektrophoreseeinheit	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	horizontal, Gelgröße: 70x100 mm
Geldokumentationseinheit	Biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland	"Dark Hood DH-40/50"
Küvette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	"µCuvette G1.0"
Messermühle	Retsch GmbH, Haan, Germany	"Grindomix GM 200"
Mikrowelle	Migros-Genossenschaft, Zürich, Schweiz	"MioStar DMR-704"
Mikrozentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	"5417R" gekühlt
Mikrozentrifuge	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	"Galaxy MiniStar"
PCR-Arbeitsbank	C.B.S. Scientific Company, Inc., San Diego, CA, USA	"Optimizer PCR Workstation"

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland	"ENTRIS" max. 320 g, d = 0,001 g
Real-time Thermocycler	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland	"qTower3"
Schüttel- und Mischgerät mit Inkubator	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland	"Unimax 1010" "Incubator 1000"
Spektralphotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	"BioSpectrometer® basic"
Thermocycler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	"Mastercycler® nexus gradient"
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	"Thermomixer comfort"
Vakuumverteiler-System	Promega Corp., Madison, WI, USA	"Vac-Man®"
Vortex-Schüttler	Scientific Industries, Inc., Islip, NY, USA	"Vortex-Genie 2"
Vortex-Schüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	"Lab dancer"
Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland	"ROTOFIX 32 A"

Die verwendete Software ist in Tabelle 25 aufgelistet.

Tabelle 25: Verwendete Software für den DNA basierten Nachweis von *Cocos nucifera*.

Software	Version	Hersteller	Anwendung
argus X1	7.14.22	Biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland	Bedienung der Geldokumentationseinheit "Dark Hood 40/50"
Biocalculator	Web-Tool http://www.metabion.com/support-and-solution/biocalculator/	Metabion international AG, Planegg, Deutschland	Berechnung und Prüfung der Eigenschaften von Nukleotid-Sequenzen

Software	Version	Hersteller	Anwendung
BioEdit	7.0.5	Ibis Therapeutics, Inc., Carlsbad, CA, USA	Alignment und Translation biologischer Sequenzen
BLASTn	Web-Tool https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA	Vergleich von Nukleotidsequenzen gegen Nukleotidsequenzdatenbanken
NCBI (Nucleotide)	Web-Tool https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA	Sammlung von Gen-Sequenzen
OligoAnalyzer	Web-Tool https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer	Integrated DNA Technologies Inc. Coraville, IA, USA	Berechnung und Prüfung der Eigenschaften von Nukleotid-Sequenzen
Primer-Blast	Web-Tool https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA	Auffinden spezifischer Primer-Sequenzen
qPCRsoft	4.0	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland	Bedienung des "qTower ³ "-Thermocyclers
Tm Calculator	Web-Tool https://tcalculator.neb.com/#!/main	New England BioLabs Inc. Ipswich, MA, USA	Berechnung der Schmelztemperatur von Primern

8.3.2 Analyse unpolarer Metabolite

Tabelle 26 bietet eine Übersicht der verwendeten Chemikalien. Generell sind analysenreine, für die Massenspektrometrie geeignete Chemikalien/Reagenzien zu verwenden.

Tabelle 26: Herstellerangaben zu den Chemikalien für die Analyse unpolarer Metabolite.

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller	GHS-Symbol	Hazard-Statement	Precaution-Statement
2-Propanol (≥ 99,95 %, ULC-MS grade)	67-63-0	Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande	02, 07, Gefahr	225, 319, 336	210, 241, 303+361+353, 305+351+338, 405, 501

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller	GHS-Symbol	Hazard-Statement	Precaution-Statement
Acetonitril (≥ 99,9 %, UPLC-MS grade)	75-05-8	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	02, 07, Gefahr	225, 302+312+332, 319	210, 280, 305+351+338, 308+310
Ameisensäure (99 %, ULC-MS grade)	64-18-6	Biosolve BV, Valkenswaard, Niederlande	02, 05, 07, Gefahr	226, 302, 314	303+361+353, 305+351+338, 310, 405, 501
Ammoniumformiat (≥ 99,0 %, LC-MS grade)	540-69-2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Leucin Enkephalin		Waters Corp., Milford, MA, USA	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
Major Mix IMS/Tof Calibration Kit		Waters Corp., Milford, MA, USA	02,07, Gefahr, Achtung	319, 332, 225	321, 370+378, 210
Methanol (≥ 99,9 %, UPLC-MS grade)	67-56-1	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	02, 06, 08, Gefahr	225, 301+311+331, 370	210, 243, 280, 302+352, 304+340, 308+310
Trichlormethan (≥ 99,9 %, HPLC grade)	67-66-3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	06, 08, Gefahr	302, 315, 319, 331, 351, 361d, 372	202, 260, 302+352, 304+340, 305+351+338, 308+313
Wasser (Optigrade HPLC)		LGC Standards GmbH, Wessel, Deutschland	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die Analyse unpolarer Metabolite.

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Spezifikation
Einmalspritzen	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland	Norm-Ject®, zweiteilig, V = 10 mL (12 mL)
Glasvials	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland	Gewinde, N9, weite Öffnung, braun, flach, V = 1,5 mL, 11,6 x 32 mm

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Spezifikation
Glasvials	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland	Gewinde, N15, braun, flach, V = 8 mL, 16,6 x 61 mm
Mikroinserte für Vials	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland	weite Öffnung, klar, konisch, 15 mm Spitze V = 0,2 mL; 6x31 mm
Pasteurpipetten	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland	aus Glas, ohne Wattestopfen, 150 mm
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	PP, cadmiumfrei V = 100-1000 µL (Farbcode: blau) V = 2-200 µL (Farbcode: gelb)
Pipettenspitzen	Ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland	Finntip™, PP, V = 2-10 mL (Farbcode: rot) V = 1-5 mL (Farbcode: grün)
Plastik-Einmalspatel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	PP, 210 mm, Standard, Opaque
Reagenz- und Zentrifugenröhren	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	PP, konisch, Schraubverschluss, farblos V = 50 mL
Schraubkappen	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland	N9, PP, blau, Kopfbohrung, Septum aus Red Rubber/FEP farblos, 45° shore A, 1,0 mm
Schraubkappen	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland	N15, grün, geschlossen, PTFE beige/weiß
Spritzenfilter	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland	CHROMAFIL® Xtra RC-20/25, regenerierte Cellulose
UPLC-Trennsäule	Waters Corp., Milford, MA, USA	"ACQUITY UPLC BEH C18" 150 mm x 2,1 mm, Partikelgröße: 1,7 µm
UPLC-Vorsäule	Waters Corp., Milford, MA, USA	"ACQUITY UPLC BEH C18 VanGuard Precolumn" 5 mm x 2,1 mm, Partikelgröße: 1,7 µm

In Tabelle 28 sind die verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 28: Verwendete Geräte für die Analyse unpolarer Metabolite.

