

Weiterentwicklung und Nutzungsempfehlungen validierter Methoden zur Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Produkten

Evaluation and recommendation of further use of selected methods for determining organic and conventional products

FKZ: 08OE023, 08OE044, 08OE225 und 08OE226

Koordination des Verbundvorhabens (FKZ 08OE044):

FiBL Deutschland e.V.

Kasseler Straße 1a, 60486 Frankfurt am Main

Tel.: +49 69 7137699-0

Fax: +49 69 7137699-9

E-Mail: info.deutschland@fibl.org

Internet: <http://www.fibl.org>

Autoren:

Hermanowski, Robert; Boner, Markus; Bonte, Anja; Henryson, Ann-Sofie; Hofem, Sabine; Langenkämper, Georg; Mäder, Rolf; Mende, Gudrun; Neuendorff, Jochen; Niehaus, Karsten; Stolz, Peter; Strube, Jürgen † 2010

Gefördert vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN)

Die inhaltliche Verantwortung für den vorliegenden Abschlussbericht inkl. aller erarbeiteten Ergebnisse und der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen liegt beim Autor / der Autorin / dem Autorenteam. Bis zum formellen Abschluss des Projektes in der Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft können sich noch Änderungen ergeben.



Weiterentwicklung und Nutzungsempfehlungen ausgewählter Methoden zur Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Produkten

Abschlussbericht

Berichtszeitraum: 01.02.2009–31.08.2012



**Robert Hermanowski, Markus Boner, Anja Bonte, Ann-Sofie Henryson,
Sabine Hofem, Georg Langenkämper, Rolf Mäder, Gudrun Mende, Jochen
Neuendorff, Karsten Niehaus, Peter Stolz,
Jürgen Strube † 2010**

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung,
Landwirtschaft und Verbraucherschutz im Rahmen des Bundesprogramms
Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft

Projekt Nr.: **08OE023, 08OE044, 08OE225 und 08OE226**

Frankfurt am Main, den 19.04.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	9
2	Übersicht der differenzierenden Methoden	11
2.1	Auflistung der Methoden	11
2.2	Kombination von Parametern unterschiedlicher Analytikmethoden: Stabil-Isotopen- und Fettsäure-Analytik	21
2.2.1	Das Prinzip	21
2.2.2	Die Messung und Auswertung	24
2.2.3	Bewertung der Anwendbarkeit in der Praxis	26
2.3	Kurze Zusammenfassung der Methodenbeurteilung	29
3	Durchführung anhand ausgewählter Methoden	31
3.1	Weiterentwicklung der Isotopenmassenspektroskopie (IRMS)	31
3.1.1	Methodenbeschreibung: IRMS	32
3.1.2	Planung und Ablauf	35
3.1.3	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	35
3.1.4	Material und Methoden	36
3.1.5	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	38
3.1.5.1	Möglichkeiten der Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Möhren	38
3.1.5.2	Möglichkeiten der Unterscheidung von ökologischem und konventionellem Weizen	43
3.1.5.3	Möglichkeiten der Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Kartoffeln	46
3.1.5.4	Möglichkeiten der Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Eiern	50
3.1.6	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	52
3.1.7	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	53
3.1.8	Kurze Zusammenfassung des Arbeitsblocks und der wichtigsten Ergebnisse	54
3.2	Weiterentwicklung der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie (FAS)	55
3.2.1	Methodenbeschreibung: FAS	56
3.2.2	Planung und Ablauf	57
3.2.3	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	58
3.2.4	Material und Methoden	59
3.2.5	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	61
3.2.5.1	Statistik und grafische Darstellung	61
3.2.5.2	Hühnereier: Referenzproben	61
3.2.5.3	Hühnereier: codierte Proben	63
3.2.5.4	Hühnereier: Praxisproben	66
3.2.5.5	Weizen: DOK-Proben	67
3.2.5.6	Weizen: Referenzproben	69
3.2.5.7	Weizen: codierte Proben	72
3.2.5.8	Weizen: Keim- und Lagertest	74
3.2.5.9	Weizen: Praxistest	75
3.2.6	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	76
3.2.7	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	78

3.2.8	Kurze Zusammenfassung des Arbeitsblocks und der wichtigsten Ergebnisse	80
3.3	Weiterentwicklung von Profiling-Techniken: Metabolom	81
3.3.1	Methodenbeschreibung: Profiling-Techniken	81
3.3.2	Planung und Ablauf	83
3.3.3	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	83
3.3.4	Material und Methoden	84
3.3.5	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	85
3.3.5.1	Datenauswertung über alle elf Weizensorten	87
3.3.5.2	Jahresvergleich der Weizensorte Runal	90
3.3.5.3	Maschinelle Klassifikationsverfahren und erster Blindversuch	93
3.3.5.4	Erweiterung der Metabolit-Profil-Datenbasis mit definierten Weizenproben in der Projektverlängerungsphase	93
3.3.5.5	Vorhersage der Anbauart bei verblindeten Proben und Tests auf Probenidentität	97
3.3.5.6	Aufnahme von Metaboliten-Profilen mit Flüssigchromatografie-Massenspektrometrie (HPLC-MS)	99
3.3.6	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	101
3.3.7	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	102
3.3.8	Kurze Zusammenfassung des Arbeitsblocks und der wichtigsten Ergebnisse	103
3.4	Weiterentwicklung von Profiling-Techniken: Proteom	104
3.4.1	Planung und Ablauf	104
3.4.2	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	104
3.4.3	Material und Methoden	105
3.4.4	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	106
3.4.4.1	Analyse der Sorte Runal aus dem Anbaujahr 2007	106
3.4.4.2	Proteinidentifikation via MALDI-TOF-MS/MS und Datenbankabfrage	108
3.4.4.3	Analyse der Sorte Runal aus den Anbaujahren 2009 und 2010	112
3.4.4.4	Gesamtübersicht der in der Sorte Runal identifizierten Proteine	114
3.4.4.5	Der Sortenvergleich aus dem Anbaujahr 2007	115
3.4.5	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	119
3.4.6	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	120
3.4.7	Kurze Zusammenfassung des Arbeitsblocks und der wichtigsten Ergebnisse	120
4	Praxistests	122
4.1	Planung und Ablauf	122
4.2	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	123
4.3	Material und Methoden	123
4.4	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	124
4.4.1	Fragestellung: Unterscheidung ökologisch/konventionell	124
4.4.1.1	Eier-Blindproben Agroisolab	125
4.4.1.2	Eier-Blindproben Kwalis	126
4.4.2	Fragestellung: Ist die Herkunft plausibel?	131
4.5	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	132
4.5.1	Konzept Wasserzeichen	133
4.5.1.1	Ergebnisse der Machbarkeitsstudie „Konzept Wasserzeichen“	135
4.6	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen	137
4.7	Kurze Zusammenfassung des Arbeitsblocks und der wichtigsten Ergebnisse	138

5	Wissenstransfer und Erstellung eines Leitfadens	139
6	Zusammenfassung	142
7	Literaturverzeichnis	145
8	Anhang	155

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Gehalt an α -Linolensäure (C18:3 ω 3) und das Isotopenverhältnis von Kohlenstoff ($\delta^{13}\text{C}$) schwanken jahreszeitlich stark im Fett von deutscher Kuhmilch.....	22
Abbildung 2: Der Gehalt an α -Linolensäure (C18:3 ω 3) und der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Kuhmilchfett korrelieren stark negativ.....	23
Abbildung 3: Gefriertrocknungsanlage.....	33
Abbildung 4: Kombination Elementanalysator mit Isotopenmassenspektrometer zur Messung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - und $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse.....	34
Abbildung 5: Boxplot und statistische Kenndaten der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse von Möhren aus der ökologischen (öko) und konventionellen (kon) Landwirtschaft aus Deutschland und Israel.....	39
Abbildung 6: Boxplots und statistische Kenndaten der ökologischen und konventionellen Möhren aus Deutschland unter besonderer Berücksichtigung der Düngung.....	40
Abbildung 7: Vergleich und Statistik der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse von Möhren aus unterschiedlichen Erntejahren (2009/2010) in Deutschland.....	42
Abbildung 8: D/H und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Isotopenverhältnisse von Referenzmöhren aus unterschiedlichen Regionen von Deutschland, Spanien, Portugal und Israel und Erntejahren.....	43
Abbildung 9: Vergleich und Statistik der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse von Getreide aus unterschiedlichen Erntejahren (2009/2010) in Deutschland.....	44
Abbildung 10: Vergleich und Statistik der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse von Getreide aus unterschiedlichen Erntejahren (2009/2010) in Deutschland.....	45
Abbildung 11: Vergleich und Statistik der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse von Kartoffeln aus unterschiedlichen Erntejahren (2009/2010) in Deutschland.....	47
Abbildung 12: Vergleich und Statistik der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse von Kartoffeln aus unterschiedlichen Erntejahren (2009/2010) in Deutschland.....	48
Abbildung 13: Vergleich und Statistik der Abweichung von der Meteoritic-Water-Line von Kartoffeln aus unterschiedlichen Erntejahren (2009/2010) in Deutschland.....	49
Abbildung 14: Box-Plot und statische Kenndaten der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse von Hühnereiern aus ökologischer (öko) und konventioneller (kon) Landwirtschaft aus Deutschland.....	51
Abbildung 15: Box-Plot und statistische Kenndaten der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse aus der Gesamtheit konventioneller (kon) und ökologischer (öko) Hühnereier des vorliegenden Projektes sowie den Gesamtdaten der TR Agroisolab GmbH.....	51
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Messanlage für Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie.....	56
Abbildung 17: Spektrum nach optischer Anregung für getrockneten Weizen.....	57
Abbildung 18: Mittlerer Kurvenverlauf (Mean & SD) der Lichtemission nach einer Minute Anregung mit weißem Licht von Eidotter.....	61
Abbildung 19: Mittlerer Kurvenverlauf (Mean&SD) der Lichtemission nach einer Minute Anregung mit gelbem Licht von Eidotter.....	62
Abbildung 20: Linke Grafik R40w [Counts/Sek], mittlere Grafik R80ge [Counts/Sek], rechte Grafik R80geDbI [%] von Eidotter der Referenzproben.....	63
Abbildung 21: R40w (Mittelwerte und 95 % CI der Kurvenabschnitte 61–100 Sekunden nach Anregung mit Weiß) von Hühnereiprobe (Eidotter) Phase 1 (Referenzproben) und Phase 2 (codierte Proben).....	64
Abbildung 22: R80geDbI (Mittelwerte und 95 % CI der prozentualen Kurvenverhältnisse 21–100 Sekunden nach Anregung mit Gelb zur Anregung mit Blau) von Hühnereiprobe (Eidotter) Phase 1 (Referenzproben) und Phase 2 (codierte Proben), Probenreihenfolge analog.....	64
Abbildung 23: R40w [Counts/Sek] und R80geDbI [%] von Hühnereiprobe (Eidotter) Phase 1 (Referenzproben) und Phase 2 (codierte Proben) nach Angaben der Haltungform.....	65

Abbildung 24: Linke Grafik R40w, rechte Grafik R80geDbI von zehn Hühnereierproben im Vergleich zu den Ergebnissen der Varianten von 63 Proben aus Phase 1 und 2.....	66
Abbildung 25: Grafische Darstellung von Mw1grDbI in Prozent für Weizen DOK-Feldversuch verschiedener Erntejahre, darunter die jeweiligen Mittelwertvergleiche für alle Paare nach Tukey-Kramer HSD.	68
Abbildung 26: Mw1grDbI in Prozent (0,2 bis 0,3 Sekunden nach Anregung mit Grün zur Anregung mit Blau), Mittelwert und 95 % Konfidenzintervall von DOK-Weizenproben der Ernte 2007 und 2009.....	69
Abbildung 27: R40ge und R40bl in Counts/0,1Sekunde für Weizen-Referenzproben Ernte 2008 beziehungsweise 2009 (Phase1) und Ernte 2010 (Phase 3), Mittelwerte und Standardfehler.....	71
Abbildung 28: R40geDbI [%] Weizen, codierte Proben aus Phase 2 und Phase 4.....	72
Abbildung 29: Mw1grDbI [%] Weizen, codierte Proben aus Phase 2 und Phase 4 mit R40geDbI < 150 %.	73
Abbildung 30: R40geDbI [%] Weizen aus Phase 1 und Phase 2.....	74
Abbildung 31: R40geDbI [%] Weizen-Doppelproben, Mittelwerte & 95 % Konfidenzintervall ..	76
Abbildung 32: Hauptkomponentenanalyse (PCA) des Metabolit-Profiles der Weizensorte Runal aus dem Erntejahr 2007.....	87
Abbildung 33: Metabolite mit signifikant unterschiedlichen Konzentrationen zwischen den Anbauformen über alle Weizensorten hinweg.....	88
Abbildung 34: Nicht identifizierte Metabolite (TAGs), die über alle Sorten hinweg einen signifikanten Unterschied in der Konzentration zwischen ökologischer und konventioneller Anbauart zeigen	90
Abbildung 35: Jahresvergleich der Metabolite mit signifikanten Konzentrationsunterschieden in Weizenproben der Sorte Runal aus konventioneller und ökologischer Anbauart.....	91
Abbildung 36: PCA mit identifizierten Metaboliten und mit TAGs der Weizensorte Runal aus den Jahrgängen 2007, 2009 und 2010.....	92
Abbildung 37: Vierzehn Metabolite sind zur Unterscheidung zwischen ökologischen und konventionellen Proben innerhalb des Probenpools besonders wichtig.	94
Abbildung 38: PCA auf Basis der mit SVM ermittelten 14 für die Unterscheidung der Anbauart wichtigsten Metabolite.....	95
Abbildung 39: Unterscheidung der Anbaumethode mithilfe der PCA auf Basis von Metabolitdaten individueller Sorten in verschiedenen Anbaujahren.....	96
Abbildung 40: Auswertung der Metabolitprofile mithilfe der PCA aus ökologischen, konventionellen und verblindeten Weizenproben (GfRS).....	97
Abbildung 41: Auswertung der Metabolitprofile mithilfe der PCA aus ökologischen, konventionellen und verblindeten Weizenproben (MRI).....	99
Abbildung 42: Analyse eines Extraktes aus Weizen (Probe P2651 – Anbau ökologisch; erhalten von KWALIS) mithilfe der HPLC-ESI-MS.	100
Abbildung 43: Massenspektrum der Komponenten der Probe P2651 (Anbau ökologisch, erhalten von KWALIS) bei 1,9–2,1 Minuten.	100
Abbildung 44: Elektrophoretische Trennung der Proteine der Sorte Runal aus dem Erntejahr 2007.	106
Abbildung 45: Konzentration spezifischer Proteine („Spotintensitäten“) mit signifikant unterschiedlicher Abundanz.	108
Abbildung 46: Quantifikation des Proteins Spot-ID 6723 aus ökologischem bzw. konventionellem Anbau im Erntejahr 2007.....	109
Abbildung 47: MALDI-TOF-MS/MS-Spektren des Proteins aus Spot-ID 6723.	109
Abbildung 48: Datenbankzuweisung des Proteins in Spot-ID 6723.	110
Abbildung 49: Quantifikation des Proteins in Spot-ID 6526 aus ökologischem bzw. konventionellen Anbau im Erntejahr 2007.....	110
Abbildung 50: Quantifikation des Proteins in Spot-ID 6533 aus ökologischem bzw. konventionellen Anbau im Erntejahr 2007.....	111
Abbildung 51: MALDI-TOF-MS/MS-Spektren des Proteins aus Spot 6533.	111

Abbildung 52: Datenbankzuweisung des Proteins ID 6533.	112
Abbildung 53: 2D-Gelbild der elektrophoretischen Trennung der Proteine der Sorte Runal aus dem Erntejahr 2010.	112
Abbildung 54: Quantifikation des Proteins aus Spot-ID 1092..	113
Abbildung 55: Identifizierte Proteine im Weizenproteom der Sorte Runal..	115
Abbildung 56: Trefferquote für die Differenzierung von ökologisch und konventionell erzeugter Weizen-Blindproben mittels IMRS (Agroisolab) und FASD (Kwalis).....	125
Abbildung 57: Trefferquote für die Differenzierung von ökologisch und konventionell erzeugter Eier-Blindproben mittels IMRS (Agroisolab) und FAS (Kwalis).....	126
Abbildung 58: Trefferquote für die Differenzierung von ökologisch und konventionell erzeugter Möhren-Blindproben mittels IMRS (Agroisolab).....	127
Abbildung 59: Trefferquote für die Differenzierung von ökologisch und konventionell erzeugter Kartoffel-Blindproben mittels IMRS (Agroisolab).....	128
Abbildung 60: Trefferquote für die Differenzierung von ökologisch und konventionell erzeugter Tomaten-Blindproben mittels IMRS (Agroisolab).....	129
Abbildung 61: Trefferquote für die Differenzierung von ökologisch und konventionell erzeugter Eier-Praxisproben mittels IMRS (Agroisolab) und FAS (Kwalis).....	130
Abbildung 63: Aufbau einer Datenbank mit Isotopenreferenzdaten für verschiedene Produkte und regionale Herkünfte.....	133
Abbildung 64: Hauptkomponentenanalyse der Bioelemente in Kartoffeln.	135
Abbildung 65: Hauptkomponentenanalyse der Bioelemente in Möhren	135
Abbildung 66: Hauptkomponentenanalyse der Bioelemente in Getreide in der Organik	136
Abbildung 67: Einfluss der Lagerung auf die ¹⁸ O/ ¹⁶ O und D/H Isotopenverhältnisse des Gewebewassers in der Kartoffel.....	136

