

**ENTWICKLUNG UND ANWENDUNG
MOLEKULARBIOLOGISCHER VERFAHREN
ZUM NACHWEIS VON KUHMITCH
IN ZIEGENMITCH UND -KÄSE**

CATHRIN SCHUCH

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde,
Professur für Milchwissenschaften
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. Ewald Usleber

**ENTWICKLUNG UND ANWENDUNG MOLEKULAR-
BIOLOGISCHER VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON
KUHMITLCH IN ZIEGENMITLCH UND -KÄSE**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

CATHRIN SCHUCH

Tierärztin aus Trier

Gießen 2006

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. E. Usleber
Prof. Dr. G. Reiner

Tag der Disputation: 20. Oktober 2006

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	2
2.1	Produktion und wirtschaftliche Bedeutung von Ziegenmilch und Ziegenkäse... 2	
2.1.1	Ziegenmilch und Erzeugnisse aus Ziegenmilch	3
2.2	Somatischer Zellgehalt in Kuh- und Ziegenmilch.....	4
2.3	Nachweisverfahren für Milchverfälschungen	5
2.3.1	Fettanalytische Methoden.....	5
2.3.2	Proteinanalytische Methoden	6
2.3.3	DNA-analytische Methoden	9
2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	10
2.5	Universelle Primer zur DNA-Differenzierung	10
2.5.1	<i>Cytochrom b</i> -Gen als Markersubstanz	11
2.5.2	Tierartennachweis mittels spezifischer Primer.....	13
2.6	Verfälschungen von Ziegenmilcherzeugnissen mit Kuhmilch.....	15
3	MATERIAL UND METHODEN	19
3.1	Material.....	19
3.1.1	Biochemika.....	19
3.1.2	Lösungen und Puffer	20
3.1.3	Geräte und Sonstiges	20
3.2	Probenmaterialien.....	21
3.2.1	Konsummilch	21
3.2.2	Käse	22
3.2.3	Artifizuell mit Kuhmilch gemischte Ziegenmilch bzw. mit Kuhmilch gemischter Ziegenkäse	22
3.3	Methoden.....	23
3.3.1	Präparation der DNA aus Milch und Käse	23
3.4	PCR-Methoden auf Basis universeller Oligonukleotidprimer zum Nachweis von mtDNA	26
3.4.1	Amplifizierung einer Sequenz des mt- <i>cytb</i> -Gens nach MEYER <i>et al.</i> (1995)..	26

3.4.2	Amplifizierung von Sequenzen des mt- <i>cytb</i> - sowie des mt-tRNA-Gens nach MAUDET und TABERLET (2001).....	29
3.4.3	Amplifizierung einer Sequenz des mt- <i>cytb</i> -Gens nach ZEHNER <i>et al.</i> (1998)	32
3.5	PCR-Methoden auf Basis speziesspezifischer Oligonukleotidprimer zum Nachweis boviner DNA	32
3.5.1	Amplifizierung eines für bovine DNA spezifischen Abschnitts des mitochondrialen Genoms nach MAUDET und TABERLET (2001).....	33
3.5.2	Amplifizierung eines für bovine DNA spezifischen Abschnitts des mitochondrialen Genoms nach HERMAN (2001).....	34
3.5.3	Amplifizierung eines für bovine DNA spezifischen Abschnitts des mitochondrialen Genoms nach BOTTERO <i>et al.</i> (2002).....	34
3.6	Etablierung eines Routineverfahrens zum Nachweis Kuh-spezifischer DNA in Ziegenmilcherzeugnissen	36
3.6.1	Überprüfung der Sensitivität der Standardmethode	36
3.6.2	Überprüfung der Spezifität der Standardmethode.....	36
3.6.3	Anwendung des entwickelten Standardverfahrens zum Nachweis von Kuhmilch in Erzeugnissen aus Ziegenmilch.....	37
3.7	Vergleichsuntersuchung mit einem enzymimmunologischen Testverfahren ...	37
3.8	Orientierende Untersuchungen zur Eignung des mt- <i>cytb</i> -Gens zum speziesspezifischen Nachweis der Milch verschiedener Tierarten	38
3.8.1	Amplifizierung eines Ziegen-spezifischen Abschnitts des mt- <i>cytb</i> -Gens.....	39
3.8.2	Amplifizierung eines Schaf-spezifischen Abschnitts des mt- <i>cytb</i> -Gens.....	39
3.8.3	Amplifizierung eines Büffel-spezifischen Abschnitts des mt- <i>cytb</i> -Gens	40
3.8.4	Amplifizierung eines Kamel-spezifischen Abschnitts des mt- <i>cytb</i> -Gens	41
3.8.5	Amplifizierung eines Pferde-spezifischen Abschnitts des mt- <i>cytb</i> -Gens	41
4	ERGEBNISSE	42
4.1	DNA-Extraktion.....	42
4.2	PCR-Methoden auf Basis universeller Oligonukleotidprimer	43
4.2.1	Amplifizierung eines DNA-Abschnitts des mt- <i>cytb</i> -Gens nach MEYER <i>et al.</i> (1995)	43
4.2.2	Restriktionsverdau des mt- <i>cytb</i> -Genamplikates nach der PCR beschrieben von MEYER <i>et al.</i> (1995)	44

4.2.3	Amplifizierung eines DNA-Abschnitts des mitochondrialen Gens nach MAUDET und TABERLET (2001).....	47
4.2.4	Amplifizierung eines DNA-Abschnitts des mitochondrialen Gens nach ZEHNER <i>et al.</i> (1998).....	49
4.3	PCR-Methoden auf Basis speziesspezifischer Oligonukleotidprimer zum Nachweis mitochondrialer DNA	49
4.3.1	Amplifizierung eines für bovine DNA spezifischen Abschnitts des mitochondrialen Genoms mit den Oligonukleotidprimern nach MAUDET und TABERLET (2001)	50
4.3.2	Amplifizierung eines für bovine DNA spezifischen DNA-Abschnitts des mitochondrialen Gens mit den Oligonukleotidprimer nach HERMAN (2001) ..	51
4.3.3	Amplifizierung eines für bovine DNA spezifischen DNA-Abschnitts des mitochondrialen Gens mit den Oligonukleotidprimer nach BOTTERO <i>et al.</i> (2002)	52
4.4	Routineverfahren zum Nachweis boviner DNA in Ziegenmilcherzeugnissen mit der Methode nach BOTTERO <i>et al.</i> (2002).....	53
4.4.1	Sensitivität der Standardmethode	54
4.4.2	Spezifität der Standardmethode.....	57
4.5	Anwendung der Standardmethode zum Nachweis einer Verfälschung von Ziegenmilcherzeugnissen mit Kuhmilch.....	59
4.6	Vergleichsuntersuchung eines Enzymimmuntests und der entwickelte PCR-Methode zum Nachweis von Kuhmilch in Ziegenmilch und in Ziegenkäse.....	61
4.7	Orientierende Untersuchungen zur Eignung des <i>cytb</i> -Gens als Markersequenz für den speziesspezifischen Nachweis verschiedener Tierarten in Milch und Käse	62
4.7.1	Nachweis von Ziegenmilch mittels eines speziesspezifischen Genabschnitts des <i>mt-cytb</i> -Gens	62
4.7.2	Nachweis von Schafmilch mittels eines speziesspezifischen Abschnitts des <i>mt-cytb</i> -Gens	63
4.7.3	Nachweis von Büffelmilch mittels eines speziesspezifischen Abschnitts des <i>mt-cytb</i> -Gens	64
4.7.4	Nachweis von Kamelmilch mittels eines speziesspezifischen Abschnitts des <i>mt-cytb</i> -Gens	65

4.7.5	Nachweis von Stutenmilch mittels eines speziesspezifischen Genabschnitts des mt-cytb-Gens.....	66
5	DISKUSSION	68
5.1	Probenvorbereitung und DNA-Extraktion	69
5.2	Untersuchung von Ziegenmilcherzeugnissen mittels universeller Polymerasekettenreaktion (PCR) und Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP).....	70
5.3	Untersuchung von Ziegenmilcherzeugnissen mittels PCR unter Verwendung speziesspezifischen Primer.....	74
5.4.	Validierung und Anwendung der Standardmethode unter Verwendung der Kuh-spezifischen Primer nach BOTTERO <i>et al.</i> (2002)	76
5.5	Orientierende Untersuchungen zum Einsatz speziesspezifischer Primer zum Nachweis von Milch anderer Tierarten.....	79
6	ZUSAMMENFASSUNG	81
7	SUMMARY	82
8	LITERATURVERZEICHNIS	83
9	ANHANG	92
9.1	Arbeitsanleitung zur Durchführung eines tierartenspezifischen Nachweises aus Milch und Milcherzeugnissen auf Basis einer molekularbiologischen Methode.....	92
9.1.1	Extraktion von DNA aus Milch- bzw. Käseproben	92
9.1.2	Durchführung der PCR zum speziesspezifischen Nachweis boviner DNA.....	93
9.1.3	Auftrennung der Amplifikate in der Gelelektrophorese	93

1 EINLEITUNG

Das gesteigerte Interesse der Öffentlichkeit an Alternativprodukten zu Kuhmilch sowie an "naturnahen" Erzeugnissen führt zu einem wachsenden Markt für Ziegenmilchprodukte. Dies zeigt sich vor allem in der Direktvermarktung von Ziegenkäse über Wochenmärkte oder dem ab-Hof Verkauf. Starke saisonale Schwankungen bei der Erzeugung von Ziegenmilch und der Preisunterschied zwischen Ziegen- und Kuhmilch können Anreiz zur Verfälschung von Ziegenmilcherzeugnissen mit Kuhmilch sein.

Die bisher zum Nachweis von Kuhmilchzusatz zu Ziegenmilchprodukten eingesetzten Verfahren erfordern einerseits einen hohen apparativen, zeitlichen und arbeitstechnischen Aufwand (isoelektrische Fokussierung) und sind zum Einsatz in der Routinediagnostik nur bedingt geeignet. Andererseits sind sie nur für nicht wärmebehandelte Erzeugnisse geeignet (immunchemische Verfahren). Eine Alternative stellt ein Nachweissystem auf Grundlage molekularbiologischer Methoden dar.

Ziel dieser Arbeit war es, die in der Literatur beschriebenen methodischen Ansätze zum molekularbiologischen Nachweis boviner DNA hinsichtlich ihrer Eignung zum Nachweis von Kuhmilch in Ziegenkäse und anderen Milcherzeugnissen zu überprüfen und gegebenenfalls zu modifizieren, um eine praktikable Routinemethode zu etablieren.

Darüber hinaus sollte dieses erarbeitete „Standardverfahren“ in einer Anwendungsstudie zur Überprüfung des Status Quo von Ziegenkäse bezüglich nicht deklarerter Kuhmilchzusätze eingesetzt werden. Schließlich sollte orientierend ein erweiterter speziesspezifischer Nachweis auf der Basis von Genabschnitten des *Cytochrom b*-Gens (*cytb*) für die zur Milcherzeugung verwendeten Tierarten (Ziege, Schaf, Büffel, Kamel, Pferd) geprüft werden.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Produktion und wirtschaftliche Bedeutung von Ziegenmilch und Ziegenkäse

Kuhmilch bildete im Jahre 2004 mit rund 84 % der insgesamt 618 Millionen Tonnen produzierter Milch den Hauptanteil am Weltmilchmarkt. Dagegen betrug 2005 die Produktion an Ziegen- und Schafmilch zusammen nach Angaben der Food and Agriculture Organisation (FAO) ca. 3,8 % der Weltmilcherzeugung. In Deutschland werden pro Jahr ca. 28 Millionen Tonnen Milch verarbeitet, wobei es sich fast ausschließlich um Kuhmilch handelt.

Die Produktion und Verarbeitung von Ziegenmilch spielt daher quantitativ in Deutschland weiterhin eine untergeordnete Rolle, obwohl die Zuwachsraten vor allem bei der Ziegenkäseproduktion recht beachtlich sind (Tabelle 1). Ein erheblicher Teil der Ziegenkäseproduktion in der EU entfällt auf Frankreich und Griechenland, beide Länder exportieren in großem Umfang nach Deutschland. Dies spiegelt sich auch in der im Einzelhandel verfügbaren Warenpalette an Ziegenkäse wieder.

Tabelle 1: Käseproduktion weltweit in Tonnen im Vergleich

Land	Kuhmilchkäse		Ziegenmilchkäse		Schafmilchkäse	
	2001	2004	2001	2004	2001	2004
Deutschland	1.741.480	1.851.960	1.500	2.100	k.A.	k.A.
Frankreich	1.654.150	1719.550	63.992	68.000	52.000	52.000
Griechenland	65.806	68.500	48.000	48.000	127.452	130.000
Niederlande	662.400	670.000	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
Weltweit	15.521.508	16.468.812	412.649	425.163	642.870	667.275

Quelle: Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), 2004

Die regional in Hessen produzierte und verarbeitete Ziegenmilch wird zu einem relativ großen Teil über die Direktvermarktung, „Ökoläden“ oder über Wochenmärkte vermarktet, exakte Daten hierüber liegen allerdings nicht vor. Der hessische Ziegenzuchtverband hat derzeit rund 160 Mitglieder, rund 30 davon halten auch Milchziegen. Rund 20 Betriebe vermarkten Ziegenmilch oder Ziegenkäse direkt (Hessischer Ziegenzuchtverband, 2004).

2.1.1 Ziegenmilch und Erzeugnisse aus Ziegenmilch

Ziegenmilch ist in pasteurisierter Form nur über Wochenmärkte verfügbar. Aufgrund der geringeren Marktanteile und der weiten Transportwege findet sich Ziegenmilch im Handel als ultrahoherhitztes Erzeugnis. Ab-Hof wird Ziegenmilch gelegentlich auch roh abgegeben, hier sollte entsprechend §8 Milchverordnung allerdings die Milch vor dem Verzehr abgekocht werden. Der größte Anteil an der Vermarktung von Ziegenmilch entfällt auf Ziegenkäse. Ziegenkäse wird in fast allen Sorten produziert, die auch für Kuhmilch existieren. Sehr häufig sind Weichkäse oder halbfeste Schnittkäse, welche auch als Rohmilchkäse produziert werden. Frischkäse aus Rohmilch darf nur in der Direktvermarktung verkauft werden, die im Einzelhandel (allerdings recht selten) erhältlichen Ziegenfrischkäse werden aus wärmebehandelter Milch hergestellt.

Wird eine Käse mit der Bezeichnung „Ziegenkäse“ in den Verkehr gebracht, so muss er aus reiner Ziegenmilch hergestellt worden sein und nach § 14 Abs. 2 Nr. 7 der Käseverordnung auch als solcher deklariert werden. Die Verwendung von Kuhmilchzusätzen bei der Herstellung ist nur in Verbindung mit einer entsprechenden Kennzeichnung gestattet. Dies schließt gegebenenfalls auch die Verwendung von in Kuhmilch kultivierten Starterkulturen bzw. in Kuhmilch angesetztem Labkonzentrat ein (Zusatz meist 1-3 Volumenprozent). Unterbleibt dies Kennzeichnung von Kuhmilchzusätzen, so liegt eine Täuschung des Verbrauchers nach § 11 LFGB vor.

2.2 Somatischer Zellgehalt in Kuh- und Ziegenmilch

Jede Milch enthält somatische Zellen, welche in gesunden Eutervierteln oder –hälften nur in geringer Zahl, vorwiegend als Epithelzellen vorkommen. Bei entzündlichen Erkrankungen der Milchdrüse steigt der Zellgehalt in der Milch an, wobei vor allem der Anteil der Abwehrzellen, insbesondere der Leukozyten, stark zunimmt (KIELWEIN, 1994). Die Epithelzellen in der Milch enthalten, genauso wie die Leukozyten, DNA und eignen sich daher zum molekularbiologischen Tierartennachweis (LIPKIN *et al.*, 1993, LÓPEZ-CALLEJA *et al.*, 2004). Die in Deutschland erlaubten Höchstzahlen für den somatischen Zellgehalt (SCC = somatic cell count) in roher Kuhmilch, die zur Herstellung von Erzeugnissen auf Milchbasis verwendet wird, sind in der Milch-Verordnung Anlage 4 Absatz 1 mit ≤ 400.000 Zellen pro ml festgelegt. Für rohe Schaf- und Ziegenmilch gibt es keine vorgeschriebenen Grenzwerte für den somatischen Zellgehalt. In Anlage 4 Absatz 3 zur Herstellung wärmebehandelter Konsummilch oder Erzeugnissen auf Schaf- oder Ziegenmilchbasis, ist lediglich eine Keimzahl von $\leq 1.500.000$ Keimen pro ml und für die Herstellung von Rohmilcherzeugnissen eine Zahl von ≤ 500.000 Keimen pro ml vorgeschrieben. POUTREL und LERONDELLE (1982) untersuchten Milchproben von Ziegenherden und ermittelten eine Anzahl von 6,14 bis $14,04 \times 10^5$ somatische Zellen pro ml als physiologischen Zellgehalt in der Milch. Andere Untersuchungen mittels Fossomatic-Zellzählgeräten ergaben einen Medianwert von $4,15 \times 10^5$ Zellen pro ml. Dabei ist zu beachten, dass die Zellzahl in der Ziegenmilch natürlichen Schwankungen, u. a. abhängig vom Laktationsstadium unterworfen ist (PERNTHANER *et al.*, 1991). Ursache für den unterschiedlich hohen Zellgehalt in Kuh- bzw. Ziegenmilch (Tabelle 2) ist die Art der Milchsekretion (POUTREL und LERONDELLE, 1982; DROKE *et al.*, 1993; BOUTINAUD und JAMMES, 2002). Sie ist auch verantwortlich für die in Ziegenmilch vorkommenden zytoplasmatischen Partikel (CPP). Diese besitzen keinen Zellkern, sind von einer Zytoplasmamembran umgeben und enthalten Mitochondrien, Fett und Eiweiß (PERNTHANER *et al.*, 1991; DROKE *et al.*, 1993). Daher sind für eine aussagekräftige Untersuchung von Ziegenmilch nur solche Zellzählmethoden sinnvoll, die ausschließlich die DNA-enhaltenden Zellen zählen (HAENLEIN, o. A.). Für molekularbiologische Nachweisverfahren in Milch und Milcherzeugnissen auf der Basis von Zell-DNA ist die Zellzahl von großer Bedeutung.

Tabelle 2: Vergleich der Zusammensetzung der somatischen Zellen in Kuh- und Ziegenmilch, modifiziert nach BOUTINAUD und JAMMES (2002)

Tierart	Zellzahl x 10 ⁶ /ml	Zytoplasmatische Partikel x 10 ³ /ml	Epitheliale Zellen %	Abwehrzellen %		
				N	L	M
Kuh	0.075	n.b.*	nicht spezifiziert**	5-20	20-30	61
Ziege	1,1	128	10-20	45-75	3-10	10-35

* nicht beobachtet, N= Neutrophile, L= Lymphozyten, M= Makrophagen

** sehr wenige (nach Angaben des Autors)

2.3 Nachweisverfahren für Milchverfälschungen

Zur Überprüfung der Produktauthentizität, im Sinne des Nachweises einer Verfälschung von Milch und Milcherzeugnissen, wurden eine Reihe unterschiedlichen Verfahren entwickelt, die entweder auf qualitativen oder quantitativen Unterschieden in der Milchezusammensetzung verschiedener Spezies beruhen (RAMOS und JUAREZ, 1986). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Zusammensetzung der Milchinhaltsstoffe saisonal sowie fütterungsbedingt bzw. haltungsbedingt stark schwanken kann (HAENLEIN, o. J.). SAUER (1992) und MOOSHEIMER (1997) zeigen eine ausführliche Zusammenstellung sowie einen Vergleich der bisher angewendeten immunchemischen sowie enzymimmunologischen Methoden. In den folgenden Abschnitten wird kurz auf die bisher entwickelten Nachweisverfahren eingegangen.

2.3.1 Fettanalytische Methoden

Eine Tierartendifferenzierung auf Basis der unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzung wurden von verschiedenen Autoren beschrieben (siehe auch RAMOS und JUAREZ, 1986, Review). So ist beispielsweise der Gehalt an mittelkettigen Fettsäuren (C₆-C₁₂) in Schaf- und Ziegenmilch deutlich höher als der in Kuhmilch. Die Bestimmung der Fettsäureanteile erfolgte mittels Gaschromatographie (Tabelle 3). Die Nachteile dieses Verfahrens liegen in den relativ hohen rasse- und fütterungsabhängigen Schwankungen der Fettsäurezusammensetzungen innerhalb einer Spezies sowie bei Problemen der eindeutigen Identifizierung von Fremdmilchzusätzen in Milchgemischen.

Tabelle 3: Nachweis von Kuhmilchzusatz zu Schaf- und Ziegenmilch bzw. Schaf- und Ziegenkäsen anhand der Fettsäurezusammensetzung modifiziert nach SAUER (1992)

Verfahren	Fettsäuren	Probenmaterial	Nachweisgrenze Kuhmilchzusatz	Referenz
Gaschromatographie	C _{10:0} /C _{10:1}	Manchego-artige Käse	7 %	RAMOS <i>et al.</i> (1977)
Gaschromatographie	C ₁₂ / C ₁₀ ; C ₁₄ / C ₁₂	Schafmilch	5 %	PALO (1975)
Gaschromatographie	C ₁₂ / C ₁₀	Ziegenmilch Schafkäse	k.A.	IVERSON und SHEPPARD (1985)

2.3.2 Proteinanalytische Methoden

Unterschiede in den Eiweißfraktionen der Milch verschiedener Tierarten lassen sich mit elektrophoretischen und immunologischen Nachweisverfahren bzw. mit Kombinationen beider Verfahren darstellen. Das Milcheiweiß setzt sich aus Caseinen und Molkenproteinen zusammen. Caseine sind relativ thermostabil, fallen während der Lab- und der Säuregerinnung aus und bilden eine der Hauptfraktionen der meisten Käse. Allerdings werden sie im Laufe der Käsureifung proteolytisch abgebaut (AMIGO *et al.*, 1989). Sie eignen sich daher gut als Indikatorproteine in wärmebehandelten und kurz gereiften Käsen. Immunglobuline, die den Molkenproteinen zugehören sind hitzelabil, d. h. sie werden abhängig vom Grad der Erwärmung partiell bis vollständig denaturiert (KIELWEIN, 1984). In Käsen liegen diese Molkenproteine ohnehin nur in geringen Konzentrationen vor, in Käse aus wärmebehandelter Milch zudem überwiegend in denaturierter Form. Immunglobuline eignen sich daher als Markerproteine vor allem in Rohmilchkäse oder Käse aus schwach wärmebehandelter (thermisierte) Milch. In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Verfahren zum Nachweis von Milchverfälschungen auf der Basis von Antikörpern gegen bovine Caseine oder Molkenproteine (vor allem Immunglobuline) beschrieben (HURLEY *et al.*, 2004).

Verschiedene Autoren (Tabelle 4) führten sowohl Untersuchungen über den Nachweis von Caseinen mittels der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE), sowie isoelektrischer Fokussierung (IEF) durch (KRAUSE *et al.*, 1982, ADDEO *et al.*, 1990 a und b), als auch über den Nachweis von Molkenproteinen mittels Immundiffusion, Elektrophorese und teils mit Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HAASNOOT *et al.*, 1986). Diese Verfahren

werden durch die natürlichen Schwankungen des Immunglobulingehaltes in der Milch, die relative Hitzeempfindlichkeit der Globuline, welche bei Temperaturen über 80°C geschädigt werden (KAISER, 1989), sowie den proteolytischen Abbau sowohl der Molkenproteine als auch der Caseine während der Käsureifung nachteilig beeinflusst. Tests auf der Basis des Nachweises von Molkenproteinen funktionieren bei wärmebehandelten Erzeugnissen nicht oder nur noch unzureichend. Beim Nachweis von Casein verwandter Tierarten können Kreuzreaktionen durch Proteinomologien hervorgerufen werden (PARSON *et al.*, 2000). So können die γ -Caseine aus Schafmilch nicht von denen aus Ziegenmilch unterschieden werden (MAYER *et al.*, 1997). Ein direkter tierartenspezifischer Nachweis über Casein ist somit nicht in allen Erzeugnissen möglich, Meist wird daher eine Kombination aus initialer Auftrennung über isoelektrische Fokussierung und anschließender immunologischer Detektion spezifischer Proteine gewählt.

In der Routinediagnostik kommen daher aus Kostengründen und aufgrund des geringeren Arbeitsaufwandes überwiegend Enzymimmunoassays (EIA), die häufig auch als ELISA-Tests (Enzyme-linked immunosorbent assay) bezeichnet werden, zum Einsatz, die auf dem Nachweis von Caseinen (β -Casein oder κ -Casein) oder von Molkeproteinen (beispielsweise β -Lactoglobulin oder Immunglobulin G) beruhen (SAUER, 1992; ANGUITA *et al.* 1997; HURLEY *et al.*, 2004). Verschiedene Hersteller bieten inzwischen entsprechende kommerzielle Testsysteme an. Eine vergleichende Untersuchung verschiedener immunchemischer und auf IEF basierender Verfahren zum Nachweis von Kuhmilch in Schafmilch und -käse wurde von MOOSHEIMER (1997) durchgeführt. In Abhängigkeit von den Eigenschaften des verwendeten Markerproteins ist der Anwendungsbereich solcher Tests jedoch stark eingeschränkt.