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Einkanal-Kolbenhubpipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	"Research® plus" mit variabler Volumeneinstellung V = 100-1000 µL (Farbcode: blau) V = 10-100 µL (Farbcode: gelb) V = 2-20 µL (Farbcode: gelb)
Einkanal-Kolbenhubpipette	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	"Finnpipette" mit variabler Volumeneinstellung V = 0,5-5 mL (Farbcode: grün) V = 1-10 mL (Farbcode: rot)
Präzisionswaage	A&D Instruments Limited, Abingdon, UK	"EK-300i" max. 300 g, d = 0,01 g
QToF-Massenspektrometer	Waters Corp., Milford, MA, USA	"Vion IMS QToF"
Schüttelgerät	Collomix GmbH, Gaimersheim, Germany	"Shaker VIBA 330"
UPLC-System	Waters Corp., Milford, MA, USA	"ACQUITY UPLC I-Class" bestehend aus: I-Class Binary Solvent Manager, Column Manager, Sample Manager FTN
Vortex-Schüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	"Vortex-Schüttler"
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	"Heraeus Multifuge X3"

Die verwendete Software ist in Tabelle 29 aufgelistet.

Tabelle 29: Verwendete Software für die Analyse unpolarer Metabolite.

Software	Version	Hersteller	Anwendung
UNIFI Scientific Information System	1.9.4	Waters Corp., Milford, MA, USA	Bedienung des LC-MS-Systems

8.3.3 Beschreibung sensorischer Eigenschaften

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

Tabelle 30: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die Beschreibung sensorischer Eigenschaften.

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Spezifikation
Einweg-Plastikbecher	handelsüblich	2 cL, klar
Einweg-Plastiklöffel	handelsüblich	13 cm, weiß

8.3.4 Mikroskopische Analyse

Tabelle 31 bietet eine Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Tabelle 31: Herstellerangaben zu den verwendeten Chemikalien für die mikroskopische Analyse.

Chemikalie	CAS- Nummer	Hersteller	GHS- Symbol	Hazard- Statement	Precaution- Statement
Chloralhydrat	302-17-0	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland	06, 07, Gefahr	301, 315, 319	262, 264, 270, 280, 301, 310, 405, 501

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller	GHS-Symbol	Hazard-Statement	Precaution-Statement
Iod-Kaliumiodidlösung	Eigene Herstellung	1 g Iod, 2 g Kaliumiodid, in 150 mL Wasser lösen			

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 32 zusammengefasst.

Tabelle 32: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die mikroskopische Analyse.

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Spezifikation
Deckgläser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	24 x 24 mm
Objektträger	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	76 x 26 mm, gebrauchsfertig
Plastik-Einmalspatel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	PP, 140 mm, mikro, antistatisch

In Tabelle 33 sind die verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 33: Verwendete Geräte für die mikroskopische Analyse.

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland	"Zeiss Primo Star"
Mikroskopkamera	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland	"Axio Cam ERc 5s"

Die verwendete Software ist in Tabelle 34 aufgelistet.

Tabelle 34: Verwendete Software für die mikroskopische Analyse.

Software	Version	Hersteller	Anwendung
ZEN lite	2.3	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland	Bedienung der Mikroskopkamera "Axio Cam ERc 5s"

8.3.5 Bestimmung des Gehalts an Gluten

Tabelle 35 bietet eine Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Tabelle 35: Herstellerangaben zu den verwendeten Chemikalien für die Bestimmung des Gehalts an Gluten.

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller	GHS-Symbol	Hazard-Statement	Precaution-Statement
Ethanol (≥ 99,8 %)	64-17-5	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	02, 07, Gefahr	225, 319	210, 243, 280, 305+351+338, 403+235
Magermilchpulver		handelsüblich	Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008		
RIDA® Cocktail-Solution (patented)		R-biopharm AG, Darmstadt, Deutschland	07, Achtung	315, 319	264, 280, 305+351+338, 321, 332+313, 337+313
RIDASCREEN® Gliadin Kit		R-biopharm AG, Darmstadt, Deutschland	02, 06, 08, Gefahr	226, 331, 370	210, 241, 260, 303+361+353, 405, 501

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 36 zusammengefasst.

Tabelle 36: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die Bestimmung des Gehalts an Gluten.

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Spezifikation
Mikrotestplatten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Rotilabo®, PS, transparent, 96 alphanumerisch gekennzeichnete Vertiefungen, U-Profil, 128 x 85 x 15 mm
Multipette-Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Combitips advanced® V = 10 mL (Farbcode: orange) V = 5 mL (Farbcode: blau) V = 1 mL (Farbcode: gelb)
Pipettenspitzen	Ratiolab GmbH Dreieich, Deutschland	Finntip™, PP V = 2-10 mL (Farbcode: gelb)
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	PP, cadmiumfrei V = 2-200 µL (Farbcode: gelb)
Pipettenspitzen	Thermo Labsystems Oy, Helsinki, Finnland	Finntip™, PP V = 5-300 µL (Farbcode: orange)
Plastik-Einmalspatel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	PP, 210 mm, Standard, Opaque
Reagenz- und Zentrifugenröhren	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	PP, konisch, Schraubverschluss, farblos V = 50 mL
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Safe-Lock Tubes, farblos V = 2,0 mL

In Tabelle 37 sind die verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 37: Verwendete Geräte für die Bestimmung des Gehalts an Gluten.

Gerät	Hersteller	Spezifikation
12-Kanal-Kolbenhubpipette	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	"Finnpipette" V = 30-300 µL (Farbcode: orange)

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Einkanal-Kolbenhubpipette	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	"Finnpipette" mit variabler Volumeneinstellung V = 1-10 mL (Farbcode: rot)
Einkanal-Kolbenhubpipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	"Research® plus" mit variabler Volumeneinstellung V = 20-200 µL (Farbcode: gelb)
Mikrotiterplatten-Lesegerät	TECAN Group Ltd., Männedorf, Schweiz	"GENios"
Multipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	"E3" V = 1-50 mL
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland	"ENTRIS" max. 320 g, d = 0,001 g
Schüttel- und Mischgerät mit Inkubator	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland	"Unimax 1010" "Incubator 1000"
Vortex-Schüttler	Scientific Industries, Inc., Islip, NY, USA	"Vortex-Genie 2"
Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland	"ROTOFIX 32 A"

Die verwendete Software ist in Tabelle 38 aufgelistet.

Tabelle 38: Verwendete Software für die Bestimmung des Gehalts an Gluten.

Software	Version	Hersteller	Anwendung
XFlour4	4.5	TECAN Group Ltd., Männedorf, Switzerland	Bedienung des Mikroplatten-Lesegerätes " GENios"

8.3.6 Feuchtigkeitsbestimmung

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 39 zusammengefasst.

Tabelle 39: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die Feuchtigkeitsbestimmung.

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Spezifikation
Plastik-Einmalspatel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	PP, 210 mm, Standard, Opaque
Probenschalen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Rotilabo®, Aluminium V = 125 mL

In Tabelle 40 sind die verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 40: Verwendete Geräte für die Feuchtigkeitsbestimmung.