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zeitliche Übersicht der Arbeitsschritte im Projekt.....	10
Tabelle 2: Übersicht der Methoden für die Unterscheidung zwischen ökologisch und konventionell erzeugten Lebensmitteln tierischen Ursprungs	14
Tabelle 3: Übersicht der Methoden für die Unterscheidung zwischen ökologisch und konventionell erzeugten Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs.....	16
Tabelle 4: Übersicht der Arbeitsschritte bei der IRMS	31
Tabelle 5: Internationale Standards zur Kalibrierung von Isotopenmassenspektrometern	34
Tabelle 6: Übersicht über die Referenz- und Blindproben	36
Tabelle 7: Übersicht über die eingesetzte Analytik	37
Tabelle 8: Geplante Arbeiten und tatsächlich erreichte Ziele im Projektteil Weiterentwicklung der IRMS	53
Tabelle 9: Übersicht der Arbeitsschritte bei der FAS	55
Tabelle 10: Geplante Arbeiten und tatsächlich erreichte Ziele im Projektteil Weiterentwicklung der FAS	79
Tabelle 11: Übersicht der Arbeitsschritte beim Metabolom-Profilings.....	81
Tabelle 12: Übersicht der verschiedenen Sorten aus dem DOK-Feldversuch 2006/2007.....	85
Tabelle 13: Identifizierte Metabolite in der Weizensorte Runal aus dem Erntejahr 2007.....	86
Tabelle 14: Nicht identifizierte Metabolite (TAGs), die nach dem Student-t-Test über alle analysierten Weizensorten hinweg einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen konventioneller und ökologischer Anbauart aufweisen.....	89
Tabelle 15: Geplante Arbeiten und tatsächlich erreichte Ziele im Projektteil Weiterentwicklung von Profiling-Techniken: Metabolom	102
Tabelle 16: Übersicht der Arbeitsschritte beim Proteom-Profilings.....	104
Tabelle 17: Ergebnis des Sortenvergleichs der 10 Weizensorten aus der Ernte 2007 und des Jahresvergleichs der Sorte Runal aus den Erntejahren 2007, 2009 und 2010..	116
Tabelle 18: In ökologischer und konventioneller Anbauart signifikant differenzielle Proteine in verschiedenen Weizensorten aus dem Erntejahr 2007.....	117
Tabelle 19: Proteinidentitäten im Sortenversuch.....	119
Tabelle 20: Geplante Arbeiten und tatsächlich erreichte Ziele im Projektteil Weiterentwicklung von Profiling-Techniken: Proteom	120
Tabelle 21: Übersicht der Arbeitsschritte im Rahmen der Praxistests	122
Tabelle 22: Herkunftsaussagen Agrolab zu Blindproben Karotten	131

1 Einführung

Nicht nur in den Medien, sondern auch innerhalb des Ökosektors wird seit einiger Zeit diskutiert, ob angesichts der rasant steigenden Nachfrage nach Bioprodukten und des teilweise nicht schnell genug wachsenden Angebots die bestehenden Qualitätssicherungs- und Kontrollsysteme ausreichen, um vor Missbrauch und Betrug zu schützen. Ökologische Erzeugnisse sind noch deutlich stärker als andere Lebensmittel auf das Vertrauen der Verbraucher angewiesen, denn die ökologische Qualität kann man im Endprodukt weder optisch noch sensorisch eindeutig erkennen. Insbesondere in Zweifelsfällen sollten Verfahren zur Verfügung stehen, die Rückschlüsse zulassen, ob ein Produkt ökologisch oder konventionell erzeugt wurde.

Gerade die großen Verarbeitungs- und Handelsunternehmen haben schon seit Jahren neben der Zertifizierung eigene Qualitätssicherungssysteme eingeführt, die zum Beispiel Rückverfolgbarkeitssysteme und Rückstandskontrollen umfassen. Systematische Rückstandsanalysen bei der eingekauften Ware sind inzwischen weit verbreitet. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist, dass auch bei konventioneller Ware häufig Pestizidanwendungen nicht analytisch nachgewiesen werden können und andererseits teilweise auch Ökoprodukte Spuren von Pestiziden enthalten. Zudem sind Rückstandsanalysen mit einem breiten Analysespektrum sehr teuer.

Das Kontrollsystem gemäß den EU-Rechtsvorschriften für den ökologischen Landbau basiert auf einer Verfahrenskontrolle, die gerade in Zweifelsfällen durch Probenahmen und Analytik ergänzt wird. Neben den bekannten Rückstandsanalysen wurden in den letzten Jahren diverse Verfahren entwickelt und validiert, die zumindest für bestimmte Produktgruppen Rückschlüsse auf die ökologische Qualität eines Erzeugnisses zulassen und auch in der Privatwirtschaft vereinzelt bereits eingesetzt werden. Hierzu gehören beispielsweise die stabile Isotopenanalyse und die Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie.

Ziel des Projektes war es, diskriminierende Methoden zu evaluieren und diese nach vorgängig festgelegten Kriterien, wie Anwendungsmöglichkeiten und Aussagesicherheit für Qualitätssicherungssysteme in den Unternehmen, aber ebenso für die Anwendung im Kontrollsystem durch Kontrollstellen und zuständige Behörden zu bewerten.

Der vorliegende Schlussbericht ist wie folgt aufgebaut:

- › In Kapitel 2 wird das **Methodenspektrum** systematisch dargestellt und evaluiert.
- › Kapitel 3.1 beschäftigt sich mit der Weiterentwicklung der **Isotopenmassenspektroskopie (IRMS)**.
- › Die Weiterentwicklung der **Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie (FAS)** ist in Kapitel 3.2 beschrieben.
- › Grundlagenarbeit muss bei der Entwicklung von **Profiling-Techniken** geleistet werden (siehe Kapitel 3.3 und 3.4).
- › In **Praxistests** mittels IRMS und FAS wird anhand von Marktproben die Praxistauglichkeit überprüft. Dazu gehört auch die Abklärung der Frage des Aufwandes und der Kosten, die ein Unternehmen oder eine Kontrollstelle tragen muss, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten (siehe Kapitel 4).

Die folgende Übersicht dokumentiert die wesentlichen Arbeitsschritte im Projekt mit einer zeitlichen Einordnung.

Tabelle 1: Zeitliche Übersicht der Arbeitsschritte im Projekt (A = Anfang, E = Ende, X = Verlauf)

Arbeitsblock/Durchgeführte Arbeiten	1. Halbjahr 2009	2. Halbjahr 2009	1. Halbjahr 2010	2. Halbjahr 2010	1. Halbjahr 2011	2. Halbjahr 2011	1. Halbjahr 2012	2. Halbjahr 2012
FAS, IRMS und Praxistests								
Auswahl von Leitprodukten	AE							
Einengung der Leitprodukte		AE						
Praxistests								
Beschaffung Referenzproben	A	E						
Einfordern von Zusatzinformationen zur Erzeugung		A	X	X	E			
Erweiterung der Fragestellung auf Herkunftsnachweis			A	X	E			
Beschaffung Blindproben			A	X	E			
Beschaffung Praxisproben			A	X	X	E		
Auswertung der Untersuchungsergebnisse		A	X	X	X	X	E	
Zusatzmodul Wasserzeichen						A	E	
IRMS und FAS								
Schaffung einer Datenbankgrundlage	A	E						
Zusatzinformationen zur Erzeugung des Produkts		A	X	X	E			
Aufbau signifikanter Datensätze		A	X	X	E			
Blindtests		A	X	X	X	E		
IRMS								
Authentizitätsprüfung: Erweiterung auf weitere stabile Isotope			A	X	E			
FAS								
Ausarbeitung statistisch signifikanter Kenngrößen zur Unterscheidung			A	X	X	E		
Weiterentwicklung der Praxistauglichkeit des Verfahrens					A	E		
Profiling-Techniken								
Aufnahme Protein- und Metabolit-Profile: Weizensorte Runal, Ernten 2007, 2009 und 2010	A	X	X	X	X	X	E	
Aufnahme der Protein- und Metabolit-Profile: 10 Weizensorten der Ernte 2007		A	X	X	X	X	E	
Blindproben					A	E		
Projektverlängerungsphase							A	E
Datenauswertung		A	X	X	X	X	X	E

2 Übersicht der differenzierenden Methoden

2.1 Auflistung der Methoden

In den letzten 20 Jahren hat eine rasante Entwicklung von Methoden für die Unterscheidung von ökologisch und konventionell erzeugten Lebensmitteln stattgefunden. Neben den klassischen analytischen Methoden, wie zum Beispiel der Analyse der Pflanzenschutzmittelrückstände, der Stabil-Isotopen-Analytik, dem Metaboliten-Profilung, dem Protein-Profilung, der Fettsäureanalytik und Kombinationen dieser Methoden, haben auch ganzheitliche Methoden eine Weiterentwicklung erlebt. Zu den ganzheitlichen Methoden zählen unter anderem die Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie und die Biokristallisation.

Ziel der Methodenübersicht war es, die bestehenden oder in der Entwicklung befindlichen differenzierenden Methoden zur Unterscheidung von ökologisch und herkömmlich erzeugten Nahrungsmitteln zu beschreiben und ihre Praxistauglichkeit zu bewerten. Hierfür wurden eine umfangreiche Literaturstudie sowie ergänzende Expertengespräche durchgeführt.

In Tabelle 2 sowie Tabelle 3 werden die Methoden dargestellt, welche in der Literatur gefunden wurden. Die Tabellen sind eine Momentaufnahme aus heutiger Sicht (2010) und haben keinen Anspruch auf Vollständigkeit, da ständig neue Methoden veröffentlicht werden.

Lebensmittel tierischen Ursprungs

Bei der Unterscheidung zwischen ökologischen und konventionellen Lebensmitteln tierischen Ursprungs (siehe Tabelle 2) stehen die Unterschiede in der Fütterung (weniger Mais, mehr Gras/Grassilage) sowie der verstärkte Einsatz von tierischem Dünger bei der Produktion des Futters im Vordergrund. Diese Unterschiede spiegeln sich in der Zusammensetzung der Fettsäuren und dem Verhältnis zwischen schweren und leichten Kohlenstoff- und Stickstoffisotopen wider ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$). So können ökologische und konventionelle Kuhmilch und deren Produkte gut mittels Fettsäureanalytik mit/oder Kohlenstoff-Stabil-Isotopen-Analytik unterschieden werden. Dank der Kohlenstoff-Stabil-Isotopen-Analytik kann der Anteil von C4-Pflanzen¹ im Futter geschätzt und somit ein Hinweis auf eine Intensivmast mit Mais erhalten werden. Jedoch reichen die Informationen aus der Stickstoff-Stabil-Isotopen-Analytik allein nicht aus, um zwischen ökologischem und konventionellem Rindfleisch zu unterscheiden. Biohühnereier wiederum lassen sich gut von konventionellen Eiern anhand von Stickstoff-Stabil-Isotopen-Analytik differenzieren. Vielversprechend für die Diskriminierung von Wildlachs, konventionellem und ökologischem Zuchtlachs ist die Fettsäureanalytik in Kombination mit Stickstoff-Stabil-Isotopen-Analytik. Die Diskriminierung dieser drei Lachstypen gelingt auch mit der Analytik der Isomere des Carotins Astaxanthin. Auch diesen zwei Methoden liegen die Unterschiede in der Fütterung zugrunde. Vielversprechend ist ebenfalls die Überprüfung der

¹ C4-Pflanzen nutzen einen Stoffwechselweg, um Kohlenstoffdioxid für die Fotosynthese zunächst räumlich vorzufixieren und erst dann wie C3-Pflanzen im Calvin-Zyklus zu Kohlenhydraten aufzubauen. Der Name C4 leitet sich vom ersten Fixierungsprodukt ab, welches durch die Assimilation von Kohlenstoffdioxid entsteht. Während dies bei C3-Pflanzen eine Kohlenstoffverbindung mit drei C-Atomen ist, findet man in C4-Pflanzen eine Verbindung mit vier C-Atomen. Amarant, Hirse, Mais und Zuckerrohr sind C4-Pflanzen.

korrekten Anwendung von Tetracyclin-Antibiotika in der Schweine- und Geflügelhaltung anhand von Fluoreszenzmikroskopie von Knochenschnitten.

Die angewendeten Analytiktechniken Gaschromatografie bei der Fettsäureanalytik, HPLC² bei der Analytik von Carotinisomeren, Isotopenmassenspektrometrie bei den Stabil-Isotopen und Fluoreszenzmikroskopie sind gut etabliert. Gaschromatografen und HPLC-Anlagen sind in Praxislaboratorien gängig. Isotopenmassenspektrometer hingegen sind in den kommerziellen Laboratorien noch nicht so weit verbreitet.

Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs

Der Ökolandbau und die konventionelle Landwirtschaft weichen unter anderem in der Art der Nährstoff-/Mineralversorgung der Nutzpflanzen, in der Bestandsdichte sowie in der Bekämpfung der Pflanzenpathogene, -schädlinge und Beikräuter ab. Die Böden der beiden Anbausysteme weisen unterschiedliche Bodenmikroorganismen und eine abweichende Bodenqualität auf. Diese anbaubedingten Differenzen haben Auswirkungen auf den pflanzlichen Stoffwechsel, welche sich im Metabolom, im Proteom, in diversen Inhaltsstoffen und in den Verhältnissen der Stabil-Isotope niederschlagen.

Bei den pflanzlichen Lebensmitteln werden in der Praxis ökologisch erzeugte und konventionelle Produkte häufig mit dem Nachweis von chemisch-synthetischen Pflanzenschutzmitteln unterschieden (siehe auch Tabelle 3). Hier wird der generelle Verzicht auf chemisch-synthetische Pflanzenschutzmittel im Ökolandbau kontrolliert. Da der Ökolandbau nicht isoliert von der konventionellen Landwirtschaft arbeitet, sind unbeabsichtigte Kontaminationen mit chemisch-synthetischen Pestiziden durch Abdrift, Verschleppung et cetera möglich. Dadurch kommt es zu einer Überlappung der Messdaten von konventionell und ökologisch erzeugten Proben. Die Interpretation der Messdaten erfolgt mittels Plausibilitätsprüfung, erfordert unter anderem Wissen über das Abbauverhalten des detektierten Wirkstoffs in der Pflanze und zusätzliche Informationen über die Produktionsbedingungen der analysierten Produktcharge. Die Extraktions- und Analysetechniken (GC-MS³, GC-TOFMS⁴, HPLC, LC-MS/MS⁵ etc.) für chemisch-synthetische Pflanzenschutzmittel sind in der Praxis gut etabliert und die erforderlichen Geräte sind in den kommerziellen Laboratorien weit verbreitet.

Andere Methoden zur Differenzierung zwischen ökologischen und konventionellen Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs machen sich Unterschiede im Metabolom, im Proteom, in den Gehalten diverser Inhaltsstoffe und in den Verhältnissen der Stabil-Isotope zunutze. Eine Übersicht der Methoden ist in Tabelle 3 ersichtlich.

Es gibt Unterschiede zwischen ökologisch und konventionell hergestellten Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs im Gehalt an Stickstoff, Magnesium, Zink, Polyphenolen, Zucker, Phosphor et cetera. Allerdings lassen sich diese Unterschiede nicht für alle Lebensmittel verallgemeinern. Diese Parameter werden nicht nur vom Anbausystem beeinflusst. Es muss für jedes pflanzliche Produkt untersucht werden, welche Parameter eine Unterscheidung zwischen konventionell und ökologisch erzeugten Produkten ermöglichen.

² HPLC: Hochleistungsflüssigkeitschromatografie

³ GC-MS: Gaschromatografie mit Massenspektrometrie-Kopplung

⁴ GC-TOFMS: Gaschromatografie mit Time of Flight-Massenspektrometrie-Kopplung

⁵ LC-MS/MS: Flüssigchromatografie mit MSxMS-Massenspektrometrie-Kopplung

Ganzheitliche Methoden, wie es die Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie und die Biokristallisation sind, ermöglichen, den gesamten Anbauprozess im Lebensmittel zu erfassen. Sie ermitteln die Unterschiede zwischen konventionellen und ökologischen Lebensmitteln als Ganzes. Dabei werden produktinterne Organisations- und Ordnungsphänomene gemessen, welche durch die Anbau- und Umweltbedingungen beeinflusst werden. Die Techniken der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie und der Biokristallisation sind validiert und einfach in der Durchführung. Durch die computergestützte Bildauswertung bei der Biokristallisation und die automatisierte Auswertung der Messwerte bei der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie konnten die Methoden standardisiert werden. Beides sind Erfolg versprechende Methoden, die sich noch im Forschungsstadium befinden. Mittels Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie gelang die Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Produkten wie Äpfeln, Karotten, Weizen und Mais. Die Biokristallisation differenzierte unter anderem konventionell und ökologisch angebauten Weizen.