Tabelle 4: Nachweismethoden von Kuhmilchzusatz in Schaf- und Ziegenmilch bzw. Schaf- und Ziegenkäse anhand von bovinem Markerproteinen modifiziert nach RAMOS und JUAREZ (1986)

bovines Protein	Verfahren	Probenmaterial	Nachweisgrenze Kuhmilchzusatz	Referenz
Immunglobulin/Lactoglobulin	Immundiffusion	Schafmilch Ziegenmilch	2,5 % in Milch	DURAND <i>et al.</i> (1974)
Immunglobulin G ₁	Radiale Immundiffusion	Schafmilch	1 %	LEVIEUX (1974) und (1980)
	Hämagglutinationshemmung	Ziegenmilch	1 % in Milch 3 % in Käse	
anti-Kuhmilchserum	Rocketimmunoelektrophorese	Ziegenmilch	1-5 %	RADFORD <i>et al.</i> (1981)
Immunglobulin G	Gegenstromelektrophorese	Schafmilch/-käse Ziegenmilch/-käse	0,1 –2 %	BERNHAEUER <i>et al.</i> (1983)
Gamma-Caseine	IEF	Kuhmilch in Schaf- und Ziegenmilch bzw. -käse	1-2 %	KRAUSE <i>et al.</i> (1982)
Immunglobulin G	Sandwich-Enzymimmunoassay	Schaf-, Ziegenmilch	0,001 %	SAUER (1992)
β-Casein	Kompetitiver ELISA	Schafmilch/-käse, Ziegenmilch/-käse	0,5 %	ANGUITA <i>et al.</i> (1997)
Immunglobulin G	Indirekt kompetitiver ELISA	Schaf-, Ziegen-, Büffelmilch	0,1 %	HURLEY <i>et al.</i> (2004)
β-Lactoglobulin	Sandwich ELISA	Schaf-, Ziegenmilch	0,1 %	LEVIEUX und VENIEN (1994)

IEF= Isoelektrische Fokussierung;

PAGIF= Polyacrylamid-Gel-Isoelektrische-Fokussierung;

HPLC= High Performance Liquid Chromatographie;

PAGE= Polyacrylamidgelelektrophorese;

ELISA= Enzyme-linked Immunosorbent Assay

2.3.3 DNA-analytische Methoden

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von molekularbiologischen Untersuchungen auf Basis von DNA-Sequenzen beschrieben, darunter zahlreiche Arbeiten über die Verwandtschaftsbeziehungen bei Tieren (WATANOBE *et al.*, 1999; MANNEN *et al.*, 2000; SOTELO *et al.*, 2001). Schon Ende der Achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts amplifizierten und sequenzierten KOCHER *et al.* (1989) homologe DNA-Segmente von über 100 Spezies, darunter Säugetiere, Vögel, Amphibien, Fische und einige Wirbellose, welche in der Gendatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) zur Verfügung stehen.

Auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene überwogen bisher die molekularbiologischen Verfahren zur Identifikation von Keimen aus Fleisch- und Molkereierzeugnissen (OLSEN *et al.*, 1995). Aber auch in Bereichen der Lebensmittelanalytik nimmt die Zahl der molekularbiologischen Verfahren zum Tierartennachweis generell, insbesondere auch die Anwendung bei Milch und Milcherzeugnissen zu (BENEKE *et al.*, 1998; BEHRENS *et al.*, 1999; BRANCIARI *et al.*, 2000; CALVO *et al.*, 2001; MATSUNAGA *et al.*, 1998; MONTIEL-SOSA *et al.*, 2000; PARSON *et al.*, 2000; MAUDET und TABERLET, 2001; RAJAPAKSHA *et al.*, 2002; RODRÍGUEZ *et al.*, 2004). Während in der Bakterienzelle die ribosomale RNA (rRNA) hochkonserviert ist und sich die rRNA-Differenzierung als Standardmethode zur Identifizierung von Bakterienspezies etablierte (HASSAN, 2003), hat sich in der Untersuchung von humaner und tierischer DNA neben dem mitochondrialen 12S rRNA-Gen (LÓPEZ-CALLEJA *et al.*, 2004; RODRÍGUEZ *et al.*, 2004; LÓPEZ-CALLEJA *et al.*, 2005) das *cytb*-Gen der mitochondrialen DNA zur Artendifferenzierung als geeignet erwiesen (IRWIN *et al.*, 1991; SOTELO *et al.*, 2001; HERMAN, 2001; BOTTERO *et al.*, 2002; MEYER *et al.*, 1995; ZEHNER *et al.*, 1989, BANIA *et al.*, 2001). Das mitochondrial codierte *cytb*-Gen weist konservierte Regionen auf, in denen sogenannte universelle Primer ansetzen können. Andere Bereiche dieses Gens haben sich im Laufe der Evolution ständig verändert und können daher beispielsweise nach Amplifizierung größerer Genabschnitte mittels Analyse des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) oder durch die Wahl speziesspezifischer Primersequenzen zur Tierartenidentifikation herangezogen werden. Zudem liegt das mitochondrial codierte Gen in hoher Zahl vor, so dass prinzipiell schon kleinste Mengen Probenmaterial zur Untersuchung ausreichen (MAUDET und TABERLET, 2001; EUGSTER, 2003). Die

große Stabilität von DNA-Material gegenüber einer Wärmebehandlung oder sonstigen technologischen Verarbeitungsprozessen sind weitere Vorteile bei der Verwendung dieser Methodik (LIPKIN *et al.*, 1993).

2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde Ende der 80er Jahre entwickelt (SAIKI *et al.*, 1985, MULLIS *et al.* 1986). Die gezielte Vervielfältigung von DNA-Abschnitten, welche von zwei bekannten Sequenzen eingerahmt werden, beruht auf der Anlagerung von zwei Oligonukleotidprimer an die bekannten Stellen der extrahierten DNA und einer nachfolgenden enzymatischen Vervielfältigung mittels eines thermostabilen Polymeraseenzym. Ein Zyklus ist in drei Schritte eingeteilt und kann in geeigneten Thermocyclern vollautomatisch durchgeführt werden. Zuerst erfolgt die Denaturierung (Auftrennung) der DNA-Stränge durch Erhitzen. Während der anschließenden Abkühlung in Schritt zwei, erfolgt die Anlagerung der Oligonukleotidprimer an die spezifische Zielregion der komplementären Stränge. In Gegenwart der vier Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) und geeigneten Puffern findet die Verlängerung der Oligonukleotidprimer am 3'-Ende durch die hitzestabile DNA-Polymerase statt (Schritt 3). Dieser Zyklus wird typischerweise 20 - 40 Mal wiederholt, wobei sich ab dem vierten Zyklus die Ziel-Sequenz exponentiell vermehrt. Somit liegen diese amplifizierte Genabschnitte in hoher Anzahl vor.

2.5 Universelle Primer zur DNA-Differenzierung

Ein Verfahren zur Tierartendifferenzierung stellt die PCR mit universellen Primern und anschließender Fragmentierung dar. Wichtig für die Wahl der Primer ist eine Region im Genom, die während der Evolution der verschiedenen Tierarten hindurch konserviert wurde, d. h. zum großen Teil gleich geblieben ist, dennoch aber ein Minimum an Sequenzunterschieden aufweist. Ziel ist es, eine hoch konservierte, von bekannten Sequenzen begrenzte Region, welche bei allen zu untersuchenden Tierarten vorkommt, zu amplifizieren und so gleichgroße Genabschnitte zu erhalten (ZEHNER *et al.*, 1989; MEYER *et al.*, 1995). Eine solche Region ist das *cytb*-Gen im mitochondrialen Genom der

Zelle (ZEHNER *et al.*, 1998). Die weitere Tierartendifferenzierung anhand der Sequenzunterschiede in den amplifizierten Genabschnitten findet im Anschluss durch Restriktionsenzymverdau statt, bei dem je nach Tierart DNA-Fragmente unterschiedlicher Zahl und Größe entstehen.

2.5.1 *Cytochrom b*-Gen als Markersubstanz

Das *Cytochrom b* (*cytb*)-Gen ist Bestandteil des mitochondrialen Genoms jeder eukaryonten Zelle. Dort liegt es zusammen mit 2 RNA-, 22 tRNA- und 13 proteincodierenden Genen auf den H-(heavy) und L-(light) Strängen der superhelikalen DNA. Die „Displacement“ (D-loop) Region oder „Control-Region“ beschreibt einen Dreistrang-DNA-Abschnitt, in dem ein 700 Basenpaare (bp) großes DNA-Stück an den L-Strang gebunden vorliegt und so den komplementären H-Strang verdrängt (KNIPPERS, 2001). Die ist die Region des mitochondrialen Gens mit der größten Variabilität, da sie eine höhere Mutationsrate als genomische DNA aufweist und somit Punktmutationen akkumulieren. Diese Eigenschaft kann somit zur Tierartendifferenzierung herangezogen werden (MAUDET und TABERLET, 2001; LÓPEZ-CALLEJA *et al.*, 2004) und spielt daher auch eine große Rolle bei der Untersuchung von genetischen Verwandtschaftsgraden in der Tierwelt (IRWIN *et al.*, 1991; MANCEAU *et al.*, 1998; KAHILA *et al.*, 2001). Das *cytb*-Gen wird annähernd zu 100 % maternal vererbt, da die Mitochondrien in reifen Eizellen in hunderttausendfach höherer Konzentration vorliegen als in Spermien. So liegt z. B. in den Mitochondrien von Maultieren (Pferdestute und Eselhengst) Pferde-mtDNA vor. KOCHER *et al.* (1989) amplifizierten und sequenzierten die mtDNA von über 100 Tierspezies mit einem Standardprimer für hochkonservierte Regionen des *cytb*- Gens, der Control-Region und der 12 rRNA. Ein Beispiel für die Ergebnisse dieser Autoren zu Unterschieden in den Sequenzen von Kuh- und Ziegen-DNA ist in Abbildung 1 dargestellt. Das *cytb*-Gen der Kuh ist 1139 bp groß, es liegt im mitochondrialen Genom an der Stelle 14514 bis 15653 (NCBI Zugangsnummer J01394). Das *cytb*-Gen der Ziege weist mit 1139 bp eine identische Größe auf, die Lokalisation im Genom liegt bei Basenpaar 14151 bis 15290 (NCBI Zugangsnummer NC005044). Einzelne Abschnitte weisen deutliche, analytisch nutzbare Sequenzunterschiede auf.

```

Capra hircus Position: 14151          atgaccaaca
Bos taurus   Position: 14514          atgactaaca

tccgaaagacccccacttaataaaaattgtaaacacgcatttattgacctccaacccc
ttcgaaagtcccccacttaataaaaattgtaaacatgcattcatcgaccttcagccc

catcaaacatctcatcatgatgaaactttggatccctcctaggaatttgcctaatcttac
catcaaacatttcatcatgatgaaatttcggttcctcctggaatctgcctaatcctac

aaatcctgacaggcctattcctagcaatacactatacatccgacacaaataacagcatttt
aaatcctcagaggcctattcctagcaatacactacacatccgacacaacaacagcattct

cctctgtaactcacatttgttcgagatgtaattatggctgaatcatccgatacatacag
cctctgttaccatatctgccgagacgtgaactacggctgaatcatccgatacatacag

caaacggagcatcaatattctttatctgctattcatacatatcggacgaggtctatatt
caaacggagcttcaatgttttttatctgcttatatatgcacgtaggacgaggtctatatt

atggatcatataccttttctagaaacatgaaacattggagtaatcctctgctcgcaaa
acgggtcttacacttttctagaaacatgaaatattggagtaatccttctgctcacagtaa

tggccacagcattcataggctatgttttaccatgaggacaaatatcattttgaggggcaa
tagccacagcatttattaggatacgtcctaccatgaggacaaatatcatttctgaggagcaa

```

Abbildung 1: *Cytochrom b*-Gen von Kuh (*Bos taurus*) und Ziege (*Capra hircus*) im Vergleich mit den Anlagerungsstellen (unterstrichen) der Primer nach MEYER *et al.* (1995). Die Unterschiede in den Gensequenzen sind unterlegt.

Die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP) baut auf solchen artspezifischen Sequenzunterschieden in der DNA auf. Mittels PCR werden zunächst DNA-Regionen amplifiziert, die tierartübergreifend stark konserviert, d. h. bei verschiedenen Tierarten homolog sind, wie z. B. das *cytb*-Gen (BEHRENS *et al.*, 1999). Im nächsten Schritt erfolgt die Verdauung der Amplifikate mit einem ausgewählten Restriktionsenzym. Hierbei bindet das jeweilige Enzym an eine spezifische Basenpaarabfolge in der Gensequenz und durchtrennt diese. Es entstehen unterschiedlich große Fragmente, abhängig von Anzahl und Lokalisation der Schnittstellen. Ob enzyspezifische Schnittstellen innerhalb des PCR-Produktes vorliegen, wird nach elektrophoretischer Auftrennung der jeweiligen Fragmente sichtbar. An Gensequenzen bekannter Amplikons können am schnellsten mit Hilfe eines Computerprogramms (z. B. Clone Manager Version 4.0; Scientific and Educational Software) die wahrscheinlich spezifischen Schnittstellen für ein bestimmtes Restriktionsenzym gefunden werden. Ein Kriterium für die Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme liegt in der Nachweissicherheit

der durch den Verdau des PCR-Produktes entstehenden Fragmente. Diese sollten in der Gelelektrophorese ein deutlich sichtbares Muster mit gut voneinander unterscheidbaren Banden ergeben. Die spezifischen Schnittstellen der Restriktionsenzyme sowie deren Basenpaarabfolgen sind in Tabelle 6 aufgeführt. Anwendung findet die RFLP zur Keimdifferenzierung in der Mikrobiologie (HASSAN, 2003) ebenso wie zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln. Weitere Anwendungen liegen z. B. in der Überprüfung von Futtermitteln auf Knochenmehlzusätze tierischer Herkunft (BELLAGAMBA *et al.*, 2001) oder die Untersuchung von Milcherzeugnissen auf Verfälschungen mit Kuhmilch (BRANCIARI *et al.*, 2000).

Tabelle 6: Beispiele für spezifische Schnittstellen bzw. Basenpaarabfolgen einiger Restriktionsendonukleasen (nach Herstellerangaben von MBI Fermentas, 2002)

Enzym	Schnittstellensequenz	
		
<i>Bsh1236I</i>	CG	CG
<i>HaeIII</i>	GG	CC
	CC	GG
<i>HinI</i>	G-----	ANTC
	CTNA	-----G
<i>SspI</i>	AAT	ATT
	TTA	TAA
<i>TaqI</i>	AATT	AATT
	TTAA	TTAA

A= Adenin, G= Guanin, C= Cytosin, T= Thymin, N= beliebige Base

2.5.2 Tierartennachweis mittels spezifischer Primer

Der Tierartennachweis mittels spezifischer Primer unterscheidet sich von der im Bereich der Lebensmittelanalytik bislang überwiegend benutzten universellen PCR-RFLP-Methodik in der Auswahl der Primer. Für diese Methodik müssen Primer verwendet werden, die die spezifische DNA einer bestimmten Tierart amplifizieren (Abbildung 2). Das Primer-Design orientiert sich an DNA-Regionen, die innerhalb einer Spezies konserviert sind, jedoch zu anderen Tierarten eine genetische Diversität aufweisen

(BEHRENS *et al.*, 1999). Im Unterschied zur PCR mit universellen Primer werden in der speziesspezifischen PCR nur DNA-Abschnitte amplifiziert, wenn die entsprechende Tierarten-DNA in dem DNA-Extrakt vorliegt. Die Amplifikate sind direkt im Anschluss in der Gelelektrophorese zu identifizieren. Anwendungen solcher Methoden zur Untersuchung von Lebensmitteln tierischen Ursprungs, auch von Milch und Milcherzeugnissen, wurden in den letzten Jahren von mehreren Autoren publiziert. CALVO *et al.* (2001, 2002 b) untersuchten sowohl Schweinefleisch als auch Rindfleisch mit tierartenspezifischen Primer, welche sich an die Gensequenzen von Schweine-DNA bzw. Rind-DNA anlagern. Der von CALVO *et al.* (2002 a) entwickelte Primer zur Identifizierung von Kuh-, Ziegen- und Schafkäse stellte speziesspezifisch alle drei Tierarten mit unterschiedlichen Banden in einer PCR dar. Hiermit konnte der Käse qualitativ auf nicht deklarierte Zumischungen von Milch anderer Tierarten analysiert werden. Allerdings ist die Differenzierung von Kuh- und Ziegen-DNA aufgrund des geringen Größenunterschiedes der spezifischen Banden von Kuh (290 und 310 Bp) und Ziege (340 Bp) in der Gelelektrophorese schwierig und mit dem Risiko falsch-positiver Ergebnisse behaftet. REA *et al.* (2001) und BOTTERO *et al.* (2002) beschrieben eine Duplex-PCR zur Untersuchung von Mozzarella, in der sich zwei Primerpaare, je eines für Kuh- und eines für Büffel-DNA in einer PCR-Amplifikation an die DNA anlagerten und die jeweiligen vorhandenen Genabschnitte amplifizierten. Weitere Untersuchungen von roher (HERMAN, 2001) bzw. thermisch behandelter Milch (BANIA *et al.*, 2001; MAUDET und TABERLET, 2001) zielten auf den Nachweis von nicht deklarierten Kuhmilchzusätzen in Ziegenmilch. Eine Anwendung zur Untersuchung von Ziegenkäse in breiterem Umfang wurde jedoch nicht beschrieben, insbesondere liegen keine Erfahrungen mit der tatsächlichen Praxistauglichkeit dieser Methoden vor.

ALTMANN *et al.* (2004) erzielten mit einem Primer für eine ziegenspezifische β -Casein-Zielsequenz gute Erfolge in der Untersuchung von prozessierten und erhitzten Ziegenmilch- und Ziegenfleischerzeugnissen. Ein 15 % iger Ziegenmilchanteil im Käse ergab bei dieser Methode allerdings nur ein sehr schwaches Signal, so dass geringere Zusätze möglicherweise nicht nachgewiesen werden können.

```

Bos taurus (NCBI J01394): Position: 14799   tatgcacgtaggacgaggct.....
Capra hircus (NCBI AF217254) Position:14436  catacatatcggacgaggc.....

.....cttactaattctagctctaatactac
.....gctactaattcttgttctaatattac

```

Abbildung 2: Sequenzvergleich der spezifischen Primer des *cytb*-Gens von Rind (*Bos taurus*, NCBI J01394) und Ziege (*Capra hircus*, NCBI AF217254). Markiert sind die nicht-homologen Basen (fett) in den Ansatzregionen der Kuh-spezifischen Primers BosL-15794 und BosH-16102 (MAUDET und TABERLET, 2001).

2.6 Verfälschungen von Ziegenmilcherzeugnissen mit Kuhmilch

Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass Ziegenkäse (aber auch Schafkäse) nach wie vor mit recht hoher Häufigkeit unter Verwendung von Kuhmilchzusätzen und ohne entsprechende Kennzeichnung auf den Markt gebracht werden. Auffällig ist, dass als Ziegenkäse deklarierte Erzeugnisse oft sogar überhaupt keine nachweisbaren Ziegenmilchanteile enthalten. Dies deutet auch darauf hin, dass selbst vollständige Produktfälschungen vom Verbraucher rein sensorisch vermutlich oft nicht erkannt werden. Eine Übersicht über die in den letzten Jahren publizierten Untersuchungen zur Authentizität von Ziegen- bzw. Schafskäse ist in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7: Untersuchungen zur Häufigkeit von Verfälschungen von als Ziegen- und Schafmilchkäsen deklarierten Handelserzeugnissen mit Kuhmilch

Probenmaterial	Probenanzahl	nicht deklarierte Kuhmilchanteile nachweisbar, n			Untersuchungsverfahren	Referenz
		nein	ja	ausschließlich Kuhmilch		
Schafkäse	109	72	8	29	IEF	HORN (1989)
Schafkäse	41		3 [~]	k. A.	IEF	MOOSHEIMER (1997)
Schafkäse	20 ⁺⁺	9	0	11	ELISA, PAGIF	Institut für Hygiene und Umwelt der Stadt Hamburg (2002)
Schafkäse	21 ⁺	11	2	8	ELISA, PAGIF	Institut für Hygiene und Umwelt der Stadt Hamburg (2003)
Kuhkäse mit Schaf- oder Ziegenmilch bzw. reiner Ziegenkäse	13	9	1	3	Multiplex PCR	BOTTERO <i>et al.</i> (2003)
Schafkäse	51	39	8 [*]	4	Fettsäureanalytik, PAGIF, PCR	LGL Bayern (2004)
Ziegenkäse	22	12	10 ^{**}	0		
Käse, teilweise Kuhmilch mit Schafmilch, teilweise nur Schafmilch	10	8	0	2	Duplex-PCR	MAFRA <i>et al.</i> (2004)
Schafkäse	27	10	17 [#]	k. A.	k. A.	Institut für Hygiene und Umwelt der Stadt Hamburg (2005)

⁺ = 1 bzw. ⁺⁺ 2 Proben waren Käseimmitate,

^{*} = je 4 Proben enthielten zusätzlich nicht deklarierte Ziegen- bzw. ^{**} Schafmilchanteile

[#] = 5 Proben enthielten zusätzlich Ziegenmilch

[~] = > 0,5 Kuhmilchanteil

IEF = Isoelektrische Fokussierung

PAGIF = Polyacrylamid-Gel-Isoelektrische-Fokussierung

HORN (1989) untersuchte die Caseinfraktionen von 109 Schafkäsen mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF). Bei einer relativ hohen Nachweisgrenze von 5 % Kuhmilchanteil konnte er in immerhin 37 Proben bovines Casein nachweisen, wobei 29 Proben ausschließlich bovines Casein enthielten und damit als komplett gefälschte Erzeugnisse zu bewerten waren.

MOOSHEIMER untersuchte in einer Studie 41 Schafkäse aus dem Handel mittels der Referenzmethode nach EWG-Verordnung Nr.690/92 und konnte bei drei Käsen einen Kuhmilchgehalt von mindestens 0,5 % nachweisen.

Vom bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit wurden im Jahr 2003 insgesamt 73 Schaf- und Ziegenkäseproben mittels Fettsäureanalytik, PAGIF und PCR auf nicht deklarierten Zusatz von Milch anderer Tierarten untersucht (LGL BAYERN, 2004). Insgesamt wurden 33 % der Käseproben wegen falscher Kennzeichnung und damit verbundener Irreführung des Verbrauchers beanstandet. Teilweise wurden kleine Mengen an Kuhmilchzusatz (ca. 1 %) gefunden, bei denen es sich vermutlich um Kuhmilch handelte, die zum Ansatz der Käsekulturen oder des Labferments verwendet wurden.

Eine Untersuchung von 19 Weich- und Schnittkäsen aus dem italienischen Einzelhandel wurde von BOTTERO *et al.* (2003) auf Basis speziesspezifischer Primer in einer Multiplex-PCR durchgeführt. Zusätzlich wurden die Proben mittels der RFLP-Analyse untersucht. In drei als Kuhmilch-Schafmilchkäse deklarierten Proben wurde ausschließlich Kuhmilch nachgewiesen, eine Ziegenkäseprobe enthielt - nicht gekennzeichnete - Zusätze Kuhmilch, die zwar mittels PCR, nicht jedoch mittels RFLP nachgewiesen werden konnte.

In einer weiteren Studie wurden 10 portugiesische Schafkäse mittels einer von MAFRA *et al.* (2004) beschriebenen speziesspezifischen Duplex-PCR untersucht. Von den 10 untersuchten Käseproben waren zwei als Kuhmilchkäse mit Schafmilchzusatz und ein Schafkäse als mit Kuhmilchzusatz gekennzeichnet, sowie sieben weitere Käse als reine Schafkäse deklariert. Zu beanstanden waren 2 Proben des als mit Schafmilch gemischten Kuhmilchkäses, da keine Schaf-spezifische Bande in der an die PCR anschließenden Gelelektrophorese nachgewiesen werden konnte. In den restlichen acht Proben konnten jeweils die erwarteten spezifischen Banden dargestellt werden.

