

## Sortenbestimmung von Haselnüssen mittels Next-Generation-Sequenzierungstechnologien und bioinformatischer Auswertung

<b>Koordinierung:</b>	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn
<b>Forschungsstelle I:</b>	Universität Hamburg Hamburg School of Food Science Institut für Lebensmittelchemie Arbeitskreis Prof. Dr. Markus Fischer Prof. Dr. Markus Fischer/Christina Lang
<b>Forschungsstelle II:</b>	Universität Tübingen Lehrstuhl für Angewandte Bioinformatik Prof. Dr. Oliver Kohlbacher
<b>Industriegruppen:</b>	Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e.V. (BDSi), Bonn Nucis e.V. Deutschland, Hamburg
	Projektkoordinator: Dr. Ilka Haase, Eurofins Medigenomix GmbH, Ebersberg
<b>Laufzeit:</b>	2015 - 2019
<b>Zuwendungssumme:</b>	€ 476.540,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI)

### Ausgangssituation:

Haselnüsse sind für die deutsche Lebensmittelwirtschaft ein wichtiger Rohstoff. Deutschland zählt weltweit zu den größten Importeuren von Haselnuss, das Importvolumen umfasst einen Wert von ca. 1,2 Mrd. €. Für die Industrie sind dabei zwei verschiedene Haselnussarten von Bedeutung, die Gemeine Hasel (*Corylus avellana*) und die Lambertshasel (*Corylus maxima*). Botanisch gesehen ist die Haselnuss die Frucht des Haselnussstrauchs. Die Haselnuss wird vor allem in den Ländern rund um den 45. Breitengrad angebaut. In Europa wird sie im Mittelmeerraum in Italien und Spanien, aber auch in Frankreich kultiviert, zudem in der Schwarzmeerregion der Türkei sowie dem Kaukasus. 2017 betrug die Weltproduktion über eine Million Tonnen. Hauptanbau land ist die Türkei mit 675.000 t im Jahr 2017.

Nach der Ernte werden die Haselnüsse zunächst getrocknet. Dabei wird der Feuchtigkeitsgehalt auf 4-6 % reduziert und damit

die Lagerbeständigkeit erhöht. Etwa 90 % der weltweiten Ernte wird geschält und in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Weiterverarbeitet werden Haselnüsse überwiegend in der Süßwarenindustrie in Schokoladenprodukten, Pralinen, Keksen, Süßigkeiten, Feingebäck und Eiscreme. Hierbei kommt der Schokoladenindustrie bei weitem die größte Bedeutung zu, da hier Schätzungen zufolge 85 % der Haselnüsse weiterverarbeitet werden.

Von den weltweit rund 400 bekannten Sorten sind lediglich 20 für die Wirtschaft von Bedeutung. Sortenunterschiede liegen hierbei u.a. in den ökologischen Ansprüchen, Krankheitsresistenzen, Verwendungsmöglichkeiten, Aromaprofilen und den Erträgen. Bevorzugte Sorten der Süßwarenindustrie sind z.B. die Tonda Gentile Romana, welche sich durch ein besonderes Aromaprofil (u.a. grün, fruchtig, erdig, Popcorn-ähnlich, Kaffee-ähnlich sowie fettig) auszeichnet oder die Tonda Gentile Trilobata, welche sich

sehr gut für die großtechnische industrielle Röstung eignet. Häufig korrelieren Sorten mit den entsprechenden Herkunftsländern. Dies ist vor allem in den östlichen Anbaugebieten der Fall.

Bisher sind keine Methoden in der Routineanalytik etabliert, anhand derer die Herkunfts- oder Sortenbestimmung von Haselnüssen erfolgt. Auch Angaben zu geschützten geografischen Angaben (g.g.A.) oder geschützten Ursprungsbezeichnungen (g.U.) können bisher nur aufgrund der Dokumentationspflicht anhand der Frachtpapiere überprüft werden.

Angesichts der Tatsache, dass die Anbauflächen nicht mit dem Volumen der gehandelten Haselnüsse korrelieren, ist zu vermuten, dass ein nicht geringer Teil der Ware zum Schaden der verarbeitenden Industrie falsch deklariert ist oder mit minderwertiger Rohware gestreckt wird. Die Verwendung von Surrogaten, also nicht-authentischer Ware, ohne die gewünschten technofunktionellen oder molekularen Eigenschaften kann jedoch die Produkte negativ beeinflussen und erhebliche wirtschaftliche Schäden verursachen.