Tabelle 2: Übersicht der Methoden für die Unterscheidung zwischen ökologisch und konventionell erzeugten Lebensmitteln tierischen Ursprungs

Methode	Lebensmittel	Literaturreferenz	Bemerkungen
Tierische Produkte			
Fettsäureanalytik	Kuhmilch aus Berggebieten	Collomb, M., W. Bisig, U. Bütikofer, R. Sieber, M. Bregy, & L. Etter (2008): Fatty acid composition of mountain milk from Switzerland: Comparison of organic and integrated farming systems. <i>International Dairy Journal</i> 18: 976–982.	Vielversprechend für die Unterscheidung von Schweizer Bergkuhmilch konventioneller und ökologischer Erzeugung. Praxisnah. Parameter und Grenzwerte sind nur bedingt übertragbar auf andere Berggebiete wegen der regionalen Unterschiede in der Fütterung und im Weidegang der Milchkühe.
Fettsäureanalytik	Kuhmilch und Kuhmilchprodukte	Vetter, W. & M. Schröder (2010): Concentrations of phytanic acid and pristanic acid are higher in organic than in conventional dairy products from the German market. <i>Food Chemistry</i> 119 (2): 746–752.	Vielversprechend für die Unterscheidung von ökologisch und konventionell erzeugten Produkten wie Käse, Butter, Sahne und Milch (aus Kuhmilch). Im Forschungsstadium. Untersuchungen sollten mit mehr Proben des gleichen Typs erweitert werden.
Kombination von Stabil-Isotopen-Analytik und Fettsäureanalytik	Kuhmilch	Molkentin, J. & A. Giesemann (2007): Differentiation of organically and conventionally produced milk by stable isotope and fatty acid analysis. <i>Analytical and Bioanalytical Chemistry</i> 388 (1): 297–305. Molkentin, J. (2009): Authentication of organic milk using $\delta^{13}\text{C}$ and the α -linolenic acid content of milk fat. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> 57: 785–790.	Vielversprechend für die Unterscheidung von deutscher ökologisch und konventionell erzeugter Kuhmilch. Unterscheidung von konventioneller und ökologischer Bergmilch vermutlich schwierig mit dieser Methode. Praxisnah.
Kombination von Stabil-Isotopen-Analytik, Fettsäureanalytik und „Artificial Neural Network“	Lachs	Molkentin, J.; H. Meisel, I. Lehmann, & H. Rehbein (2007): Identification of organically farmed Atlantic salmon by analysis of stable isotopes and fatty acids. <i>European Food Research and Technology</i> 224 (5): 535–543.	Vielversprechend für die Unterscheidung von wildem Lachs, ökologischem Zuchtlachs und konventionellem Zuchtlachs. Im Forschungsstadium. Untersuchungen sollten mit weiteren Lachsproben erweitert werden, um eine größere Diversität in der Lachsfütterung abzudecken und die Robustheit der Methode zu erhöhen.
Fettsäureanalytik	Lachs	Megdal, P. A., N. A. Craft, & G. J. Handelman (2009): A simplified method to distinguish farmed (Salmon solar) from wild salmon: Fatty acid ratios versus Astaxanthin chiral isomers. <i>Lipids</i> 44 (6): 56–576.	Vielversprechend für Unterscheidung von wildem Lachs und Zuchtlachs (ökologisch und konventionell). Unterscheidet allerdings nicht zwischen ökologisch und konventionell erzeugtem Lachs. Analytik ist praxisnah.

Methode	Lebensmittel	Literaturreferenz	Bemerkungen
Analytik der Isomere von Carotinoiden	Lachs	Rehbein, H., J. Brüggemann, W. Jira, H. Karl, I. Lehmann, M. Manthey-Karl, H. Meisel, J. Molkentin, J. Oehlschläger, U. Ostermeyer, U. Ruoff, K.-H. Schwind (2003): Entwicklung von Methoden zum Nachweis von ökologisch erzeugten Produkten am Beispiel der Lachszucht. Abschlussbericht des Projekts 02OE073/1 des Bundesprogramms Ökologischer Landbau. Bericht archiviert unter http://orgprints.org/16211/3/16211-02OE073-ble-mri_bund-2003-lachszucht.pdf .	Vielversprechend für die Unterscheidung von wildem Lachs, ökologischem Zuchtlachs und konventionellem Zuchtlachs. Praxisnah. Methode wird bereits für die Authentizitätsprüfung von Lachs von der U. S. Food and Drug Administration (FDA) angewendet.
Stabil-Isotopen-Analytik (Kohlenstoff)	Rindfleisch	Boner, M. (2006): Überprüfung der Authentizität von Rindfleisch (öko) mithilfe der stabilen Isotope der Bioelemente. Dissertation, vorgelegt bei der Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn. Beitrag archiviert unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online/landw_fak/2006/boner_markus/0804.pdf Boner, M. & S. Hofem (2009): The usage of stable isotopes to prove the authenticity of organic food especially organic eggs and organic beef. In: Proceedings of the International Workshop on Organic Food Authentication: Challenge or Utopia? Geel, Belgium, 30. November – 01. December 2009. JRC Technical Notes.	Die $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse bieten Möglichkeiten, über den abgeschätzten C4-Anteil in der Nahrung Hinweise auf eine Intensivmast mit Mais zu erhalten und bieten somit eine indirekte Möglichkeit zur Unterscheidung von konventionell und ökologisch erzeugten Produkten. Eine Unterscheidung von ökologisch und konventionell erzeugtem Rindfleisch ist nur bedingt möglich. Ohne Rückführung der Erkenntnis aus den ^{13}C -Isotopenverhältnissen auf die eingesetzte Menge an Mais kann nur der Status in der Nahrung wiedergegeben, jedoch kann nicht zwischen ökologisch und konventionell erzeugtem Rindfleisch unterschieden werden.
Antibiotika-Nachweis in Knochenschnitten mit Fluoreszenzmikroskopie	Schweinefleisch, Hühnerfleisch	Kelly, M., J. A. Tarbin, H. Ashwin, & M. Sharman (2006): Verification of compliance with organic meat production standards by detection of permitted and nonpermitted uses of veterinary medicines (Tetracycline antibiotics). Journal of agricultural and food chemistry 54: 1523–1529.	Vielversprechende Untersuchungen für die Überprüfung der korrekten Anwendung von Tetracyclin-Antibiotika in der ökologischen Schweine- und Geflügelhaltung. Im Forschungsstadium. Untersuchungen müssen erweitert werden, um die Robustheit der Methode zu überprüfen.
Stabil-Isotopen-Analytik (Stickstoff)	Hühnereier	Boner, M. (2003): Herkunftsbestimmung von Bioeiern und deren mögliche Differenzierung von konventionellen Eiern mithilfe der stabilen Isotope der Bioelemente. Abschlussbericht des Projekts 02OE542 des Bundesprogramms Ökologischer Landbau. Boner, M. & S. Hofem (2009): The usage of stable isotopes to prove the authenticity of organic food especially organic eggs and organic beef. In: Proceedings of the International Workshop on Organic Food Authentication: Challenge or Utopia? Geel, Belgium, 30. November – 01. December 2009. JRC Technical Notes.	Vielversprechend. Die Unterscheidung von Eiern aus ökologischer und konventioneller Erzeugung ist möglich. Die Methode wird in der Praxis der Authentizitätsprüfung von Hühnereiern bereits angewandt.

Tabelle 3: Übersicht der Methoden für die Unterscheidung zwischen ökologisch und konventionell erzeugten Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs

Methode	Lebensmittel	Literaturreferenz	Bemerkungen
Pflanzliche Produkte			
Inhaltsstoffe	Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs	Brandt, K. & J. P. Molgaard (2001): Organic agriculture: does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods? <i>Journal of the Science of Food and Agriculture</i> 81: 924–931. Dangour, A., S. Dodhia, A. Hayter, A. Aikenhead, E. Allen, K. Lock, & R. Uauy (2009): Comparison of composition (nutrients and other substances) of organically and conventionally produced foodstuffs: a systematic review of the available literature. Report for the Food Standards Agency.	Unterschiede zwischen ökologischen und konventionellen Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs im Gehalt an Stickstoff, Magnesium, Zink, Polyphenole, Zucker, Phosphor. Es muss für jedes pflanzliche Produkt untersucht werden, welche Parameter eine Unterscheidung zwischen konventionell und biologisch erzeugten Produkten ermöglichen.
Analytik von chemisch-synthetischen Pflanzenschutzmittel-rückständen	Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs	Wyss, G. S. & K. Nowack (2006): Konzept zur Beurteilung von Pestizidrückständen in Bioprodukten. <i>Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene</i> 97(4): 312–322.	Eine gängige und gut etablierte Methode in der Praxis. Die Methode ermöglicht die Unterscheidung von ökologischen und konventionell erzeugten Lebensmitteln. Um eine eindeutige Zuordnung zu ökologisch oder nicht ökologisch machen zu können, bedarf es Hintergrundinformationen über die jeweilige Charge des untersuchten Lebensmittels.
Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie	Äpfel	Strube, J. & P. Stolz (2007): Differenzierung und Klassifizierung von Ökoprodukten mittels validierter analytischer und ganzheitlicher Methoden. Abschlussbericht zum Projekt 02OE170/F2 des Bundesprogramms Ökologischer Landbau. Beitrag archiviert unter http://orgprints.org/14072/1/14072-02OE170_F2-kwalis-strube-2007-oekoprodukte.pdf .	Vielversprechende Ergebnisse. Im Forschungsstadium. Die Methode ist validiert. Untersuchungen sollten mit weiteren Apfelproben erweitert werden, um eine größere Diversität in den Produktionsbedingungen und den klimatischen und geografischen Gegebenheiten abzudecken und die Robustheit der Methode zu erhöhen.
Metabonomik	Karotten	Dasko, L., H. Jijakl, & A. Maquet (2009): Application of a metabonomic approach for the discrimination of organically and conventionally grown carrots. In: <i>Proceedings of the International Workshop on Organic Food Authentication: Challenge or Utopia?</i> Geel, Belgium, 30. November – 01. December 2009. JRC Technical Notes.	Vielversprechende Forschungsergebnisse für die Unterscheidung von ökologisch und konventionell erzeugten Karotten. Untersuchungen müssen erweitert werden, um die bisherigen Ergebnisse zu bestätigen.
Polyphenolanalytik	Karotten	Soltoft, M., J. Nielsen, K. H. Laursen, S. Husted, U. Halekoh, & P. Knuthsen (2010): Effects of organic and conventional growth systems on the content of flavonoids in onions and phenolic acids in carrots and potatoes. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> 58: 10323–10329.	Keine Unterscheidung aufgrund der Gehalte von einzelnen Polyphenolen möglich zwischen ökologisch und konventionell erzeugten Karotten aus dänischen Feldversuchen.

Methode	Lebensmittel	Literaturreferenz	Bemerkungen
Stabil-Isotopen-Analytik (Stickstoff)	Karotten	Bateman, A. S., S. D. Kelly, & M. Woolfe (2007): Nitrogen isotope composition of organically and conventionally grown crops. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> 55: 2664–2670.	Keine Unterscheidung möglich zwischen konventionell und ökologisch erzeugten Karotten mit $\delta^{15}\text{N}$.
Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie	Karotten	Strube, J. & P. Stolz (2007): Differenzierung und Klassifizierung von Ökoprodukten mittels validierter analytischer und ganzheitlicher Methoden. Abschlussbericht zum Projekt 02OE170/F2 des Bundesprogramms Ökologischer Landbau. Beitrag archiviert unter http://orgprints.org/14072/1/14072-02OE170_F2-kwalis-strube-2007-oekoprodukte.pdf .	Vielversprechende Ergebnisse. Im Forschungsstadium. Die Methode ist validiert. Untersuchungen sollten mit weiteren Karottenproben erweitert werden, um eine größere Diversität in den Produktionsbedingungen und den klimatischen und geografischen Gegebenheiten abzudecken und die Robustheit der Methode zu erhöhen.
Bestimmung Proteingehalt und Gehalt an Ascorbinsäure	Kartoffeln	Camin, F., A. Moschella, F. Miselli, B. Parisi, G. Versini, P. Ranalli, & P. Bagnaresi (2007): Evaluation of markers for the traceability of potato tubers grown in an organic versus conventional regime. <i>Journal of the Science of Food and Agriculture</i> 87: 1330–1336.	Konventionell und ökologisch erzeugte italienische Kartoffeln konnten nicht unterschieden werden.
Metabolomik-Fingerabdruck	Kartoffeln	Hajslova, V. Schulzova, L. Vaclavik, & K. Riddellova (2009): Metabolomic profiling employing DART-TOFMS: a challenging tool in organic crops authentication. In: <i>Proceedings of the International Workshop on Organic Food Authentication: Challenge or Utopia?</i> Geel, Belgium, 30. November – 01. December 2009. JRC Technical Notes.	Vielversprechend für die Unterscheidung von ökologisch und konventionell erzeugten Kartoffeln. Im Forschungsstadium. Untersuchungen sollten erweitert werden.
Polyphenolanalytik	Kartoffeln	Soltoft, M., J. Nielsen, K. H. Laursen, S. Husted, U. Halekoh, & P. Knuthsen (2010): Effects of organic and conventional growth systems on the content of flavonoids in onions and phenolic acids in carrots and potatoes. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> 58: 10323–10329.	Keine Unterscheidung aufgrund der Gehalte von einzelnen Polyphenolen möglich zwischen ökologisch und konventionell erzeugten Kartoffeln aus dänischen Feldversuchen.
Protein-Profiling	Kartoffeln	Leshera, S. J., K. M. Koistinen, N. Massat, H. V. Davies, L. V. T. Shepherd, J. W. McNicol, I. Cakmak, J. Cooper, L. Lück, S. O. Kärenlampi, & C. Leifert (2007): Effects of agricultural production systems and their components on protein profiles of potato tubers. <i>Proteomics</i> 7: 597–604.	Vielversprechend. Im Forschungsstadium. Die Untersuchungen sollten mit weiteren Kartoffelproben erweitert werden, um eine größere Diversität in den Produktionsbedingungen und den klimatischen und geografischen Gegebenheiten abzudecken, die Ergebnisse zu bestätigen und die Robustheit der Biomarker zu erhöhen. Eine Vereinfachung der Methode für die Praxis ist möglich.

Methode	Lebensmittel	Literaturreferenz	Bemerkungen
Spurenelemente, Metalle, Sekundäre Metabolite, Enzymatische Oxidation, Sensorik	Kartoffeln	Hajslova, J., V. Schulzova, P. Slanina, K. Janne, K. E. Hellenäs, & C. Andersson (2005): Quality of organically and conventionally grown potatoes: Four-year study of micronutrients, metals, secondary metabolites, enzymic browning and organoleptic properties. <i>Food Additives and Contaminants</i> 22 (6): 514–534.	Die Parameter sind nicht robust genug für eine saisonunabhängige Unterscheidung von ökologisch und konventionell erzeugten Kartoffeln.
Stabil-Isotopen-Analytik (Stickstoff)	Kartoffeln	Camín, F., A. Moschella, F. Miselli, B. Parisi, G. Versini, P. Ranalli, & P. Bagnaresi (2007): Evaluation of markers for the traceability of potato tubers grown in an organic versus conventional regime. <i>Journal of the Science of Food and Agriculture</i> 87: 1330-1336.	Vielversprechend. Im Forschungsstadium. Die Untersuchungen (bisher Italien) sollten mit weiteren Kartoffelproben erweitert werden, um eine größere Diversität in den Produktionsbedingungen und den klimatischen und geografischen Gegebenheiten abzudecken, die Ergebnisse zu bestätigen und die Robustheit der Methode zu erhöhen.
Stabil-Isotopen-Analytik (Stickstoff)	Kopfsalat	Bateman, A. S., S. D. Kelly, & M. Woolfe (2007): Nitrogen isotope composition of organically and conventionally grown crops. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> 55: 2664–2670.	Keine eindeutige Unterscheidung bisher möglich zwischen konventionell und ökologisch erzeugtem Kopfsalat. Weiterführende Untersuchungen nötig, um eine breitere Referenzdatenbank aufzubauen.
Kombination von Stabil-Isotopen-Analytik (Stickstoff) und Spurenelementanalytik	Kopfsalat	Simon D. Kelly & Alison S. Bateman (2010): Comparison of mineral concentrations in commercially grown organic and conventional crops – Tomatoes (<i>Lycopersicon esculentum</i>) and lettuces (<i>Lactuca sativa</i>). <i>Food Chemistry</i> 119 (2): 738–745.	Konventionell und ökologisch erzeugter Kopfsalat aus England und der EU konnten nicht signifikant unterschieden werden.
Metaboliten-Profilung	Mais	Röhlig, R. M. & K-H. Engel (2010): Influence of the Input System (Conventional versus Organic Farming) on Metabolite Profiles of Maize (<i>Zea mays</i>) Kernels. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> 58 (5): 3022–3030.	Vielversprechend. Im Forschungsstadium. Die Untersuchungen sollten mit weiteren Maisproben erweitert werden, um eine größere Diversität in den Produktionsbedingungen und den klimatischen und geografischen Gegebenheiten abzudecken und die Robustheit der Biomarker zu erhöhen. Die verwendete Analytik ist in der Praxis gut etabliert.
Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie	Mais	Strube, J. & P. Stolz (2007): Differenzierung und Klassifizierung von Ökoprodukten mittels validierter analytischer und ganzheitlicher Methoden. Abschlussbericht zum Projekt 02OE170/F2 des Bundesprogramms Ökologischer Landbau. Beitrag archiviert unter http://orgprints.org/14072/1/14072-02OE170_F2-kwalis-strube-2007-oekoprodukte.pdf .	Vielversprechende Ergebnisse. Im Forschungsstadium. Die Methode ist validiert. Untersuchungen sollten mit weiteren Maisproben erweitert werden, um eine größere Diversität in den Produktionsbedingungen und den klimatischen und geografischen Gegebenheiten abzudecken und die Robustheit der Methode zu erhöhen.