Zusammenfassend zeigen die bisher publizierten Untersuchungen, dass nach wie vor mit einer Verfälschung von Ziegen- und Schafkäse mit Kuhmilch zu rechnen ist. Die in der Regel geringen untersuchten Probenzahlen sind methodisch bedingt, da ein praktikables, und vielseitiges Routineverfahren nach wie vor nicht existiert. Zudem sind bisher überwiegend Untersuchungen von Schafkäse durchgeführt worden. Daten zur Authentizität von Ziegenkäse des deutschen Marktes liegen kaum vor.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Biochemika

Agarose NEEO [®]	(Roth, Karlsruhe, Deutschland, 2267.4)
dNTP-Set	(MBI Fermentas St. Leon-Roth, Deutschland, R0181)
Ethidiumbromid-Lsg. 10 mg/ml	(Sigma, Taufkirchen, Deutschland, E1510)
Eisessig 100 %	(Merck, Darmstadt, Deutschland 1.00056.2500)
Isopropanol > 99,5 % (2-Propanol)	(Roth, 9866.1)
Loading Puffer 6x Loading Dye Solution	(MBI Fermentas, R0631)
Loading Puffer 6x Orange Loading Dye Solution	(MBI Fermentas, R0611)
Marker Gene [®] Ruler 100 Bp Ladder	(MBI Fermentas, SM0241)
Marker Gene [®] Ruler 50 Bp Ladder	(MBI Fermentas, SM0371)
MetaPhor [®] Agarose	(Biozym, Hessisch-Oldendorf, Deutschland, 850.180)
MgCl ₂ 25 mmol/l	(Promega, Mannheim, Deutschland A351H 15246903)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	(Roth, 4360.1)
Natriumhydroxid (NaOH)	(Merck, 1.06498.1000)
Natriumperchlorat (NaClO ₄)	(Sigma, 13455)
Natriumchlorid (NaCl)	(Merck, 1.06400.5000)
Oligonukleotidprimer	(Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland und MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland)
Proteinase K (14,8 mg/ml)	(Roche Mannheim, Deutschland)
QIAamp [®] DNA Stool Mini Kit	(Qiagen, 69506)
QIAquick [®] PCR Purification Kit	(Qiagen, 28997)
Restriktionsenzyme: <i>TasI</i>	(MBI Fermentas, ER1351)
Hinfl	(ER0801)

<i>Bsu</i> RI (<i>Hae</i> III)	(ER0151)
SspI	(ER0772)
Bsh1236I	(ER0921)
Roti [®] -Phenol-Chloroform	(Roth, A156.2)
Saekem [®] LE Agarose	(Biozym, 840.004)
Steriles Aqua destillatum	
Taq-DNA Polymerase (5U/ μ l)	(Promega, M186A 12396135)
Titriplex II [®] (EDTA)	(Merck, 1.08417.0250)
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan	(Roth, 5429.3)

3.1.2 Lösungen und Puffer

Ethidiumbromid-Lösung, 5 μ g/ml	
Natriumperchlorat (NaClO ₄)-Lösung, 5 mol/l	
Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung, 2,6 mol/l	
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung, 24 %	
NET-Puffer (50 mmol/l NaCl; 125 mmol/l EDTA; 50 mmol/l Tris-HCl; pH 7,6)	
TAE-Puffer 1-fach (40 mmol/l Tris-HCl; 1,14 mol/l Eisessig; 1 mmol/l EDTA, pH 8,0)	
TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8,0)	
Reaktionspuffer (Thermophile DNA- Polymerase 10-fach)	(Promega, M190A 14864506)

3.1.3 Geräte und Sonstiges

DNA UV-Cleaner, UVC/T	(Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland)
Dstroy [®] -Sticks	(Biozym, 710399)
EasyFreezer [®] -Ice-Box	(Biozym, 730625)
Eppendorf Zentrifuge 3200	(Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
GelDoc [™] 2000	(Biorad, München, Deutschland)

Gelelektrophorese Power Pac 1000	(Biorad)
Lagerrack mit Scharnierdeckel	(Biozym, 730209)
MicroPipetten	(Eppendorf)
Mikrolöffel Stahl	(Merck, 2311352)
Mikrotiterplatten-Photometer (450 nm)	(Biorad)
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	(Biozym, 710925)
Pipettenaufsätze DNase/RNase-frei	(Greiner, Kremsmünster, Österreich, 740288)
Pipettenaufsätze DNase/RNase-frei	(Greiner, 771288)
Pipettenaufsätze DNase/RNase-frei	(Greiner, 739288)
Reaktionsgefäße 1,5 und 2,0 ml	(Biozym, 710190)
Stomacher 400 Circulator	(Seward Ltd., Großbritannien, http://www.seward.co.uk)
Sub-Cell [®] GT	(Biorad)
Thermocycler iCycler	(Biorad)
Vortex Genie 2, Scientific Industries	(Merck)
Waage, Mettler PM 480 Delta Range [®]	(Mettler Instrumente GmbH, Gießen, Deutschland)
Wasserbad GFL	(MAGV GmbH, Rabenau-Londorf, Deutschland)
Zentrifuge 202 MK	(Sigma)
ZeroCooler [®] -Ice-Box	(Biozym, 730620)

3.2 Probenmaterialien

3.2.1 Konsummilch

Pasteurisierte bzw. ultrahocherhitzte, jeweils homogenisierte Kuh- und Ziegenmilchproben mit verschiedenen Fettgehaltsstufen (1,5 %; 3,5 % bzw. 3,8 %) wurden im Einzelhandel (Supermarkt, Reformhaus) im Raum Giessen/Wetzlar gekauft. Einzelgemelkproben (Rohmilch) von Kühen (Braunvieh, Deutsche Schwarzbunte, Deutsche Rotbunte, Fleckvieh, Jersey, Limousin, Hinterwäldler), Ziegen (Toggenburger Ziege, Bunte Deutsche Edelziege, Thüringerwald-Ziege, Walliser Schwarzhalsziege und Weiße Deutsche Edelziege), Schafen und Pferden stammten aus landwirtschaftlichen Betrieben in Hessen.

Eine Büffelmilchprobe wurde von einem Büffelnzuchtbetrieb in der Nähe von Leipzig eingeschickt, die Kamelmilchproben stammten aus einer Kamelherde in Ägypten.

3.2.2 Käse

Kuh-, Ziegen-, Schaf- und Büffelkäse, welche nach Herstellerangaben zu 100 % aus Milch der jeweiligen Tierart hergestellt worden waren, Ziegenkäse mit deklarierten Kuhmilchgehalt, Schafkäse mit deklariertem Ziegenmilchgehalt sowie Käse aus Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch, wurden in Lebensmittelläden (Supermärkte, Reformhäuser) und bei Direktvermarktern (Wochenmärkte, ab-Hof Verkauf) in der Region Mittelhessen sowie im Raum Frankfurt gekauft. Hierbei wurden sowohl Käse aus konventioneller als auch aus deklariert ökologischer Produktionsweise berücksichtigt.

3.2.3 Artifizuell mit Kuhmilch gemischte Ziegenmilch bzw. mit Kuhmilch gemischter Ziegenkäse

Für die Herstellung artifizuell gemischter Ziegen- und Kuhmilch wurden 5 ml rohe bzw. pasteurisierte oder ultrahocherhitzte Kuhmilch mit 5 ml entsprechender Ziegenmilch gemischt. Dieser Ansatz wurde durch weitere Zugabe von Ziegenmilch zu Mischungen bis 0,005 % Kuhmilchanteil in Ziegenmilch verdünnt. Je 600 µl dieser Mischung wurden in ein 2 ml-Reaktionsgefäß verbracht. Zur Herstellung von Ziegenkäse mit Kuhkäsezusatz wurden jeweils 10 g Ziegenkäse (Weichkäse, halbfester Schnittkäse bzw. fester Schnittkäse) und 10 g eines entsprechenden Kuhkäses mit 20 ml Aqua dest. in einem Stomacher zwei Minuten homogenisiert. Durch Zumischung von Ziegenkäse-Homogenisat (in Aqua dest.) wurden aus diesem Ansatz anschließend Mischungen von 30 % bis 0,05 % Kuhkäse in Ziegenkäse hergestellt. Je 500 µl dieser Verdünnungen wurden zur weiteren Untersuchung in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben.

3.3 Methoden

Die einzelnen Arbeitsschritte (DNA-Extraktion, PCR und Elektrophorese) wurden zur Reduktion des Kontaminationsrisikos räumlich getrennt durchgeführt, die verwendeten Lösungen und Geräte vor Gebrauch sterilisiert oder autoklaviert bzw. DNase/ RNase-frei bezogen.

3.3.1 Präparation der DNA aus Milch und Käse

Zur Entwicklung geeigneter Präparationsmethoden für DNA aus Milch und Käse wurden Extraktionen unter Verwendung eines NET-Puffers bzw. eines TE-Puffers sowie eines modifizierten kommerziellen Extraktionssystems (QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit), welches ursprünglich zur Untersuchung von Fäzes entwickelt wurde, durchgeführt.

3.3.1.1 DNA-Extraktion aus Milch und Käse unter Verwendung eines NET-Puffers nach LOPEZ-GOÑI (1999)

Zur Überprüfung der Probenaufbereitung unter Verwendung des NET-Puffers aus Milch wurden von jeder zu untersuchenden Milchprobe in der Regel mindestens für vier separate Extraktionsansätze je 100 µl, 200 µl, 400 µl und 600 µl in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Von jeder zu untersuchenden Käseprobe wurden 10 g in einem Stomacherbeutel mit 10 ml Aqua dest. gemischt und in einem Stomacher zwei Minuten homogenisiert. Anschließend wurden je 500 µl des Homogenisates wie oben angegeben zentrifugiert. Nach Entfernung der Fettschicht mit einem Mikrolöffel wurden zu jeder Probe 400 µl NET-Puffer nach ROMERO und LOPEZ-GOÑI (1999) zugegeben und erneut eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Bei fettreichen Proben wurde die Fettschicht gegebenenfalls nochmals entfernt. Zum Abbau der Milchproteine wurden je 25 µl Proteinase K hinzugefügt und die Proben zwei Stunden bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. Die Proben wurden nach Zugabe von 20 µl 2,6 mol/l NaOH und 40 µl 24%-igem Natriumdodecylsulfat (SDS) zur Inaktivierung der Proteinase K für 10 Minuten in kochendes Wasser gestellt. Anschließend wurde 200 µl Roti[®]-Phenol-Chloroform hinzugefügt und fünf Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Die obere Phase

wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß abpipettiert und pro 100 µl Überstand 20 µl NaClO₄ (5 mol/l) sowie 100 µl Isopropanol (2-Propanol) zugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben 30 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Entfernung der Salze aus der isolierten DNA wurden 500 µl 70%-iges Ethanol hinzugegeben, die Ansätze fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die gefällte DNA zehn Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die gefällte und getrocknete DNA wurde in 100 µl destilliertem Wasser aufgelöst und bei -18 °C aufbewahrt. Der Nachweis der DNA erfolgte nach einer PCR mittels universeller Primer in der Gelelektrophorese.

3.3.1.2 Vereinfachte DNA-Extraktion unter Verwendung des TE-Puffers

Die Extraktion unter Verwendung des TE-Puffers erfolgte bei zehn zu untersuchenden Milchproben. Von jeder Milchprobe wurden 100 µl in ein 2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und je 100 µl TE-Puffer hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen und Zugabe von je 15 - 25 µl Proteinase K wurden die Proben zwei Stunden in einem Wasserbad bei 56° C inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben 10 Minuten in kochendes Wasser gestellt und anschließend 15 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und im Kühlschrank für weitere Versuche aufbewahrt. Der Nachweis der DNA erfolgte nach PCR mittels universeller Primer in der Gelelektrophorese.

3.3.1.3 DNA-Extraktion aus Milch unter modifizierter Anwendung eines kommerziellen Testkits

Als weiteres Verfahren zur Extraktion von DNA aus Milch wurde das kommerzielle Testkit QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit in einer modifizierten Anwendung getestet. Von jeder zu untersuchenden Milchprobe (n = 40) wurden je 100 µl, 200 µl, 400 µl bzw. 600 µl in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gegeben und eine Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Nach Entfernung der Fettschicht mit einem Mikrolöffel wurde jeder Probe zur Zell-Lysis 1,6 ml des im Kit enthaltenen ASL-Lysis-Puffers hinzugefügt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurden 1,4 ml Überstand in ein weiteres 2 ml-Reaktionsgefäß

pipettiert. Dem Überstand wurde pro Gefäß eine InhibitEX-Tablette zugefügt und diese durch Schütteln aufgelöst. Nach Zentrifugation der Mischung bei 10.000 x g und Überführung des Überstandes in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß folgte ein erneutes Zentrifugieren. Anschließend wurden 600 µl des Überstandes mit je 600 µl AL-Puffer und 25 µl Proteinase K in ein 2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert, gründlich gemischt und zehn Minuten bei 70 °C inkubiert. Aus dieser Probenmischung wurden danach 600 µl in das „QIAamp spin collum“ pipettiert und wie oben zentrifugiert. Das „QIAamp spin collum“ wurde in ein neues 2 ml-Gefäß eingesetzt, das Filtrat verworfen, wiederum 600 µl AL-Puffer in das „QIAamp spin collum“ gegeben und dieses eine Minute wie oben zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Filtrats wurde dem „QIAamp spin collum“ 500 µl des im Kit enthaltenen AW1-Wasch-Puffers zugefügt. Nach Zentrifugation und Zugabe von 500 µl AW2-Wasch-Puffer und erneutem Zentrifugieren wurde das entstandene Filtrat ebenfalls verworfen. Durch Zugabe von 200 µl des im Kit enthaltenen AE-Puffers wurde die gewonnene DNA aus der Membran des „QIAamp spin collums“ herausgelöst und in einem 2 ml-Reaktionsgefäß gesammelt. Die extrahierte DNA wurde bei -18 °C für weitere Versuche aufbewahrt. Der Nachweis der DNA erfolgte nach PCR mittels universeller Primer in der Gelelektrophorese.

3.4 PCR-Methoden auf Basis universeller Oligonukleotidprimer zum Nachweis von mtDNA

Drei verschiedene in der Literatur beschriebene universelle Primer wurden auf ihre Eignung zum Nachweis von DNA in den Extraktionsansätzen aus Milch und Käse überprüft. In Tabelle 8 sind die jeweiligen Sequenzen der Primerpaare in einer Übersicht dargestellt.

Tabelle 8: Überprüfte universelle Primer für die Amplifikation des *cytb*- und einem Teil des anschließenden tRNA-Gens der mitochondrialen DNA

Ziel-gen	Primersequenzen („forward“/ „reverse“ Primer)	Referenz
<i>cytb</i>	L-14841: 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'	MEYER <i>et al.</i> (1995)
	H-15149: 5'-GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA 3'	
<i>cytb</i>	F: 5'-CATCGACCTTCCAGCCCCATCAAACAT-3'	ZEHNER <i>et al.</i> (1998)
	R: 5'-TGTTCTACTGGTTGGCCTCCAAT-3'	
<i>cytb</i> / tRNA	L-15774: 5'-ACATGAATTGGAGGACAACCACT-3'	MAUDET und TABERLET (2001)
	H-16498: 5'-CCTGAAGTAAGAACCAGA-3'	

3.4.1 Amplifizierung einer Sequenz des mt-*cytb*-Gens nach MEYER *et al.* (1995)

Die Amplifizierung des mt-*cytb*-Gens der nach 3.3.1.1 extrahierten DNA wurde mit der nach MEYER *et al.* (1995) beschriebenen Methode durchgeführt. In Tabelle 8 sind die Anlagerungssequenzen der von den Autoren beschriebenen universellen Primer L-14841 und H-15149 dargestellt. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die PCR und die Amplifikationsbedingungen sind in Tabelle 9 und 10 aufgeführt. Bei allen PCR-Ansätzen wurde jeweils eine Negativkontrolle ohne DNA-Zusatz mitgeführt. Die Proben verblieben nach Ablauf des Programms bis zur Entnahme bei 4 °C im Thermocycler.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Durchführung der nach MEYER *et al.* (1995) beschriebenen PCR-Methode

Substanz	Menge
Aqua bidest.	34,8 µl
Reaktionspuffer (10x Puffer)	5,0 µl
MgCl ₂ (25 mmol/l)	3,0 µl
dNTP (10 mmol/l je Nukleotid)	1,0 µl
Primer I (10 µmol/l)	1,0 µl
Primer II (10 µmol/l)	1,0 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Extrahierte DNA	4,0 µl

Tabelle 10: Amplifikationsbedingungen der PCR zur Durchführung der Methode nach MEYER *et al.* (1995) und ZEHNER *et al.* (1998)

Zyklen	Temperatur °C	Dauer	Amplifizierungsschritt
1	94	4 min	Initiale Denaturierung
35	94	30 sec	Denaturierung
	55	30 sec	Primeranlagerung
	72	30 sec	Polymerisierung
1	72	7 min	Renaturierung

3.4.1.1 Darstellung der Amplifikate nach PCR in der Gelelektrophorese

Der Nachweis der DNA-Amplifikate erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender optischer Darstellung in einem Auswertungssystem (GelDocTM 2000®). Dazu wurden 10 µl des PCR-Produkts mit 2 µl Farbstofflösung (6x Orange Loading Dye Solution) versetzt und auf ein Agarosegel (2,0 %-ige Agarose NEEO®) aufgetragen. Zur Größenbestimmung des Amplifikats wurde jeweils ein Standard-Marker von 100 bzw. 50 Bp Größenabstand randständig aufpipettiert. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte bei 120 mA (2,5 Stunden) in einem 1x TAE-Laufpuffer. Zur optischen Darstellung der

Amplifikate wurde das Gel anschließend in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml) 5 min auf einem Labor-Taumelgerät gefärbt. Zur Entfernung überschüssigen Farbstoffes wurde das Gel in destilliertem Wasser zehn Minuten bei Zimmertemperatur geschwenkt und anschließend unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm digital fotografiert.

3.4.1.2 Restriktionsverdau des *cytb*-Genamplikats

3.4.1.2.1 Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme für die tierartenspezifische Differenzierung

Die zur Tierartendifferenzierung geeigneten Restriktionsenzyme wurden mit dem Computerprogramm Clone Manager 4.0 ermittelt. Hierbei wurde eine Simulation des Restriktionsverdaus des nach 3.3.1.1 extrahierten und anschließend nach MEYER *et al.* (1995) amplifizierten (3.4.1) mt-*cytb*-Genproduktes durchgeführt. Die Sequenzen wurden aus der Gendatenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) übernommen. Aus 525 theoretisch möglichen Enzymen der Computerdatenbasis wurden die Restriktionsenzyme *TasI*, *HaeIII*, *SspI*, *Bsh1236I* und *HinfI* ausgewählt, da diese die relevanten DNA-Abschnitte tierartenspezifisch an unterschiedlichen Stellen schneiden und somit unterschiedlich große Fragmente entstehen sollten, die theoretisch eine eindeutige Zuordnung erlauben.

3.4.1.2.2 Verdau mit den in simulierten Vorversuchen ausgewählten Restriktionsenzymen

Die Darstellung von Genpolymorphismen der extrahierten und nach MEYER *et al.* (1995) amplifizierten DNA erfolgte im Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *TasI*, *HaeIII*, *SspI*, *Bsh1236I* bzw. *HinfI*. Der Ansatz des Restriktionsgemisches setzte sich wie in Tabelle 11 dargestellt zusammen. Die Inkubation des Reaktionsgemisches (30 µl) erfolgte für 24 h in einem 2 ml-Reaktionsgefäß im Wasserbad bei 37 °C (*HaeIII*, *SspI*, *Bsh1236I* und *HinfI*) bzw. 65 °C (*TasI*). Zur Überprüfung rassespezifischer Einflüsse beim Einsatz der Restriktionsendonukleasen wurden Rohmilchproben verschiedener Kuh- (n = 7) und Ziegenrassen (n = 5) anschließend an die PCR nach 3.4.1 einem Restriktionsverdau

unterzogen. Bei jedem Restriktionsverdauansatz wurde eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle (ohne DNA) mitgeführt.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zum Restriktionsenzymverdau der Amplifikate nach der PCR nach 3.4.1 mit den Enzymen *TasI*, *HaeIII*, *SspI*, *Bsh1236I* bzw. *HinfI*

Substanz	Menge
PCR-Produkt	18,0 µl
Enzymlösung	2,0 µl
Reaktionspuffer	3,0 µl
Aqua dest.	7,0 µl

3.4.1.2.3 Gelelektrophorese der Restriktionsfragmente nach Enzymverdau

Für die Darstellung der Fragmente nach dem Restriktionsenzymverdau (3.4.1.2.2) wurde eine Elektrophorese in 4,0%-igem Metaphor[®]-Agarosegel durchgeführt. Dazu wurden 10 µl des Restriktionsproduktes mit 2 µl Färbelösung (6x Orange Loading Dye Solution) versetzt, auf das Agarosegel aufgetragen und bei 100 mA 3,5 h elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente TAE-Laufpuffer (1x). Zur Größenabschätzung des Restriktionsproduktes wurde ein Standard-Marker (50 Bp) randständig aufpipettiert. Die weitere Durchführung erfolgte wie in 3.4.1.1 beschrieben. Anschließend wurden die errechneten Fragmentgrößen mit den tatsächlich Gefundenen verglichen.

3.4.2 Amplifizierung von Sequenzen des *mt-cytb*- sowie des *mt-tRNA*-Gens nach MAUDET und TABERLET (2001)

Zur Amplifizierung einer mitochondrialen Gensequenz aus DNA-Extrakten von Milch und Käse wurden die von MAUDET und TABERLET (2001) beschriebenen universellen Primersequenzen (Tabelle 8) L-15774 für das *mt-cytb*-Gen sowie H-16498, das bereits auf dem *mt-tRNA*-Gen gelegen ist, getestet. Obwohl sich diese Primer sowohl an bovine als auch an caprine DNA anlagern, sollen sie nach MAUDET und TABERLET (2001) eine

Differenzierung von Kuh und Ziege ermöglichen, da die bovine D-loop Region mehrere Deletionen aufweist und somit kleinere Amplifikate (Kuh: 724 Bp; Ziege: 987 Bp) gebildet werden. Die Primeranlagerungsstellen sind in Abbildung 2 zu sehen. Zur Durchführung der PCR wurde zunächst ein Reaktionsgemisch mit in Tabelle 12 beschriebener Zusammensetzung nach Angaben von MAUDET und TABERLET (2001) hergestellt.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Durchführung der PCR für den Nachweis mitochondrialer DNA nach MAUDET und TABERLET (2001)

Substanz	Menge
Aqua bidest.	19,9 µl
Reaktionspuffer	3,0 µl
MgCl ₂ (25 mmol/l)	1,8 µl
dNTP (10 mmol/l je Nukleotid)	0,6 µl
Primer I (10 µmol/l)	1,0 µl
Primer II (10 µmol/l)	1,0 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Extrahierte DNA	2,5 µl

Nach gründlichem Mischen wurden jeweils 27,5 µl des Reaktionsgemisches in ein 0,2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und 2,5 µl der nach 3.3.1.1 präparierten DNA zugegeben. Bei allen PCR-Ansätzen wurde jeweils eine Negativkontrolle ohne DNA-Zusatz mitgeführt. Die Amplifikation wurde unter Einhaltung des in Tabelle 13 dargestellten Temperaturprogramms durchgeführt. Die Proben verblieben nach Ablauf des Programms bis zur Entnahme bei 4 °C im Thermocycler.

Tabelle 13: Amplifikationsbedingungen der PCR mit den universellen Oligonukleotidprimer nach MAUDET und TABERLET (2001)

Zyklen	Temperatur °C	Dauer	Amplifizierungsschritt
1	95	4 min	Initiale Denaturierung
30	95	60 sec	Denaturierung
	50	60 sec	Primeranlagerung
	72	60 sec	Polymerisierung
1	72	7 min	Renaturierung

Abbildung 2: Darstellung der Nukleotidsequenz eines Ausschnittes des mt-*cytb*-Gens und des kompletten mt-tRNA-Gens von *Bos taurus* (Gendatenbank NCBI-"National Center for Biotechnology Information" Zugangsnummer J01394) mit Markierung der Anlagerungsstellen der universellen Primer **L-15774** und **H-16498** und der speziesspezifischen Primer *BosL-15794* und *BosH-16102*, beide nach MAUDET und TABERLET (2001).

3.4.3 Amplifizierung einer Sequenz des mt-*cytb*-Gens nach ZEHNER *et al.* (1998)

Zur Amplifizierung des mt-*cytb*-Gens aus Milch und Käse wurde der von ZEHNER *et al.* (1998) beschriebene universelle Primer (Tabelle 8) eingesetzt. Zur Durchführung der PCR wurde zunächst ein Reaktionsgemisch wie in Tabelle 9 beschrieben hergestellt. Nach gründlichem Mischen wurden 46 µl des Reaktionsgemisches in ein 0,2 ml-PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und 4 µl der nach 3.3.1.1 präparierten DNA zugegeben. Bei allen PCR-Ansätzen wurde jeweils eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle ohne DNA-Zusatz mitgeführt. Das anschließende Temperaturprogramm umfasste die in Tabelle 10 dargestellten Schritte. Die Proben verblieben nach Ablauf des Programms bis zur Entnahme bei 4 °C im Thermocycler.