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Analysenwaage	Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz	"AE 160" max. 162 g, d = 0,1 mg
Trockenschrank	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	"DRY-Line DL 53"

8.3.7 Enzymatische Zuckerbestimmung

Tabelle 41 bietet eine Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Tabelle 41: Herstellerangaben zu den Chemikalien für die enzymatische Zuckerbestimmung.

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller	GHS-Symbol	Hazard-Statement	Precaution-Statement
Enzytec™ Liquid D-Glucose		R-biopharm AG, Darmstadt, Deutschland		Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008	
Enzytec™ Liquid D-Glucose/D-Fructose		R-biopharm AG, Darmstadt, Deutschland		Kein gefährlicher Stoff oder gefährliches Gemisch gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008	
Enzytec™ Liquid Sucrose/D-Glucose		R-biopharm AG, Darmstadt, Deutschland	07, 08, Gefahr	315, 319, 360d	280, 305+351+338, 321, 308+313, 405, 501

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 42 zusammengefasst.

Tabelle 42: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die enzymatische Zuckerbestimmung.

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Spezifikation
Plastik-Einmalspatel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	PP, 210 mm, Standard, Opaque
Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	Safe-Lock Tubes, farblos, V = 2,0 mL

In Tabelle 43 sind die verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 43: Verwendete Geräte für die enzymatische Zuckerbestimmung.

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Analysenwaage	Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz	"AE 160" max. 162 g, d = 0,1 mg

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Automatisiertes Chemie-Analysegerät	Awareness Technology Inc., Palm City, FL, USA	"ChemWell® 2910"
Messkolben	ISOLAB Laborgeräte GmbH, Wertheim, Deutschland	Borosilikatglas 3.3, Klasse A, blau graduiert, mit PP Stopfen, NS 14/23 V = 100 mL

Die verwendete Software ist in Tabelle 44 aufgelistet.

Tabelle 44: Verwendete Software für die enzymatische Zuckerbestimmung.

Software	Version	Hersteller	Anwendung
Chemwell Manager	6.4.1.786	Awareness Technology Inc., Palm City, FL, USA	Bedienung des automatisierten Chemie-Analysegeräts "ChemWell® 2910"

8.3.8 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Stabilisotopenanalyse

In Tabelle 45 sind die verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 45: Verwendete Geräte für die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Stabilisotopenanalyse.

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Elementaranalysator	Carlo Erba Instruments S.r.l., Milano, Italien	"NA 1500 series II"
Isotopenmassenspektrometer	Nu Instruments Ltd, Wrexham, UK	"Horizon"

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Kokospalme (<i>Cocos nucifera</i>) und ihre Frucht. a) Die unverzweigte, schlanke Palme. b) Die Kokosnuss – der eigentliche Steinkern der Frucht. c) Schematischer Längsschnitt durch die Frucht.	12
Abbildung 2: Herstellungsprozess von Kokosblütenzucker. a) Ernte des Phloemsafts, der b) über offenem Feuer erhitzt wird bis er c) verdickt und kristallisiert.	13
Abbildung 3: Ablauf einer allergischen Reaktion bei a) Erstkontakt und b) Zweitkontakt.	15
Abbildung 4: Aufbau der DNA aus a) den 4 verschiedenen Desoxynukleotiden. b) Die komplementären DNA-Doppelstränge, die sich c) zur Helix winden.	18
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Polymerasekettenreaktion.	21
Abbildung 6: Funktionsprinzip einer TaqMan™-Sonde.	23
Abbildung 7: Sequenzherleitung anhand eines Elektropherogramms.	25
Abbildung 8: Informationsfluss der Genexpression.	26
Abbildung 9: Schematischer Aufbau eines UPLC-Systems.	27
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Elektrosprayionisation.	29
Abbildung 11: Schematischer Aufbau eines IMS-QToF-MS.	30
Abbildung 12: Reduktion und Visualisierung der Daten mittels PCA. a) PC1 erklärt die größte Varianz. b) Gruppierung der Proben im Scores Plot. c) Lage der Loadings im Raum der Hauptkomponenten.	31
Abbildung 13: Funktionsweise eines Sandwich-ELISAs.	32
Abbildung 14: Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der Spezifität der Primerpaare <i>cocosPRK</i> a), <i>cocosITS109</i> b) und <i>cocosITS197</i> c) anhand der PCR-Produkte der DNA-Isolate der Honigpalme (1), Ölpalme (2), Kokospalme (3), Gelepalme (4) sowie einer Negativkontrolle (5) und eines DNA-Größenmarkers (6) visualisiert mit dem Programm argus X1 an der Geldokumentationseinheit „Dark Hood 40/50“.	43
Abbildung 15: Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit von DNA-Templaten aus Kokosnuss (1-2), Kokoschips (3-4) und Kokosblütenzucker (6-7) mit einem DNA-Größenmarker (5) sowie einer Negativkontrolle (8) visualisiert mit dem Programm argus X1 an der Geldokumentationseinheit „Dark Hood 40/50“.	44
Abbildung 16: Platzierung und Sequenz der TaqMan™-Sonde innerhalb des <i>prk</i> -Gens von <i>Cocos nucifera</i> (GenBank: AY601235.1).	45
Abbildung 17: Spezifitätstest des Primer-/Sondensystems zum Nachweis von <i>Cocos nucifera</i> mittels real-time PCR.	45
Abbildung 18: Sensitivitätstest des real-time PCR-Assays zum Nachweis von <i>Cocos nucifera</i> mit DNA-Extrakten im Konzentrationsbereich von 100 ng/μL bis 0,1 pg/μL.	46