Methode	Lebensmittel	Literaturreferenz	Bemerkungen
Kombination von Metabolitenanalytik und Stabil-Isotopen-Analytik (Stickstoff)	Orangen und Orangensaft	Rapisarda, P., M. L. Calabretta, G. Romano, & F. Intrigliolo (2005): Nitrogen metabolism components as a tool to discriminate between organic and conventional citrus fruits. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> 53: 2664–2669.	Vielversprechend. Unterscheidung von italienischen konventionell und ökologisch erzeugten Orangen und Orangensaft mittels Stickstoffgehalt, Sinephringehalt und $\delta^{15}\text{N}$. Untersuchungen sollten mit weiteren Orangen- und Orangensaftproben erweitert werden, um eine größere Diversität in den Produktionsbedingungen und den geografischen und klimatischen Gegebenheiten abzudecken und die Robustheit der Biomarker zu erhöhen.
Kombination von Stabil-Isotopen-Analytik (Stickstoff) und Spurenelementanalytik	Tomaten	Simon D. Kelly & Alison S. Bateman (2010): Comparison of mineral concentrations in commercially grown organic and conventional crops – Tomatoes (<i>Lycopersicon esculentum</i>) and lettuces (<i>Lactuca sativa</i>). <i>Food Chemistry</i> 119 (2): 738–745.	Vielversprechende Forschungsergebnisse für die Unterscheidung von konventionellen und ökologisch erzeugten Tomaten aus England und der EU.
Stabil-Isotopen-Analytik (Stickstoff)	Tomaten	Bateman, A. S., S. D. Kelly, & M. Woolfe (2007): Nitrogen isotope composition of organically and conventionally grown crops. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> 55: 2664–2670.	Vielversprechende Ergebnisse für die Unterscheidung von konventionell und ökologisch erzeugten Tomaten. Trennschärfe kann mit der Kombination mit anderen Parametern verbessert werden (siehe Kombination von Stabil-Isotopen-Analytik [Stickstoff] und Spurenelementanalytik).
Metaboliten-Profilung	Weizen	Zörb, C., G. Langenkämper, T. Betsche, K. Niehaus, & A. Barsch (2006): Metabolite profiling of wheat grains (<i>Triticum aestivum</i> L.) from organic and conventional agriculture. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> 54: 8301–8306. Zörb, C., K. Niehaus, A. Barsch, T. Betsche, & G. Langenkämper (2009): Level of compounds and metabolites in wheat ears and grains in organic and conventional agriculture. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> 57: 9555-9562.	Vielversprechende Forschungsergebnisse für die Unterscheidung von ökologisch und konventionell erzeugtem Weizen. Die Untersuchungen sollten mit weiteren Weizenproben erweitert werden, um eine größere Diversität in den Produktionsbedingungen und den klimatischen und geografischen Gegebenheiten abzudecken und die Robustheit der Biomarker zu erhöhen. Die verwendete Analytik ist in der Praxis gut etabliert.
Proteom-Profilung	Weizen	Langenkämper, G., C. Zörb, & T. Betsche (2007): Charakterisierung von Getreide aus ökologischem und konventionellem Anbau – Anwendung von „Protein-Profilung-Techniques“ und Inhaltsstoffanalysen. Abschlussbericht des Projekts 02OE069 des Bundesprogramms Ökologischer Landbau. Bericht archiviert unter http://orgprints.org/13501/1/13501-02OE069-mri-bund-langenkaemper-2007-getreidecharakterisierung.pdf .	Vielversprechende Forschungsergebnisse für die Unterscheidung von ökologisch und konventionell erzeugtem Weizen. Die Untersuchungen sollten mit weiteren Weizenproben erweitert werden, um eine größere Diversität in den Produktionsbedingungen und den klimatischen und geografischen Gegebenheiten abzudecken und die Robustheit der Biomarker zu erhöhen. Eine Vereinfachung der Methode für die Praxis ist möglich.

Methoden	Lebensmittel	Literaturreferenz	Bemerkungen
Biokristallisation	Weizen	Kahl, J. (2006): Entwicklung, in-house Validierung und Anwendung des ganzheitlichen Verfahrens Biokristallisation für die Unterscheidung von Weizen-, Möhren- und Apfelproben aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten. Habilitationsschrift für das Fach „Ökologische Lebensmittelqualität“ vorgelegt am Fachbereich Ökologische Agrarwissenschaften der Universität Kassel. Beitrag archiviert unter https://kobra.bibliothek.uni-kassel.de/bitstream/urn:nbn:de:hebis:34-2007061118604/1/HABILJKAHL.pdf . Kahl, J., N. Busscher, & A. Ploeger (2009): Authentication: Biocrystallisation applied on defined wheat samples. In: Proceedings of the International Workshop on Organic Food Authentication: Challenge or Utopia?, Geel, Belgium, 30. November – 01. December 2009. JRC Technical Notes.	Vielversprechende Ergebnisse für die Unterscheidung von ökologisch und konventionell erzeugtem Weizen. Die Methode ist validiert. Weiterführende Untersuchungen mit Blindproben nötig. Praxisnah. Mehr Details zur Evaluierung der Praxistauglichkeit im Bericht.
Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie	Weizen	Strube, J. & P. Stolz (2007): Differenzierung und Klassifizierung von Ökoprodukten mittels validierter analytischer und ganzheitlicher Methoden. Abschlussbericht zum Projekt 02OE170/F2 des Bundesprogramms Ökologischer Landbau. Beitrag archiviert unter http://orgprints.org/14072/1/14072-02OE170_F2-kwalis-strube-2007-oekoprodukte.pdf .	Vielversprechende Ergebnisse. Im Forschungsstadium. Die Methode ist validiert. Untersuchungen sollten mit weiteren Weizenproben erweitert werden, um eine größere Diversität in den Produktionsbedingungen und den klimatischen und geografischen Gegebenheiten abzudecken und die Robustheit der Methode zu erhöhen.
Polyphenolanalytik	Zwiebeln	Soltoft, M., J. Nielsen, K. H. Laursen, S. Husted, U. Halekoh, & P. Knuthsen (2010): Effects of organic and conventional growth systems on the content of flavonoids in onions and phenolic acids in carrots and potatoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58: 10323–10329.	Keine Unterscheidung aufgrund der Gehalte von einzelnen Polyphenolen möglich zwischen ökologisch und konventionell erzeugten Zwiebeln aus dänischen Feldversuchen.
Multielement- und Stabil-Isotopen-Fingerabdruck	----	Laursen, K. H., T. H. Hansen, D. P. Persson, J. K. Schjoerring & S. Husted (2009): Multi-elemental fingerprinting of plant tissue by semi-quantitative ICP-MS and chemometrics. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 24: 1198–1207	Die neue Analysentechnik „halbquantitative ICP-MS“ (liefert Multielement- und Stabil-Isotopen-Fingerabdruck) kombiniert mit „Chemometrik“ ist im Forschungsstadium. Anwendung für die Unterscheidung von ökologisch und konventionell erzeugten Produkten muss noch erforscht werden. ICP-MS = Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma; Chemometrik = Anwendung mathematischer und statistischer Methoden, um ein Maximum an chemischen Informationen aus experimentellen Messdaten zu extrahieren.

2.2 Kombination von Parametern unterschiedlicher Analytikmethoden: Stabil-Isotopen- und Fettsäure-Analytik

Wenn zwei oder mehr Parameter unabhängig voneinander ökologisch von konventionell erzeugten Produkten unterscheiden können, kann die Kombination der Parameter die Trennschärfe verbessern. Die Methodenkombination wird im Folgenden am Beispiel der Kuhmilch dargestellt.

2.2.1 Das Prinzip

Kohlenstoffisotopen

Das Element Kohlenstoff kann für Aussagen über die Art der Fütterung herangezogen werden. So existieren in der Natur im Wesentlichen zwei unterschiedliche Fotosynthesemechanismen: der Mechanismus der C3-Pflanzen (z. B. Weizen, Zuckerrüben) und der C4-Pflanzen (z. B. Mais, Rohrzucker). Der wesentliche Unterschied liegt in der Art der Bindung des atmosphärischen Kohlendioxids. C4-Pflanzen weisen charakteristisch andere Isotopenwerte im Kohlenstoff auf als C3-Pflanzen. Produkte auf Basis von C3- und C4-Pflanzen lassen sich so differenzieren (Winkler & Schmidt, 1980) und die Futterbasis von Tieren kann überprüft werden (Metges et al., 1990).

Es ist ein wesentlicher Anspruch der landwirtschaftlichen Biobetriebe, dass eine artgerechte Tierhaltung angestrebt wird. Im Gegensatz zur intensiven Mast- und Rinderhaltung, bei der die Rinder ganzjährig im Stall gehalten werden, praktizieren die Biobetriebe die extensive Rinderhaltung, die sich aus Weidegang im Sommer und Laufstall im Winter zusammensetzt. Neben der artgerechten Haltung liegt der Hauptunterschied in der Fütterung. Bei Biomilchkühen besteht das Grundfutter im Sommer überwiegend aus frischem Gras, das bevorzugt durch Weidegang aufgenommen wird. Auch im Winter enthält das Futter der Biomilchkühe einen hohen Anteil von Gras-/Kleesilage. Weiterhin ist der Einsatz von Krafffutter (z. B. Maissilage und Getreide) in der ökologischen Milchkuhfütterung eingeschränkt. Insgesamt liegt im Vergleich zur konventionellen Milcherzeugung in der ökologischen Produktion ein ganzjährig höherer Anteil an Grünfutter vor.

Diese Unterschiede in der Fütterung spiegeln sich in der Verteilung der $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Isotopen im Milchfett und im Milchprotein wider. So hat Milch von Kühen, die vorwiegend mit Gras gefüttert werden, negativere $\delta^{13}\text{C}$ -Werte als die von Kühen, welche mehr Krafffutter bekommen (Camin et al., 2008; Kornexl et al., 1997; Molkentin & Giesemann, 2007; Molkentin & Giesemann, 2010). Dabei unterliegen die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte saisonalen Schwankungen, die auf die unterschiedliche Futterzusammensetzung im Winter und im Sommer zurückzuführen sind (Abbildung 1) (Molkentin, 2009; Molkentin & Giesemann, 2010).

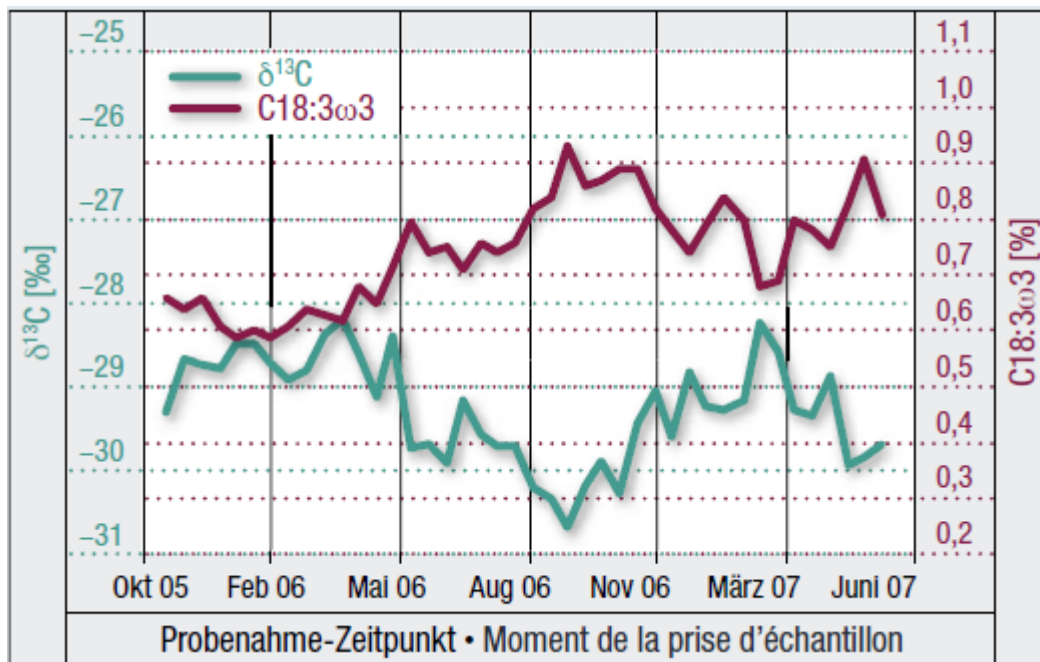


Abbildung 1: Der Gehalt an α -Linolensäure (C18:3 ω 3) und das Isotopenverhältnis von Kohlenstoff ($\delta^{13}\text{C}$) schwanken jahreszeitlich stark im Fett von deutscher Kuhmilch (Quelle: Molkentin, Alimenta 21/2008)

Fettsäuren

Die Fettsäurezusammensetzung in der Kuhmilch variiert unter anderem mit der Haltungsform (Jahreis et al., 1996), mit dem Zugang zu frischem Gras auf der Weide (Kelly et al., 1998), mit der Futterzusammensetzung (Dewhurst et al., 2003; Wijesundera et al., 2003; Grummer, 1991; Palmquist et al., 1993) und mit dem Standort (Thorsdottir et al., 2004). Dabei unterliegt die Fettsäurezusammensetzung saisonalen Schwankungen, die auf die unterschiedliche Futterzusammensetzung und Haltung im Winter und im Sommer zurückzuführen sind (Butler et al., 2008; Molkentin, 2009).

Ellis et al. (2006) zeigten, dass ökologisch erzeugte Kuhmilch in England das ganze Jahr über stets einen höheren Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren hatte, insbesondere an Omega-3-Fettsäuren, als konventionell erzeugte Milch. Butler et al. bestätigten 2008 die ganzjährig höhere Konzentration von der Omega-3-Fettsäure α -Linolensäure in Biomilch im Vergleich zur konventionellen Kuhmilch in England. Höhere Gehalte an α -Linolensäure und/oder konjugierter Linolsäure in Biokuhmilch wurden auch aus Deutschland (Jahreis et al., 1996) und Italien (Bergamo et al., 2003) gemeldet. Trotz länderspezifischer Unterschiede in der Fütterung wurde eine höhere Konzentration an α -Linolensäure ebenfalls in dänischer, schwedischer und walisischer Biokuhmilch im Vergleich zur konventionell erzeugten Kuhmilch in diesen Ländern festgestellt (Butler et al., 2007).

Allerdings verschwimmen die Unterschiede der Fettsäurezusammensetzung zwischen konventionell und ökologisch erzeugter Kuhmilch in den Berggebieten. Unabhängig von konventioneller und ökologischer Produktion haben die Kühe der Berggebiete im Sommer Zugang zu frischem Gras und im Winter relativ viel Raufutter. Das erklärt die geringeren Abweichungen in der Fettsäurezusammensetzung der Milch beider Produktionsformen in den italienischen und Schweizer Alpen (Battaglini et al., 2009; Collomb et al., 2008).