3.5 PCR-Methoden auf Basis speziesspezifischer Oligonukleotidprimer zum Nachweis boviner DNA

Die Eignung der in der Literatur von verschiedenen Autoren beschriebenen speziesspezifischen Primer wurde in den folgenden Experimenten überprüft. Die jeweiligen Zielsequenzen der speziesspezifischen Primer auf der mitochondrialen DNA sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Darstellung der verwendeten Sequenzen der speziesspezifischen Primerpaare zum Nachweis von boviner DNA in Ziegenmilch und -käse

Zielgen	Primersequenz („forward“/„reverse“)	Referenz
<i>cytb</i> / tRNA	BosL-15794: 5'-TTCTATTTAAACTATTCCATGAAC-3' BosH-16102: 5'-GATATACTATCAAGAATGAATTTGAC-3'	MAUDET und TABERLET (2001)
<i>cytb</i>	F: 5'-GGACGTATCCTATAAAT-3' R: 5'-GGAATCTGCCTAATCCTA-3'	HERMAN (2001)
<i>cytb</i>	L14814: 5'-GGCTTATATTACGGGTCTTACACT-3' H15092: 5'-AATTCATTCAACCAGACTTGTACCA-3'	BOTTERO <i>et al.</i> (2002)

3.5.1 Amplifizierung eines für bovine DNA spezifischen Abschnitts des mitochondrialen Genoms nach MAUDET und TABERLET (2001)

Zur Amplifizierung eines für bovine DNA spezifischen Abschnitts aus dem mitochondrialen Genom der nach 3.3.1.1 extrahierten DNA aus Milch- und Käseproben wurden das Primerpaar BosL-15794 und BosH-16102 nach MAUDET und TABERLET (2001) verwendet (Abbildung 2). Die Autoren wählten die Ansatzstellen der spezifischen Primer in der D-loop Region des mt-*cytb*-Gens, in welcher, verglichen mit veröffentlichten Gensequenzen von Schaf- und Ziegen-DNA, beim Rind mehrere Deletionen vorkommen (ANDERSON *et al.*, 1982). Somit kann der Kuh-spezifische Oligonukleotidprimer nicht an Schaf- oder Ziegen-DNA anlagern und nur bovine DNA amplifizieren. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches erfolgte nach den in Tabelle 9 beschriebenen Angaben, die Amplifikationsbedingungen der PCR sind in Tabelle 15 aufgeführt. Die Proben verblieben bis zur Entnahme und anschließender gelelektrischer Auftrennung nach 3.4.1.1 bei 4 °C im Thermocycler.

Tabelle 15: Amplifikationsbedingungen der PCR zum Nachweis boviner DNA unter Verwendung der spezies-spezifischen Oligonukleotidprimer nach MAUDET und TABERLET (2001)

Zyklen	Temperatur °C	Dauer	Amplifizierungsschritt
1	95	4 min	Initiale Denaturierung
30	95	60 sec	Denaturierung
	59	60 sec	Primeranlagerung
	72	60 sec	Polymerisierung
1	72	7 min	Renaturierung

3.5.2 Amplifizierung eines für bovine DNA spezifischen Abschnitts des mitochondrialen Genoms nach HERMAN (2001)

Zur Amplifizierung eines für bovine DNA spezifischen Abschnitts des mt-*cytb*-Gens von der nach 3.3.1.1 extrahierten DNA wurden die von HERMAN (2001) beschriebenen Primer 1 und Primer 2 (Tabelle 14) verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches sowie die Durchführung der PCR erfolgten nach den in Tabelle 17 beschriebenen Angaben. Das verwendete Temperaturprogramm wird in Tabelle 16 beschrieben. Die Proben verblieben bis zur Entnahme und gelelektrischer Auftrennung nach 3.4.1.1 bei 4 °C im Thermocycler.

Tabelle 16: Amplifikationsbedingungen der PCR unter Verwendung der für bovine DNA spezifischen Primer nach HERMAN (2001)

Zyklen	Temperatur °C	Dauer	Amplifizierungsschritt
1	95	4 min	Initiale Denaturierung
35	95	30 sec	Denaturierung
	54	30 sec	Primeranlagerung
	72	30 sec	Polymerisierung
1	72	7 min	Renaturierung

3.5.3 Amplifizierung eines für bovine DNA spezifischen Abschnitts des mitochondrialen Genoms nach BOTTERO *et al.* (2002)

Die Amplifizierung eines - für bovine DNA spezifischen - Abschnitts des mt-*cytb*-Gens der aus Milch- und Käseproben extrahierten DNA (3.3.1.1) nach BOTTERO *et al.* (2002) erfolgte unter Verwendung der von diesen Autoren beschriebenen Primer L-14814 und H-15092. Die Primer wurden nach Angaben der Autoren anhand der bovinen Gensequenz der Datenbank (NCBI) mit der Zugangsnummer J01394 synthetisiert. Der Reaktionsansatz setzte sich wie in Tabelle 17 beschrieben zusammen. Nach gründlichem Mischen wurden

jeweils 27,5 µl des Reaktionsansatzes in 0,2 ml-Reaktionsgefäße pipettiert und 2,5 µl der nach 3.3.1.1 präparierten DNA zugegeben. Die PCR erfolgte nach dem Temperaturprogramm in Tabelle 18. Die Proben verblieben nach Ablauf des Programms bis zur Entnahme bei 4 °C im Thermocycler. Die Auswertung der Amplifikate erfolgte wie in 3.4.1.1 beschrieben.

Tabelle 17: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes nach HERMANN (2001) sowie BOTTERO *et al.* (2002)

Substanz	Menge
Aqua bidest.	19,5 µl
Reaktionspuffer	3,0 µl
MgCl ₂ (25 mmol/l)	1,8 µl
dNTP (10 mmol/l je Nukleotid)	1,0 µl
Primer I (10 µmol/l)	1,0 µl
Primer II (10 µmol/l)	1,0 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Extrahierte DNA	2,5 µl

Tabelle 18: Amplifikationsbedingungen für die PCR unter Verwendung der Primer nach BOTTERO *et al.* (2002)

Zyklen	Temperatur °C	Dauer	Amplifizierungsschritt
1	94	4 min	Initiale Denaturierung
35	94	30 sec	Denaturierung
	52	30 sec	Primeranlagerung
	72	30 sec	Polymerisierung
1	72	7 min	Renaturierung

3.6 Etablierung eines Routineverfahrens zum Nachweis Kuh-spezifischer DNA in Ziegenmilcherzeugnissen

Aufgrund der Resultate der in 3.3 - 3.5 beschriebenen Experimente wurde im Folgenden eine Standardmethode zum Nachweis Kuh-spezifischer DNA in Ziegenmilcherzeugnissen etabliert. Die nach 3.3.1.1 aus den Milch- und Käseproben extrahierte DNA wurde mit der PCR nach BOTTERO *et al.* (2002) vervielfältigt (3.5.3) und anschließend gelelektrophoretisch nach 3.4.1.1 aufgetrennt und ausgewertet. Eine detaillierte Methodenbeschreibung findet sich im Anhang 9.1.

3.6.1 Überprüfung der Sensitivität der Standardmethode

Zur Überprüfung der Sensitivität der erarbeiteten PCR-Standardmethode nach BOTTERO *et al.* (2002) wurden in mehreren Untersuchungsgängen Milch- bzw. Käseproben aus 100 % Ziegenmilch künstlich mit Kuhmilch (n = 84) bzw. Kuhkäse (n = 103) in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt (3.3.2) und mit der Standardmethode untersucht.

3.6.2 Überprüfung der Spezifität der Standardmethode

Zur Überprüfung der Spezifität der Standardmethode wurde zunächst Milch (Kuhmilch, n = 45; Ziegenmilch, n = 29) und Käse (Kuhmilchkäse, n = 7), aus dem Einzelhandel sowie Milch von Direktvermarktern bezogen und unter den Bedingungen der PCR-Standardmethode untersucht.

Um rassebedingte Variabilitäten der entsprechenden zu amplifizierenden Gensequenzen ausschließen zu können, wurde die Standardmethode mit Kuh- bzw. Ziegenrohmilch verschiedener Rassen (3.2.1) überprüft. Zusätzlich wurde Rohmilch anderer Tierarten wie Schaf, Büffel, Kamel und Stute mit der Standardmethode überprüft.

3.6.3 Anwendung des entwickelten Standardverfahrens zum Nachweis von Kuhmilch in Erzeugnissen aus Ziegenmilch

Zur Überprüfung der Produktauthentizität der in Hessen auf dem Markt befindlichen Ziegenmilcherzeugnisse wurden 165 verschiedene Proben (Käse, n = 153; Frischkäse (Quark), n = 6; Joghurt, n = 5; Konsummilch, n = 1) mit der Standardmethode überprüft. Diese Proben waren überwiegend als reine Ziegenmilcherzeugnisse deklariert (n = 160), teilweise handelte es sich um deklarierte Mischungen aus Ziegen- und Kuhmilch (n = 5). Bei der Auswahl der Produkte wurde auf eine gleichmäßige Verteilung zwischen konventioneller (n = 81) und ökologischer Herstellung (n = 84) geachtet. Die Proben wurden nach 3.3.1.1 aufbereitet und unter Verwendung der entwickelten Standardmethode (3.6) untersucht.

3.7 Vergleichsuntersuchung mit einem enzymimmunologischen Testverfahren

Zur orientierenden Untersuchung der Vergleichbarkeit der Standardmethode mit einem enzymimmunologischen Verfahren wurden Käseproben stichprobenartig (Rohmilchkäse, n = 4; Käse aus pasteurisierter Milch, n = 9) mittels eines kommerziellen Mikrotiterplatten-Enzymimmuntests (Ridascreen[®] cis) auf der Basis von Antikörpern gegen bovines IgG untersucht. Die Milchproben wurden entsprechend der Testvorschrift des Herstellers 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt und je 100 µl pro Kavität im Test eingesetzt. Käseproben (1 g) wurden mit 10 ml Aqua dest. versetzt, homogenisiert und 10 min zentrifugiert (4000 x g bei 15 °C). Anschließend wurden je 100 µl des Überstands pro Kavität in den Test eingesetzt.

Alle Proben sowie die im Testkit enthaltenen Standardlösungen wurden im Doppelansatz untersucht. Die Auswertung der Farbreaktion des Testsystems erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm.

3.8 Orientierende Untersuchungen zur Eignung des mt-cytb-Gens zum speziesspezifischen Nachweis der Milch verschiedener Tierarten

Der speziesspezifische Tierartennachweis dient nicht nur der Detektion von Verfälschungen, sondern kann umgekehrt in Lebensmitteln tierischen Ursprungs auch zur Bestätigung der Herkunft der verwendeten Rohstoffe von einer bestimmten Tierart dienen. Dies ist nicht nur für Lebensmittel interessant, sondern auch für Kosmetika, z. B. Pflegeprodukte aus Stutenmilch. Anhand von Gensequenzen aus der Gendatenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) wurden spezifische Primer auf Basis des mt-cytb-Gens für Ziege (*Capra hircus*), Schaf (*Ovis aries*), Büffel (*Bubalus bubalis*), Kamel (*Camelus dromedarius*) und Pferd (*Equus caballus*) synthetisiert (Tabelle 19) und im Hinblick auf ihre Eignung zur Etablierung entsprechender PCR-Verfahren orientierend überprüft.

Tabelle 19: Zielgen und Sequenzen der Primerpaare zum spezifischen Nachweis verschiedener Tierarten (Ziege, Schaf, Büffel, Kamel und Pferd)

Zielgen	Bezeichnung	Zielsequenz der Primer („forward“/„reverse“)
<i>Capra hircus</i> , cytb	mt-Goat-I	5'-CATACATATCGGACGAGGTC-3'
	mt-Goat-II	5'-GTAATATTAGAACAAGAATTAGTAGC-3'
<i>Ovis aries</i> , cytb	mt-Sheep-I	5'-ATTAGTCAATGTATATTCTGAATCTTAGG-3'
	mt-Sheep-II	5'-GAGGTTATTTTCGATAGTGCTAGCTAC-3'
<i>Bubalus bubalis</i> , cytb	mt-Buffalo-I	5'-ACACGTAGGACGAGGCATATAC-3'
	mt-Buffalo-II	5'-CCATTCAGGCTTGATGTGG-3'
<i>Camelus dromedarius</i> , cytb	mt-Camel-I	5'-CTGAAACGTTGGAATTG-3'
	mt-Camel-II	5'-ACTAATGGGACGGAATG-3'
<i>Equus caballus</i> , cytb	mt-Horse-I	5'-ATGAATTATCCGCTACCTC-3'
	mt-Horse-II	5'-AAATAGTAAATGTACGACTACC-3'

3.8.1 Amplifizierung eines Ziegen-spezifischen Abschnitts des mt-cytb-Gens

Zur Amplifizierung eines Ziegen-spezifischen (*Capra hircus*) Abschnitts des mt-cytb-Gens aus Ziegenmilch- und Ziegenkäseproben wurden die Primer mt-Goat-I und mt-Goat-II (Tabelle 19) ausgewählt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes nach den in Tabelle 17 beschriebenen Angaben. Die PCR wurde wie in Tabelle 20 beschrieben durchgeführt. Die Proben verblieben bis zur Entnahme bei 4 °C im Thermocycler. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate erfolgte wie in 3.4.1.1 beschrieben.

Tabelle 20: Amplifikationsbedingungen der PCR unter Einsatz Ziegen-spezifischer Primer (mt-Goat-I und mt-Goat-II).

Zyklen	Temperatur °C	Dauer	Amplifizierungsschritt
1	95	4 min	Initiale Denaturierung
35	95	60 sec	Denaturierung
	59	60 sec	Primeranlagerung
	72	60 sec	Polymerisierung
1	72	7 min	Renaturierung

3.8.2 Amplifizierung eines Schaf-spezifischen Abschnitts des mt-cytb-Gens

Die Amplifizierung eines Schaf-spezifischen (*Ovis aries*) Genabschnittes des mt-cytb-Gens aus nach 3.3.1.1 extrahierter DNA aus Schafmilch und Schafkäse erfolgte mit den Primern mt-Sheep-I und mt-Sheep-II (Tabelle 19). Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes erfolgte nach Tabelle 17, die PCR wurde nach den Angaben in Tabelle 21. Die Proben verblieben bis zur Entnahme bei 4 °C im Thermocycler. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte wie in 3.4.1.1 beschrieben.

Tabelle 21: Amplifikationsbedingungen der PCR unter Einsatz Schaf-spezifischer Primer (mt-Sheep-I und mt-Sheep-II).

Zyklen	Temperatur °C	Dauer	Amplifizierungsschritt
1	95	4 min	Initiale Denaturierung
35	95	20 sec	Denaturierung
	59	25 sec	Primeranlagerung
	72	20 sec	Polymerisierung
1	72	7 min	Renaturierung

3.8.3 Amplifizierung eines Büffel-spezifischen Abschnitts des mt-cyfb-Gens

Die Amplifizierung eines Büffel-spezifischen (*Bubalus bubalis*) Genabschnittes des mt-cyfb-Gens von nach 3.3.1.1 extrahierter DNA aus Büffelmilch bzw. -käse erfolgte mit den Primer mt-Buffalo-I und mt-Buffalo-II (Tabelle 19). Der Reaktionsansatz erfolgt nach Tabelle 17, die PCR nach Tabelle 22. Die Proben verblieben bis zur Entnahme bei 4 °C im Thermocycler. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte wie in 3.4.1.1 beschrieben.

Tabelle 22: Amplifikationsbedingungen der PCR unter Einsatz Büffel-spezifischer Primer (mt-Buffalo-I und mt-Buffalo-II).

Zyklen	Temperatur °C	Dauer	Amplifizierungsschritt
1	95	4 min	Initiale Denaturierung
35	95	30 sec	Denaturierung
	59	30 sec	Primeranlagerung
	72	30 sec	Polymerisierung
1	72	7 min	Renaturierung

3.8.4 Amplifizierung eines Kamel-spezifischen Abschnitts des mt-cytb-Gens

Zur Amplifizierung eines für das Kamel (*Camelus dromedarius*) speziesspezifischen Genabschnittes nach DNA-Extraktion aus Kamelmilch (3.3.1.1) wurden die Primer mt-Camel-I und mt-Camel-II (Tabelle 19) eingesetzt. Der Reaktionsansatz setzte sich nach Tabelle 17 zusammen und die PCR wurde wie in Tabelle 23 beschrieben durchgeführt. Die Proben verblieben bis zur Entnahme bei 4 °C im Thermocycler. Die Amplifikate wurden wie in 3.4.1.1 beschrieben aufgetrennt.

Tabelle 23: Amplifikationsbedingungen der PCR unter Einsatz der Kamel-spezifischen Primer (mt-Camel-I und mt-Camel-II) sowie der Pferd-spezifischen Primer (mt-Horse-I und mt-Horse-II).

Zyklen	Temperatur °C	Dauer	Amplifizierungsschritt
1	95	4 min	Initiale Denaturierung
30	95	15 sec	Denaturierung
	55	10 sec	Primeranlagerung
	72	15 sec	Polymerisierung
1	72	7 min	Renaturierung

3.8.5 Amplifizierung eines Pferde-spezifischen Abschnitts des mt-cytb-Gens

Zur Amplifizierung eines equinen (*Equus caballus*) Genabschnittes nach DNA-Extraktion aus Stutenmilch (3.3.1.1) wurden die Primer mt-Horse-I und mt-Horse-II (Tabelle 19) eingesetzt. Der Reaktionsansatz erfolgte nach Tabelle 15, die PCR wurde wie in Tabelle 23 beschrieben durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 DNA-Extraktion

Zur Ermittlung eines geeigneten Extraktionsverfahrens für DNA aus Milch- und Käseproben wurden drei verschiedene Methoden getestet. Die extrahierte DNA wurde jeweils mittels universeller Oligonukleotidprimer amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Methode unter Verwendung des NET-Puffers erwies sich mit einer Ausbeute von 78 % am Effizientesten (Tabelle 24). Als geeignete Probenvolumina zur DNA-Extraktion wurden 600 µl Milch (Tabelle 25) bzw. 500 µl homogenisierter Käse ermittelt.

Tabelle 24: Untersuchung verschiedener Verfahren zur DNA-Extraktion aus Milch

	Extraktionsverfahren		
	NET-Puffer	QiAMP Mini Stool Kit	TE-Puffer
Extraktionsansätze	105	30	10
positive DNA-Nachweise (n)	82	19	0
% positive Ergebnisse	78	63,3	0

Tabelle 25: Einfluss verschiedener Probenvolumina zur DNA-Extraktion aus Milch auf die Anzahl positiver DNA-Nachweise in der PCR (universeller Primer)

Probenvolumina	1000 µl	600 µl	500 µl	200 µl	100 µl	50 µl
Anzahl Probenansätze	17	74	2	63	73	8
positive DNA-Nachweise (n)	16	70	2	53	54	6
% positive Ergebnisse	94,1	94,6	100	84,1	73,9	75

4.2 PCR-Methoden auf Basis universeller Oligonukleotidprimer

4.2.1 Amplifizierung eines DNA-Abschnitts des *mt-cytb*-Gens nach MEYER *et al.* (1995)

Unter Verwendung der universellen Primer L-14841 und H-15149 (3.4.1) konnte das *mt-cytb*-Gen aus 681 von 747 Extraktionsansätzen der insgesamt untersuchten 359 Milch- bzw. Käseproben amplifiziert werden (Tabelle 26). Das Amplikon wies jeweils die von MEYER *et al.* (1995) beschriebene einheitliche Größe von 359 Bp auf (Abbildung 3).

Tabelle 26: Untersuchung von Milcherzeugnissen verschiedener Tierarten mittels PCR nach MEYER *et al.* (1995)

Probenmaterial	Proben- anzahl n	Extraktions- ansätze n	PCR-Nachweis (359 Bp Bande)	
			Positives Ergebnis n	% positive Ergebnisse
Kuhmilch	46	175	145	82,8
Ziegenmilch	36	151	147	97,4
Schafmilch	10	34	31	91,2
Pferdemilch	6	31	13	41,9
Kamelmilch	3	12	10	83,3
Schafkäse	4	36	35	97,2
Kuhkäse	5	20	14	70
Ziegenkäse	7	32	32	100
Büffelkäse	4	18	18	100
mit Kuhmilch gemischter Büffelkäse	4	4	4	100
mit Kuhmilch gemischte Ziegenmilch	112	112	111	99,1
mit Kuhkäse gemischter Ziegenkäse	122	122	121	99,1

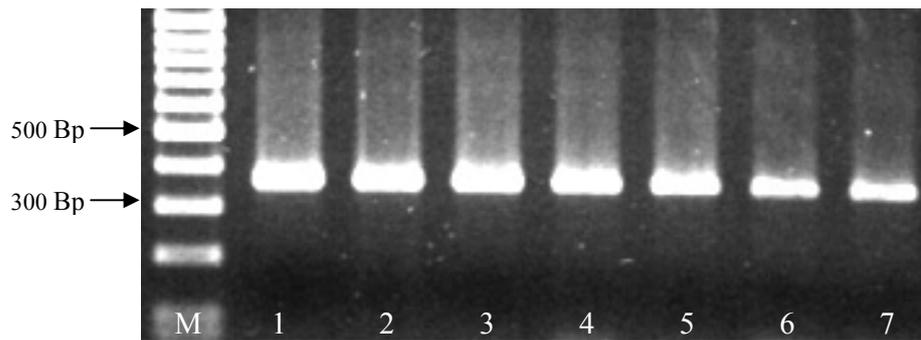


Abbildung 3: Typische Amplikons (359 Bp) des mt-cytb-Gens aus Rind (1, 2, 3)- und Ziegen- (4, 5, 6, 7) DNA nach Verwendung der Primer L-14841 und H-15149 nach MEYER *et al.* (1995); M= Marker, Gene[®]Ruler 100 Bp Ladder

4.2.2 Restriktionsverdau des mt-cytb-Genamplifikates nach der PCR beschrieben von MEYER *et al.* (1995)

Zur weiteren tierartenspezifischen Differenzierung der nach MEYER *et al.* (1995) vervielfältigten Amplikons, wurden die Amplifikate in einem Restriktionsenzymverdau nach 3.4.1.2 eingesetzt. Hierbei sollte das universelle Amplikon mit einer Größe von 359 Bp durch unterschiedliche Enzyme in verschieden große Fragmente geschnitten werden, die eine Unterscheidung der Tierarten zulassen.

4.2.2.1 Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme für den tierartenspezifischen Nachweis mit dem Computerprogramm Clone Manager 4.0

Eine Simulation des Restriktionsverdaus der nach MEYER *et al.* (1995) amplifizierten mt-cytb-Gensequenzen von Rind (NCBI AF419237), Ziege (NCBI AB004069), Schaf (NCBI AB006800); Büffel (NCBI D82893), Kamel (NCBI U06426) und Pferd (NCBI X79547), ergab die in Tabelle 27 zusammengestellten Reaktionsmuster. Aufgrund dieser Ergebnisse, die eine eindeutige Tierartendifferenzierung zulassen, wurden die Enzyme *HaeIII*, *Hinfi*, *SspI*, *TasI* bzw. *Bsh1236I* in praktischen Versuchen eingesetzt.

Tabelle 27: Mittels Clone Manager 4.0 errechnete Größen der Restriktionsfragmente des nach MEYER *et al.* (1995) amplifizierten mt-*cytb*-Gens (359 Bp) nach simuliertem Restriktionsverdau

Spezies (NCBI)	Errechnete Fragmentgrößen der Amplikons (359 bp) nach Restriktionsenzymverdau mit				
	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>SspI</i>	<i>TspEI (TasI)</i>	<i>Bsh1236I</i>
Rind (AF 419237)	285 74	198 117 44	247 87	336 23	–
Ziege (AB 004069)	230 74 55	198 161	196 163	210 106 43	294 65
Schaf (AB006800)	159 126 74	198 161	188 162 8	198 108 52	–
Büffel (D82893)	286 73	–	195 164	120 108 79 52	–
Kamel (U06426)	–	199 160	351 8	225 82 52	229 130
Pferd (X79547)	159 105 73 22	234 81 44	196 163	199 160	229 130

– = kein Restriktionsmuster

4.2.2.2 Verdau des mt-*cytb*-Gens nach MEYER *et al.* (1995) mit den in simulierten Vorversuchen ausgewählten Restriktionsenzymen

Die zur Tierartendifferenzierung geeigneten Enzyme wurden in der praktischen Anwendung zum Restriktionsverdau des universellen Amplikons eingesetzt. Nach PCR-Amplifizierung des mt-*cytb*-Gens nach MEYER *et al.* (1995) der Tierarten Rind, Ziege, Schaf, Pferd, Büffel und Kamel (4.2.1) erfolgte eine Überprüfung der Amplifikate durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *HaeIII*, *HinfI*, *SspI*, *TasI* bzw. *Bsh1236I*. Danach konnten die errechneten hypothetischen Fragmentgrößen mit den tatsächlich erhaltenen verglichen werden. Die nach Restriktionsverdau experimentell entstandenen, d. h. nach gelelektrophoretischer Auftrennung erhaltenen Fragmente für die Tierarten Rind, Ziege, Schaf, Büffel, Kamel und Pferd entsprachen jeweils den in Tabelle 77 aufgeführten Werten. Typische Ergebnisse sind in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt.

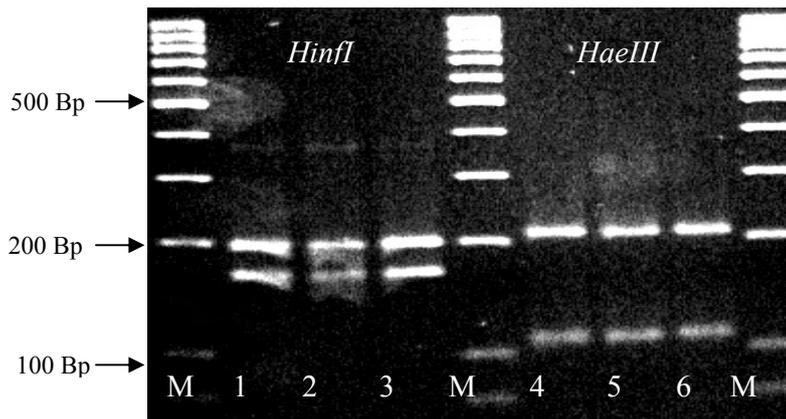


Abbildung 4: Charakteristisches Restriktionsmuster für Ziegen-DNA nach PCR und RFLP-Analyse nach MEYER *et al.* (1995). M= Marker (Gene[®]Ruler 100 Bp Ladder).