Ziel des Forschungsvorhabens war es daher, mit Hilfe des genetischen Fingerabdrucks und den davon abgeleiteten molekularbiologischen Bestimmungsmethoden einen Beitrag zur Qualitätssicherung zu leisten und eine Sortenbestimmung für Haselnüsse zu ermöglichen. Hierfür sollten zunächst die Chloroplastengenome verschiedener Sorten sequenziert und auf Sequenzunterschiede hin untersucht werden. Anschließend sollten auf Basis identifizierter Einzelbasenaustausche oder Inserts (= eingefügte DNA-Sequenz) targeted-Methoden entwickelt werden. Zudem sollten auch variable Bereiche des Kerngenoms auf Unterschiede untersucht werden. Des Weiteren sollten non-targeted-Methoden in die Analyse einbezogen werden, um ein möglichst breites Spektrum an Methoden für die Sortendifferenzierung heranziehen zu können.

#### Forschungsergebnis:

Im Laufe des Projektes wurden sowohl non-targeted- als auch targeted-Ansätze für die Sortendifferenzierung von Haselnüssen herangezogen. Zu Beginn wurden parallel zu den Sequenzierungsarbeiten zwei non-

targeted-Methoden etabliert. Zunächst erfolgte die RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA). Hierbei ist mit lediglich sechs Primern eine Differenzierung von neun verschiedenen Haselnussorten anhand von identifizierten Unterschieden innerhalb der generierten Bandenmuster (fingerprints) möglich. Als zweite Methode wurde die Mikrosatelliten-Analyse (SSR = simple sequence repeats) herangezogen. Über diesen Ansatz können 13 Haselnussorten durch die Analyse von 13 Primerpaaren differenziert werden. Da eine parallele Analyse von zwei Primerpaaren möglich ist, kann die benötigte Analysenzeit um die Hälfte reduziert werden.

Für die Entwicklung einer targeted-Methode sollten Sequenzunterschiede identifiziert werden. Hierfür wurden verschiedene variable Bereiche auf dem Kerngenom analysiert. Zum einen wurden die ITS-Bereiche (internal transcribed spacer), welche i.d.R. für die Artendifferenzierung herangezogen werden, und zum anderen die WRKY-Gene, welche variable Introns enthalten, untersucht. Hierbei konnten jedoch keine Sequenzunterschiede identifiziert werden. Hauptaugenmerk lag auf dem Chloroplastengenom. Dieses wurde von 13 verschiedenen Proben und darunter 12 unterschiedlichen Haselnussorten sequenziert und auf Sequenzunterschiede hin untersucht. Es konnten zwei Inserts mit einer Länge von je ca. 100 bp sowie sechs SNPs (single nucleotide polymorphism = Einzelbasenaustausch) identifiziert und validiert werden. Auf Basis dieser Ergebnisse können 20 Haselnussorten aus sieben Ländern in drei Gruppen unterteilt werden.

Eine Gruppe bilden die georgischen Haselnussproben. Die zweite Gruppe besteht aus den europäischen Haselnüssen sowie der türkischen Sorte Çakıldak. Die dritte Gruppe wird aus allen anderen türkischen Proben und den aserbajdschanischen Haselnüssen gebildet. Zwei türkische Sorten (Tombul und Karayağlı), welche sich in ihren morphologischen Merkmalen äußerst stark ähneln und nur sehr schwer zu differenzieren sind, konnten bisher nicht eindeutig zugeordnet werden. Auf Basis eines Inserts wurde eine Methode mittels Kapillargelelektrophorese (CGE) für die Untersuchung von Mischungen entwickelt. Damit können Mischungen von europäischen Proben inklusive der Sorte

Çakildak und nicht-europäischen Proben bis zu einer Beimengung von 5 % quantifiziert werden. Die Identifizierung ist bereits mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Agarsegelelektrophorese (AGE) möglich. Auf der Basis eines SNPs innerhalb eines Inserts wurde eine Hochauflösende Schmelzpunktanalyse (HRMA) entwickelt. Damit können Haselnüsse aus Georgien von allen anderen untersuchten Sorten unterschieden werden.