Kombination von Kohlenstoffisotopen und Fettsäuren

Die signifikante Abweichung der Werte von $\delta^{13}\text{C}$ und α -Linolensäure im Milchfett von ökologisch und konventionell erzeugter Kuhmilch machen diese Parameter attraktiv für die Unterscheidung von ökologischer und konventioneller Kuhmilch. In seinen Untersuchungen mit Kuhmilchfett zeigte Molzentin (2009), dass diese Parameter sehr negativ zueinander korrelieren (Abbildung 2). Die stark negative Korrelation weist darauf hin, dass zwischen $\delta^{13}\text{C}$ im Milchfett und α -Linolensäure ein Zusammenhang besteht. Schließlich werden beide Parameter vom Maisanteil im Futter der Milchkühe beeinflusst und weisen auf die Verfütterung von Mais hin. Die Kombination beider Parameter erhöht die Robustheit der Diskriminierung von ökologisch und konventionell erzeugter Kuhmilch.

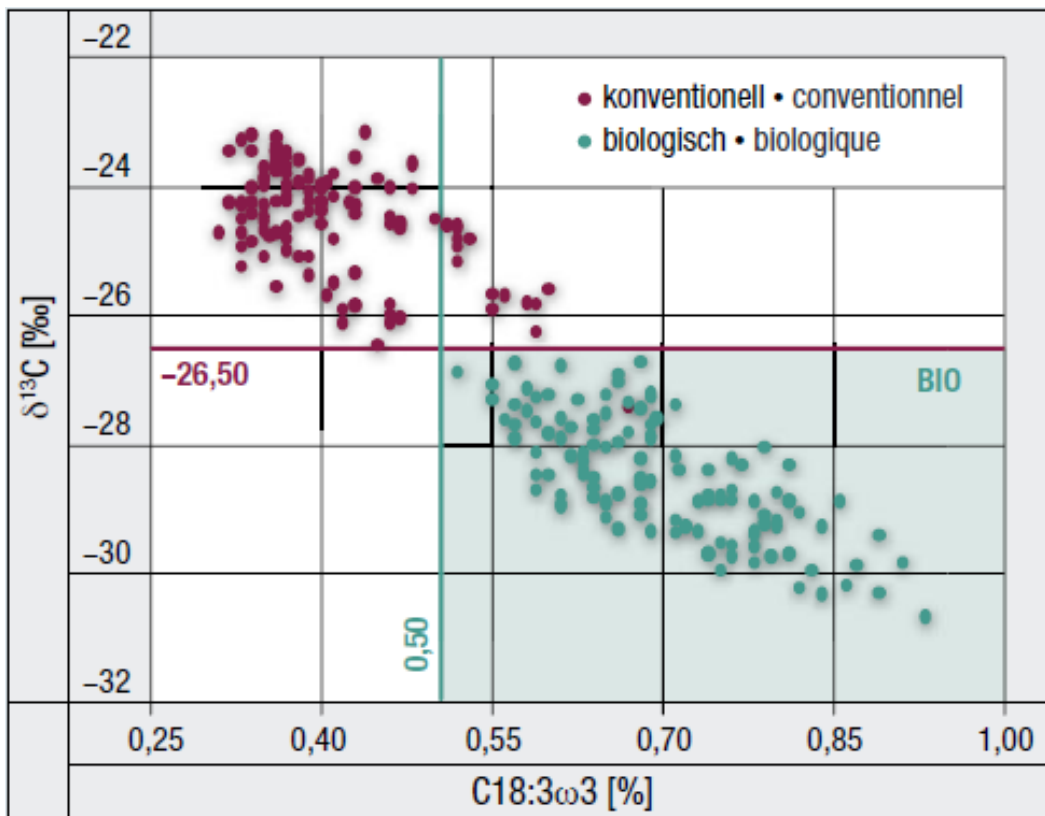


Abbildung 2: Der Gehalt an α -Linolensäure (C18:3 ω 3) und der $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von Kuhmilchfett korrelieren stark negativ. Aus den Ergebnissen lassen sich ganzjährig gültige Grenzwerte zur Identifizierung von deutscher Biokuhmilch ableiten (Quelle: Molzentin, Alimenta 21/2008)

Kombination von Kohlenstoffisotopen aus unterschiedlichen Milchfraktionen

Sowohl $\delta^{13}\text{C}$ im Milchfett wie $\delta^{13}\text{C}$ im Milchprotein eignen sich gleichermaßen, um Biokuhmilch von konventioneller Kuhmilch zu unterscheiden. Sie korrelieren stark positiv zueinander, sodass davon ausgegangen werden kann, dass ein Zusammenhang zwischen den beiden Parametern besteht. Das Verhältnis zwischen den beiden Parametern ist relativ konstant sowohl bei ökologisch wie auch bei konventionell erzeugter Kuhmilch. Eine Veränderung des Verhältnisses könnte auf eine Vermischung von Milchkomponenten aus unterschiedlichen Produktionssystemen bei rekombinierten Milchprodukten hinweisen (Molzentin & Giesemann, 2010).

2.2.2 Die Messung und Auswertung

Die Stabil-Isotopenmassenspektrometrie für Kohlenstoff-Isotope

Als Methode zur Messung von stabilen Isotopen hat sich die Massenspektrometrie neben der NMR⁶ besonders bewährt. Der hier untersuchte Einsatzbereich liegt in der Messung stabiler Isotope, die im Wesentlichen mit drei Arten von Massenspektrometern durchgeführt wird (TIMS⁷, ICP-MS⁸ mit Multikollektor und IRMS⁹), da sie die stabilen Isotope mit der nötigen Genauigkeit und Reproduzierbarkeit detektieren können. „Leichte“ Elemente, besonders die stabilen Isotope der Bioelemente, werden mit dem Isotopenmassenspektrometer bestimmt (Boner, 2006).

Die Stabil-Isotopenmassenspektrometer können nur einfache Gase vermessen. Deshalb ist es notwendig, die Kohlenstoffverbindungen der Probe vollständig in das einfache Gas Kohlendioxid zu überführen. Dafür werden die Proben in einem Ofen unter Sauerstoffzufuhr bei hohen Temperaturen verbrannt. Anfallendes Verbrennungswasser wird eliminiert. Anschließend erfolgt die Trennung von Kohlendioxid und Stickstoff mit einer gepackten GC¹⁰-Säule. Das Kohlendioxid wird in das Massenspektrometer überführt. Hierbei werden die Anteile von ¹²C- und ¹³C-Isotopen gemessen. Zur Kalibrierung der Isotopenmassenspektrometer werden die internationalen Standards der IAEA¹¹ verwendet. Die Isotopenverhältnisse von Kohlenstoff (¹³C/¹²C) sind in ‰ auf einer δ-Skala (δ¹³C) angegeben und beziehen sich auf die internationalen Standards VBDP¹² beziehungsweise AIR¹³.

Die Gaschromatografie für die Analyse von Fettsäuren

Die Gaschromatografie (GC) ist eine Verteilungschromatografie, die als Analysenmethode zum Auftrennen von Gemischen in einzelne chemische Verbindungen weite Verwendung findet.

In einem ersten Schritt wird das Fett aus den Proben extrahiert, schonend getrocknet und zu Pulver verarbeitet. Zur Analyse im Gaschromatografen müssen die Triglyceride des Fetts vorher in Methylester überführt werden (Umesterung). Dies erhöht die Hitzestabilität und Flüchtigkeit der Fettkomponenten. Soll das Milchprotein analysiert werden, so werden die Milcheiweiße aus entfetteter Milch ausgefällt und schonend getrocknet. Danach wird das Methylestergemisch oder das Proteingemisch in den Gaschromatografen injiziert und wandert in Gasform bei hoher Temperatur durch die Kapillarsäule. Die einzelnen Verbindungen wandern mit unterschiedlichen

⁶ NMR: Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

⁷ TIMS: Thermal Ionisation Source Mass Spectrometry

⁸ ICP-MS: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

⁹ IRMS: Isotope Ratio Mass Spectrometer, Isotopenmassenspektrometer

¹⁰ GC: Gaschromatografie

¹¹ IAEA: International Atomic Energy Agency, Internationale Atomenergie-Organisation

¹² VBDP: Vienna – PeeDee Belemnite (international gültige Standardsubstanz für ¹³C, die von der IAEA in Wien festgelegt wurde)

¹³ AIR: Der natürliche Gehalt von ¹⁵N in der Luft (AIR) ist als Standard für ¹⁵N festgelegt.

Retentionszeiten¹⁴ durch die Säule. Die Geschwindigkeit, mit der eine Substanz die Kapillarsäule durchquert, ist charakteristisch für diese Substanz und hängt von den Arbeitsbedingungen der Gaschromatografie ab. Mit einem Detektor wird der Austrittszeitpunkt am Säulenende gemessen. Der Zeitpunkt des Austritts am Säulenende und die Menge der Substanz werden mit denen von Standardsubstanzen verglichen. Ein Schreiber, der mit dem Detektor gekoppelt ist, hält die Retentionszeiten der Einzelsubstanzen in einem Chromatogramm grafisch fest. Mit der Auswertung der Peaks des Chromatogramms ist eine sehr schnelle und leichte qualitative und quantitative Bestimmung von komplexen Stoffgemischen möglich.

Auswertung

Die Messungen der Parameter $\delta^{13}\text{C}$ und α -Linolensäure im Milchfett beziehungsweise $\delta^{13}\text{C}$ im Milchprotein werden zuerst separat ausgewertet. Bei den Fettsäuren wird für jede Probe das Chromatogramm analysiert. Auf dem Chromatogramm verkörpern die Peaks die Konzentration der einzelnen Komponenten in Abhängigkeit von der Zeit. Dank der Retentionszeit der Komponenten und dem Vergleich mit Peaks/Retentionszeiten bekannter Standardsubstanzen, kann eine qualitative Aussage (Identität) über die in der Probe enthaltenen Komponenten gemacht werden. Eine quantitative Aussage über eine Komponente ist möglich über die Höhe und die Fläche des entsprechenden Peaks. Als Messwert bei stabilen Isotopen wird das Verhältnis von ^{13}C -Isotopen zu ^{12}C -Isotopen in ‰ $\delta^{13}\text{C}$ für jede Probe angegeben.

Die Messwerte der Parameter $\delta^{13}\text{C}$ und α -Linolensäure im Milchfett beziehungsweise $\delta^{13}\text{C}$ im Milchprotein werden anschließend separat statistisch analysiert (Median, Standardabweichung, Varianzanalyse). Zum Schluss wird eine Korrelationsanalyse für $\delta^{13}\text{C}$ und α -Linolensäure im Milchfett sowie $\delta^{13}\text{C}$ im Milchfett und im Milchprotein durchgeführt. Dafür können gängige statistische Pakete verwendet werden (Molkentin, 2009; Molkentin & Giesemann, 2010).

In der Praxis können die Probenmesswerte für $\delta^{13}\text{C}$ und α -Linolensäure im Kuhmilchfett beziehungsweise $\delta^{13}\text{C}$ im Milchprotein mit den Grenzwerten verglichen werden, welche für jeden dieser Parameter festgelegt wurden (persönliche Mitteilung J. Molkentin, 26.01.2011).

Untersuchtes Lebensmittel: pasteurisierte Kuhvollmilch

In einer Studie von Molkentin (2009) wurden Kuhmilchproben im zweiwöchigen Rhythmus zwischen November 2005 und Mai 2007 gesammelt. Durch den langen Beprobungszeitraum von 18 Monaten sollten saisonale Schwankungen abgedeckt werden. Bei den Milchproben handelte es sich um abgepackte handelsübliche pasteurisierte Kuhvollmilch, welche vom Einzelhandel bezogen wurde. Dass heißt, die Milchproben bestehen aus einem Gemisch aus Milch von unterschiedlichen Bauernhöfen (Sammelmilch). An jedem Probenahmetag wurden jeweils drei Packungen von konventioneller und ökologisch erzeugter Milch diverser Handelsmarken gekauft. Die Milch dieser Handelsmarken wurde im Süden, Osten und Norden Deutschlands gesammelt. Zusätzlich wurde pasteurisierte Kuhvollmilch von einem ökologisch zertifizierten Einzelbetrieb im Norden Deutschlands bezogen. Insgesamt wurde das Milchfett von 286 Milchproben analysiert.

¹⁴ Retentionszeit ist die Zeit, welche eine Substanz braucht, um durch die Kapillarsäule im Gaschromatografen zu wandern. Sie ist abhängig von den Bedingungen der Gaschromatografie. Unter festgelegten Bedingungen hat jede Verbindung eine charakteristische Retentionszeit.

Das Fett der Biomilch hatte stets einen höheren Gehalt an α -Linolensäure als die konventionellen Milchproben, wenn man Tageswerte verglich. Über das Jahr jedoch überlappten etwas die α -Linolensäure-Werte von konventioneller und ökologischer Milch aufgrund der saisonalen Schwankungen der Futterzusammensetzung und des Weidegangs. Dennoch konnte ein Grenzwert für Biomilch von Minimum 0.50 % für α -Linolensäure im Milchfett festgelegt werden (Molkentin, 2009).

Auch im $\delta^{13}\text{C}$ vom Milchfett spiegelten sich die saisonalen Schwankungen der Futterzusammensetzung wider. Je mehr Mais im Futter enthalten war, desto höher waren die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte im Milchfett. So hatten alle Milchmarken niedrigere $\delta^{13}\text{C}$ -Werte im Sommer, wenn weniger Mais verfüttert wurde und die Kühe mehr frisches Grass auf der Weide fraßen. Übers Jahr betrachtet, wiesen – bis auf eine Ausnahme – alle konventionellen Milchfettproben höhere $\delta^{13}\text{C}$ -Werte als die ökologischen Milchfettproben auf. Darauf basierend wurde ein $\delta^{13}\text{C}$ -Grenzwert für Biomilchfett von Maximum -26.5‰ bestimmt. Dieser Grenzwert schließt 99 % aller konventionellen Milchfettproben aus (Molkentin, 2009).

Molkentin und Giesemann hatten 2010 die Analysen von 120 der oben genommenen Proben ausgeweitet, indem sie die stabile Isotopenmassenspektrometrie unter anderem auf $\delta^{13}\text{C}$ im Milchprotein erweiterten. Die saisonalen Schwankungen von $\delta^{13}\text{C}$ im Milchprotein sind – wie bei auch bei $\delta^{13}\text{C}$ im Milchfett – auf den Maisanteil im Futter der Milchkühe zurückzuführen. Mittels $\delta^{13}\text{C}$ im Milchprotein konnte Biomilch von konventioneller Milch signifikant unterschieden werden. $\delta^{13}\text{C}$ im Milchprotein und $\delta^{13}\text{C}$ im Milchfett korrelieren stark positiv. Es wurde ein $\delta^{13}\text{C}$ -Grenzwert für Biomilchprotein von Maximum -23.5‰ bestimmt, der 100 % aller konventionellen Milchfettproben ausschloss. Die absolute Differenz $\Delta\delta^{13}\text{C}$ zwischen $\delta^{13}\text{C}$ im Milchprotein und $\delta^{13}\text{C}$ im Milchfett ist relativ konstant sowohl für konventionelle Milch (1.1‰) als auch für Biomilch (1.3‰). Ist $\Delta\delta^{13}\text{C}$ höher als erwartet, könnte zum Beispiel konventioneller Milchrahm mit fettarmer Biomilch rekombiniert worden sein. $\Delta\delta^{13}\text{C}$ könnte bei rekombinierten Milchprodukten also aufzeigen, wenn konventionelle Milchkomponenten Biomilch beigemischt werden.

2.2.3 Bewertung der Anwendbarkeit in der Praxis

Stand der Entwicklung

Die Isotopenmassenspektroskopie ist eine gut etablierte Methode. Sie wird für die Authentizitätsprüfung (z. B. geografischer Ursprung) von gewissen Lebensmitteln seit einigen Jahren in Praxislaboren eingesetzt. Die Gaschromatografie von Fettsäuren ist ebenfalls gut etabliert in den kommerziellen Laboratorien. Die kombinierte Anwendung beider Analytikmethoden für die Unterscheidung von ökologisch und konventionell erzeugten Lebensmitteln wird erst seit wenigen Jahren praktiziert. Das Spektrum der Lebensmittel, deren Anbausystem (ökologisch/konventionell) mittels Isotopenmassenspektroskopie und Fettsäureanalytik unterschieden werden kann, soll erweitert werden.

Stärken

› Mit der Methode kann ökologisch und konventionell erzeugte Kuhmilch unabhängig von den saisonalen Schwankungen, dem Produktionsdatum, der Milchkuhrasse und dem geografischen Ursprung unterschieden werden (die Untersuchungen wurden mit Sammelmilch aus unterschiedlichen deutschen Bundesländern durchgeführt und erstreckten sich über 18 Monate).