Abbildung 19: Auftragung der Ct-Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Ausgangskonzentration der DNA-Extrakte.....	46
Abbildung 20: Schema zur Probenextraktion.....	59
Abbildung 21: Total Ion Chromatogram (TIC) der Produktgruppen Kokosblütenzucker, Palmzucker, Vollrohrzucker, Rohrzucker und Rübenzucker. Das TIC zeigt die summierte Intensität aller detektierten Signale des Massenspektrums.....	63
Abbildung 22: Chromatogramme verschiedener Mischungen von Kokosblütenzucker und Rapadura-Vollrohrzucker.....	65
Abbildung 23: Chromatogramme von Kokos- und Palmfett.....	65
Abbildung 24: Chromatogramme von Kokosblütenzucker in Abhängigkeit der geographischen Herkunft.....	66
Abbildung 25: Vergleich der sensorischen Eigenschaften a) Geruch und b) Geschmack von Kokosblütenzucker und Vollrohrzucker.....	72
Abbildung 26: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Iod-Kaliumiodidpräparates mit blau gefärbten Stärkekörnern.....	74
Abbildung 27: Zusammensetzung von Kokosblütenzucker.....	75
Abbildung 28: Korrelation des Glucose-Fructose-Verhältnisses und des C ₄ -Anteils.....	75
Abbildung 29: Alignment der DNA-Sequenzen des prk-Gens für Öl- (<i>Elaeis guineensis</i>), Geleed- (<i>Butia capitata</i>), Honig- (<i>Jubaea chilensis</i>) und Kokospalme (<i>Cocos nucifera</i>) sowie die ausgewählten Positionen der Primer.....	85
Abbildung 30: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte aus den Blättern der Honigpalme (1), Ölpalme (2), Kokospalme (3) und Geleepalme (4) im Vergleich zu einem DNA-Größenmarker zur Verifizierung der botanischen Herkunft visualisiert mit dem Programm argus X1 an der Geldokumentationseinheit „Dark Hood 40/50“.....	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Temperaturprogramm der konventionellen PCR.	37
Tabelle 2: Temperaturprogramm des real-time PCR-Assays zum Nachweis von <i>C. nucifera</i>	38
Tabelle 3: Variierte Reaktionsbedingungen des real-time PCR-Assays.	39
Tabelle 4: Eigenschaften der aus Gelee-, Honig-, Kokos- und Ölpalme gewonnenen DNA-Isolate.	40
Tabelle 5: Temperaturprogramm des real-time PCR-Assays zum Nachweis von Eukaryoten. ..	53
Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der DNA-Isolierung aus Kokosblütenzucker unter Anwendung verschiedener Methoden.	54
Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der DNA-Isolierung aus Kokosblütenzucker unter Verwendung des PME Food DNA Extraction Kits.	55
Tabelle 8: Parameter der flüssigkeitschromatographischen Trennmethode.	60
Tabelle 9: Parameter des massenspektrometrischen Systems im positiven Ionenmodus.	60
Tabelle 10: Parameter zur Durchführung des Peak-Processings.	61
Tabelle 11: Probenübersicht für die einfach beschreibende Prüfung von Kokosblütenzucker. ..	70
Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der Bestimmung des Glutengehalts.	73
Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse der ¹³ C/ ¹² C-Stabilisotopenanalyse.	74
Tabelle 14: Verifizierung der botanischen Herkunft der Palmenblätter durch einen Sequenzabgleich gegen die NCBI-Datenbankeinträge.	87
Tabelle 15: Spektrophotometrische Eigenschaften und Amplifizierbarkeit der DNA-Isolate aus Kokoschips, -nuss und -blütenzucker.	89
Tabelle 16: Ct-Werte der DNA-Extrakte in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen des real-time PCR-Assays.	89
Tabelle 17: Zusammensetzung untersuchter Kokosblütenzuckerproben.	90
Tabelle 18: Verwendete Pflanzenbestandteile für die Entwicklung einer DNA basierten Nachweismethode von <i>Cocos nucifera</i>	91
Tabelle 19: Analytierte Kokosblütenzuckerproben.	91
Tabelle 20: Übersicht weiterer Proben- und Referenzmaterialien.	95
Tabelle 21: Herstellerangaben zu den Chemikalien für den DNA basierten Nachweis von <i>Cocos nucifera</i>	98
Tabelle 22: Verwendete Primer und Sonden.	101
Tabelle 23: Verwendete Verbrauchsmaterialien für den DNA basierten Nachweis von <i>Cocos nucifera</i>	102
Tabelle 24: Verwendete Geräte für den DNA basierten Nachweis von <i>Cocos nucifera</i>	103
Tabelle 25: Verwendete Software für den DNA basierten Nachweis von <i>Cocos nucifera</i>	104
Tabelle 26: Herstellerangaben zu den Chemikalien für die Analyse unpolarer Metabolite.	105

Tabelle 27: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die Analyse unpolarer Metabolite.	106
Tabelle 28: Verwendete Geräte für die Analyse unpolarer Metabolite.....	108
Tabelle 29: Verwendete Software für die Analyse unpolarer Metabolite.	109
Tabelle 30: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die Beschreibung sensorischer Eigenschaften.....	109
Tabelle 31: Herstellerangaben zu den verwendeten Chemikalien für die mikroskopische Analyse.	109
Tabelle 32: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die mikroskopische Analyse.....	110
Tabelle 33: Verwendete Geräte für die mikroskopische Analyse.....	110
Tabelle 34: Verwendete Software für die mikroskopische Analyse.	111
Tabelle 35: Herstellerangaben zu den verwendeten Chemikalien für die Bestimmung des Gehalts an Gluten.	111
Tabelle 36: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die Bestimmung des Gehalts an Gluten... 112	
Tabelle 37: Verwendete Geräte für die Bestimmung des Gehalts an Gluten.	112
Tabelle 38: Verwendete Software für die Bestimmung des Gehalts an Gluten.	113
Tabelle 39: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die Feuchtigkeitsbestimmung.	114
Tabelle 40: Verwendete Geräte für die Feuchtigkeitsbestimmung.....	114
Tabelle 41: Herstellerangaben zu den Chemikalien für die enzymatische Zuckerbestimmung.	115
Tabelle 42: Verwendete Verbrauchsmaterialien für die enzymatische Zuckerbestimmung..... 115	
Tabelle 43: Verwendete Geräte für die enzymatische Zuckerbestimmung.	115
Tabelle 44: Verwendete Software für die enzymatische Zuckerbestimmung.....	116
Tabelle 45: Verwendete Geräte für die ¹³ C/ ¹² C Stabilisotopenanalyse.	116

Literaturverzeichnis

1. Ahuja S. C., Ahuja U., & Ahuja S. (2014). Coconut-History, Uses, and Folklore. *Asian Agri-History*, 18(3).
2. Krack R. (2019). *Phuket*. Bielefeld: Reise-Know-How-Verlag Peter Rump GmbH.
3. Burger K. (2018). Kokos-Hype: Steigende Nachfrage ist kritisch. <https://www.spektrum.de/news/kokos-hype-steigende-nachfrage-ist-kritisch/1612616>, Zugriff am 07.06.2020.
4. Vormann J., & Stenger M. (2016). *SUPERFOOD KOKOSNUSS - Mit der Kraft der Ketone Nerven, Immunsystem und Stoffwechsel stärken*. München: GRÄFE UND UNZER VERLAG GmbH.
5. Nayar N. M. (2017). *THE COCONUT: Phylogeny, Origins, and Spread*. London, Oxford, Cambridge, San Diego: Elsevier.
6. Janick J., & Paull R. E. (2008). *The encyclopedia of fruit and nuts*. Wallingford: CAB International.
7. Lieberei R., & Reisdorff C. (2012). *Nutzpflanzen*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
8. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2019). FAOSTAT: Crops statistics - Production quantities of Coconuts by country 2017. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>, Zugriff am 20.05.2019.
9. Levang P. (1988). Le cocotier est aussi une plante sucrière = Coconut is also a sugar crop. *Oléagineux*, 43(3), 159-164.
10. Bureau of Agriculture and Fisheries Product Standards (BAFPS). (2010). *Philippine National Standard for Coconut sap sugar - Grading and classification*. PNS/BAFPS 76:2010.
11. Hebbar K. B., Arivalagan M., Manikantan M. R., Mathew A. C., Thamban C., Thomas G. V., & Chowdappa P. (2015). Coconut inflorescence sap and its value addition as sugar-collection techniques, yield, properties and market perspective. *Current Science*, 1411-1417.
12. Dalibard C. (1999). Overall view on the tradition of tapping palm trees and prospects for animal production. *Livestock Research for Rural Development*, 11(1), 1-37.
13. Philippine Coconut Authority (PCA). (2015). Coconut processing technologies - Coconut sap sugar. *Food Product Development Division Guide*, 5.
14. The Centre for the Promotion of Imports from developing countries (CBI) Ministry of Foreign Affairs. (2016). Exporting palm sugar to Europe? <https://www.cbi.eu/market-information/honey-sweeteners/palm-sugar/palm-sugar-europe>, Zugriff am 04.02.2019.