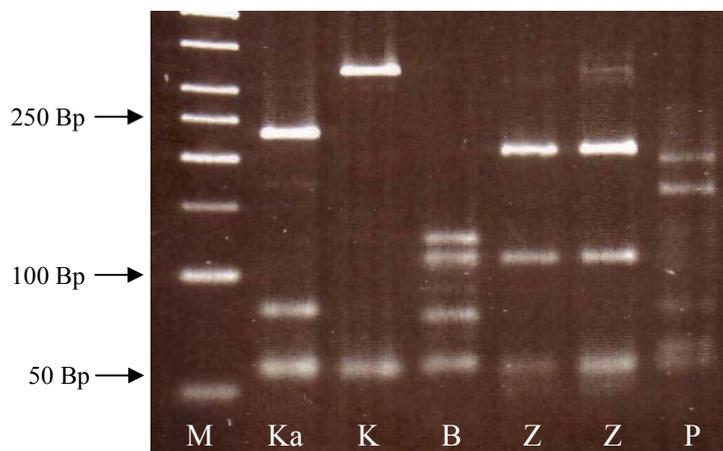


Abbildung 5: Restriktionsverdau mit dem Enzym *TasI* nach PCR mit dem universellen Primer nach MEYER *et al.* (1995) von Kamel- (Ka), Kuh- (K), Büffel- (B), Ziegen- (Z) bzw. Pferde- (Pf) DNA. M= Marker (Gene[®]Ruler 50 Bp Ladder).

Anschließend wurden DNA-Proben verschiedener Kuh- und Ziegenrassen (3.2.1) nach der von MEYER *et al.* (1995) beschriebenen Methode amplifiziert und mit den Enzymen *HaeIII*, *Hinfl*, *SspI*, *TasI* bzw. *Bsh1236I* geschnitten, um die spezifischen Schnittstellen der Enzyme auf Rasseunterschiede innerhalb einer Spezies zu untersuchen. Die Versuche ergaben, dass die Restriktionsenzyme die entsprechende DNA Ziegen- bzw. Rindspezifisch und nicht rassespezifisch schneiden. Daraus folgt, dass die rassebedingten Unterschiede in den Gensequenzen nicht an den spezifischen Schnittstellen der hier eingesetzten Enzyme liegen.

Nach der Amplifizierung des mt-*cytb*-Gens (4.2.1) nach MEYER *et al.* (1995) aus artifiziell gemischten Käse- und Milchproben (50 % - 0,01 %) und anschließendem Restriktionsverdau konnten in 19 von 20 Versuchen lediglich die für Ziegen-DNA charakteristischen Fragmente gelelektrophoretisch nachgewiesen werden, Kuh-spezifische Banden waren in keinem dieser Probenansätze erkennbar. Der Restriktionsenzymverdau lieferte somit für die Identifikation gemischter Milch- und Käseproben keine brauchbaren Ergebnisse. Auch eine Erhöhung der Enzymmenge konnte keine besseren Ergebnisse liefern. Aufgrund der falsch negativen Ergebnisse wurde auf die weitere Anwendung der PCR-RFLP verzichtet.

4.2.3 Amplifizierung eines DNA-Abschnitts des mitochondrialen Gens nach MAUDET und TABERLET (2001)

Nach der Amplifizierung eines Abschnitts des mitochondrialen Gens mit den von MAUDET und TABERLET (2001) beschriebenen universellen Primer (3.4.2) konnten in 14 von 15 Experimenten unter Verwendung von 100 % reiner Kuh- und Ziegenmilch bzw. reinem Kuhkäse die entsprechenden Banden für Ziegen-DNA mit einer Größe von 987 Bp und für Kuh-DNA mit einer Größe von 724 Bp gelelektrophoretisch nachgewiesen werden (Abbildung 6). Diese Ergebnisse, sowie die der Untersuchung artifiziell gemischter Ziegenmilch bzw. -käseproben, sind in Tabelle 28 dargestellt. Die Amplifizierung der DNA aus artifiziell gemischten Milchproben ergab in 15 von 25 Ansätzen statt der erwarteten zwei Banden nur eine Bande mit einer Größe von 724 Bp und in 4 Ansätzen nur eine Bande mit einer Größe von 987 Bp. Bei 5 weiteren gemischten Proben konnte kein Amplikon nachgewiesen werden. Die Amplifizierung der DNA-Extrakte aus gemischten Käseproben hingegen ergab in 19 von 32 Untersuchungen die erwarteten Amplikons mit der Größe von 724 sowie 987 Bp. Aufgrund der falsch negativen Ergebnisse in der Untersuchung der artifiziell gemischten Proben wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

Tabelle 28: PCR-Nachweis (Banden mit einer Größe von 724 Bp (Kuh) bzw. 987 Bp (Ziege)) nach Amplifizierung mit den universellen Primer nach MAUDET und TABERLET (2001) aus Kuh- und Ziegenmilcherzeugnissen

Probenmaterial	Proben- Anzahl n	Extraktions- ansätze n	PCR-Ergebnisse (724 bzw. 987 Bp Banden)			
			Ziege (987 Bp)	Kuh (724 Bp)	Kuh und Ziege	% positive Isolate
Kuhmilch	3	3	-	-	3	100
Ziegenmilch	7	7	-	-	7	100
Stutenmilch	2	2	0	0	0	0
mit Kuhmilch gemischte Ziegenmilch	25	25	4	15	1	4
Kuhkäse	5	5	-	-	4	80
mit Kuhkäse gemischter Ziegenkäse	32	32	-	-	19	59,4

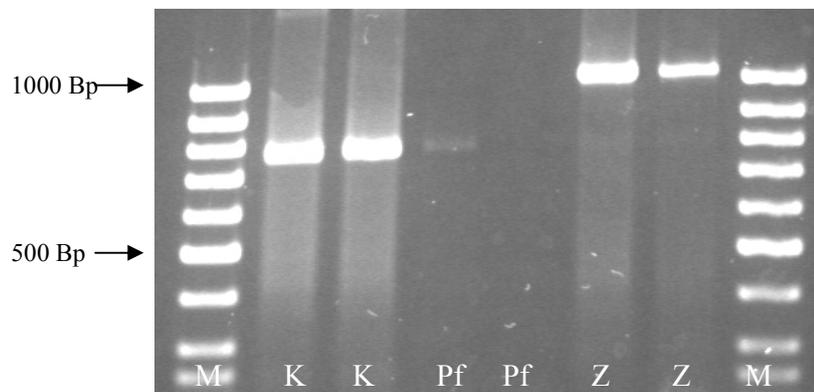


Abbildung 6: Typische Amplikons für Kuh- (724 Bp), Pferde- (kein Amplikon) und Ziegen-DNA (987 Bp) nach PCR mit der Methode von MAUDET und TABERLET (2001) und gelelektrophoretischer Auftrennung. M= Marker (Gene® Ruler 100 Bp Ladder).

4.2.4 Amplifizierung eines DNA-Abschnitts des mitochondrialen Gens nach ZEHNER *et al.* (1998)

Die Ergebnisse der PCR unter Verwendung der von ZEHNER *et al.* (1998) beschriebenen universellen Primer 1 und 2 (3.4.3) sind in Tabelle 29 aufgelistet. Das in der Gelelektrophorese aufgetrennte Amplikon wies jeweils eine Größe von 921 Basenpaaren auf und entsprach damit der von ZEHNER *et al.* (1998) beschriebenen Größe. Aufgrund der festgestellten geringen Effizienz der Amplifikation und dem damit verbundenen hohen Anteil falsch negativer Ergebnisse wurde jedoch auf eine weitere Anwendung dieser Methode verzichtet.

Tabelle 29: Ergebnisse des PCR-Nachweises mit der Methode von ZEHNER *et al.* (1998)

Probenmaterial	Probenanzahl n	Extraktions Ansätze n	PCR-Nachweis (921 Bp Bande)	
			Positives Ergebnis	% positive Ergebnisse
Kuhmilch	16	63	35	55,5
Ziegenmilch	2	4	3	75
Schafmilch	2	2	2	100
Stutenmilch	1	4	3	75
mit Kuhmilch gemischte Ziegenmilch	2	2	1	50

4.3 PCR-Methoden auf Basis speziesspezifischer Oligonukleotidprimer zum Nachweis mitochondrialer DNA

Nach Abschluss der Untersuchungen mit den universellen Primer wurden speziesspezifische Primer zur Tierartendifferenzierung getestet. Es wurden die in der Literatur von MAUDET und TABERLET (2001), HERMAN (2001) und BOTTERO *et al.* (2002) beschriebenen Primer eingesetzt (Tabelle 14).

4.3.1 Amplifizierung eines für bovine DNA spezifischen Abschnitts des mitochondrialen Genoms mit den Oligonukleotidprimern nach MAUDET und TABERLET (2001)

Nach Amplifizierung des mitochondrialen Genabschnitts mit den Primern BosL-15794 und BosH-16102 nach der Methode von MAUDET und TABERLET (2001) wurde in allen Isolaten aus Kuhmilchproben (n = 6) sowie allen Kuhkäseproben (n = 6) die für bovine DNA spezifischen Amplifikate mit einer Größe von 413 Bp gelelektrophoretisch nachgewiesen. Die Ergebnisse der Versuche mit DNA anderer Tierarten sind in Tabelle 30 aufgeführt. Hier zeigte sich, dass gemischte Proben (Kuh- und Ziegenmilch) einen hohen Anteil falsch-negativer Ergebnisse erbrachten. Daher wurde die Methode nicht weiter verfolgt.

Tabelle 30: Zusammenstellung der PCR Ergebnisse der DNA-Extrakte aus Milch- und Käseproben unter Verwendung der speziesspezifischen Methode nach MAUDET und TABERLET (2001)

Probenmaterial	Probenanzahl n	Extraktionsansätze n	PCR-Nachweis (413 Bp Bande)	
			Positive Ergebnisse	% positive Ergebnisse
Kuhmilch	5	6	6	100
Ziegenmilch	6	6	0	0
Schafmilch	2	2	0	0
mit Kuhmilch gemischte Ziegenmilch	49	49	23	46,9
Kuhkäse	3	6	6	100
Ziegenkäse	3	5	3	60
Schafkäse	1	1	0	0
Büffelkäse	2	4	1	25
mit Kuhkäse gemischter Ziegenkäse	44	44	28	63,6

4.3.2 Amplifizierung eines für bovine DNA spezifischen DNA-Abschnitts des mitochondrialen Gens mit den Oligonukleotidprimer nach HERMAN (2001)

Die Amplifizierung eines von HERMAN (2001) beschriebenen für bovine DNA spezifischen Abschnitts der mtDNA aus 48 Extraktionsansätzen der Kuhmilch bzw. – käseproben (n = 35) mit den vom Autor beschriebenen Oligonukleotidprimern ergab in 47 Versuchen die erwarteten spezifischen DNA-Amplifikate des mt-*cytb*-Gens mit einer Größe von 286 Basenpaaren. Aus 62 Ansätzen artifiziell gemischter Ziegenmilch bzw. – käse konnten jedoch nur in 33 Fällen bovine Amplifikate nachgewiesen werden (Tabelle 31). Die Untersuchung der 38 Ansätzen aus 21 Ziegenmilch- bzw. käseproben ergab 8 Amplifikate mit einer Größe von 286 Bp. Aufgrund des hohen Anteils falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse wurde die Methode als ungeeignet bewertet.

Tabelle 31: Übersicht der PCR Ergebnisse der untersuchten Proben mit der Methode nach HERMAN (2001)

Probenmaterial	Proben- anzahl n	Extraktions- ansätze n	PCR-Nachweise (286 Bp Bande)	
			Positive Ergebnisse	% positive Ergebnisse
Kuhmilch	29	38	38	100
Ziegenmilch	18	32	5	15,6
mit Kuhmilch gemischte Ziegenmilch	35	35	19	54,3
Kuhkäse	6	10	9	90
Ziegenkäse	3	6	3	50
mit Kuhkäse gemischter Ziegenkäse	27	27	14	51,8

4.3.3 Amplifizierung eines für bovine DNA spezifischen DNA-Abschnitts des mitochondrialen Gens mit den Oligonukleotidprimer nach BOTTERO *et al.* (2002)

Unter Verwendung der spezifischen Primer L-14814 und H-15092 (3.5.2.2) nach der von BOTTERO *et al.* (2002) beschriebenen Methode konnten bei allen 60 untersuchten Extraktionsansätzen aus 52 Kuhmilchproben und Kuhkäseproben die erwarteten Kuh-spezifischen DNA-Amplifikate mit einer Größe von 279 Basenpaaren mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Abbildung 7). In Proben reiner Ziegenmilch, Schafmilch, Büffelmilch, Kamelmilch und Stutenmilch ergab die Untersuchung meistens negative Ergebnisse (Tabelle 32). In drei Extraktionsansätzen aus einer einzigen Ziegenkäseprobe konnten Kuh-spezifische Amplifikate mit einer Größe von 279 Bp nachgewiesen werden. Hier konnte, genau wie bei dem untersuchten Schafkäse, nicht geklärt werden, ob es sich um falsch-positive Ergebnisse handelte, oder ob die Probe tatsächlich Kuhmilch enthält. Büffelkäse ergab mit einem deutlichen Anteil der Untersuchungen (78,6 %) ebenfalls positive Ergebnisse. Mit diesem Anteil von falsch-positiven Ergebnissen im Sinne des Nachweises von Kuhmilch war diese Methodik damit den anderen Verfahren deutlich überlegen.

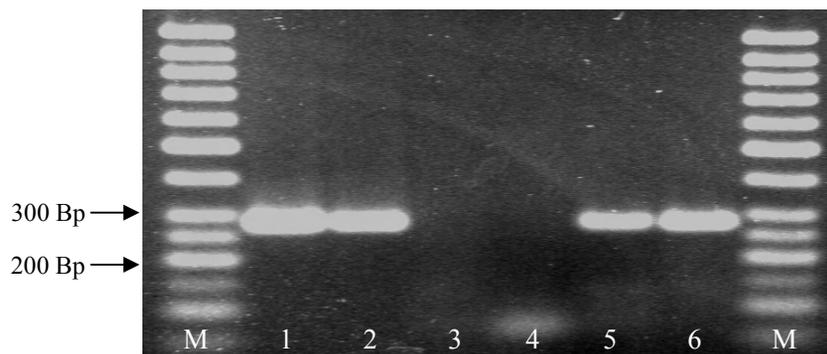


Abbildung 7: Typische Amplikons (279 Bp) aus Kuhkäse (1, 2), Ziegenkäse (3,4) und gemischtem Ziegenkäse (1 % bzw. 20 % Kuhmilch-Anteil) (5, 6) nach PCR unter Verwendung der für bovine DNA spezifischen Oligonukleotidprimer nach BOTTERO *et al.* (2002). M= Marker (Gene®Ruler 50 Bp Ladder).

Tabelle 32: Ergebnisse der Untersuchung verschiedener Milch- und Käseproben mit dem für bovine DNA spezifischen Primer nach BOTTERO *et al.* (2002)

Probenmaterial	Proben- anzahl n	Extraktions- ansätze n	PCR-Nachweis (279 Bp Bande)	
			Positive Ergebnisse	% positive Ergebnisse
Kuhmilch	45	47	47	100
Ziegenmilch	24	32	0	0
Schafmilch	2	5	0	0
Stutenmilch	2	3	0	0
Büffelmilch	1	2	0	0
Kamelmilch	1	2	0	0
Käse aus Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch	3	3	3	100
Kuhkäse	7	13	13	100
Ziegenkäse	7	18	3	16,6
Schafkäse	17	32	13	40,6
Büffelkäse	7	14	11	78,6

4.4 Routineverfahren zum Nachweis boviner DNA in Ziegenmilcherzeugnissen mit der Methode nach BOTTERO *et al.* (2002)

Aufgrund der Ergebnisse der Methodenentwicklung und -optimierung zur Tierartenidentifizierung in Milch und Milcherzeugnissen wurde die Methode nach BOTTERO *et al.* (2002) als Routineverfahren zur weiteren Untersuchung von Erzeugnissen aus Ziegenmilch eingesetzt. Eine detaillierte Beschreibung des hierzu etablierten Untersuchungsprotokolls findet sich im Anhang 9.1-9.3.

4.4.1 Sensitivität der Standardmethode

Die Untersuchung der artifiziell mit unterschiedlichen Mengen Kuhmilch versetzten Ziegenmilchproben mit der Standardmethode (4.4) zeigte ab einem Kuhmilchanteil von 4 % in Ziegenmilch keine falsch negativen Ergebnisse. In einem Konzentrationsbereich zwischen 2 % Kuhmilchzusatz und 0,05 % Kuhmilchzusatz erhöhte sich der Anteil falsch negativer Ergebnisse auf ca. 80 %. Kuhmilchanteile von 0,01 % bzw. 0,005 % ergaben stets negative Ergebnisse. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 bzw. Abbildung 8 dargestellt.

Tabelle 33: Nachweis von Amplifikaten boviner DNA nach Untersuchung von artifiziell mit Kuhmilch vermischten Ziegenmilchproben mittels der Standardmethode

Kuhmilch- anteil in Ziegenmilch	n	Nachweis Kuh-spezifischer Amplifikate (279 Bp Bande)	
		Positive Ergebnisse	% positive Ergebnisse
50 %	2	2	100
40 %	2	2	100
30 %	2	2	100
20 %	2	2	100
15 %	2	2	100
10 %	8	8	100
8 %	6	6	100
6 %	6	6	100
4 %	6	6	100
2 %	8	7	87,5
1 %	8	8	100
0,5 %	8	6	75
0,1 %	8	5	62,1
0,05 %	8	2	21,2
0,01 %	6	0	0
0,005 %	2	0	0

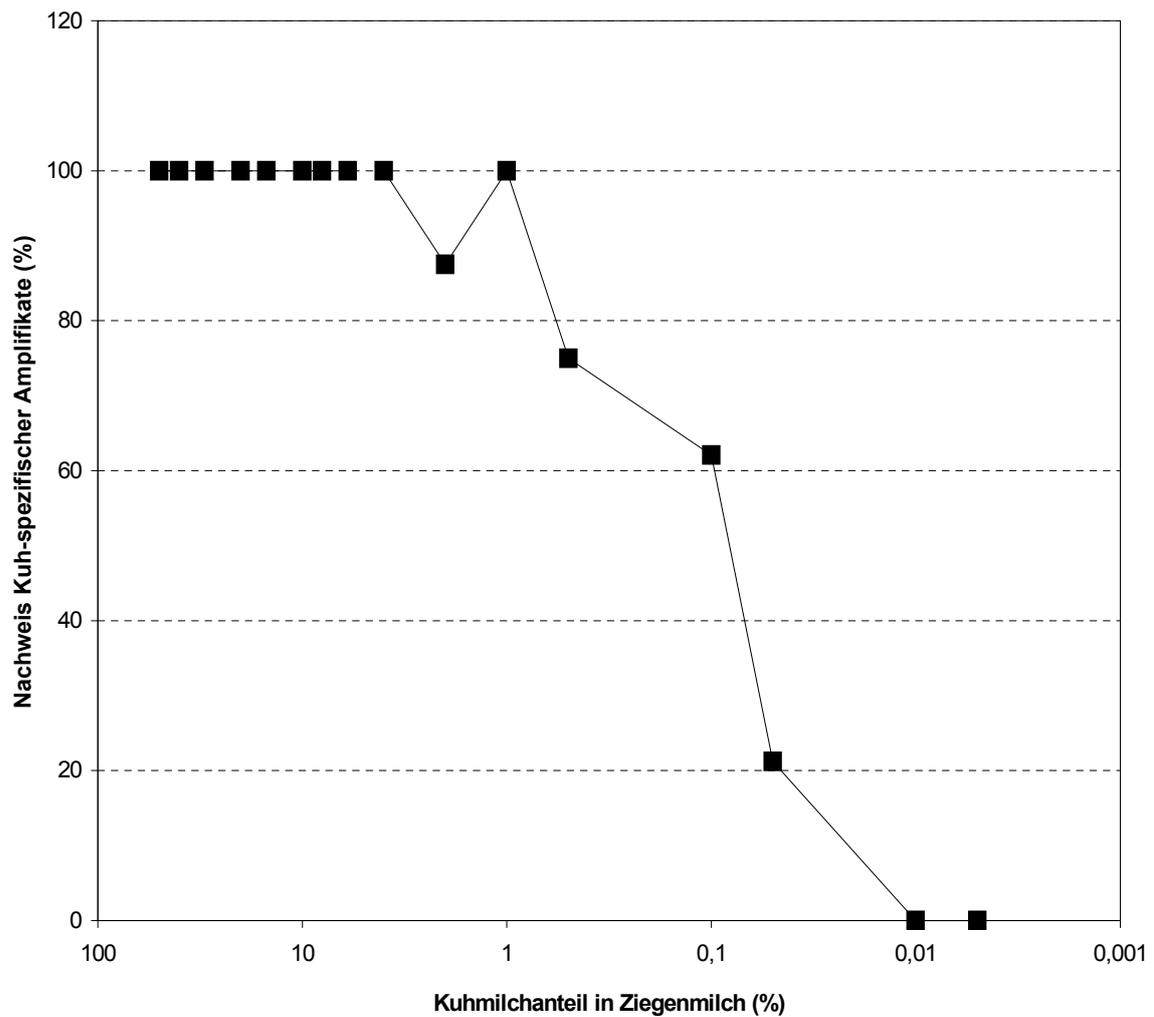


Abbildung 8: Nachweis von Amplifikaten boviner DNA in mit Kuhmilch gemischter Ziegenmilch (50 % bis 0,005 %) mittels der Standardmethode.

Bei der Untersuchung von artifiziell mit Kuhmilch verfälschtem Ziegenkäse wurde eine sichere Nachweisgrenze von ca. 1 % Kuhmilchanteil festgestellt (Tabelle 34 und Abbildung 9). Eine Konzentration von 0,5 % ergab jedoch in 8 von 12 Versuchen ebenfalls noch positive Ergebnisse.

Tabelle 34: Nachweis von Amplifikaten boviner DNA nach Untersuchung von artifiziell mit Kuhmilch vermischten Ziegenkäseproben mittels der Standardmethode

Kuhmilch- anteil in Ziegenkäse	n	Nachweis Kuh-spezifischer Amplifikate (279 Bp Bande)	
		Positive Ergebnisse	% positive Ergebnisse
30 %	3	3	100
20 %	2	2	100
15 %	3	3	100
10 %	16	16	100
8 %	3	3	100
6 %	3	3	100
5 %	12	11	91,7
4 %	3	3	100
2 %	13	13	100
1 %	19	18	94,7
0,5 %	12	8	66,7
0,1 %	8	2	25
0,05 %	6	0	0

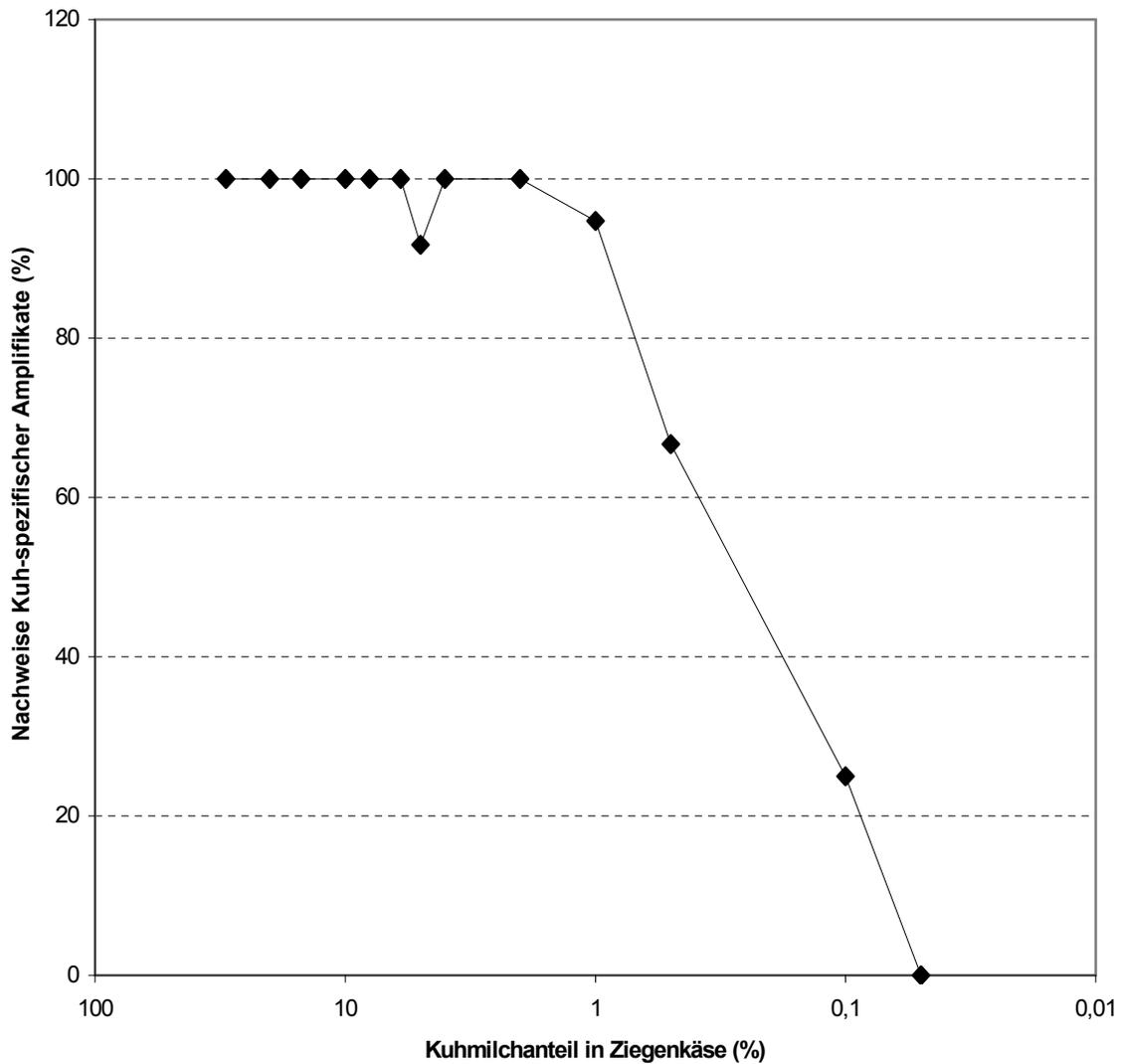


Abbildung 9: Nachweis von Kuh-spezifischen Amplifikaten in mit Kuhmilch gemischtem Ziegenkäse (30 % bis 0,05 %) mittels der Standardmethode

4.4.2 Spezifität der Standardmethode

Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit der Standardmethode (4.4) im Hinblick auf die innerhalb einer Spezies vorkommenden rassebedingten Sequenzvariabilitäten wurden Einzelgemelkproben verschiedener Rassen in die Versuche eingesetzt (Tabelle 35). Die Ergebnisse für verschiedene Kuh- und Ziegenrassen (3.2.2.1) zeigten eine hohe Speziespezifität des Primers nach BOTTERO *et al.* (2002).