- › Die Fettsäureanalytik von Milchfett ist validiert (z. B. IDF 184:202). Die Analytik von stabilen Isotopen ist in den Laboren etabliert und zeigt bei verschiedenen Lebensmitteln keine wesentlichen Matrixeffekte¹⁵. Eine Validierung speziell für Milch ist also nicht erforderlich.
- › Für die Durchführung der Kombination von Stabil-Isotopen- und Fettsäureanalytik muss das Laborpersonal nur in die Gerätebedienung eingewiesen werden.
- › Biomilch konnte mit einer Wahrscheinlichkeit von 99 % bei den untersuchten Proben von konventioneller Milch unterschieden werden.
- › Die betrachtete Methode (Stabil-Isotopen- und Fettsäureanalytik für die Messung von $\delta^{13}\text{C}$ und α -Linolensäure im Milchfett) allein genügt, um eine zuverlässige Aussage zu machen, ob eine Milchprobe ökologisch oder konventionell ist; sie muss nicht mit Messdaten weiterer Methoden kombiniert werden, um diese Aussage machen zu können.
- › Die statistische Auswertung der Messdaten mittels Korrelation wird im Forschungs- und Entwicklungsstadium der Methode durchgeführt. Sie kann mit gängiger Statistik-Software bewerkstelligt werden. Allerdings bedarf es in der Praxis keiner Statistik, da die Messwerte mit einfachen Grenzwerten verglichen werden.
- › Die voraussichtlichen Kosten für die Analyse einer Milchprobe (von der Anlieferung der Probe bis zu den Endergebnissen) mit der Stabil-Isotopen- und Fettsäureanalytik liegen lediglich zwischen 100 und 500 Euro.
- › Der Zeitaufwand für die Analyse einer Probe (von der Anlieferung der Probe bis zu den Endergebnissen) mit der Stabil-Isotopen- und Fettsäureanalytik liegt zwischen 16 und 24 Stunden.
- › Die hier betrachtete Methode ist eine Forschungsmethode, die sich bereits für die Kontrollpraxis eignet. Es ist aber eventuell machbar, auf der Grundlage positiver Forschungsergebnisse eine vereinfachte Methode für die Praxislaboratorien zu entwickeln. Die Analytik der stabilen Isotope lässt sich mit geringerem apparativen Aufwand und zu möglicherweise niedrigeren Kosten durch den Einsatz von CRDS (Cavity Ring-Down Spectroscopy) durchführen.
- › Die Kombination der Stabil-Isotopen- und Fettsäureanalytik ist dafür geeignet, die Diskriminierung ökologisch–konventionell auf andere Tierprodukte zu erweitern (z. B. Lachs). Die Parameter für Milch ($\delta^{13}\text{C}$ und α -Linolensäure) lassen sich allerdings nicht auf andere Produkte übertragen. Geeignete Parameter müssen für jede Matrix neu bestimmt werden (z. B. Lachs: $\delta^{15}\text{N}$ und Linolensäure).
- › Die Kombination der Analyse von $\delta^{13}\text{C}$ und α -Linolensäure bei Milchfett eignet sich – mit Einschränkungen – für die Diskriminierung ökologisch–konventionell von verarbeiteten Milchprodukten zum Beispiel Naturjoghurt, Butter, Rahm). Die Zusammensetzung des Milchfetts darf sich allerdings bei der Verarbeitung nicht verändern. Das bedeutet, dass die Methode sich nicht für die Unterscheidung ökologisch–konventionell bei Magermilch, Buttermilch oder Produkten mit fraktioniertem Milchfett eignet.
- › Die Kombination der Analyse von $\delta^{13}\text{C}$ und α -Linolensäure im Milchfett könnte mit zusätzlichen Analysen von $\delta^{13}\text{C}$ im Milchprotein dazu geeignet sein, in rekombinierten

¹⁵ Matrixeffekte sind auf die unterschiedliche Art, Zusammensetzung und Beschaffenheit der Proben zurückzuführen und beeinflussen die Analytik.

Biomilchprodukten die unzulässige Verwendung von konventionellen Milchkomponenten zu detektieren.

Schwächen

- › Mit der Kombination $\delta^{13}\text{C}$ und α -Linolensäure im Milchfett wurde nur deutsche Milch aus verschiedenen Bundesländern untersucht. Es ist nicht bekannt, ob die ermittelten Grenzwerte für Biomilch auch für Kuhmilch aus anderen Ländern gelten.
- › Die Methode $\delta^{13}\text{C}$ und α -Linolensäure im Milchfett weist für Kuhmilch einzelner Herden beziehungsweise Milchviehbetriebe eine geringere Trennschärfe auf.
- › Die Methode $\delta^{13}\text{C}$ und α -Linolensäure im Milchfett wurde noch nicht anhand von Blindproben verifiziert. Eine formelle Studie zur Verifizierung steht noch aus.
- › Die Anschaffungskosten für die erforderlichen Geräte werden getrennt betrachtet: Die Kosten eines Gaschromatografen bewegen sich zwischen 20.000 bis 50.000 Euro; die für einen Isotopenverhältnismassenspektrometer inklusive Elementaranalysator liegen bei 100.000 bis 250.000 Euro. Es sind keine Zusätze notwendig.
- › Während Gaschromatografen in den meisten kommerziellen Laboratorien vorhanden sind, besitzen nur wenige Praxislaboratorien einen Isotopenverhältnismassenspektrometer.
- › Zwar bestehen keine Gesundheitsrisiken für das Laborpersonal bei der Durchführung der Isotopenmassenspektrometrie. Jedoch gibt es Gesundheitsrisiken bei der Gaschromatografie durch das Arbeiten mit organischen Lösungsmitteln. Diese können minimiert werden durch übliche Schutzkleidung und Arbeiten unter einem Abzug.
- › Die Kombination der Analyse von $\delta^{13}\text{C}$ und α -Linolensäure im Milchfett braucht Datenbanken für die statistische Auswertung der Probenmessdaten. Jedes Labor sollte seine eigene Datenbank für beide Parameter anlegen. Insbesondere bei Fettsäuren ist die Übertragbarkeit der Analyseergebnisse und somit der Grenzwerte von einem Labor ins andere nicht immer gegeben. Grenzwerte können auf diese Weise schärfer gezogen werden.
- › Die Gerichtsbarkeit ist für die betrachtete Methode nicht gegeben, da Ausnahmen möglich sind. Deshalb sind die Ergebnisse der stabilen Isotope in Kombination mit der Fettsäureanalytik als ergänzendes Indiz zu betrachten.
- › Die Kombination der Analyse von $\delta^{13}\text{C}$ und α -Linolensäure im Milchfett eignet sich nur mit großen Einschränkungen, um Vermischungen ökologisch–konventionell in Kuhmilch zu detektieren. Die Nachweisgrenze von Vermischungen ökologisch–konventionell hängt von der Zusammensetzung der einzelnen Ausgangsprodukte ab. Ausgehend von einer durchschnittlichen Zusammensetzung von Biomilch beziehungsweise konventioneller Milch kann eine Vermischung detektiert werden:
 1. mit $\delta^{13}\text{C}$ ab 50 % Anteil konventioneller Milch in Biomilch;
 2. mit α -Linolensäure ab 63 % Anteil konventioneller Milch in Biomilch.
- › In jedem anwendenden Labor muss eine Datenbank etabliert werden mit Messdaten von authentischen Öko- und konventionellen Milchfettproben unterschiedlichen geografischen Ursprungs, unterschiedlichen Produktionsdaten und Milch von unterschiedlichen Milchkuhrassen. Anstelle des Abgleichs mit einer Datenbank kann im Einzelfall auch der Vergleich mit authentischen Vergleichsproben (möglichst zeitnahes Produktionsdatum, gleiche Region beziehungsweise Erzeuger) erfolgen. Im Verdachtsfall sind darüber hinaus Betriebskontrollen eine sinnvolle Ergänzung.

2.3 Kurze Zusammenfassung der Methodenbeurteilung

Tierische Lebensmittel

Bei Lebensmitteln tierischen Ursprungs sind die Fettsäureanalytik und die Stabil-Isotopen-Analytik (alleine oder in Kombination) vielversprechend für die Differenzierung von konventionellen und ökologischen Produkten wie zum Beispiel Kuhmilch, Kuhmilchprodukte, Hühnereier und Lachs. Bei der Unterscheidung von ökologisch erzeugtem und konventionellem Rindfleisch reicht die Stabil-Isotopen-Analytik alleine nicht aus, jedoch liefert sie wichtige Hinweise auf den Anteil an Kraffutter in der Fütterung der Rinder. Andere Erfolg versprechende Methoden sind die Analytik der Isomere des Carotins Astaxanthin für die Diskriminierung von Wildlachs, konventionellem und ökologischem Zuchtlachs und die Überprüfung der korrekten Anwendung von Tetracyclin-Antibiotika in der Schweine- und Geflügelhaltung anhand von Fluoreszenzmikroskopie von Knochenschnitten. Die Praxistauglichkeit der Stabil-Isotopen-Analytik, der Analytik von Carotinisomeren, der Fettsäureanalytik und der Fluoreszenzmikroskopie wird erleichtert durch die Verbreitung der Analysegeräte und die Tatsache, dass viele Praxislaboratorien mit den Methoden arbeiten. Die Robustheit der identifizierten Parameter muss in manchen Fällen noch erhöht werden.

Pflanzliche Lebensmittel

Bei den pflanzlichen Lebensmitteln werden in der Praxis ökologisch erzeugte und konventionelle Produkte häufig mit dem Nachweis von chemisch-synthetischen Pflanzenschutzmitteln unterschieden. Andere Methoden für die Differenzierung zwischen ökologischen und konventionellen Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs machen sich die Unterschiede zwischen den Anbausystemen, welche sich auf die Stoffwechselprodukte (Proteom, Metabolom, Inhaltsstoffe) und die Verhältnisse der Stabil-Isotope auswirken, zunutze. Bei den meisten vielversprechenden Methoden für die Differenzierung von pflanzlichen Produkten aus ökologischen und konventionellen Anbausystemen braucht es noch weiterführende Untersuchungen, um die Robustheit der Parameter zu erhöhen.

Folgende differenzierende Methoden können aus heutiger Sicht als Erfolg versprechend für eine Etablierung in der Praxis angesehen werden:

- › Die **Stabil-Isotopen-Analytik** eignet sich generell gut für die Praxis, da der Zeit- und Kostenaufwand bei der Analyse relativ gering sind. Allerdings sind Isotopenmassenspektrometer noch nicht so verbreitet in den Praxislaboratorien wegen ihres hohen Anschaffungswertes. Eine weitere wichtige Voraussetzung ist die Referenzdatenbank für jedes Produkt.
- › Das **Metabolom-Profiling** ist eine Methode, die sich problemlos in die Praxis einführen ließe, da zum Beispiel Gaschromatografen mit Koppelung an Massenspektrometer in Praxislaboren weit verbreitet und der Zeit- und Kostenaufwand für die Analyse relativ gering sind.
- › Das **Proteom-Profiling** ist eine vielversprechende Forschungsmethode, die sich jedoch für die Einführung in die Kontrollpraxis nur bedingt eignet. Wenn die Robustheit der Biomarker (Proteinsignatur) abgesichert ist, wäre eine vereinfachte Methode, welche allein auf die Messung der Eiweiße der Proteinsignatur basiert, für kommerzielle Laboratorien geeignet. Für diesen Zweck ist beispielsweise eine ELISA Methode einsetzbar, welche relativ geringe Kosten für Investition und Verbrauchsmittel erfordert.

- › Die **Kombination von Fettsäureanalytik und Stabil-Isotopen-Analytik** eignet sich für die Kontrollpraxis, da der Zeit- und Kostenaufwand für die Analyse relativ gering sind. Die Geräte für Hochleistungsflüssigkeitschromatografie für die Fettsäureanalytik sind in vielen Praxislaboratorien verbreitet, die Isotopenmassenspektrometer allerdings noch nicht. Im jetzigen Entwicklungsstadium ist die Methode für Kuhmilch bereits sehr weit entwickelt. Es bedarf allerdings noch einer Verifizierung mit Blindproben.
- › Die **Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie** ist eine vielversprechende Forschungsmethode mit Potenzial für die Erweiterung der Diskriminierung auf viele weitere Lebensmittel. Die Durchführung ist einfach und die Auswertung der Messdaten automatisiert. Die Methode ist validiert und die Verifizierung mit Blindproben wurde bereits für verschiedene Produkte, wie zum Beispiel Hühnereier und Weizen, durchgeführt. Einige wenige Laboratorien besitzen Messgeräte für die Methode.
- › Die **Biokristallisation** ist ebenfalls eine vielversprechende Forschungsmethode für die Differenzierung von konventionellen und ökologischen Lebensmitteln. Die Durchführung und Auswertung sind computergestützt, standardisiert und validiert. Die Anschaffungskosten für die Einrichtung sind mittelgroß. Eine Verifizierung mit Blindproben ist erforderlich, zum Beispiel bei Weizen. Einige wenige Laboratorien haben diese Methode im Forschungsstadium bei sich etabliert.

3 Durchführung anhand ausgewählter Methoden

3.1 Weiterentwicklung der Isotopenmassenspektroskopie (IRMS)

Tabelle 4: Übersicht der Arbeitsschritte bei der IRMS

Arbeitsschritt	2009				2010				2011			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Gespräche mit Marktpartnern zur Eingrenzung geeigneter Leitprodukte	S. 32											
Festlegung der Gerätekonfiguration	S. 37											
Probenanalyse			A	X	X	X	X	X	X	E	S. 36	
Produkt: Möhren												
Aufbau signifikanter Datensätze Bsp. Möhren			A	X	X	X	X	X	X	E	S. 39	
Verknüpfung der Ergebnisse mit Zusatzinformationen Bsp. Möhren											S. 40	
Vergleich der ¹⁵ N/ ¹⁴ N-Isotopenverhältnisse über verschiedene Erntejahre											S. 42	
Berücksichtigung weiterer stabiler Isotope zur Herkunftsüberprüfung (¹⁸ O/ ¹⁶ O, D/H)			A	X	X	X	X	X	X	E	S. 43	
Produkt: Weizen												
Aufbau signifikanter Datensätze Bsp. Weizen und Vergleich verschiedener Erntejahre			A	X	X	X	X	X	X	E	S. 44	
Betrachtung der ¹³ C/ ¹² C-Isotopenverhältnisse verschiedener Erntejahre											S. 45	
Produkt: Kartoffeln												
Aufbau signifikanter Datensätze Bsp. Kartoffeln			A	X	X	X	X	X	X	E	S. 47	
Vergleich der ¹³ C/ ¹² C-Isotopenverhältnisse unterschiedlicher Erntejahre											S. 48	
Produkt: Eier												
Aufbau signifikanter Datensätze Bsp. Eier			A	X	X	X	X	X	X	E	S. 51	
Überprüfung der Chargenidentität anhand von 46 Eierproben						A	E					
Blindtests aller Produkte					A	X	X	X	E			

3.1.1 Methodenbeschreibung: IRMS

Die Analytik der stabilen Isotope der Bioelemente hat sich gerade im Bereich der Agrarprodukte als universelle analytische Möglichkeit etabliert, die Herkunft beziehungsweise die Authentizität eines Produktes zu verifizieren (Dennis, 1998). Die Technik basiert auf der Untersuchung der natürlichen Verteilung der stabilen Isotope der Bioelemente in einem Produkt.

Die gesamte Biomasse besteht hauptsächlich aus den Elementen Wasserstoff, Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel. Dabei weisen auch die Bioelemente zumindest ein schweres Isotop auf, das keinem radioaktiven Zerfall unterworfen ist. Die schweren Isotope stellen zwar nur einen geringen Anteil dar, sind jedoch überall in der Biomasse vorhanden. Dabei ist ihr Anteil nicht konstant, sondern variiert aufgrund geochemischer, geophysikalischer und biochemischer Prozesse. Die Natur liefert damit im biologischen Material eine natürliche Markierung („isotoper Fingerabdruck“), die es ermöglicht, Herkunftsüberprüfungen an Lebensmitteln durchzuführen. So wurden die Anwendungsmöglichkeiten der stabilen Isotope der Bioelemente zur Herkunfts- und Authentizitätsprüfung in den letzten Jahren an Beispielen von Milch, Käse, Butter, Schaumwein, Whiskey, Tomaten und Olivenölen demonstriert (Angerosa et al., 1999; Bateman et al., 2005; Boner & Förstel, 2001; Camin et al., 2008; Manca et al., 2001; Molkentin, 2009; Rossmann et al., 2000; Winkler & Schmidt, 1980).

Kennzeichen der ökologischen Landwirtschaft ist eine möglichst natürliche Bewirtschaftung des landwirtschaftlichen Betriebs. Dazu gehört nicht nur der Verzicht auf chemisch-synthetische Kunstdünger oder Pflanzenschutzmittel, sondern auch der Aufbau geschlossener Systeme und der artgerechten Tierhaltung. Die artgerechte Tierhaltung ist durch chemische beziehungsweise physikalische Kenndaten kaum zu erfassen. Auch die Unterscheidung der Produkte aus der ökologischen Landwirtschaft von den Produkten aus der konventionellen Landwirtschaft mittels analytischer Methoden ist schwierig, wenn zum Beispiel keine Pflanzenschutzmittelrückstände in den pflanzlichen Lebensmitteln nachgewiesen werden.