15. Verordnung (EU) Nr. 1308/2013 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 17. Dezember 2013 über eine gemeinsame Marktorganisation für landwirtschaftliche Erzeugnisse und zur Aufhebung der Verordnungen (EWG) Nr. 922/72, (EWG) Nr. 234/79, (EG) Nr. 1037/2001 und (EG) Nr. 1234/2007 des Rates.
16. Verordnung über einige zur menschlichen Ernährung bestimmte Zuckerarten (Zuckerartenverordnung) vom 23. Oktober 2003 (BGBl. I S. 2098), die zuletzt durch Artikel 8 der Verordnung vom 5. Juli 2017 (BGBl. I S. 2272) geändert worden ist.
17. Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission.
18. Bruijnzeel-Koomen C., Ortolani C., Aas K., Bindslev-Jensen C., Björkstén B., Moneret-Vautrin D., & Wüthrich B. (1995). Adverse reactions to food. *Allergy*, 50(8), 623-635.
19. Busch U. (2010). *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik: Grundlegende Methoden und Anwendungen*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
20. Schnadt S., & Pfaff S. (2012). *Fragen & Antworten Allergene*. Hamburg: B. Behr's Verlag.
21. APOTHEKEN Umschau. (2018). Lebensmittelallergien, <https://www.apotheken-umschau.de/Nahrungsmittelallergie>, Zugriff am 26.10.2019.
22. Johansen P., Senti G., Martínez Gómez J. M., Wüthrich B., Bot A., & Kündig T. M. (2005). Heat denaturation, a simple method to improve the immunotherapeutic potential of allergens. *European journal of immunology*, 35(12), 3591-3598.
23. Magi M., Garcia L., Vandenbranden M., Palmantier R., & Jacquet A. (2004). Heat denaturation affects the ProDer p 1 IgE reactivity and downregulates the development of the specific allergic response. *Journal of allergy and clinical immunology*, 114(3), 545-552.
24. Soziales Bundesministerium für Arbeit, Gesundheit und Konsumentenschutz (BMSGK) Öffentliches Gesundheitsportal Österreichs. (2018). Nahrungsmittelallergene IgE, <https://www.gesundheit.gv.at/labor/laborwerte/allergie/nahrungsmittelallergene-ige>, Zugriff am 13.08.2019.
25. Bundesministerium für Risikobewertung (BfR) Przyrembel C. (2007). Allergische und nicht-allergische Lebensmittelunverträglichkeiten, https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/allergische_und_nichtallergische_lebensmittelunvertraeglichkeiten.pdf, Zugriff am 13.08.2019.

26. Bundesverband der Lebensmittelchemiker/-innen im öffentlichen Dienst e.V. (BLC). (2015). Allergenkennzeichnung bei Lebensmitteln – Sind Allergiker ausreichend geschützt?, <https://www.lebensmittel.org/blc/monatsartikel/524-monatsartikel48.html>, Zugriff am 03.10.2019.
27. World Health Organization and International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS). (2019). Allergen Nomenclature, <http://www.allergen.org/>, Zugriff am 17.05.2019.
28. Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.
29. Benito C., González-Mancebo E., Díaz de Durana M. D. A., Tolón R. M., & Fernández-Rivas M. (2007). Identification of a 7S globulin as a novel coconut allergen. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 98(6), 580-584.
30. Carr H. J., Plumb G. W., Parker M. L., & Lambert N. (1990). Characterisation and crystallisation of an 11S seed storage globulin from coconut (*Cocos nucifera*). *Food chemistry*, 38(1), 11-20.
31. Garcia R. N., Arocena R. V., Laurena A. C., & Tecson-Mendoza E. M. (2005). 11S and 7S globulins of coconut (*Cocos nucifera* L.): purification and characterization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(5), 1734-1739.
32. Anagnostou K. (2017). Coconut allergy revisited. *Children*, 4(10), 85.
33. Food and Drug Administration (FDA)- Center for Food Safety and Applied Nutrition - Office of Nutrition Labeling, and Dietary Supplements. (2013). A Food Labeling Guide - Guidance for Industry.
34. Horn F. (2012). *Biochemie des Menschen - Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
35. Mülhardt C. (2006). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. München: Elsevier.
36. Alberts B., Johnson A., & Lewis J. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.
37. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). (2014). Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Untersuchung von Lebensmitteln: Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten in Lebensmitteln L 00.00-119:2014-02.
38. Analytik Jena AG. (2019). *PME Food DNA Extraction Kit*. Manual for beta testing, (03).
39. Nordheim A., & Knippers R. (2015). *Molekulare Genetik*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
40. Biotium Inc. (2019). Gelred® Nucleic Acid Gel Stain, <https://biotium.com/product/gelred-nucleic-acid-gel-stain/>, Zugriff am 22.08.2019.

41. ThermoFisher Scientific Inc. (2019). So funktionieren TaqMan Assays, <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>, Zugriff am 26.10.2019.
42. ThermoFisher Scientific Inc. (2019). Top Ten Pitfalls in Quantitative Real-time PCR Primer Probe Design and Use, <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/ambion-tech-support/rtpcr-analysis/general-articles/top-ten-pitfalls-in-quantitative-real-time-pcr-primer.html>, Zugriff am 12.10.2019.
43. Dettmer K., Aronov P. A., & Hammock B. D. (2007). Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Mass Spectrom Rev*, 26(1), 51-78.
44. Beecher C. W. W. (2003). The human metabolome *Metabolic profiling: Its role in biomarker discovery and gene function analysis* (pp. 311-319): Springer.
45. Weckwerth W., Wenzel K., & Fiehn O. (2004). Process for the integrated extraction, identification and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. *Proteomics*, 4(1), 78-83.
46. Esslinger S., Riedl J., & Fauhl-Hassek C. (2014). Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control. *Food Research International*, 60, 189-204.
47. Cubero-Leon E., Peñalver R., & Maquet A. (2014). Review on metabolomics for food authentication. *Food Research International*, 60, 95-107.
48. Vernocchi P., Vannini L., Gottardi D., Del Chierico F., Serrazanetti D. I., Ndagijimana M., & Guerzoni M. E. (2012). Integration of datasets from different analytical techniques to assess the impact of nutrition on human metabolome. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2.
49. Kaltenböck K. (2008). *Chromatographie für Einsteiger*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag.
50. Otto M. (2011). *Analytische Chemie*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
51. Schwedt G., & Vogt C. (2010). *Analytische Trennmethode*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag.
52. Lambert J. B., Gronert S., Shurvell H. F., & Lightner D. A. (2012). *Spektroskopie - Strukturaufklärung in der Organischen Chemie*. München: Pearson.
53. Gross J. H. (2013). *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
54. Waters Corp. (2018). *Waters Vion IMS QToF*. Übersicht und Wartungsanleitung.
55. Massart D. L., & Heyden Y. V. (2004). From tables to visuals: principal component analysis, part 1. *LC•GC Europe*, 17(11), 586-591.
56. Qi X., Chen X., & Wang Y. (2015). *Plant Metabolomics - Methods and Applications*. Dordrecht, Heidelberg, New York, London: Springer.