#### **Wirtschaftliche Bedeutung:**

Die Haselnuss ist ein für die deutsche Lebensmittelindustrie wirtschaftlich sehr relevantes Importgut. Deutschland ist vor Frankreich und Italien der führende Importeur von Haselnüssen. Im Jahr 2016 wurden knapp 62.000 t Haselnüsse mit einem Wert von rd. 490 Mio. € importiert. Die Preise auf dem Weltmarkt sind sehr stark abhängig von dem jeweiligen Herkunftsland. So liegt der Preis für türkische Haselnüsse bei 2.370 €/Tonne und bei georgischen Haselnüssen nur bei 1.041 €/Tonne. Im Vergleich dazu kosten italienische Haselnüsse 2.802 €/Tonne. Dieser Aspekt kann die Motivation zur Streckung teurer Ware durch günstigere Rohstoffe erhöhen. Daher ist das identifizierte Insert ein wichtiger Marker für die Identifizierung von Vermischungen, z.B. italienischer und georgischer Haselnüsse. Zudem können diese auch mittels CGE quantifiziert werden. Ein weiterer Punkt, weshalb die Methodenentwicklung für den Nachweis der Sorte bzw. Herkunft wirtschaftlich relevant ist, sind Auslobungen bzgl. der geschützten geographischen Herkunftsangaben. In der Datenbank der EU sind zwei g.U. und drei g.g.A. eingetragen. Hierbei spielen die Anbauggebiete, aber auch die Sorte eine entscheidende Rolle. So ist die g.g.A. Nocciola di Giffoni der Sorte Tonda di Giffoni und die g.g.A. Nocciola del Piemonte bzw. Nocciola Piemonte der Sorte Tonda Gentile Trilobata vorbehalten. Hier können die entwickelten non-targeted-Methoden (RAPD-PCR und SSR-Analyse) für eine Authentizitätsbestimmung eingesetzt werden.

Bisher kann die Herkunft und Sorte von Haselnüssen nur anhand der Frachtpapiere überprüft werden. In der Routineanalytik existieren keine etablierten Methoden für die Sortendifferenzierung. Die Streckung von

Haselnüssen oder Haselnusspasten mit anderen Nüssen, können bereits nachgewiesen werden, wie es z.B. im Rahmen der von Interpol und Europol koordinierten Operation OPSON VI der Fall war. Eine Streckung hochwertiger Nüsse oder Rohstoffe durch minderwertige Ware der gleichen Art kann bisher nicht nachgewiesen werden. Es können lediglich morphologische Unterschiede herangezogen werden. Diese stellen jedoch keinen verlässlichen und beweissicheren Marker dar. Daher können die erzielten Ergebnisse einen essentiellen Beitrag zur Qualitätssicherung sowohl durch die verarbeitende Industrie, als auch Dienstleistern (Handelslaboratorien) leisten. Der Handel kann vor finanziellen Schäden geschützt werden, da falsch deklarierte minderwertige Ware identifiziert werden kann. Des Weiteren können die Ergebnisse dazu beitragen, die Erwartung der Verbraucher durch eine gleichbleibend hohe Qualität bzgl. Aroma und Geschmack der Produkte zu erfüllen. Dies schützt Handel wie Produzenten vor Imageschäden und weiteren möglichen finanziellen Verlusten.

#### **Publikationen (Auswahl):**

1. FEI-Schlussbericht 2019.
2. Felbinger, C., Schelm, S. & Fischer, M.: Food Fraud – Hindernisse und Lösungswege bei der Authentizitätsbestimmung von Lebensmitteln. J. Verbr. Lebensm. 10 (S1), 25-30 (2015).

#### **Weiteres Informationsmaterial:**

Universität Hamburg  
Hamburg School of Food Science  
Institut für Lebensmittelchemie  
Arbeitskreis Prof. Dr. Markus Fischer  
Grindelallee 117, 20146 Hamburg  
Tel.: +49 40 42838-4359  
Fax: +49 40 42838-4342  
E-Mail: markus.fischer@chemie.uni-hamburg.de

Universität Tübingen  
Lehrstuhl für Angewandte Bioinformatik  
Sand 14, 72076 Tübingen  
Tel.: +49 7071 29-70456  
Fax: +49 7071 29-5152  
E-Mail: oliver.kohlbacher@uni-tuebingen.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)  
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn  
Tel.: +49 228 3079699-0  
Fax: +49 228 3079699-9  
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.