Eine Möglichkeit bieten die stabilen Isotope der Bioelemente, insbesondere des Stickstoffs. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass sich die Stickstoff-Isotopenverhältnisse in organischem Dünger und Mineraldünger unterscheiden. Die Düngungsbasis (Verzicht auf Mineraldünger) kann hinterfragt und somit Probenmaterial aus ökologischer Landwirtschaft bestätigt werden (Yoneyama et al., 1990; Nakano und Uehara, 2003; Choi und Ro, 2003). Organische Dünger, insbesondere Fäkalien von Tieren, weisen im Vergleich zu Mineraldüngern signifikant angereicherte Isotopenverhältnisse auf. So sind Stickstoff-Isotopenverhältnisse von +10 ‰ +/- 4 zu erwarten (Shearer et al., 1974), dagegen weist Mineraldünger in der Regel negative Stickstoff-Isotopenverhältnisse auf (Bateman et al., 2007). Eine Düngung mit organischem Dünger führt entsprechend zu angereicherten Isotopenverhältnissen in Pflanzen. Dienen diese Pflanzen als Nahrungsgrundlage in der tierischen Ernährung, so sind die positiven Isotopenverhältnisse auch im Tier beziehungsweise in seinen Produkten (z. B. Eiern) wiederzufinden. Die positiven Stickstoff-Isotopenverhältnisse im ökologischen Dünger sind auf eine natürliche Fraktionierung (Transaminase) in der Biochemie des Lebewesens zurückzuführen (Turner, 1983). Eine Übergangszone besteht jedoch bei der Anwendung von Stickstoff fixierenden Pflanzen als Gründünger. Diese weisen Isotopenverhältnisse auf, die nahe dem Mineraldünger anzusiedeln sind. In diesem Fall ist es notwendig, die Kausalität der Düngung mit der Dokumentation abzugleichen. Entsprechend ist die Anwendung der stabilen Isotope des Stickstoffs eine integrative Methode, die gerade unter Einbeziehung der Düngerdokumentation erfolgreich angewendet werden kann.

Aufarbeitung

Zur schonenden Abtrennung der Wasserfraktion bei Frischprodukten wie Möhren, Kartoffeln, Tomaten und Eiern werden diese einer Gefriertrocknung unterworfen (Abbildung 3). Diese ermöglicht eine besonders schonende Separierung des Gewebewassers von der Trockensubstanz, sodass isotonenfraktionierende Prozesse (z. B. Maillard-Reaktion) vermieden werden.

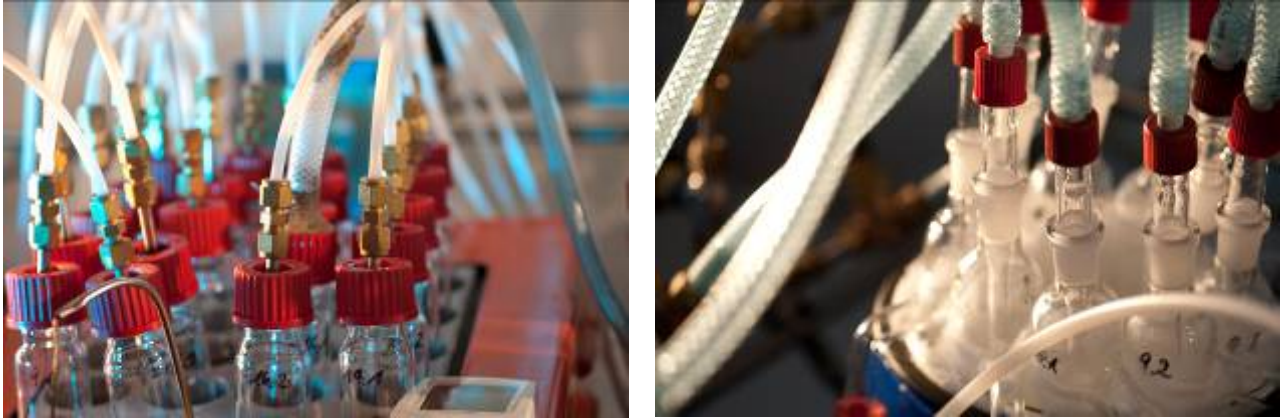


Abbildung 3: Gefriertrocknungsanlage

Die Trockenprodukte Weizen, Gerste, Mais, Dinkel und Tee werden nach der Vermahlung mittels Kugelmühle einer apolaren Extraktion mit Dichlormethan als Lösungsmittel unterworfen.

Messtechnik-Beispiel: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - und $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse

Die Stabil-Isotopenmassenspektrometer können nur einfache Gase vermessen. Deshalb ist es notwendig, Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen vollständig in ihre einfachen Gase Kohlendioxid und Stickstoff zu überführen. In der Regel werden Elementanalytoren genutzt, die diese einfachen Gase durch oxidative Verbrennung (Oxidationsmittel: Wolframoxid) darstellen (Abbildung 4).



Abbildung 4: Kombination Elementanalysator mit Isotopenmassenspektrometer zur Messung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - und $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse

Als Maßzahl der Isotopenverhältnisse hat sich seit über 60 Jahren die Delta-Notation durchgesetzt, welche die Abweichung von einem internationalen Referenzstandard angibt. Die Isotopenzusammensetzung des internationalen Referenzstandards dient als Bezugspunkt beziehungsweise Nullwert der Skalierung. Am Beispiel des Kohlenstoffs wird dies dargestellt:

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{pr} - R_{ref}}{R_{ref}} \right) * 1000 \text{ mit } R_{pr} = [^{13}\text{CO}_2]/[^{12}\text{CO}_2] \text{ in der Probe}$$

mit $R_{ref} = [^{13}\text{CO}_2]/[^{12}\text{CO}_2]$ im Standard (PDB)

Zur Kalibrierung der Isotopenmassenspektrometer werden die nachfolgend aufgeführten internationalen Standards der IAEA (International Atomic Energy Agency) verwendet.

Tabelle 5: Internationale Standards zur Kalibrierung von Isotopenmassenspektrometern

Element	IAEA Standards
Wasserstoff (D/H)	VSMOW2, GISP, SLAP2
Wasserstoff (D/H) organisch	IAEA-CH7
Sauerstoff ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) organisch	IAEA-601
Kohlenstoff ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$)	IAEA-CH6, IAEA-CH7
Stickstoff ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)	IAEA-N1, IAEA-N2
Schwefel ($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$)	IAEA-S1, IAEA-S2, IAEA-S3

3.1.2 Planung und Ablauf

Die Durchführung des Isotopenprojektes gliedert sich im Wesentlichen in drei Phasen. In der ersten Phase (Evaluierung) wurden die Möglichkeiten der Anwendung der Isotopenverhältnisse des Stickstoffs an einer Auswahl von neun verschiedenen Produkten getestet (Tabelle 6), indem eine erste Referenzdatenbank von konventionellen und ökologischen Produkten erstellt wurde.

Diese erste Datenbank diente zur Abschätzung einer möglichen Differenzierungsgüte in den verschiedenen Produkten. So zeigten die ersten Ergebnisse der Untersuchung von Tee, dass keine Differenzierungsmöglichkeiten mithilfe der Isotopenverhältnisse des Stickstoffs gegeben sind; entsprechend wurde dieses Produkt im Fortgang des Projektes nicht weiterverfolgt.

Die Produktgruppen wurde nach dieser ersten Evaluierungsphase der Analytik der stabilen Isotope auf die vier Leitprodukte von Weizen, Möhren, Kartoffeln und Eier eingengt.

In der nächsten beziehungsweise in der zweiten Phase war das Ziel, eine statistisch relevante Größe an Referenzproben zu generieren, sodass diese Datenbank im Rahmen der umfangreichen Blindtests auf die Differenzierungsgüte getestet werden kann.

Im Zuge dieser Phase konnte aufgezeigt werden, dass zum Beispiel die Isotopenverhältnisse des Kohlenstoffs Möglichkeiten aufzeigen, ökologischen Weizen von konventionellem Weizen zu trennen. Ähnliche Ergebnisse wurden ebenfalls für die Anwendung der Isotopenverhältnisse des Schwefels erarbeitet.

Daraus ergab sich zwangsläufig der Ansatz, dass auch die stabilen Isotope weiterer Bioelemente Möglichkeiten aufweisen können, ökologische Produkte aufzuzeigen beziehungsweise abzusichern. Dies ist insbesondere dann folgerichtig, wenn man die Authentizität beziehungsweise die geografische Herkunft eines Agrarproduktes ebenfalls als Kennzeichnung eines ökologischen Produktes hinzuzieht. Insbesondere die Isotopenverhältnisse des Wasserstoffs und des Sauerstoffs im Gewebewasser sowie in der Organik (Kohlenhydrate) der Agrarprodukte liefern dabei eine gute Möglichkeit, die geografische Herkunft eines Produktes zu verifizieren.

Das Projekt wurde schlussendlich in 2010 auf diese Isotopenverhältnisse erweitert und die Anwendungsmöglichkeit der Herkunftsdifferenzierung wurde in verschiedenen Blindtests integriert. Entsprechend wurde in der dritten Phase die Austestung der Belastbarkeit dieser Datenbank mit Blindproben getestet. Im Rahmen dieser Blindtests wurden ebenfalls die Möglichkeiten der Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Tomaten getestet. Hierzu wurde keine Referenzdatenbank aufgebaut, da umfangreiche Referenzen beziehungsweise Werte schon in der Literatur gegeben waren (Bateman & Kelly, 2007; Bateman et al., 2007).

3.1.3 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die Anwendung der stabilen Isotopenverhältnisse des Stickstoffs zur Unterscheidung der ökologischen und konventionellen Erzeugung basiert auf der Möglichkeit, mithilfe dieser Isotopenverhältnisse die Art der Düngung aufzuzeigen. In der Regel ist die Verwendung von stickstoffhaltigem Mineraldünger in der ökologischen Landwirtschaft nicht erlaubt. Dagegen wird überwiegend eine ökologische Düngung, z. B. mit Fäkalien/Mist, vollzogen.

Schon Shearer et al (Shearer et al., 1974) haben in ihrer Arbeit festgestellt, dass ökologischer Dünger und dabei insbesondere Fäkalien/Mist im Vergleich zu Mineraldünger signifikant angereicherte Isotopenverhältnisse von +10 +/- 4 ‰ aufweisen. Mineraldünger hat jedoch Stickstoff-Isotopenverhältnisse, die bei annähernd 0 ‰ liegen. Eine Düngung mit diesen tierischen Ausscheidungsprodukten sollte entsprechend zu angereicherten Isotopenverhältnissen in Pflanzen führen, was insbesondere 1990 von Yoneyama (Yoneyama, 1990) aufgezeigt wurde.

Die positiven Stickstoffwerte im ökologischen Dünger sind auf eine natürliche Fraktionierung durch die Transaminase im Stickstoff-Metabolismus der Lebewesen zurückzuführen (Macko et al., 1986), das heißt, die Fäkalien des Tieres sind generell gegenüber dem Futter um circa 3 ‰ angereichert beziehungsweise positiver. Das hat zur Folge, dass es in geschlossenen Systemen, wie sie gerade in der ökologischen Landwirtschaft angestrebt werden, zu einer stetigen Anreicherung beziehungsweise stetig wachsenden positiven Kennzahlen der Stickstoff-Isotopenverhältnisse kommt. In verschiedenen Studien konnte dieser Einfluss und damit die Möglichkeit eines Nachweises der ökologischen Landwirtschaft aufgezeigt werden (Choi & Ro, 2003; Nakano & Uuhara, 2003). Dienen diese Pflanzen als Nahrungsgrundlage in der tierischen Ernährung, so sind diese positiven Isotopenverhältnisse auch im Tier beziehungsweise in seinen Produkten (z. B. Eier) wiederzufinden (Boner, 2003).

Ein Problem dieser Differenzierungsmöglichkeit der ökologischen und konventionellen Landwirtschaft besteht lediglich in der Anwendung von Stickstoff fixierenden Pflanzen als Gründünger. Diese weisen Isotopenverhältnisse auf, die nahe dem Mineraldünger anzusiedeln sind (Unkovich & Pate, 2000). Die Umsetzung dieser Biomasse als Dünger führt jedoch zu einer geringen Anreicherung im Boden, die oberhalb von +1 ‰ einzustufen ist (Turner et al., 1983). Es entstehen damit Übergangszonen, die die Unterscheidung zwischen ökologischer und konventioneller Landwirtschaft erschweren. Es ist entsprechend hilfreich, die Isotopenverhältnisse des Stickstoffs mit der Information über die Düngungsart zu verknüpfen, sodass die Kausalität der Düngung bestätigt werden kann.

Negative ¹⁵N/¹⁴N-Isotopenverhältnisse sind kausal nur noch durch den Einsatz eines konventionellen Düngers zu erklären und müssen entsprechend für Produkte aus der ökologischen Landwirtschaft hinterfragt werden.

3.1.4 Material und Methoden

Im Projektzeitraum vom 1. Februar 2009 bis zum 31. Dezember 2011 konnten insgesamt 816 Proben für das Projekt zur Verfügung gestellt werden. Die verschiedenen Proben unterteilen sich dabei in Referenzen und Blindproben (Tabelle 6).

Tabelle 6: Übersicht über die Referenz- und Blindproben

Produkt	Proben (gesamt)	Referenzproben	ökologisch	konventionell	ohne Angabe	Blindproben
Gerste	43	43	16	23	4	-
Mais	31	31	19	9	3	-
Dinkel	14	14	-	14	-	-
Tee	57	57	22	35	-	-
Weizen	199	97	62	24	11	102
Eier	100	30	15	15	-	70
Möhren	245	140	70	70	-	105
Kartoffeln	113	73	40	33	-	40
Tomaten	12	-	-	-	-	12

Frischprodukte wie Möhren, Kartoffeln, Tomaten und Eier wurden zunächst gefriergetrocknet und die erhaltene Trockensubstanz wurde direkt der Messung der Isotopenverhältnisse, insbesondere des Stickstoffs, zugeführt. Das abgetrennte Gewebewasser, insbesondere bei der Produktgruppe Möhren, wurde zusätzlich der Untersuchung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ - und D/H-Isotopenverhältnisse unterworfen.

Im Fall des Produktes Möhren wurden insgesamt 118 Proben aus Deutschland, 13 Proben aus Israel, drei Proben aus Spanien, vier Proben aus Portugal und zwei Proben aus Frankreich als Referenzproben zur Verfügung gestellt.

Die Trockenprodukte Weizen, Gerste, Mais, Dinkel und Tee wurden nach der Vermahlung einer apolaren Extraktion (Dichlormethan) unterworfen und im Anschluss auf die stabilen Isotopenverhältnisse untersucht.

Zur Bestimmung der stabilen Isotopenverhältnisse wird die Stabil-Isotopenmassenspektrometrie (IRMS) verwendet. Das Anwendungsgebiet der IRMS-Systeme (Isotope Ratio Mass Spectrometer) liegt in der Bestimmung der „leichten“ Elemente, besonders der stabilen Isotope der Bioelemente. Zur Detektion im Massenspektrometer ist es notwendig, die stabilen Isotope der Bioelemente (COHNS) dem Massenspektrometer in Gasform zuzuführen, weshalb gelegentlich der Zusatz (GIRMS = gasIRMS) verwendet wird.

Einen detaillierten Einblick über die Technik der IRMS und deren Besonderheiten sind in verschiedenen Arbeiten verfügbar (Prosser, 1993; Nier, 1947).

Folgende Gerätekonfigurationen wurden für die Vermessung der stabilen Isotope der Bioelemente eingesetzt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Übersicht über die eingesetzte Analytik

Isotope/Bioelemente	Analyseeinheit mit	Massenspektrometer
D/H (flüssig)	Elementanalysator EA 3000 (Euro Vector) mit Chrom	Isotopenmassenspektrometer (Isoprime)
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (flüssig)	Multiflow (GV-Instruments)	Isotopenmassenspektrometer (Isoprime)
D/H (org.) und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ (org.)	Hochtemperaturofen (Gero, 1550 °C)	Isotopenmassenspektrometer (Isoprime)
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	Elementanalysator NA 1500 (Carlo Erba)	Isotopenmassenspektrometer (Optima)
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	Elementanalysator NA 1500 (Carlo Erba)	Isotopenmassenspektrometer (Optima)
$^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$	Elementanalysator EA 3000 CN (Euro Vector)	Isotopenmassenspektrometer (Optima)

Zur Ausarbeitung eines statistischen stabilen Mittelwertes der verschiedenen Probenarten wurden von den Frischprodukten Möhren, Kartoffeln, Tomaten und Eier mindestens vier bis sechs Einzelproben aufgearbeitet sowie bei Getreide und Tee mindestens zehn Gramm als Einzelprobe vermahlen. Die Messung der Stickstoff-Isotopenverhältnisse erfolgt im Anschluss aus der jeweiligen Trockensubstanz.