57. Massart D. L., & Heyden Y. V. (2005). From tables to visuals: principal component analysis, part 2. *LC•GC Europe*, 18(2), 84-89.
58. Raem A. M., & Rauch P. (2007). *Immunoassays*. München: Elsevier.
59. Hess D. (2004). *Allgemeine Botanik*. Stuttgart: UTB, Eugen Ulmer Verlag.
60. Winkler F. J., & Schmidt H.-L. (1980). Einsatzmöglichkeiten der ¹³C-Isotopen-Massenspektrometrie in der Lebensmitteluntersuchung = Scope of the application of ¹³C isotope mass spectrometry in food analysis. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 171(2), 85-94.
61. Galan A. M. G., Brohée M., de Andrade Silva E., van Hengel A. J., & Chassaing H. (2011). Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of soya and lupin mitochondrial DNA as markers for the presence of allergens in processed food. *Food chemistry*, 127(2), 834-841.
62. Demmel A., Hupfer C., Hampe E. I., Busch U., & Engel K.-H. (2008). Development of a real-time PCR for the detection of lupine DNA (*Lupinus* species) in foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(12), 4328-4332.
63. Houhoula D., Koussissis S., Lougovois V., Tsaknis J., Kassavita D., Papatheodorou S., Akkermans S., van Impe J., & Tsakali E. (2018). Detection of peanut allergen traces with a Real Time PCR assay-the challenge to protect food-allergic consumers. *Journal of Food Research*, 7(1), 32-37.
64. Houhoula D., Papatheodorou S. A., Moschou D., Pappa S., Tsaatazoglou N., Koussissis S., Tsaknis J., Lougovois V., van Impe J., & Tsakali E. (2019). Evaluation of a Real Time PCR Assay and a ELISA Method for the Detection of Walnuts and Almonds Allergen Traces in Food Products. *Journal of Food Research*, 8(3), 71-76.
65. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). (2001). Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Untersuchung von Lebensmitteln: Screeningverfahren zum Nachweis gentechnisch veränderter DNA-Sequenzen in Lebensmitteln durch den Nachweis von DNA-Sequenzen, die häufig in gentechnisch veränderten Organismen vorkommen L 00.00-31:2001-07.
66. Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im Deutschen Institut für Normung (DIN) e. V. *DIN EN ISO 21571 Lebensmittel – Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Nukleinsäureextraktion* Berlin: Beuth Verlag.
67. Analytik Jena AG. (2017). *innuMIX qPCR MasterMix Probe*. Instructions for Use.
68. Allmann M., Candrian U., Höfelein C., & Lüthy J. (1993). Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food Detection of wheat contamination in non-wheat food products. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 196(3), 248-251.

69. Zeltner D., Glomb M. A., & Maede D. (2009). Real-time PCR systems for the detection of the gluten-containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat. *European Food Research and Technology*, 228(3), 321-330.
70. Wrage J., Kleyner O., Rohn S., & Kuballa J. (2020). Development of a DNA-based detection method for *cocos nucifera* using TaqMan™ real-time PCR. *Foods*, 9(3), 332.
71. Mizioroko H. M. (2000). Phosphoribulokinase: current perspectives on the structure/function basis for regulation and catalysis. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 74, 95-127.
72. Baker W. J., Norup M. V., Clarkson J. J., Couvreur T. L. P., Dowe J. L., Lewis C. E., Pintaud J.-C., Savolainen V., Wilmot T., & Chase M. W. (2011). Phylogenetic relationships among arecoid palms (*Areaceae: Arecoideae*). *Annals of botany*, 108(8), 1417-1432.
73. Gunn B. F. (2004). The phylogeny of the Cocoeae (*Areaceae*) with emphasis on *Cocos nucifera*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 91(3), 505-522.
74. Porter C. H., & Collins F. H. (1991). Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: *Culicidae*). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 45(2), 271-279.
75. Schultz J., Müller T., Achtziger M., Seibel P. N., Dandekar T., & Wolf M. (2006). The internal transcribed spacer 2 database - a web server for (not only) low level phylogenetic analyses. *Nucleic acids research*, 34(2), 704-707.
76. Yao H., Song J., Liu C., Luo K., Han J., Li Y., Pang X., Xu H., Zhu Y., Xiao P., & Chen S. (2010). Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PloS one*, 5(10), 1-9.
77. Ju J., Ruan C., Fuller C. W., Glazer A. N., & Mathies R. A. (1995). Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4347-4351.
78. Livak K. J., Flood S. J. A., Marmaro J., Giusti W., & Deetz K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Research*, 4(6), 357-362.
79. Biosearch Technologies Inc. (2000). Black Hole Quencher® Dyes. <https://www.biosearchtech.com/support/education/fluorophores-and-quenchers/black-hole-quencher-dyes>, Zugriff am 16.05.2019.
80. Johansson M. K., & Cook R. M. (2003). Intramolecular dimers: a new design strategy for fluorescence-quenched probes. *Chemistry—A European Journal*, 9(15), 3466-3471.
81. García A., Madrid R., García T., Martín R., & González I. (2017). Detection of food allergens by Taqman real-time PCR methodology Lin, J., & Alcocer, M., (Eds.), *Food Allergens: Methods and Protocols* (pp. 95-108). New York: Springer.