Tabelle 35: Überprüfung der Spezifität der Standardmethode im Hinblick auf mögliche rassebedingte Unterschiede mittels Einzelgemelkproben verschiedener Kuh- und Ziegenrassen

Probenmaterial	Proben- anzahl n	Extraktions- ansätze n	PCR Ergebnis (279 Bp Bande)	
			Positive Isolate	% positive Isolate
Kuhmilch gesamt	7	14	14	100
Deutsche Schwarzbunte	1	2	2	100
Deutsche Rotbunte	1	2	2	100
Braunvieh	1	2	2	100
Fleckvieh	1	2	2	100
Jersey	1	2	2	100
Limousin	1	2	2	100
Hinterwäldler	1	2	2	100
Ziegenmilch gesamt	20	31	0	0
Bunte Deutsche Edelziege	7	9	0	0
Weiße Deutsche Edelziege	5	6	0	0
Thüringer Waldziege	4	5	0	0
Walliser Schwarzhalsziege	2	9	0	0
Toggenburger Ziege	2	2	0	0

Aus allen Einzelgemelkproben der sieben getesteten Kuhrassen konnte das charakteristische 279 Bp große Amplikon amplifiziert werden. Erwartungsgemäß gelang dies in den Versuchen mit den Milchproben der fünf getesteten Ziegenrassen mit dem Kuh-spezifischen Primer nicht. In den vorhergehenden Untersuchungen der Milch anderer Tierarten (4.3.3) wie Schaf, Büffel, Kamel oder Stute wurde ebenfalls in keinem Fall eine Amplifikation der entsprechenden Region des mt-*cytb*-Gens festgestellt (Tabelle 32).

4.5 Anwendung der Standardmethode zum Nachweis einer Verfälschung von Ziegenmilcherzeugnissen mit Kuhmilch

Mit der in 4.4 beschriebenen Standardmethode wurden Ziegenmilcherzeugnisse und Ziegenkäse (n gesamt = 165; Käse, n = 153; Frischkäse (Quark), n = 6; Joghurt, n = 5; Milch, n = 1) aus dem Einzelhandel auf deklarierte und nicht deklarierte Kuhmilchzusätze untersucht. Die Proben repräsentierten dabei das im Raum Giessen erhältliche Warenspektrum. Bei einem relativ hohen Anteil der Proben aus dem Einzelhandel handelte es sich um Importerzeugnisse aus französischer Herstellung. Von den untersuchten Proben waren 160 als reine Ziegenmilcherzeugnisse deklariert, 5 enthielten laut Deklaration angegebene Kuhmilchzusätze. Die Herstellungsländer der verschiedenen Produkte sind in Tabelle 36 aufgelistet. Aus deutscher und französischer Herstellung entstammten je 53 Produkte. Die aus Deutschland stammenden Käse waren überwiegend aus ökologischer Produktion, während die Käse aus Frankreich ausschließlich aus konventioneller Produktion stammten. Aus den Niederlanden waren 37 von 45 Ziegenmilcherzeugnissen ökologisch hergestellt, da viele Hersteller dem Öko-Siegel „Eco-Skal“ angehören. Die restlichen Proben verteilten sich auf die Herkunftsländer Griechenland, Schweiz, Italien, Norwegen und Österreich.

Tabelle 36: Übersicht über die Herkunft der untersuchten Probenmaterialien (entsprechend Produktkennzeichnung)

Herkunftsland	Probenanzahl n	davon aus ökologischer Produktion	davon aus konventioneller Produktion
Deutschland	53	38	15
davon Hessen	20	15	5
andere Bundesländer	33	23	10
Frankreich	53	0	53
Niederlande	45	37	8
Griechenland	6	4	2
Schweiz	3	3	0
Italien	2	1	1
Norwegen	2	0	2
Österreich	1	1	0
Gesamt	165	84	81

Insgesamt 21 der 160 als reine Ziegenmilcherzeugnisse deklarierten Käse ergaben ein positives Ergebnis in der Untersuchung mit der Standardmethode. Von den 21 Proben, die hier ein positives Ergebnis für bovines *cytb*-Gen und damit einen Zusatz von Kuhmilch ergaben, stammten 10 aus Frankreich, 8 aus Deutschland und 3 aus den Niederlanden. Insgesamt 11 Proben entstammten konventioneller Produktion, 10 Proben waren ökologisch hergestellt. Tabelle 37 gibt eine Übersicht über die Einzelergebnisse der speziesspezifischen Untersuchung dieser Proben. Die Untersuchung der als Kuhmilch enthaltend deklarierten Proben (n = 5), die alle aus der konventionellen Produktion stammten, ergab in jedem Fall eine Bestätigung der Angaben.

Tabelle 37: Übersicht über die mittels Standardmethode als Kuhmilch-positiv ermittelten Proben

Lfd. Nr.	Käsesorte ¹	Herstellungsland	Ökol. /konven.	Positiv in Verdünnungs- stufe
72	S	D (Bayern)	Ö	1:10
46	F	D (Bayern)	Ö	1:10
23	W	D (Hessen)	Ö	1:10
24	W	D (Hessen)	Ö	1:100
43	W	D (Hessen)	Ö	1:1
94	W	D (Hessen)	Ö	1:100
25	F	D (Saarland)	Ö	1:10
2	F	D (Sachsen)	Ö	1:1
67	W	F	K	1:1
128	W	F	K	1:1
78	W	F	K	1:10
87	F	F	K	1:1
12	W	F	K	1:100
65	F	F	K	1:10
80	W	F	K	1:10
165	W	F	K	1:10
163	W	F	K	1:1
154	S	F	K	1:100
112	S	NL	Ö	1:10
6	S	NL	K	1:100
3	W	NL	Ö	1:1

1 = Frischkäse (F), Weichkäse (W), Schnitt- und Hartkäse (S)

Positive Proben wurden zur quantitativen Abschätzung des Kuhmilchanteils erneut in mehreren Verdünnungsstufen nachuntersucht. Hier zeigte sich, dass 9 Proben nach Verdünnung bis 1:10 und 5 Proben auch nach Verdünnung bis zu 1:100 noch ein positives Ergebnis auf den Nachweis von bovinem *cytb* erbrachten. Weitere 7 Proben waren zwar bei der Nachuntersuchung unverdünnter Proben weiterhin positiv, ergaben aber in Verdünnung (ab 1:10) ein negatives Ergebnis.

4.6 Vergleichsuntersuchung eines Enzymimmuntests und der entwickelte PCR-Methode zum Nachweis von Kuhmilch in Ziegenmilch und in Ziegenkäse

Zur orientierenden Untersuchung der Vergleichbarkeit des in dieser Arbeit erstellten molekularbiologischen Verfahrens mit einem immunchemischen Testsystem wurden Ziegenkäseproben aus Rohmilch (n = 4) sowie aus wärmebehandelter Milch (n = 9) auf Kuhmilchzusatz über den Nachweis von bovinem IgG untersucht. Die Ergebnisse der PCR-Untersuchung von Rohmilchkäsen stimmten jeweils mit denen des ELISA-Tests überein (zwei positive, zwei negative Kuhmilch-Befunde), bei Käsen aus pasteurisierter Milch in sieben Fällen (zwei positive, fünf negative Kuhmilch-Befunde). In einem Fall enthielt der untersuchte Käse laut Deklaration 20 % Kuhsahne. Während mit der PCR-Methode ein positiver Kuhmilch-Nachweis erreicht wurde, ergab der ELISA hier erwartungsgemäß aufgrund des Nachweisprinzips, ein negatives Ergebnis. Im zweiten Fall ergab die Untersuchung mittels ELISA ein nur schwach positives Ergebnis, während mittels PCR-Methode ein stark positives Ergebnis erzielt wurde. Generell lag somit aber unter Berücksichtigung der jeweiligen Methodenparameter eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse vor.

4.7 Orientierende Untersuchungen zur Eignung des *cytb*-Gens als Markersequenz für den speziesspezifischen Nachweis verschiedener Tierarten in Milch und Käse

4.7.1 Nachweis von Ziegenmilch mittels eines speziesspezifischen Genabschnitts des *mt-cytb*-Gens

Nach Verwendung der nach Genomvergleich synthetisierten Primer (3.9.1) für die Amplifikation von Ziegen-spezifischer DNA konnten in allen untersuchten Ziegenmilchproben das spezifische 440 Bp große Amplikon nachgewiesen werden. Die Primer wurden auch in Milch- und Käseproben anderer Tierarten eingesetzt (Tabelle 38). Da die untersuchten Käse alle aus dem Einzelhandel stammen, kann über die Richtigkeit der Etikettenangaben keine Aussage getroffen werden. Somit bedeutet ein negatives Untersuchungsergebnis bei Ziegenkäse nicht zwingend ein Versagen des Primers, sondern kann auch auf ein Fehlen von Ziegenmilch in diesem Käse zurückgeführt werden. Anschließend wurde der Primer in allen untersuchten Handelsproben (n = 165) eingesetzt, um ein Vorhandensein von Ziegenmilch in den Produkten zu bestätigen.

Tabelle 38: Ergebnisse der PCR zum Nachweis Ziegen-spezifischer DNA des *cytb*-Gens

Probenmaterial	Proben- anzahl n	Extraktions- ansätze n	PCR-Nachweise (440 Bp Bande)	
			Positive Isolate	% positive Isolate
Kuhmilch	24	37	0	0
Ziegenmilch	17	27	27	100
Schafmilch	8	14	0	0
Stutenmilch	2	3	0	0
Kamelmilch	2	4	0	0
Kuhkäse	6	10	0	0
Schafkäse insgesamt	5	13	11	84,6
mit Ziegenmilchzusatz	2	7	7	100
Büffelkäse	4	6	0	0
Handelsproben	165	208	192	92,3

In Abbildung 10 ist ein typisches Ergebnis dargestellt. Aufgrund der hohen Spezifität der Primer und der guten Wiederholbarkeit ist dieser Primer gut geeignet, um in Proben aus Milcherzeugnissen sicher einen eventuellen Ziegenmilchanteil festzustellen.

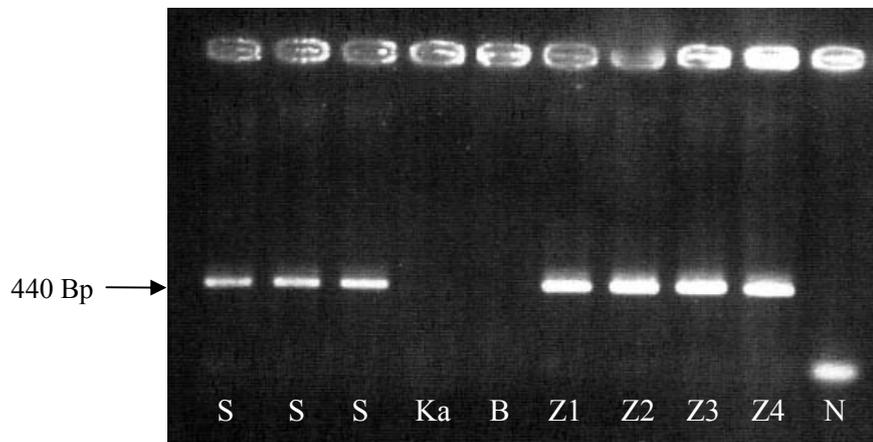


Abbildung 10: Typisches Ergebnis einer PCR mit dem Ziegen-spezifischen Primer. S = Schafkäse mit Ziegenmilch verfeinert; Ka = Kamelmilch; B = Büffelmilch; Z = Ziegenkäse mit 1 = 6 % Kuhmilchanteil; 2 = 10 %; 3 = 20 %; 4 = 30 %; N = Negativkontrolle

4.7.2 Nachweis von Schafmilch mittels eines speziesspezifischen Abschnitts des *mt-cytb*-Gens

Das mit 169 Bp typische Amplikon konnte in 9 von 10 Extraktionsansätzen aus Schafmilch und in 11 von 20 Extraktionsansätzen aus Schafkäse mit dem spezifischen Oligonukleotidprimer amplifiziert und in der Gelelektrophorese dargestellt werden. In keiner PCR mit Milch- bzw. Käseproben anderer Tierarten sowie je einer Probe aus artifiziell mit Kuhmilch gemischter Ziegenmilch- bzw. käse konnte ein Schaf-spezifisches Amplikon nachgewiesen werden (Tabelle 39). Da mit diesem Primer keine hundertprozentige Sicherheit in der Erkennung von Schaf-DNA in prozessierten Milcherzeugnissen gewährleistet werden kann, ist er nur bedingt einsetzbar. Falsch positive Ergebnisse wurden nicht erhalten.

Tabelle 39: Ergebnisse der PCR zum Nachweis Schaf-spezifischer DNA des *cytb*-Gens

Probenmaterial	Proben- anzahl n	Extraktions- ansätze n	PCR-Ergebnisse (169 Bp Bande)	
			Positive Ergebnisse	% positive Ergebnisse
Kuhmilch	3	3	0	0
Ziegenmilch	6	13	0	0
Schafmilch	7	10	9	90
Stutenmilch	1	1	0	0
Kamelmilch	1	1	0	0
mit Kuhmilch gemischte Ziegenmilch	1	1	0	0
Ziegen-/ Schafkäse	1	1	1	100
Schafkäse	13	20	11	55
Büffelkäse	3	5	0	0
mit Kuhmilch gemischter Ziegenkäse	1	2	0	0

4.7.3 Nachweis von Büffelmilch mittels eines speziesspezifischen Abschnitts des *mt-cyrb*-Gens

Aus allen als „Mozzarella di Bufalo“ deklarierten Proben (n = 4) konnte mit den synthetisierten Oligonukleotidprimern ein 529 Bp großes Amplikon amplifiziert werden. Ebenso ergab die Amplifizierung dieses DNA-Abschnitts in 6 von 18 Ansätzen aus Schafsmilch- bzw. Schafskäse, sowie in der Untersuchung eines Käses aus Milch verschiedener Tierarten (Kuh-, Ziegen- und Schafmilch) ein Amplikon von einheitlicher Größe, die der des Büffel-spezifischen Amplikons entspricht (Tabelle 40).

Keine Amplifikate konnten in Proben aus Kuhmilch, Kuhkäse, Ziegenmilch, Ziegenkäse, Kamelmilch und Stutenmilch mit diesen Oligonukleotidprimern nachgewiesen werden. Somit eignet sich dieser Primer nur bedingt für die Überprüfung von Büffelmozzarella auf Fremdmilch, da mit Schaf-DNA, einer möglichen Fremdmilch, Kreuzreaktionen stattfinden können.

Tabelle 40: Ergebnisse der PCR mit einem Büffel-spezifischen Primer

Probenmaterial	Proben- anzahl n	Extraktions- ansätze n	PCR-Ergebnisse (529 Bp Bande)	
			Positive Ergebnisse	% positive Ergebnisse
Kuhmilch	5	5	0	0
Ziegenmilch	2	2	0	0
Schafmilch	6	13	5	38,5
Stutenmilch	1	1	0	0
Kamelmilch	1	1	0	0
Kuhkäse	2	2	0	0
Ziegenkäse	2	2	0	0
Büffelmilch	4	12	12	100
Schafkäse	3	5	1	20
gemischter Kuh-, Schaf-, Ziegenkäse	1	1	1+	0

+ schwach positiv

4.7.4 Nachweis von Kamelmilch mittels eines speziesspezifischen Abschnitts des *mt-cytb*-Gens

Mit den Primer mt-Camel-I und mt-Camel-II konnte in allen Kamelmilchproben (n = 4) ein 609 Bp großes Amplikon nachgewiesen werden. Bei Milch bzw. Käse anderer Tierarten war dagegen unter Verwendung dieser Oligonukleotidprimer keine Amplifizierung der entsprechenden Region möglich (Tabelle 41). Daher könnte diese Methode zum Nachweis von Kamel-DNA in Milcherzeugnissen einsetzbar sein.

Tabelle 41: Ergebnisse der Untersuchung mittels Kamel-spezifischen Primer

Probenmaterial	Proben- anzahl n	Extraktions- ansätze n	PCR-Ergebnisse (609 Bp Bande)	
			Positive Ergebnisse	% positive Ergebnisse
Kuhmilch	4	4	0	0
Schafmilch	4	5	0	0
Stutenmilch	1	2	0	0
Kamelmilch	4	11	11	100
mit Kamelmilch gemischte Kuhmilch	1	1	1	100
Ziegenkäse	13	17	0	0
Schafkäse	3	4	0	0
Büffelkäse	2	2	0	0
mit Kuhmilch gemischter Ziegenkäse	9	9	0	0

4.7.5 Nachweis von Stutenmilch mittels eines speziesspezifischen Genabschnitts des mt-cytb-Gens

Die Amplifizierung nach 3.8.5 ergab in allen 4 Stutenmilchproben ein charakteristisches 370 Bp großes Amplikon. Dieses Amplikon konnte in Proben aus Kuhmilch, Ziegenmilch, Schafmilch, Kamelmilch, artifiziell gemischter Ziegen- und Kuhmilch sowie gemischter Ziegen- und Schafsmilch, Kuhkäse, Schafskäse und Büffelkäse nicht nachgewiesen werden (Tabelle 42). Diese Methode eignet sich somit zum speziesspezifischen Nachweis von Pferde-DNA.

Tabelle 42: Ergebnisse der PCR mit einem pferdespezifischen Primer

Probenmaterial	Proben- anzahl n	Extraktions- ansätze n	PCR-Ergebnisse (370 Bp Bande)	
			Positive Ergebnisse	% positive Ergebnisse
Stutenmilch	4	14	14	100
Ziegenmilch	4	4	0	0
Kuhkäse	1	2	0	0
Kuhmilch	4	4	0	0
Schafmilch	4	4	0	0
Schafkäse	3	4	0	0
Büffelkäse	2	3	0	0
Büffelkäse mit Kuhkäse gemischt	1	1	0	0
Kamelmilch	1	2	0	0
mit Kuhmilch gemischte Ziegenmilch	6	6	0	0

5 DISKUSSION

In zahlreichen Untersuchungen der letzten 20 Jahre wurde immer wieder gezeigt, dass die im Handel angebotenen Ziegenkäse (sowie auch Schafkäse) oft einen nicht deklarierten Kuhmilchanteil aufweisen. Dies stellt grundsätzlich eine Verbrauchertäuschung nach LFGB § 11 dar. Aufgrund der spezifischen Produktionseigenschaften kommt es, im Gegensatz zur Kuhmilch, bei Ziegenmilch zu einem jahreszeitlich schwankenden Milchangebot. Somit ist Ziegenmilch wesentlich teurer als Kuhmilch und eine teilweise oder sogar vollständige Verfälschung, insbesondere von Ziegenkäse, kann daher wirtschaftlich interessant sein. Jedoch ist die Nachweisbarkeit einer solchen Verfälschung nach wie vor schwierig und zeitaufwändig. Die bisher verwendeten Methoden eignen sich oft nur für die Untersuchung bestimmter Milcherzeugnisse, da die jeweils verwendeten Speziesmarker je nach Erzeugnis in unterschiedlichem Ausmaß verändert oder sogar zerstört werden. So werden Caseine im Verlauf der Käsereifung proteolytisch gespalten, während Molkenproteine unter der Hitzeeinwirkung der Wärmebehandlung denaturieren. Dies beeinträchtigt beispielsweise immunchemische Verfahren oder Verfahren auf der Basis der isoelektrischen Fokussierung. So zeigt z. B. der Ridascreen[®] cis-ELISA teilweise um den Faktor 2 erhöhte Werte für Kuhmilchzusatz an oder die vom Hersteller angegebene Sensitivität wird nicht erreicht, wie z. B. beim Rida[®] Quick cis (MOOSHEIMER, 1997). Daher eignen sich diese Methoden nur bedingt zum Nachweis von Kuhmilch in fermentierten und gereiften Milcherzeugnissen wie beispielsweise Ziegenkäse.

Bereits mehrere Autoren haben sich mit dieser Problematik befasst und nach einer alternativen Methode gesucht, welche zuverlässig eine Analyse von Lebensmitteln ohne großen apparativen Aufwand zulässt. Da die PCR in der Lebensmittelhygiene nunmehr weitgehend als Routineverfahren zu bezeichnen ist, schritt in den letzten Jahren auch die Entschlüsselung der Gensequenzen unserer Haustiere weiter voran (ANDERSON *et al.*, 1982; WATANOBE *et al.*, 1999; MANCEAU *et al.*, 1999; TAKADA *et al.*, 1997). Dennoch existiert derzeit kein anerkanntes PCR-Referenzverfahren zum Nachweis von Kuhmilchzusätzen in Ziegenkäse. Die bisher in der Literatur beschriebenen Verfahren bzw. Primersequenzen (MEYER *et al.*, 1995; BANIA *et al.*, 2001; HERMAN, 2001) wurden nicht oder nur rudimentär im Hinblick auf ihre Eignung als Routineverfahren für den Nachweis von Kuhmilch in Ziegenkäse validiert. Dies schließt sowohl die Probenvorbereitung als auch den eigentlichen Nachweis ein. Ziel der vorliegenden Arbeit

war es daher, eine robuste und allgemein einsetzbare Methode auf der Basis der bisher verfügbaren Literaturangaben zu entwickeln. Zudem sollte in orientierenden Untersuchungen die Möglichkeit einer weitergehenden Speziesdifferenzierung der Milch verschiedener Tierarten überprüft werden.

5.1 Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

Zur Etablierung einer geeigneten Methode zur DNA-Extraktion wurden zunächst verschiedene Methoden unter Verwendung kommerzieller bzw. selbst hergestellter Extraktionspuffersysteme getestet. Mit dem „QiAMP Mini Stool Kit“ konnte DNA aus Ziegenmilch zwar zuverlässig extrahiert werden, bei der Extraktion von Kuhmilch war jedoch aufgrund des entstehenden Pellets keine weitere Zugabe von Reagenzien in die 2 ml-Standardröhrchen möglich. Zudem war die Verwendung dieses Kits relativ umständlich und für die Routinediagnostik zu teuer. Eine relativ einfache Extraktion mittels TE-Puffer erwies sich als ungeeignet, da hier kein effizienter DNA-Nachweis möglich war.

Die klassische Methode nach ROMERO und LOPEZ-GOÑI (1999), unter Verwendung des NET-Lysis-Puffers erwies sich dagegen als zuverlässig und einfach in der Anwendung. Die Kontrolle der Extraktion fand mit universellen Primern und anschließender Gelelektrophorese statt. Mit dieser Methode konnten Probenvolumina zwischen 0,6 ml und 1 ml mit gleicher Effizienz aufgearbeitet werden. Aus praktischen Erwägungen wurde im Weiteren zur Untersuchung von Käseproben ein Extraktvolumen von 600 µl verwendet.

5.2 Untersuchung von Ziegenmilcherzeugnissen mittels universeller Polymerasekettenreaktion (PCR) und Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Bei der universellen PCR werden Primer für tierartübergreifend stark konservierte Regionen ausgewählt, d. h. die Primeranlagerungsstellen verschiedener Tierarten sind homolog. Damit ist es möglich, meist gleich große Abschnitte einer Gensequenz verschiedener Spezies, zu amplifizieren (KOCHER *et al.*, 1989; MEYER *et al.*, 1995; ZEHNER *et al.*, 1998). Tierartenunterschiede finden sich in der Basensequenzabfolge, deren Diversität umso geringer ist, je enger die Tierarten miteinander verwandt sind. Die Speziesidentifikation erfolgt anschließend durch den Restriktionsenzymverdau mit geeigneten Enzymen, welche die verschiedenen Gensequenzen in unterschiedliche Fragmente aufspalteten (RFLP). Die Wahl der Primer hängt von der gewünschten Größe des Amplifikates ab. Je länger die Sequenz, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere Enzymschnittstellen innerhalb des Amplifikats vorhanden sind. So ist es möglich, mit einem Enzym mehrere Tierarten voneinander zu unterscheiden (ZEHNER *et al.*, 1998). Oft liegen solch große DNA-Abschnitte in prozessierten Lebensmitteln allerdings nur bruchstückhaft vor und können somit nicht vollständig amplifiziert werden. Kürzere DNA-Abschnitte sind daher für den Nachweis in stark erhitzten Lebensmitteln vorteilhafter (BELLAGAMBA *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere in der Literatur beschriebene Methoden geprüft (MEYER *et al.*, 1995; ZEHNER *et al.*, 1998; MAUDET und TABERLET, 2001). Hierzu wurden die entsprechenden Amplifikationen von Genabschnitten aus DNA-Extrakten aus reinen Kuh- und Ziegenmilchproben bzw. reinen Kuh- und Ziegenkäseproben durchgeführt. Die DNA-Amplifikation nach MEYER *et al.* (1995) gelang zuverlässig, die mit den Oligonukleotidprimern L-14841 und H-15149 extrahierte DNA wurde vervielfältigt und konnte anschließend in der Gelelektrophorese dargestellt werden. Das charakteristische Amplikon wies bei allen untersuchten Tierarten (Rind, Ziege, Schaf, Büffel, Kamel und Pferd) eine Länge von 359 Basenpaaren auf und konnte aus 333 von 371 DNA-Extraktionsansätzen aus Milch- und Käseproben der verschiedenen Tierarten erzielt werden. Eine gute Wiederholbarkeit der PCR zeigte sich in der Untersuchung von artifiziell gemischten Ziegenmilch- und Käseproben mit einem Kuhmilchanteil von 0,5 – 50 %. Die weitere Tierartendifferenzierung fand nach Auswahl

geeigneter Restriktionsenzyme mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) statt. Im Gegensatz zu den von ZEHNER *et al.* (1998) amplifizierten Gensequenzen mit einer Größe von 981 Bp, bot das kleinere Amplifikat nach MEYER *et al.* (1995) mit 359 Bp weniger Ansatzstellen für Restriktionsenzyme. Daher war es wichtig, in Vorversuchen geeignete Restriktionsenzyme auszuwählen. Die entstehenden Fragmente der zu differenzierenden Tierarten sollten sich um mindesten 15 bis 20 Basenpaare unterscheiden, um in der Gelelektrophorese deutlich unterscheidbar zu sein (WOLF *et al.*, 1999). Für die Differenzierung von Kuh- und Ziegenmilch eigneten sich nach Vorversuchen mit dem Clone Manager 4.0 die Enzyme *HaeIII*, *HinfI*, *SspI*, *TasI* bzw. *BshI236I*. Dies konnte auch experimentell bestätigt werden.

Bei der Auswertung der Ergebnisse müssen allerdings mögliche Vorkommen von Milch anderer Tierarten berücksichtigt werden. Die Schnittmuster der Fragmente von Kuh- und Büffel-DNA sind nach RFLP mit den Enzymen *HaeIII* in der Gelelektrophorese identisch. Ebenso sind die DNA-Fragmente von Ziege, Schaf und Kamel nach Verdau mit *HinfI*, sowie die Fragmente von Ziegen-, Büffel- und Pferde-DNA nach Verdau mit *SspI* nicht zu unterscheiden. Einzig mit dem Restriktionsenzym *TasI* ist eine deutliche Differenzierung der DNA-Schnittmuster der hier analysierten Tierarten möglich. Das Enzym *BshI236I* unterschied sich insofern, als es hier nur Ziegen-DNA Fragmente ergab. Die ungeschnittene Kuh-DNA (359 Bp) stand dem Schnittmuster der Ziegen-DNA (294, 65 Bp) gegenüber. Da jedoch ungeschnittene Amplikons auch bei der RFLP von Büffel- und Schaf-DNA vorkommen, ist hier die Aussagekraft eingeschränkt. Dessen ungeachtet sind alle genannten Enzyme in der Praxis einsetzbar, da in Deutschland nur selten Milcherzeugnisse aus anderer Milch als Kuh-, Ziegen- oder Schafmilch eine Rolle spielen (außer Spezialitäten).

Um einen möglichen Einfluss der Rasseunterschiede von Kuh und Ziege auf das PCR-RFLP Ergebnis auszuschließen, wurde DNA aus Einzelgemelkproben von Tieren verschiedener Rassen mit den universellen Primer amplifiziert und ebenfalls mit den Enzymen *HaeIII*, *HinfI*, *SspI*, *TasI* bzw. *BshI236I* geschnitten. In den Versuchen mit verschiedenen Kuh- und Ziegenrassen konnte gezeigt werden, dass die Schnittstellen der Enzyme *HaeIII*, *HinfI*, *SspI*, *TasI* bzw. *BshI236I* zwar tierartenspezifisch, jedoch nicht rassespezifisch sind. Die entstandenen Schnittmuster stimmten innerhalb einer Tierart vollständig überein. Somit eignet sich dieses PCR-RFLP-Verfahren zur

Tierartendifferenzierung in Milchproben, auch wenn die Milch von Tieren unterschiedlicher Rassen stammt.

Nachdem die einzelnen Enzyme erfolgreich zum Restriktionsenzymverdau an Amplikons aus reiner Kuh- bzw. Ziegenmilch getestet worden waren und die nachgewiesenen Schnittmuster den Erwartungen entsprachen, wurden die Enzyme im Restriktionsverdau der DNA-Extraktionsansätze aus artifiziell gemischter Ziegenmilch bzw. artifiziell gemischten Ziegenkäseproben eingesetzt. Hier erwies sich dieses Verfahren jedoch als generell nicht geeignet. Aus den artifiziell gemischten Proben konnte in 19 von 20 Versuchen nur das für Ziegen-DNA charakteristische Schnittmuster identifiziert werden. Da auch nach Erhöhung der Enzymkonzentration sowie Verlängerung der Inkubationszeit keine für bovine DNA charakteristischen Banden nachzuweisen waren, wurde angenommen, dass in Mischproben unter Verwendung der universellen Primer die bovine DNA nicht vervielfältigt wurde. Die Detektion geringer Mengen ist abhängig von der Homologie der Primer zu der DNA-Sequenz. Ist diese nicht zu allen Gensequenzen der vorhandenen Tierarten annähernd gleich, wird an die DNA einer oder mehrerer Tierarten bevorzugt gebunden und zu 100 % amplifiziert, andere hingegen nicht (BEHRENS *et al.*, 1999). MEYER *et al.* (1995) hatten dieses Verfahren mit einer Nachweisgrenze von unter 1 % zur Detektion von Schweinefleisch in Rindfleisch entwickelt. Die eigenen Versuche zeigten, dass dieses Verfahren zum Nachweis von Kuhmilch in Ziegenmilch und -käse nicht anwendbar ist.

MAUDET und TABERLET (2001) beschrieben einen universellen Primer, mit dem es möglich war, aufgrund einer Deletion im bovinen Genom, jeweils spezifische Banden für Kuh- bzw. Ziegen-DNA zu amplifizieren. Es gelang, die jeweiligen Amplifikate für Kuh und Ziege aus den ungemischten Proben nachzuweisen. Bei der Untersuchung von artifiziell gemischtem Käse konnten die charakteristischen Banden von Ziegen- und Kuh-DNA jedoch nur aus 18 von 32 Proben nachgewiesen werden. In gemischten Milchproben konnten in der Mehrzahl der 25 Ansätze ausschließlich Kuh-spezifische Banden nachgewiesen werden, in vier Ansätzen dagegen ausschließlich Ziegen-spezifische Banden. Daher eignet sich die von MAUDET und TABERLET (2001) beschriebene Methode zwar zur Identifizierung von Kuh- bzw. Ziegenmilchproben, jedoch ist die Aussagekraft in Hinblick auf eventuell verfälschte Produkte nicht ausreichend. Für die Anwendung in der Routinediagnostik ist dieses Verfahren daher ungeeignet.

Mit der von ZEHNER *et al.* (1989) beschriebenen Methode wurden 177 DNA-Extraktionsansätze aus Milch- und Käseproben untersucht und 116 Mal das charakteristische Amplikon mit einer Länge von 981 Bp nachgewiesen. ZEHNER *et al.* (1998) verwendeten Oligonukleotidprimer, welche eine relative große Gensequenz, fast das komplette *cytb*-Gen, synthetisierten, da aufgrund mehrerer Schnittstellen in diesem Genabschnitt die Tierartendifferenzierung mit nur einem Restriktionsenzym durchzuführen war. Ihnen gelang der Nachweis von 10 % Rind- in Schweinefleisch. Allerdings liegt die DNA in stark prozessierten und erhitzten Lebensmitteln oft nur bruchstückhaft vor, da sie überwiegend degradiert ist. Dann können Primer, deren Bindungsstellen weit voneinander entfernt liegen, kein Amplikon synthetisieren (BEHRENS *et al.*, 1999). Da das Ziel dieser Arbeit die Validierung einer Standardmethode zur Routinediagnostik war und somit auch hitzebehandelte sowie fermentierte Erzeugnisse untersucht werden sollen, eignete sich diese Methode nicht zur Anwendung für die interessierende Fragestellung.

Der Vorteil bei der Verwendung universeller Primer liegt in der größeren Übersicht der Ergebnisse hinsichtlich der Zusammensetzung einer Probe. Nach einem Restriktionsverdau können mindestens zwei, meistens aber mehrere Tierarten aus einer Probe unterschieden werden. Außerdem ist es möglich, ohne Wissen über die genauen Abfolgen der Basenpaare, DNA von Tierarten mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen zu untersuchen (BOTTERO *et al.*, 2003).

Die Nachteile der PCR mit universellen Oligonukleotidprimern zeigten sich, wie bei der Methode nach MEYER *et al.* (1995) beobachtet, in der Untersuchung von Proben mit geringen Anteilen von DNA verschiedener Tierarten. Es ist hier aufgrund von Unterschieden in der Homologie der Primer möglich, dass die DNA bestimmter Spezies bevorzugt gebunden wird, die DNA anderer hingegen nicht (BEHRENS *et al.*, 1999). Bei der Auswahl der Restriktionsenzyme ist es wichtig, dass die DNA aller in Frage kommenden Tierarten geschnitten wird. Ungeschnittene Amplikons können sowohl für eine fehlende Schnittstellen als auch für defekte, inaktive Enzyme, zu niedrige Enzymkonzentrationen im Reaktionsansatz, zu hohe oder zu niedrige Inkubationstemperatur oder eine zu geringe Inkubationszeit stehen. Ist in einer Probe die DNA mehrerer Tierarten enthalten, kann es aufgrund von Überlagerungen der

unterschiedlichen Schnittmuster zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen kommen. Daher ist die Aussagekraft dieser Methode nur eingeschränkt bewertbar.

5.3 Untersuchung von Ziegenmilcherzeugnissen mittels PCR unter Verwendung speziesspezifischen Primer

Unter Verwendung speziesspezifischer Primer ist ein gezielter und daher aber auch eingeschränkter Nachweis von Material einer bestimmten Tierart möglich. Die Auswertung erfolgt direkt nach der PCR in der Gelelektrophorese, somit entfällt eine zeitaufwändige Spaltung mit teuren Restriktionsenzymen, wie es in der RFLP-Analyse nötig ist. Da die Primer spezifisch für eine Tierart entwickelt werden, ist es ausreichend, kurze Gensequenzen zu amplifizieren. Dies ist von Vorteil bei der Analyse hochgradig degradierter DNA aus be- und verarbeiteten Erzeugnissen, z. B. stark erhitzten oder fermentierten Lebensmitteln (BEHRENS *et al.*, 1999, LÓPEZ-CALLEJA *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit wurden die von BOTTERO *et al.* (2002), HERMAN (2001) bzw. MAUDET und TABERLET (2001) beschriebenen speziesspezifischen Primer zum Nachweis von Kuhmilchzusatz in Ziegenmilcherzeugnissen geprüft. Die Methode nach BOTTERO *et al.* (2002) erwies sich hierbei im Hinblick auf Spezifität und Sensitivität in artifiziell gemischten Proben sowie im direkten Vergleich mit den anderen Verfahren anhand von Handelsproben als deutlich überlegen und wurde daher in dieser Arbeit als Standardmethode zur Untersuchung von Handelsproben eingesetzt. Eine Rassespezifität der Primer konnte in Versuchen mit Einzelgemelkproben verschiedener Kuhrassen ausgeschlossen werden, wie auch PFEIFFER *et al.* (2004) in der Untersuchung von Blutproben verschiedener Kuhrassen feststellten. Die von BOTTERO *et al.* (2002) beschriebene Methode wurde zunächst an DNA-Extrakten aus Proben reiner Kuh- bzw. Ziegenmilch angewendet. Da der Primer zuverlässig aus allen 47 DNA-Extraktionsansätzen aus Kuhmilchproben spezifisch Kuh-DNA amplifizierte sowie aus 32 Extraktionsansätzen aus Ziegenmilchproben keine falsch positive Ergebnisse ergab, wurde er in Proben aus Ziegenmilch mit unterschiedlichen Kuhmilchanteilen (0,05 bis 50 %), angewendet. Die Nachweisgrenze des Verfahrens lag bei rund 1 % Kuhmilchanteil. Damit bietet diese Methode eine Grundlage für die Detektion nicht deklarerter Kuhmilchzusätze auch in geringen Mengen.

Bei der Untersuchung von Ziegenkäsen mit dem speziesspezifischen Primer nach BOTTERO *et al.* (2002) konnten ähnlich gute Resultate erzielt werden. Aus 18 DNA-Extraktionsansätzen aus Ziegenkäseproben wurde in drei Ansätzen aus einer Probe, welche in der RFLP nur Ziegen-spezifische Fragmente aufwies, Kuh-DNA nachgewiesen. Die gleiche Probe ergab sowohl bei der Analyse mit dem Primer nach HERMAN (2000) und mit dem nach MAUDET und TABERLET (2001) eine Kuh-spezifische Bande. Hier beweist die Nachweismethode mittels speziesspezifischen Primer die größere Sensitivität bei der Detektion kleiner DNA-Mengen in Milchproben. Bei der Untersuchung von Kuhmilchkäsen wurden ebenfalls keine falsch-negativen Ergebnisse beobachtet. Die Nachweisgrenze des Verfahrens lag auch hier bei rund 1 % Kuhmilchanteil im Ziegenkäse.

Obwohl man bei einer so geringen Menge an Kuhmilchzusatz kaum von einer mutwilligen und vor allem gewinnbringenden Verbrauchertäuschung reden kann, ist es z. B. für die Überprüfung von Hygienemaßnahmen hilfreich, sensible Nachweismethoden anwenden zu können.

Die PCR unter Verwendung der speziesspezifischen Oligonukleotidprimer BosL-15794 und BosH-16102 nach MAUDET und TABERLET (2001) ergab dagegen insgesamt wenig befriedigende Ergebnisse. Zwar konnte die Spezifität bei der Untersuchung von Kuhmilch und -käse, Ziegenmilch, Schafkäse und Stutenmilch bestätigt werden, wobei ein nicht deklariertes Zusatz von Kuhmilch zu den hier untersuchten, im Handel erworbenen Ziegenkäsen nicht ausgeschlossen werden kann. Die von den Autoren angegebene Nachweisgrenze von 1 % Kuhmilch in Ziegenkäse konnte jedoch nicht bestätigt werden. Aus insgesamt 93 Proben artifiziell gemischter Ziegenmilcherzeugnisse mit unterschiedlichen Anteilen an Kuhmilch konnte nur 51 Mal Kuhmilch nachgewiesen werden. Die Wiederholbarkeit dieser Ergebnisse war zudem ungenügend, so dass dieses Verfahren nicht weiter eingesetzt wurde.

In den Versuchen mit der speziesspezifischen Methode nach HERMAN (2001), die ursprünglich nur zur Untersuchung von Fleisch entwickelt worden war, konnte in allen Kuhmilch- bzw. in neun von zehn Kuhkäseansätzen jeweils Kuh-DNA nachgewiesen werden. Bei der Überprüfung der Spezifität des Primers mit Ziegenmilch ($n = 32$) wurden fünf falsch-positive Ergebnisse erhalten. Zudem zeigte sich bei der Untersuchung artifiziell gemischter Ziegen-Kuhmilcherzeugnisse eine schlechte Reproduzierbarkeit der

Ergebnisse. Daher war auch dieses Verfahren für den gewünschten Verwendungszweck ungeeignet.

5.4. Validierung und Anwendung der Standardmethode unter Verwendung der Kuh-spezifischen Primer nach BOTTERO *et al.* (2002)

Zur Feststellung der Sensitivität der Standardmethode wurden Ziegenmilch sowie Ziegenmilchkäse künstlich mit unterschiedlichen Mengen (50 % bis 0,01 %) Kuhmilch bzw. -käse versetzt und nach erfolgter DNA-Extraktion in der PCR mit dem Primer nach BOTTERO *et al.* (2002) eingesetzt.

Die praktisch erreichbare Nachweisgrenze lag bei rund 1 % Kuhmilchanteil in Ziegenmilch bzw. Ziegenkäse. Somit ist diese Methode zum Nachweis kleinster Mengen auch hinsichtlich der Untersuchung auf Verunreinigung bzw. Hygienemängel im Verarbeitungsprozess anwendbar. Vergleichbare Ergebnisse wurden von BOTTERO *et al.* (2002) bei der Untersuchung von Büffel-Mozzarella auf Verfälschung mit Kuhmilch mittels einer Duplex-PCR beobachtet. Sie identifizierten aus Büffel-Mozzarella, welcher in der gleichen Käserei, in der auch Kuhmilch-Mozzarella hergestellt wird, sowohl Büffel- als auch Kuh-DNA. Eine Verunreinigung des Büffel-Mozzarellas könnte durch das Benutzen derselben Gerätschaften, sowie durch die Anwendung von Labferment oder Starterkulturen, welche in Kuhmilch aufbewahrt werden, stattgefunden haben.

Zur weiteren Überprüfung der PCR-Ergebnisse der Standardmethode BOTTERO *et al.* (2002) wurden 13 Ziegenkäseproben, teilweise mit deklariertem Kuhmilchzusatz, vergleichend mit einem kommerziellen Enzymimmuntest auf der Basis des Nachweises von bovinen IgG untersucht. Die Ergebnisse stimmten bei 11 Käsen mit den Ergebnissen der PCR überein, ein weiterer Käse, der in der PCR eine starke Kuh-spezifische Bande zeigte, reagiert in dem ELISA, mit einer angegebenen Nachweisgrenze von 0,1 % Kuhmilch in Ziegenkäse, schwach positiv. Der deklarierte 20 %-ige Kuhsahnezusatz in einem pasteurisierten Käse wurde im ELISA nicht detektiert (vermutlich aufgrund einer Denaturierung von IgG), die Probe wies jedoch in der PCR eine Kuh-spezifische Bande auf.

Die Standardmethode wurde schließlich in einer Studie zur Überprüfung des Status quo hinsichtlich der Authentizität der auf dem hessischen Markt befindlichen Ziegenmilcherzeugnisse eingesetzt. Insgesamt wurden 165 Erzeugnisse (Käse, n = 153; Quark, n = 6; Joghurt, n = 5; Milch, n = 1) aus dem Einzelhandel untersucht. Von diesen waren fünf Käseproben als Ziegenkäse „mit Kuhmilch verfeinert“ oder „mit Kuhmilch gemischt“ deklariert, bei den übrigen Proben handelte es sich laut Kennzeichnung um reine Ziegenmilcherzeugnisse. Ein Schwerpunkt der Probennahme lag hierbei bei regionalen Direktvermarktern aus Hessen, von denen ein großer Teil nachweislich oder nach eigenen Angaben der ökologischen Produktionsweise zuzuordnen ist.

Die fünf mit Kuhmilchzusatz hergestellten und als solche deklarierten Käse ergaben eindeutig positive Ergebnisse in der Standardmethode. In immerhin 21 Käseproben (13 %), die laut Deklaration aus reiner Ziegenmilch hergestellten Erzeugnisse wurde ebenfalls bovine DNA nachgewiesen. Diese Proben waren ausnahmslos deutlich positiv, Nachuntersuchungen unter Verwendung verschiedener Probenverdünnungen ergaben bei den meisten Proben immer noch positive Ergebnisse in der 1:10 Verdünnung, einige auch in der 1:100 Verdünnung. Unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze des verwendeten Untersuchungsverfahrens ergab dies deutliche Hinweise darauf, dass der Kuhmilchanteil in diesen Proben bei mehreren Prozent und damit in einem als Verfälschung zu wertenden, relevanten Konzentrationsbereich liegen musste.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen stimmen in ihrer Größenordnung mit denen anderer Untersucher überein. Damit zeigte sich erneut, dass ein nicht unerheblicher Anteil der auf dem Markt befindlichen Ziegenmilcherzeugnisse zumindest nicht korrekt gekennzeichnet ist. Die Ursachen können neben einer absichtlichen Verfälschung, insbesondere bei schwach-positiven Ergebnissen unter 1 % Kuhmilchzusatz auch in mangelnder Sorgfalt bei der Herstellung liegen, insbesondere wenn in einem Betrieb gleichzeitig Milch von Ziegen und Kühen verarbeitet wird. Für höhere Kuhmilchanteile stellt dies jedoch keine ausreichende Erklärung mehr dar.

Drei der positiven Proben aus Deutschland stammten aus Betrieben, die sowohl Ziegen- als auch Kuhmilch verarbeiten. Hier könnte eine technologische Verunreinigung der Ziegenmilch mit Kuhmilch im Verarbeitungsprozess eine mögliche Erklärung sein. Die vierte Probe entstammt einem Betrieb, der laut eigenen Angaben lediglich Schaf- und

Ziegenmilch verarbeitet, womit eine Verunreinigung während des Herstellungsprozesses durch ungenügend gereinigte Käsereinstrumente ausgeschlossen werden kann. Ob der Betrieb Säurewecker bzw. Labferment eingesetzt hat, welches unter Zugabe von Kuhmilch hergestellt wurde, wurde nicht festgestellt. Zwei weitere Produkte dieses Herstellers ergaben negative Resultate. Insgesamt erwiesen sich weitere 13 untersuchte Proben der vier Hersteller als negativ. Bei 12 Produkten aus konventioneller Herstellung in Deutschland wurden keine Hinweise auf Kuhmilch-Zusätze gefunden. Fünf dieser Proben stammten aus zwei hessischen Betrieben mit Direktvermarktung, sieben Produkte aus Käsereien mit bundesweiter Vermarktung.

Der Anteil von Kuhmilch-positiven Proben aus Frankreich war dagegen relativ hoch (20 %), fast die Hälfte aller in dieser Arbeit ermittelten positiven Handelsproben waren französischer Herkunft (n = 10). Alle Produkte aus Frankreich stammten aus konventionell arbeitenden Betrieben. Von den drei positiven Käseproben aus den Niederlanden entstammten zwei aus ökologischer Produktion unterschiedlicher Hersteller. Die untersuchten Proben aus weiteren Herstellungsländern enthielten keine Kuhmilch-Zusätze.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass nach wie vor mit nicht deklarierten Kuhmilchzusätzen in Ziegenkäse gerechnet werden muss. Dies stellt im Hinblick auf die deutlich höheren Preise dieser Erzeugnisse im Vergleich zu solchen aus Kuhmilch eine Täuschung des Verbrauchers dar. Das in dieser Arbeit auf der Basis der Methode von BOTTERO *et al.* (2002) entwickelte Verfahren könnte in der Zukunft einen Beitrag für eine intensivere Überwachung dieser Erzeugnisse leisten und damit den Verbraucherschutz verbessern. Ein wesentlicher Vorteil des Verfahrens liegt in der Tatsache, dass im Gegensatz zu immunchemischen Verfahren auch Käse aus wärmebehandelter Milch untersucht werden kann, und dass im Gegensatz zur isoelektrischen Fokussierung der Untersuchungsaufwand deutlich geringer ist. Durch Untersuchung verschiedener Verdünnungsstufen des Probenmaterials ist zumindest eine vorsichtige semiquantitative Aussage darüber möglich, ob lediglich Spuren oder deutlich erhöhte - und damit in jedem Fall kennzeichnungspflichtige - Anteile von Kuhmilch in Ziegenkäse vorhanden sind.

5.5 Orientierende Untersuchungen zum Einsatz speziesspezifischer Primer zum Nachweis von Milch anderer Tierarten

Da Zusätze von Kuhmilch auch für Milcherzeugnisse anderer Tierarten prinzipiell wirtschaftlich interessant sein könnten, und sowohl aus rechtlichen Gründen als auch im Hinblick auf Transparenz für den Verbraucher hinsichtlich der Inhaltsstoffe eines Lebensmittels die Bestimmung der tierartlichen Zusammensetzung immer wichtiger wird, sollte geprüft werden, inwieweit hier ein einfacher molekularbiologische Nachweis möglich ist. Dies wurde anhand neuentwickelter spezifischer Primer für das *cytb*-Gen von Ziege, Schaf, Büffel, Kamel und Stute untersucht.