-
82. Atputharajah J. D., Widanapathirana S., & Samarajeewa U. (1986). Microbiology and biochemistry of natural fermentation of coconut palm sap. *Food Microbiology*, 3(4), 273-280.
 83. Stephan O., & Vieths S. (2004). Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(12), 3754-3760
 84. Rohman A., Che Man YB., & Yusof F. M. (2014). The use of FTIR spectroscopy and chemometrics for rapid authentication of extra virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(2), 207-213.
 85. Sciarrone D., Schepis A., Zoccali M., Donato P., Vita F., Creti D., Alpi A., & Mondello L. (2018). Multidimensional gas chromatography coupled to combustion-isotope ratio mass spectrometry/quadrupole MS with a low-bleed ionic liquid secondary column for the authentication of truffles and products containing truffle. *Analytical chemistry*, 90(11), 6610-6617.
 86. Tosun M. (2013). Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio analysis method. *Food chemistry*, 138(2-3), 1629-1632.
 87. Richter B., Gurk S., Wagner D., Bockmayr M., & Fischer M. (2019). Food authentication: Multi-elemental analysis of white asparagus for provenance discrimination. *Food chemistry*, 286, 475-482.
 88. Díaz R., Pozo O. J., Sancho J. V., & Hernández F. (2014). Metabolomic approaches for orange origin discrimination by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food chemistry*, 157, 84-93.
 89. Rubert J., Lacina O., Fauhl-Hassek C., & Hajslova J. (2014). Metabolic fingerprinting based on high-resolution tandem mass spectrometry: a reliable tool for wine authentication? *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(27), 6791-6803.
 90. Kaltenbrunner M., Hochegger R., & Cichna-Markl M. (2018). Development and validation of a fallow deer (*Dama dama*)-specific TaqMan real-time PCR assay for the detection of food adulteration. *Food chemistry*, 243, 82-90.
 91. Guo L., Ya M., Hai X., Guo Y.-S., Li C.-D., Xu W.-L., Liao C.-S., Feng W., & Cai Q. (2019). A simultaneous triplex TaqMan real-time PCR approach for authentication of caprine and bovine meat, milk and cheese. *International Dairy Journal*, 95, 58-64.
 92. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL). (2018). Stabilisotopenanalytik, https://www.lgl.bayern.de/lebensmittel/kennzeichnung/echtheit_herkunft/stabilisotope_nanalytik.htm, Zugriff am 12.10.2019.

93. Klockmann S., Reiner E., Bachmann R., Hackl T., & Fischer M. (2016). Food fingerprinting: metabolomic approaches for geographical origin discrimination of hazelnuts (*Corylus avellana*) by UPLC-QTOF-MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(48), 9253-9262.
94. Claassen C., Kuballa J., & Rohn S. (2019). Metabolomics-Based Approach for the Discrimination of Potato Varieties (*Solanum tuberosum*) using UPLC-IMS-QToF. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(19), 5700-5709.
95. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). (2012). Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Untersuchung von Lebensmitteln: Präparation von DNA aus nativer Maisstärke L 16.04.03-1:2012-07
96. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). (2010). Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, Untersuchung von Lebensmitteln: Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz aus Haselnuss (*Corylus avellana*) in Schokolade mittels Real-time PCR L 44.00-8:2010-01.
97. Sovová T., Křížová B., & Ovesná J. (2018). Determining the optimal method for DNA isolation from fruit jams. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(2), 126-132.
98. Scheibler C. (1872). Ueber die Löslichkeit des Rohrzuckers in Alkohol und Wasser bei verschiedenen Temperaturen. *Polytechnische Journal, Band 205*(Miszelle 10), 276-277.
99. Qiagen GmbH. (2018). *DNeasy® Plant*. Handbook.
100. Bligh E. G., & Dyer W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.
101. Vorkas P. A., Isaac G., Anwar M. A., Davies A. H., Want E. J., Nicholson J. K., & Holmes E. (2015). Untargeted UPLC-MS profiling pipeline to expand tissue metabolome coverage: application to cardiovascular disease. *Analytical chemistry*, 87(8), 4184-4193.
102. Hoffmann H., Mauch W., & Untze W. (1985). *Zucker und Zuckerwaren*. Berlin, Hamburg: Paul Parey Verlag.
103. Reformhaus Mohring. (2019). Vitasan Zuckerrohr Melasse, <https://www.naturpaket.de/vitasan-melasse.html>, Zugriff am 05.10.2019.
104. Jaffé W. (2012). *Non-centrifugal sugar: world production and trade*. Panela Monitor.
105. Jaffé W. R. (2015). Nutritional and functional components of non centrifugal cane sugar: A compilation of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 43, 194-202.
106. Wrage J., Burmester S., Kuballa J., & Rohn S. (2019). Coconut sugar (*Cocos nucifera* L.): Production process, chemical characterization, and sensory properties. *LWT - Food Science and Technology*, 112.
107. Schmid K. H., Meffert A., Schenker G., & Asbeck A. (1990). *Process for controlling foam in food processing and production*, Patent Number 4.942.049. U. S. Patent Documents.

108. Souci S., Fachmann W., & Kraut H. (2011). *Lebensmitteltabelle für die Praxis*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
109. Manaf M. A., Man Y. B. C., Hamid N. S. A., Ismail A., & Abidin S. Z. (2007). Analysis of adulteration of virgin coconut oil by palm kernel olein using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Lipids*, 14(2), 111-121.
110. Rohman A., & Man Y. B. C. (2011). The use of Fourier transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy for detection and quantification of adulteration in virgin coconut oil. *Food chemistry*, 129(2), 583-588.
111. Raj V., Swapna M. S., & Sankararaman S. (2018). Nondestructive radiative evaluation of adulteration in coconut oil. *The European Physical Journal Plus*, 133(12), 544
112. Borse B. B., Rao L. J. M., Ramalakshmi K., & Raghavan B. (2007). Chemical composition of volatiles from coconut sap (neera) and effect of processing. *Food chemistry*, 101(3), 877-880.
113. Apriyantono A., Aristyani A., Lidya Y., Budiyo S., Soekarto S. T. (2002). *Rate of browning reaction during preparation of coconut and palm sugar*. Paper presented at the International Congress Series.
114. Purnomo H. (1992). Sugar components of coconut sugar in Indonesia. *ASEAN Food Journal*, 7(4), 200-201.
115. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). (2015). Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Untersuchung von Lebensmitteln: Sensorische Prüfverfahren - Einfach beschreibende Prüfung L 00.90-6:2015-06.
116. Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im Deutschen Institut für Normung (DIN) e. V. (2014). *DIN 10964 Sensorische Prüfverfahren - Einfach beschreibende Prüfung*. Berlin: Beuth Verlag.
117. Codex Alimentarius Commission (CAC). Standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. Codex Stand 118-1979. Adopted in 1979, Amendment in 1983 and 2015, Revision in 2008.
118. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) INTERNATIONAL. (2012). Official Methods of Analysis: Gliadin as a Measure of Gluten in Rice- and Corn-Based Foods, <http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=49873>, Zugriff am 09.10.2019.
119. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). (1981). Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren § 35 LMBG, Untersuchung von Lebensmitteln: Analysemethoden für die Bestimmung der Zusammensetzung einiger für die menschliche Ernährung bestimmter Zuckerarten L 39.00-1:1981-04.

120. Verordnung (EG) Nr. 1214/2007 der Kommission vom 20. September 2007 zur Änderung von Anhang I der Verordnung (EWG) Nr. 2658/87 des Rates über die zolltarifliche und statistische Nomenklatur sowie den Gemeinsamen Zolltarif.
121. Statistisches Bundesamt. (2018). *Warenverzeichnis für die Aussenhandelsstatistik Kapitel 17 - Zucker und Zuckerwaren*.
122. Durchführungsverordnung (EU) Nr. 974/2014 der Kommission vom 11. September 2014 zur Festlegung der Refraktometermethode zur Bestimmung des löslichen trockenen Rückstands in Verarbeitungserzeugnissen aus Obst und Gemüse zwecks Einreihung dieser Waren in die Kombinierte Nomenklatur.
123. Moore J. C., Spink J., & Lipp M. (2012). Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science*, 77(4), R118-R126.

Lebenslauf

Staatlich geprüfte Lebensmittelchemikerin
mit Diplom

Name: Jasmin Wrage
Geburtsdatum: 02. Januar 1991
Geburtsort: Wedel (Holstein)



Werdegang

- 09/2019 – 04/2020 Ausbildung zur staatlich geprüften Lebensmittelchemikerin am Institut für Hygiene und Umwelt in Hamburg
- 05/2016 – 08/2019 Promotion bei der GALAB Laboratories GmbH unter wissenschaftlicher Betreuung von Prof. Dr. Rohn des Instituts für Lebensmittelchemie der Universität Hamburg zum Thema:
"Entwicklung von Methoden zum Nachweis von Cocos nucifera im Hinblick auf Kokosnussallergien sowie im Kontext der Echtheitsprüfung von Kokosblütenzucker"
- 10/2011 – 03/2016 Lebensmittelchemiestudium an der Universität Hamburg mit 1. Staatsexamen und Diplom zum Thema:
"Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Metabolit-Zusammensetzung von Spargel und Haselnüssen zur Authentizitätsbestimmung mittels LC-MS-basierten non-targeted Methoden"
- 06/2010 Abitur am Johann-Rist-Gymnasium Wedel

Publikationen

Paper und Artikel

Wrage J., Kleyner O., Rohn S., Kuballa J.,
Development of a DNA-Based Detection Method for *Cocos nucifera* Using TaqMan™ Real-Time PCR,
Foods, 9, 332, 2020.

Wrage J., Burmester (geb. Uthmann) S., Kuballa J., Rohn S.,
Coconut sugar (*Cocos nucifera* L.): Production process, chemical characterization, and sensory properties,
LWT – Food Science and Technology, 112, 2019.

Wrage J.,
“FOODOMICS“-Differenzierung von Apfelsorten anhand des metabolischen Fingerabdrucks,
Mitteilungen des Obstbauversuchsrings des Alten Landes e.V., 72, 03, 2017.

Wrage J.,
“FOODOMICS“-Bestimmung der geographischen Herkunft, Sorte und Anbauweise von Äpfeln,
Mitteilungen des Obstbauversuchsrings des Alten Landes e.V., 71, 10, 2016.

Poster

Creydt M., Hudzik D., Arndt M., **Wrage J.**, Fischer M.,
Herkunftsbestimmung von weißem Spargel mittels massenspektrometrischer Methoden,
47. Deutscher Lebensmittelchemikertag,
Berlin, 17.-19.09.2018.

Wrage J., Burmester (geb. Uthmann) S., Kuballa J., Rohn S.,
Authenticity assessment of coconut sugar using UPLC-QToF-MS and organoleptic properties,
40. International Conference on Environmental Analytical Chemistry and Food Monitoring,
Santiago de Compostela, 19.-22.06.2018.

Creydt M., Hudzik D., Arndt M., **Wrage J.**, Fischer M.,
Metabolomics-basierte Herkunftsbestimmung von Lebensmitteln,
46. Deutscher Lebensmittelchemikertag,
Würzburg, 25.-27.09.2017.

Claassen C., **Wrage J.**, Rohn S., Kuballa J.,
Discrimination of apple and potato cultivars by non-targeted metabolomic fingerprinting via
UPLC-IMS-QToF analysis,
50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie,
Kiel, 05.-08.03.2017.

Wrage J., Claassen C., Rohn S., Kuballa J.,
Discrimination of apple and potato cultivars by non-targeted metabolomic fingerprinting via
UPLC-IMS-QToF analysis,
Regionalverbandstagung Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft,
Hamburg, 27.-28.02.2017.

Lütjohann J., Claassen C., **Wrage J.**, Bauer A., Kuballa J.,
Establishment of methods for food authenticity detection by non-targeted metabolomic
profiling analysis by UPLC-IMS-HR-Q-ToF MS,
Max Rubner Conference,
Karlsruhe, 10.-12.10.2016.

Creydt M., Arndt M., **Wrage J.**, Cain N., Fischer M.,
Metabolic Profiling von weißem Spargel für die Unterscheidung der geographischen Herkunft
mittels hochauflösender Massenspektrometrie,
45. Deutscher Lebensmittelchemikertag,
Freising, 12.-14.09.2016.

Creydt M., Arndt M., **Wrage J.**, Fischer M.,
Metabolic Profiling of Asparagus officinalis for Discrimination of the Geographical Origin based
on Ultra-High-Resolution Mass Spectrometry,
39. International Conference on Environmental Analytical Chemistry and Food Monitoring,
Hamburg, 19.-22.07.2016.

Creydt M., **Wrage J.**, Klare J., Hackl T., Fischer M.,
Metabolic Profiling von weißem Spargel zur Herkunftsbestimmung mittels UPLC-ESI-QTOF-
MS/MS,
Regionalverbandstagung Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft,
Braunschweig, 04.05.05.2016.

Creydt M., **Wrage J.**, Klare J., Hackl T., Fischer M.,
Metabolic Profiling of Asparagus officinalis for Discrimination of the Geographical Origin based
on Ultra-High-Resolution Mass Spectrometry,
49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie,
Hamburg, 28.02.-02.03.2016.

Vorträge

Wrage J., Burmester (geb. Uthmann) S., Kleyner O.,
Authentizitätsbestimmung von Kokosblütenzucker,
Runder Tisch Kokosblütenzucker,
Hamburg, 12.06.2019.

Kuballa J., **Wrage J.**, Claassen C., Lütjohann J.,
Non-Targeted Metabolom-Analyse mittels hochauflösender Massenspektrometrie zur Bestim-
mung der Authentizität von Lebensmitteln (FOODOMICS),
BLE – Innovationstage 2018,
Bonn, 23.-24.10.2018.

Kuballa J., Lütjohann J., **Wrage J.**, Claassen C.,
Lebensmittelbetrug aus Sicht des Handels,
2. Kongress Lebensmittelsicherheit des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebens-
mittelsicherheit,
Erlangen, 18.-19.10.2016.

Lütjohann J., **Wrage J.**, Claassen C., Kuballa J.,
FOODOMICS: Bestimmung der Lebensmittelechtheit mit hochauflösender Massenspektro-
metrie,
foodRegio – Qualität und Zertifizierung,
Hamburg, 20.09.2016.

Kuballa J., Lütjohann J., **Wrage J.**, Claassen C.,
FOODOMICS: Neue Trends der metabolischen Fingerprintanalyse von Lebensmitteln,
45. Deutscher Lebensmittelchemikertag,
Freising, 12.-14.09.2016.

Kuballa J., Lütjohann J., **Wrage J.**, Claassen C.,
Food Metabolomics,
39. International Conference on Environmental Analytical Chemistry and Food Monitoring,
Hamburg, 19.-22.07.2016.