Der Einsatz der spezifischen Primer zum Nachweis von Ziegen-DNA in der Untersuchung von Schafkäse ergab in insgesamt elf Proben acht positive Ergebnisse. Davon waren fünf Käse als mit „Ziegenmilch verfeinert“, zwei als „Original Greek“ und ein weiterer als „Original Bulgarisch“ deklariert. In einer Untersuchung ergab sich eine unspezifische, nicht zu zuordnende Bande.

Der entwickelte Nachweis oviner DNA erwies sich in der Untersuchung von Milch- bzw. Käseproben verschiedener Tierarten als spezifisch. Er eignet sich somit zur Untersuchung von Ziegenkäsen (Tabelle 39) und auch „Mozzarella di bufalo campana“, welcher nach Literaturangaben häufiger mit Schafmilch gestreckt wird (COZZOLINO *et al.*, 2002).

Der Nachweis von Stutenmilch bzw. –DNA ist nicht nur im Hinblick auf Lebensmittel, sondern auch für eine zunehmende Palette kosmetischer Produkte, die mit den Vorteilen der Stutenmilch werben, von Interesse. Dabei liegt der Schwerpunkt aber auf dem positiven Nachweis, d. h. in der Überprüfung der Produktauthentizität.

Die Mehrzahl der Käse vom Typ Mozzarella in Deutschland besteht aus reiner Kuhmilch, während echter „Mozzarella di bufalo campana“ aus 100 % Büffelmilch (REA *et al.*, 2001; European Commission, 2001) bestehen muss. Aufgrund des hohen Preisunterschiedes ist der Anreiz für Verfälschungen durch Kuhmilch oder auch Schafmilch, die dem Geschmack des Büffelkäses ähnlicher ist, groß. In den Jahren 1998 und 1999 waren ca. 13 % der in Italien analysierten Büffelmilchkäse mit undeklariert Kuhmilch versetzt (REA *et al.*, 2001). Da der in dieser Arbeit entwickelte Primer in sieben von 13 Schafmilchproben und

in drei von sechs Schafkäseproben positive Ergebnisse zeigte, liefert diese Methode nur nach Ausschluss eines Schafmilchzusatzes, z. B. mit einem schafspezifischen Primer, zuverlässige Ergebnisse.

Kamelmilch besitzt derzeit in Deutschland praktisch keine Bedeutung. Dies könnte sich zukünftig ändern, so dass die Entwicklung einer Nachweismethode für Kamelmilch zur Bestimmung der Produktauthentizität insbesondere für bestimmte Verbrauchergruppen von gewisser Relevanz ist. Das in dieser Arbeit entwickelte Nachweisverfahren amplifizierte zuverlässig Kamel-DNA und zeigte keine Kreuzreaktionen mit DNA anderer Tierarten.

Alle diese auf verschiedenen Sequenzen des *cytb*-Gens beruhenden Verfahren scheinen prinzipiell für einen Einsatz zum tierartspezifischen Nachweis in Milch und Milcherzeugnissen geeignet, müssten vor einem breiteren Einsatz jedoch noch intensiver validiert werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zum Nachweis einer Verfälschung von Ziegenmilcherzeugnissen mit Kuhmilch wurde eine PCR-Methode auf Basis speziesspezifischer Oligonukleotidprimer für das bovine *Cytochrom b*-Gen entwickelt, mit der es möglich ist -unabhängig von der Verarbeitungsart der Käse- einen Kuhmilchzusatz zu Ziegenkäse und anderen Erzeugnissen aus Ziegenmilch sicher zu erkennen.

Für die DNA-Extraktion wurde das Verfahren nach ROMERO und LOPEZ-GONI (1999) unter Verwendung eines NET-Puffers angewendet. Ein Probenvolumen von 600 µl erwies sich unter praktischen Gesichtspunkten als optimal.

In umfangreichen Vorversuchen wurden molekularbiologische Verfahren auf der Basis von universellen Primer für das *cytb*-Gen in Verbindung mit dem Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus getestet. Diese erwiesen sich jedoch als ungeeignet, da in Mischungen aus Kuh- und Ziegenmilch häufig falsch-negative Ergebnisse erzielt wurden.

Mehrere Systeme zum direkten Nachweis bovinen *cytb*-Gens unter Verwendung speziesspezifischer Primer wurden geprüft. Hier konnte ein Testsystem etabliert werden, mit dem Kuhmilchzusätze zu Ziegenmilch bzw. Ziegenkäse zuverlässig detektiert werden konnten, mit einer Nachweisgrenze von 1 % Kuhmilchanteil.

Eine Anwendungsstudie dieser PCR Methode bei 165 Handelsproben zeigte, dass ein erheblicher Anteil (13 %) der auf dem Markt befindlichen Ziegenkäse nicht deklarierte Zusätze von Kuhmilch aufwies.

Orientierende Untersuchungen zum speziesspezifischen Nachweis des *cytb*-Gens in Milch der Tierarten Ziege, Schaf, Büffel, Kamel, und Pferd wurden unter Verwendung von Oligonukleotidprimern durchgeführt. Mit Einschränkung hinsichtlich einer nicht völligen Speziesspezifität ist mit diesem Verfahren eine Tierartendifferenzierung in Milch möglich.

7 SUMMARY

Development and application of molecular-based test systems for the differentiation of animal species in dairy goat products

A DNA based identification system on species-specific oligonucleotide primers was performed, amplifying the bovine *cytochrome b* gene for the detection of adulteration of bovine milk in dairy goat products, regardless of whether the milk is processed or not.

For DNA extraction a method described by ROMERO und LOPEZ-GONI (1999) with use of a NET-buffer was performed. Four separate DNA extracts of every sample were used in a PCR with a pair of universal primers, after a suitable sample volume of milk and cheese had been determined.

Molecular methods based on universal primer for the *cytb*-gene and subsequent restriction-fragment-length-polymorphism were extensively tested. These proved to be inappropriate as they frequently showed wrong negative results in mixtures of cow's and goat's milk.

Some methods for the direct proof of the *cytb*-gene with the use of species-specific primers were tested as well. It was possible to establish a system which provides a simple and accurate approach to detect as low as 1 % bovine milk in caprine milk and cheese.

165 samples of goat's milk and cheese purchased from supermarkets were analyzed to evaluate the applicability of the method to dairy products from the retail trade. It was shown that a considerable part of the products (13%) contained non-declared bovine milk.

Further investigations for the species-specific detection of *cytb*-gene in milk from sheep, buffaloes, horses and camels with oligonucleotide primers were tested. This procedure proves that, although it must be acknowledged that complete species-specificity is not given, it is possible to differentiate between types of animal by milk.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ADDEO, F., L. MOIO, L. CHIANESE, C. STINGO und A. DI LUCCIA (1990 a):

Improved procedure for detecting bovine and ovine milk mixtures in cheese by isoelectric focusing of para- κ -casein. *Milchwissenschaft* **45**, 221-224

ADDEO, F., L. MOIO, L. CHIANESE, C. STINGO, P. RESMINI, I. BERNER, I. KRAUSE, A. DI LUCIA und A. BOCCA (1990 b):

Use of plasmin to increase the sensitivity of detection of bovine milk in ovine cheese by gel isoelectric focusing of γ_2 -caseins. *Milchwissenschaft* **45**, 708-711

ALTMANN, K., R. BINKE und F. SCHWÄGELE (2004):

Qualitativer Nachweis von Ziege in Fleisch- und Milcherzeugnissen. *Fleischwirtschaft* **2**, 115-116

AMIGO, L., I. IBANEZ, C. FERNANDEZ, G. SANTA-MARIA und M. RAMOS (1989):

Comparison of an electrophoretic and an immunological method for the determination of goat and cow milk in cheese. *Milchwissenschaft* **44**, 215-218

ANDERSON, S., M. H. DE BRUIJN, A. R. COULSON, I. C. EPERON, F. SANGER and I. G. YOUNG (1982):

Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J. Mol. Biol.* **156**, 683-717

ANGUITA, G., R. MARTIN, T. GARCIA, P. MORALES, A. I. HAZA, I. GONZALES, B. SANZ, P. E. HERNANDEZ (1997):

A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine milk in ovine and caprine milk and cheese using a monoclonal antibody against bovine beta-casein. *J. Food Prot.* **60**, 64-66

BANIA, J., M. UGORSKI, A. POLANOWSKI und E. ADAMCZYK (2001):

Application of polymerase chain reaction for detection of goats' milk adulteration by milk of cow. *J. Dairy Res.* **68**, 333-336

BEHRENS, M. und M. UNTHAN (1999):

Tierart-spezifischer DNA-Test von Lebensmitteln. LaborPraxis **10**

BELLAGAMBA, F., V. M. MORETTI, S. COMINCINI und F. VALFRÈ (2001):

Identification of species in animal feedstuffs by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial DNA. J. Agric. Food Chem. **49**, 3775-3781

BENEKE, B. und M. HAGEN (1998):

Eignung der PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion): Tierartennachweis in erhitzten Fleischerzeugnissen. Fleischwirtschaft **78**, 1016-1019

BOTTERO, M. T., T. CIVERA, A. ANASTASIO, R. M. TURI und S. ROSATI (2002):

Identification of cow's milk in "buffalo" cheese by duplex polymerase chain reaction. J. Food Prot. **65**, 362-366

BOTTERO, M. T., T. CIVERA, D. NUCERA, S. ROSATI, P. SACCHI und R. M. TURI (2003):

A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cow's, goat's and sheep's milk in dairy products. Int. Dairy J. **13**, 277-282

BOUTINAUD, M. und H. JAMMES (2002):

Potential uses of milk epithelial cells: a review. Reprod. Nutr. Dev. **42**, 133-147

BRANCIARI, R., I. J. NIJMAN, M. E. PLAS, E. DI ANTONIO und J. A. LENSTRA (2000):

Species origin of milk in italian mozzarella and greek feta cheese. J. Food Prot. **63**, 408-411

CALVO, J. H., R. OSTA, I. und P. ZARAGOZA (2002 a):

Species-specific amplification for detection of bovine, ovine and caprine cheese. Milchwissenschaft **57**, 444-446

CALVO, J. H., C. RODELLAR, P. ZARAGOZA und R. OSTA (2002 b):

Beef- and bovine-derived material identification in processed and unprocessed food and feed by PCR amplification. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5262-5264

CALVO, J. H., P. ZARAGOZA und R. OSTA (2001):

Technical note: A quick and sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. *J. Anim. Sci.* **79**, 2108-2112

COZZOLINO, R., S. PASSALACQUA, S. SALEMI und D. GAROZZO (2002):

Identification of adulteration in water buffalo mozzarella and in ewe cheese by using whey proteins as biomarkers and matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* **37**, 985-991

DROKE, E. A., M. J. PAAPE und A. L. DI CARLO (1993):

Prevalence of high somatic cell counts in bulk tank goat milk. *J. Dairy Sci.* **76**, 1035-1039

EUGSTER, A. (2003):

Verunreinigungen tierischer Herkunft in Getreide und Getreideprodukten: I. Problemstellung und Beitrag zur Tierartenbestimmung mittels PCR. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **94**, 181-191

EUROPEAN COMMISSION (2001):

EC 231/2001 Methods for analysis and quality evaluation of milk and milk products. *Off. J. Eur. Comm.* 44:L37/31-L37/99

FAO (2005) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org>

HAASNOOT, W., D. P. VENEMA und H. L. ELENBAAS (1986):

Determination of cow milk in the milk and cheese of ewes and goats by fast protein liquid chromatography. *Milchwissenschaft* **41**, 642-645

HAENLEIN, G. F. W. (o.A.):

Goat Managment: Producing quality goat milk, University of Delaware, USA
(<http://ag.udel.edu/extension/information/goatmgt/gm-05.htm>)

HASSAN, A. A. (2003):

Nachweis und weitergehende Analyse von speziesspezifischen Genabschnitten zur molekularen Charakterisierung einiger Mastitiserreger vom Rind. Diss vet. med. Justus-Liebig-Universität Giessen

HERMAN, B. L. (2001):

Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR. J. Dairy Res. **68**, 429-436

HESSISCHER ZIEGENZUCHTVERBAND (2004) <http://www.ziegenzucht.de>

HORN, D. (1989):

Verfälschung von Schafskäse mit Kuhmilch. Deutsche Milchwirtschaft **4**, 116-118

HURLEY, I. P., H. E. IRELAND, R. C. COLEMAN und J. H. H. WILLIAMS (2004):

Application of immunological methods for the detection of species adulteration in dairy products. Int. J. Food Sci. and Technol. **39**, 873-878

INSTITUT FÜR HYGIENE UND UMWELT (2002/2003/2005) <http://fhh.hamburg.de>

IRWIN, D. M., T. D. KOCHER und A. C. WILSON (1991) :

Evolution of the cytochrome b gene of mammals. J. Mol. Evol. **32**, 128-144

KAHILA BAR-GAL, G., und C. GREENBLATT (2001):

The relationships between *Capra* species from the southern levant to other *Capra* species based on cytochrome b sequence. Unpublished. (NCBI: AF217254).

KAISER, R. (1989):

Zur Differenzierung von Kuh-, Schaf- und Ziegenmilch. DMZ **4**, 110-113

KIELWEIN, G. (1994):

Leitfaden der Milchkunde und Milchhygiene, Verlag Paul Parey, Berlin, ISBN 3-8263-3012-9

KNIPPERS, R. (2001):

Molekulare Genetik, Teil IV: Genetische Systeme, Georg Thieme Verlag, Stuttgart ISBN 3-13-477008-3

KOCHER, T. D., W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. PÄÄBO, F. X. VILLABLANCA und A. C. WILSON (1989):

Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. **86**, 6196-6200

KRAUSE, I., H.-D. BELITZ, K.-P. KAISER (1982):

Nachweis von Kuhmilch in Schaf- und Ziegenmilch bzw. -käse durch isoelektrische Fokussierung in harnstoffhaltigen Polyacrylamidgelen. Z. Lebensm. Unters. Forsch. **174**, 195-199

LGL BAYERN, LANDESAMT FÜR GESUNDHEIT UND LEBENSMITTELSICHERHEIT (2004):

Mancher Schafkäse kommt von der Kuh. Information vom 8.4.2004. Verfügbar unter:

<http://www.lgl.bayern.de/de/left/fachinformationen/lebensmittel/schafskaese.html>

LIPKIN, E., A. SHALOM, H. KHATIB, M. SOLLER und A. FRIEDMANN (1993):

Milk as a source of deoxyribonucleic acid and as a substrate for the polymerase chain reaction. J. Dairy Sci. **76**, 2025-32

LÓPEZ-CALLEJA, I., I. GONZÁLEZ, V. FAJARDO, M. A. RODRÍGUEZ, P. E. HERNÁNDEZ, T. GARCÍA und R. MARTÍN (2004):

Rapid detection of cow's milk in sheep's and goat's milk by a species-specific polymerase chain reaction technique. J. Dairy Sci. **87**, 2839-2845

LÓPEZ-CALLEJA, I., I. GONZÁLEZ, V. FAJARDO, I. MARTIN, P. E. HERNANDEZ, T. GARCIA und R. MARTIN (2005):

Application of polymerase chain reaction to detect adulteration of sheep's milk with goats' milk. *J. Dairy Sci.* **88**, 3115-3120.

MAFRA, I., I. M. P. L. V. O. FERREIRA, M. A. FARIA und B. P. P. OLIVERA (2004):

A novel approach to the quantification of bovine milk in ovine cheeses using a duplex polymerase chain reaction method. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4943-4947

MANCEAU, V., L. DESPRÉS, J. BOUVET und P. TABERLET (1999):

Systematics of the genus *Capra* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.* **13**, 504-510

MANNEN, H., Y. NAGATA und S. TSUJI (2001):

Mitochondrial DNA reveal that domestic goat (*Capra hircus*) are genetically affected by two subspecies of bezoar (*Capra aegagurus*). *Biochem. Genet.* **39**, 145-154

MATSUNAGA, T., K. CHIKUNI, R. TANABE, S. MUROYA, K. SHIBATA, J. YAMADA und J. SHINMURA (1998):

A quick and simple method for the identification of meat's and meat products by PCR assay. *Meat Sci.* **51**, 143-48

MAUDET, C. und P. TABERLET (2001):

Detection of cows' milk in goats' cheeses inferred from mitochondrial DNA polymorphism. *J. Dairy Res.* **68**, 229-235

MAYER, H. K., D. HEIDLER und C. ROCKENBAUER (1997):

Determination of the percentages of cows', ewes' and goats' milk in cheese by isoelectric focusing and cation-exchange HPLC of γ - and para- κ -caseins. *Int Dairy J.* **7**, 619-628

MEYER, R., C. HÖFELEIN, J. LÜTHY und U. CANDRIAN (1995):

Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J AOAC Int.* **78**, 1542-1551

MONTIEL-SOSA, J. F., E. RUIZ-PESINI, J. MONTOYA, P. RONCALÉS, M. J. LOPEZ-PÉREZ und A. PÉREZ-MARTOS (2000):

Direct and highly species-specific detection of pork meat and fat in meat products by PCR amplification of mitochondrial DNA. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2829-2832

MOOSHEIMER, B.(1997):

Evaluierung immunchemischer Testverfahren zum Nachweis von Kuhmilch in Schafmilch und -käse. Diss. Vet. Med., München

MULLIS, K., F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN und H. EHRLICH (1986):

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**, 263-273

OLSEN, J. E., S. AABO, W. HILL, S. NOTERMANS, K. WERNARS, P.E. GRANUM, T. POPOVIC, H.N. RASMUSSEN und Ø. OLSVIK (1995):

Review article: Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* **28**, 1-78

PARSON, W., K. PEGORARO, M. NIEDERSTÄTTER, M. FÖGER und M. STEINLECHNER (2000):

Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int. J. Legal Med.* **114**, 23-28

PERNTHANER, A., A. DEUTZ, G. SCHLERKA und W. BAUMGARTNER (1991):

Untersuchungen über den Zellgehalt in Schaf- und Ziegenmilch. *Tierärztl. Prax.* **19**, 612-616

PFEIFFER, I., J. BURGER und B. Brenig (2004):

Diagnostic polymorphisms in the mitochondrial cytochrome b gene allow discrimination between cattle, sheep, goat, roe buck and deer by PCR-RFLP. <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/5/30>

POUTREL, B. und C. LERONDELLE (1982):

Cell content of goat milk: California mastitis test, coulter counter and fossomatic for predicting half infection. *J. Dairy Sci.* **66**, 2575-2579

RAJAPAKSHA, W. R. A. K. J. S., I. D. S. I. P. THILAKARATNE, A. D. N. CHANDRASIRI und T. D. NIROSHAN (2002):

Development of PCR assay for differentiation of some important wild animal meat of Sri Lanka. *J. Vet. Med.* **49**, 322-324

RAMOS, M. und M. JUAREZ (1986):

Chromatographic, electrophoretic and immunological methods for detecting mixtures of milks from different species. *Int. Dairy Fed. Bull.* **202**, 175-187

REA S., K. CHIKUNI, R. BRANCIARI, R. S. SANGAMAYYA, D. RANUCCI und P. AVELLINI (2001):

Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. *J. Dairy Res.* **68**, 689-698

ROMERO, C. und I. LOPEZ-GOÑI (1999):

Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella spp.* by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3735-3737

SAIKI, R. K., S. H. SCHARF, F. FALOONA, K. B. MULLIS, G. T. HORN, H. A. EHRLICH und N. ARNHEIM (1985):

Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350- 1354

SAUER, S. (1992):

Entwicklung und Anwendung von enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis von Kuhmilch in Schaf- und Ziegenmilch bzw. -käse. Diss. Vet. Med., München

SOTELO, C. G., P. CALO-MATA, J. CHAPELA, R. I. PÉREZ-MARTÍN, H. REHBEIN, G. L. HOLD, V. J. RUSSEL, S. PRYDE, J. QUINTEIRO, M. IZQUIERDO, M. REY-MÉNDEZ, C. ROSA und A. T. SANTOS (2001):

Identification of flatfish species (*Pleuronectiforme*) using DNA-based techniques. J. Agric. Food Chem. **49**, 4562-4569

TAKADA, T., Y. KIKKAWA, H. YONEKAWA, S. KAWAKAMI und T. AMANO (1997):

Bezoar (*Capra aegagrus*) is a matriachal candidate for ancestor of domestic goat (*Capra hircus*): Evidence from the mitochondrial DNA diversity. Biochem. Genet. **35**, 315-326

WATANOBE, T., N. OKUMURA, N. ISHIGURO, M. NAKANO, A. MATSUI, M. SAHARA und M. KOMATSU (1999):

Genetic relationship and distribution of the japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) and Ryukyu wild boar (*Sus scrofa riukiuanus*) analysed by mitochondrial DNA. Mol. Ecol. **8**, 1509-1512

WOLF, C., J. RENTSCH und P. HÜBNER (1999):

PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: A reliable method for species identification. J. Agric. Food Chem. **47**, 1350-1355

ZEHNER, R., S. ZIMMERMANN und D. MEBS (1998):

RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application. Int. J. Legal Med. **111**, 323-327

9 ANHANG

9.1 Arbeitsanleitung zur Durchführung eines tierartenspezifischen Nachweises aus Milch und Milcherzeugnissen auf Basis einer molekularbiologischen Methode

9.1.1 Extraktion von DNA aus Milch- bzw. Käseproben

Milchproben können direkt in die Analyse eingesetzt werden. Von jeder Käseprobe werden 10 g abgewogen, in einem Stomacherbeutel mit 10 ml Aqua dest. vermischt und in einem Walkgerät zwei Minuten homogenisiert.

Von jeder zu untersuchenden Milch- bzw. Käseprobe werden nach gründlichem Mischen je 600 bzw. 500 µl in ein 2-ml Reaktionsgefäß gegeben.

Die Proben werden 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Die entstandene Fettschicht wird mit einem Mikrospatel entfernt. Bei fetthaltigen Proben wird dieser Schritt gegebenenfalls wiederholt.

Nach Zufügen von 25 µl Proteinase K werden die Proben 2 Stunden bei 56 °C inkubiert. Jeder Probe werden anschließend 20 µl NaOH sowie 40 µl SDS zugegeben und für 10 Minuten in kochendes Wasser gestellt.

Danach werden 200 µl Roti[®]-Phenol-Chloroform hinzugefügt und die Proben 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert.

Die entstandene obere Phase wird in ein 1,5-ml Reaktionsgefäß abpipettiert und pro gewonnenen 100 µl Überstand werden 20 µl NaClO₄ sowie 100 µl Isopropanol zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Proben werden 30 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Nach Zufügen von 500 µl Ethanol (70 %) werden die Proben 5 Minuten wie angegeben zentrifugiert, der Überstand verworfen und bei Raumtemperatur getrocknet.

Die gefällte und getrocknete DNA wird in 100 µl Aqua dest. aufgelöst und bei -18 °C aufbewahrt.

9.1.2 Durchführung der PCR zum speziesspezifischen Nachweis boviner DNA

1. Je 2,5 µl der extrahierten DNA werden in ein 0,2-ml Reaktionsgefäß gegeben.
2. Zu der DNA werden je 19,5 µl Aqua dest., 3,0 µl Reaktionspuffer, 1,8 µl MgCl₂, 1,0 µl dNTP, je 1,0 µl von Primer I und II sowie 0,2 µl der *Taq*-Polymerase gegeben und gründlich gemischt.
3. Die Proben werden in den Thermocycler gestellt und nach folgendem Temperaturprogramm amplifiziert:

Zyklen	Dauer	Temperatur
1	4 min	95 °C
35	30 sec	94 °C
	30 sec	52 °C
	30 sec	72 °C
1	7 min	72 °C

4. Nach Ablauf des Programms werden die Proben entnommen und bei 4 °C aufbewahrt.

9.1.3 Auftrennung der Amplifikate in der Gelelektrophorese

- 1.) Je 10 µl des PCR-Produktes werden mit 2 µl Farbstofflösung (6 x Orange Loading Dye Solution) versetzt und randständig auf ein Agarosegel (2 %ige NEEO[®] Agarose) aufgetragen.
- 2.) Auf jedes Gel wird zusätzlich ein Standardmarker mit 100 bzw, 50 Bp Größenabstand zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proben aufpipettiert.

- 3.) Die Auftrennung der Amplifikate erfolgt in 2,5 Stunden bei 120 mA.
- 4.) Das Gel wird 5 Minuten in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung in auf einem Labortaumelgerät gefärbt und anschließend zehn Minuten in Aqua dest. geschwenkt.
- 5.) Unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 302 nm, z.B. einem GelDoc TM 2000 werden die Banden sichtbar gemacht.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. E. Usleber für die freundliche Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und die zahlreichen Anregungen sowie die sorgfältige Durchsicht des Manuskriptes herzlich danken.

Ebenso gilt mein Dank den Mitarbeitern der Professur für Milchwissenschaften, im Besonderen Herrn Dr. A. Hassan und Frau Dr. E. Schneider für die Betreuung und die allzeit gewährte fachliche Hilfestellung, ihr Engagement und freundliches Entgegenkommen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Oellig für die gute Zusammenarbeit und die Überlassung von Probenmaterialien.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinem Freund einen besonderen Dank für ihr Verständnis und ihren moralischen Beistand während dieser Zeit aussprechen.

EIDESTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5088-6



9 783835 950887 