Die Werte der stabilen Isotopenmessung werden in der Regel als Verhältniszahl [‰] in Bezug zu einem internationalen Standard angegeben. Die Isotopenzusammensetzung des internationalen Referenzstandards dient als Bezugspunkt beziehungsweise Nullwert der

Skalierung. Entsprechend verweisen positive Isotopenwerte auf höhere Anteile (angereichert) am jeweils schweren Isotop und negative Isotopenwerte auf erniedrigte Anteile (abgereichert).

3.1.5 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Nachfolgend werden die Ergebnisse anhand der verschiedenen Produktgruppen dargestellt. Im Fokus stehen die vier Leitprodukte Möhren, Weizen, Kartoffeln und Hühnereier.

Die Konzentration auf diese vier Leitprodukte wurde vollzogen, um eine statistisch relevante Menge an Referenzproben aufzubauen. Daneben konnte die erste Evaluierung von möglichen „Leitprodukten“ aufzeigen, dass die Anwendung der Isotopenverhältnisse des Stickstoffs, zum Beispiel für Tee, derzeit keine Differenzierungsmöglichkeit bietet.

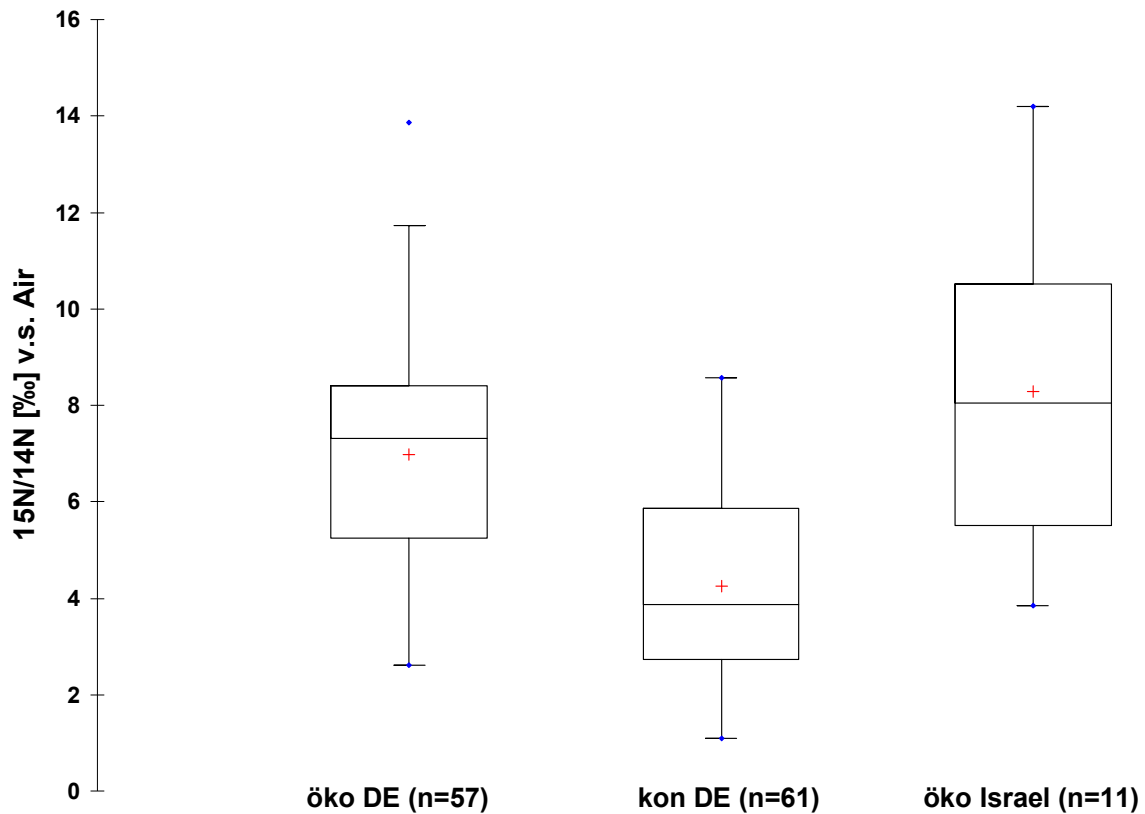
Außerhalb der Datenbankerstellung wurde im Rahmen von Blindtests die Unterscheidung von ökologischen Tomaten getestet. Hier stehen schon heute umfangreiche Datensätze durch die Arbeit von Batemann (Batemann et al., 2007) zur Verfügung. Die Blindtests wurden genutzt, um diese Datensätze auf ihre Robustheit beziehungsweise Aussagekraft zu testen.

3.1.5.1 Möglichkeiten der Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Möhren

Im Rahmen des Aufbaus der Referenzdaten von Möhren konnten neben den 118 Referenzproben ebenfalls umfangreiche Zusatzinformationen zur Düngung zur Verfügung gestellt werden, sodass eine weitergehende Bewertung der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse möglich war.

Ebenfalls standen insbesondere aus Deutschland Referenzproben aus zwei unterschiedlichen Erntejahren (2009 und 2010) zur Verfügung, sodass an den Isotopenverhältnissen des Stickstoffs die Robustheit der Datensätze aufgezeigt werden konnte.

Generell zeigen die 57 ökologischen Referenzen aus Deutschland mit einem Mittelwert von +7,0 ‰ gegenüber den 61 konventionellen Referenzen mit einem Mittelwert von +3,9 ‰ signifikant angereicherte $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenwerte (Abbildung 5). Ein ähnliches Ergebnis liegt ebenfalls in den ökologischen Referenzen aus Israel mit einem angereicherten $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenwert von +8,3 ‰ vor. Es spiegelt sich entsprechend der zu erwartende Einfluss der organischen Düngung in diesen ökologischen Proben wider.



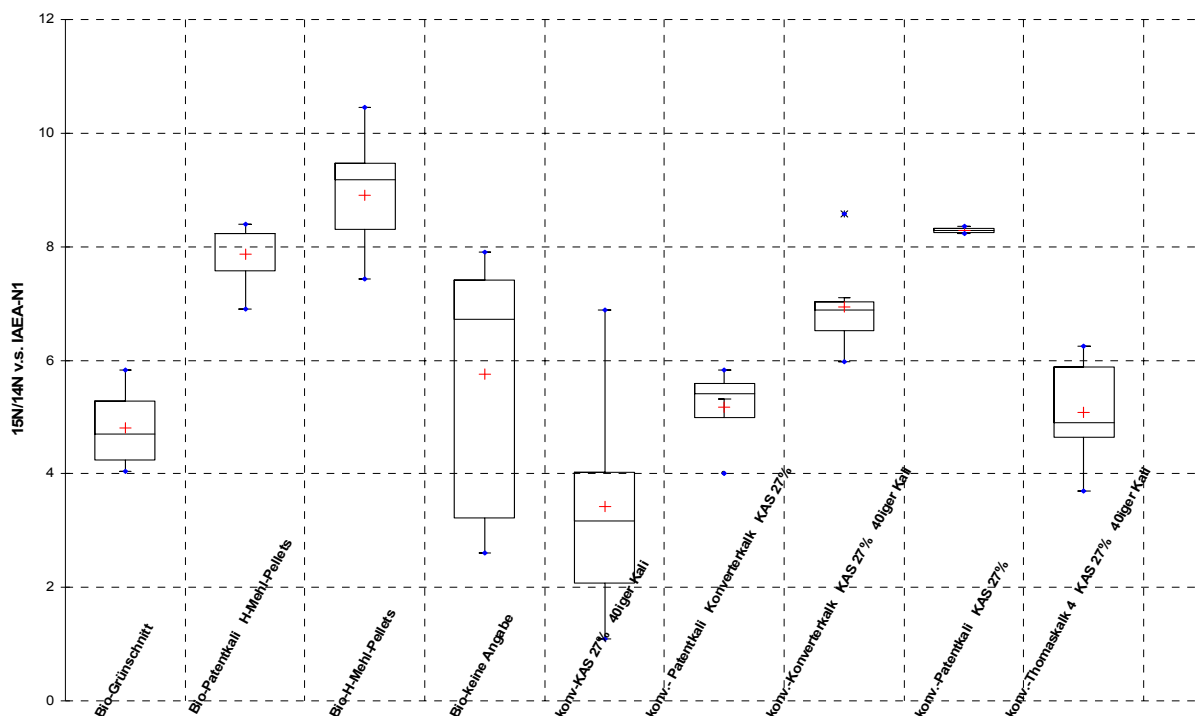
Statistik	öko DE (n = 57)	kon DE (n = 61)	öko Israel (n = 11)
Anz. der Beobachtungen	57	61	11
Minimum	2,6	1,1	3,9
Maximum	13,9	8,6	14,2
1. Quartil	5,3	2,7	5,5
Median	7,3	3,9	8,1
3. Quartil	8,4	5,9	10,5
Mittelwert	7,0	4,3	8,3
Standardabweichung (n)	2,4	1,9	3,5

Abbildung 5: Boxplot und statistische Kenndaten der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse von Möhren aus der ökologischen (öko) und konventionellen (kon) Landwirtschaft aus Deutschland und Israel

Beide Probenkollektive der deutschen Möhren weisen jedoch ebenfalls eine hohe Spannweite auf, was sich in einer Standardabweichung von über $\pm 2\%$ widerspiegelt. Entsprechend liegt ebenfalls ein signifikanter Überlappungsbereich vor, der eine eindeutige Differenzierung der Proben aus der ökologischen und konventionellen Landwirtschaft erschwert.

Auf Grundlage dieser Daten ist daher nur eine Schrankenbildung sinnvoll, sodass bei Vorlage eines Produktes mit $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenwerten oberhalb von 8,1 mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % (2σ Kriterium) eine Herkunft aus der konventionellen Landwirtschaft ausgeschlossen werden kann. Andererseits sind $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse unterhalb von $+2,2\%$ mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % (2σ Kriterium) für eine Herkunft aus der ökologischen

Landwirtschaft auszuschließen. Isotopenverhältnisse innerhalb dieser beiden Schranken müssen mithilfe der Düngerangabe hinterfragt werden. Werden diese berücksichtigt, so kann die Differenzierungsgüte signifikant erhöht werden (Abbildung 6).



Statistik	Biogrünschnitt	Biopatentkali H-Mehl-Pellets	Bio-H-Mehl-Pellets	Bio keine Angabe	Kon-KAS 27 % 40er Kali	Kon Patentkali Konverterkalk KAS 27 % 40er kali	Kon Konverterkalk KAS 27 %	Kon Patentkali KAS 27 %	Kon Thomaskalk 4 KAS 27 % 40er Kali
Anzahl Beobachtungen	7	5	13	12	23	4	7	2	5
Minimum	4,1	6,9	7,4	2,6	1,1	4,0	6,0	8,2	3,7
Maximum	5,8	8,4	10,5	7,9	6,9	5,8	8,6	8,4	6,3
1. Quartil	4,3	7,6	8,3	3,2	2,1	5,0	6,5	8,3	4,7
Median	4,7	8,2	9,2	6,7	3,2	5,4	6,9	8,3	4,9
3. Quartil	5,3	8,2	9,5	7,4	4,0	5,6	7,0	8,3	5,9
Mittelwert	4,8	7,9	8,9	5,8	3,4	5,2	6,9	8,3	5,1
Standardabweichung (n)	0,6	0,6	1,0	2,1	1,9	0,7	0,8	0,1	0,9

Abbildung 6: Boxplots und statistische Kenndaten der ökologischen und konventionellen Möhren aus Deutschland unter besonderer Berücksichtigung der Düngung

Mit einer Düngung von H-Mehl-Pellets werden $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse von +8 bis 9 % in den Möhren erzeugt (Abbildung 6). Diese angereicherten Isotopenverhältnisse unterscheiden

sich damit signifikant von den derzeit untersuchten konventionellen Düngungsarten (Ausnahme Konverterkalk).

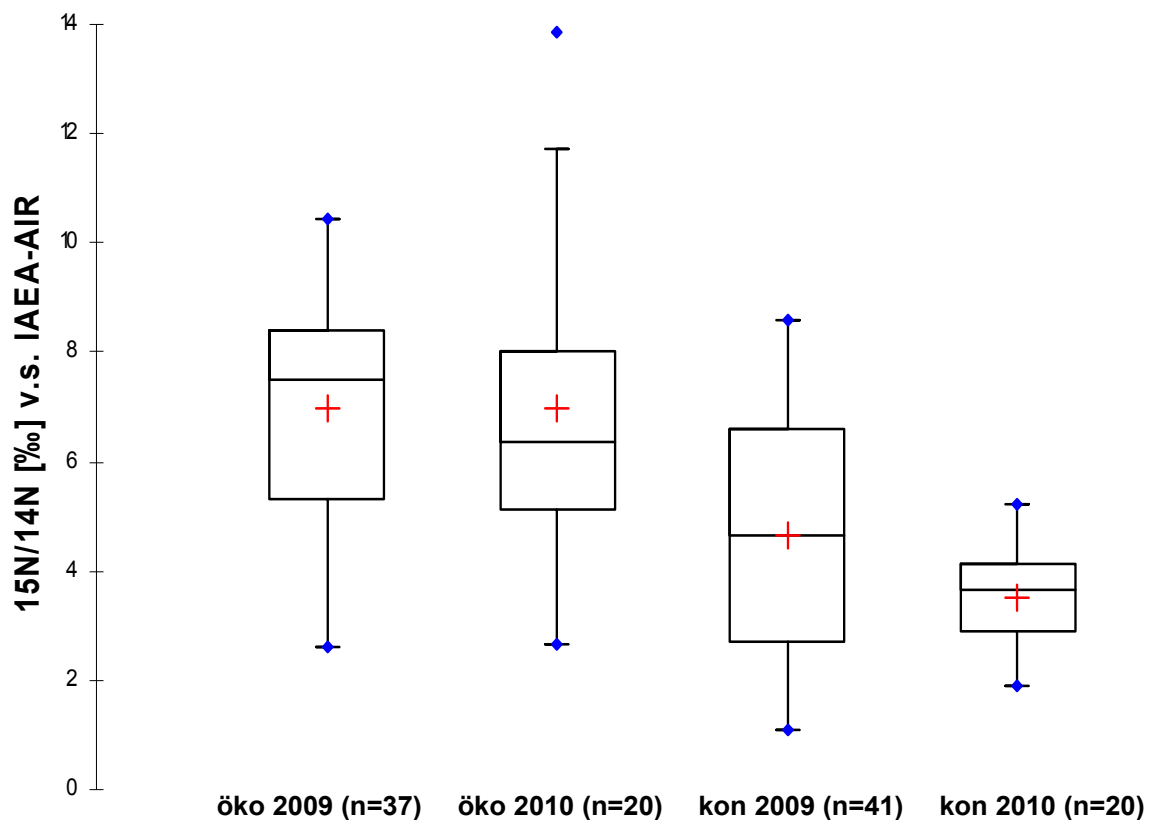
Eine Düngung mit Biogrünschnitt erlaubt es dagegen nicht, eine signifikante Differenzierung zu den konventionellen Düngungsarten zu gewährleisten. Es ist sicherlich folgerichtig, dass dieses Probenkollektiv ohne nähere Düngungsangabe („Bio – keine Angabe“, siehe Abbildung 6) nahezu diese beiden vorher erwähnten ökologischen Düngungsarten umfasst.

In der Praxis ist leider bis heute eine vollständige Angabe der Düngung im Rahmen der Rückverfolgbarkeitskette kaum gegeben, sodass die Möglichkeiten der stabilen Isotope nicht vollständig ausgenutzt werden können.

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand ist insgesamt von einer Differenzierungsgüte der beiden Probenkollektive der ökologischen und konventionellen Möhren unter alleiniger Berücksichtigung der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse von derzeit 70 % auszugehen.

Eine mögliche Variabilität der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse aufgrund des Erntejahres konnte sowohl in den ökologischen als auch in den konventionellen Referenzen nicht festgestellt werden (Abbildung 7) und war unter Berücksichtigung der Isotopenverhältnisse des Stickstoffs auch nicht zu erwarten.

Im Jahr 2009 und 2010 zeigen beide Probenkollektive der ökologischen und konventionellen Landwirtschaft untereinander jeweils nahezu identische $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Verteilungen.



Statistik	öko 2009	öko 2010	kon 2009	kon 2010
Anzahl der Beobachtungen	37	20	41	20
Minimum	2,6	2,7	1,1	1,9
Maximum	10,5	13,9	8,6	5,2
1. Quartil	5,3	5,1	2,7	2,9
Median	7,5	6,4	4,7	3,6
3. Quartil	8,4	8,0	6,6	4,1
Mittelwert	7,0	7,0	4,6	3,5
Standardabweichung (n)	2,1	2,8	2,2	0,9

Abbildung 7: Vergleich und Statistik der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse von Möhren aus unterschiedlichen Erntejahren (2009/2010) in Deutschland

Im Zuge des Projektes wurde ebenfalls die Möglichkeit der Herkunftsbestimmung ausgetestet. Hierzu wurden zusätzlich Referenzen aus Spanien und Portugal hinzugezogen (Abbildung 8).

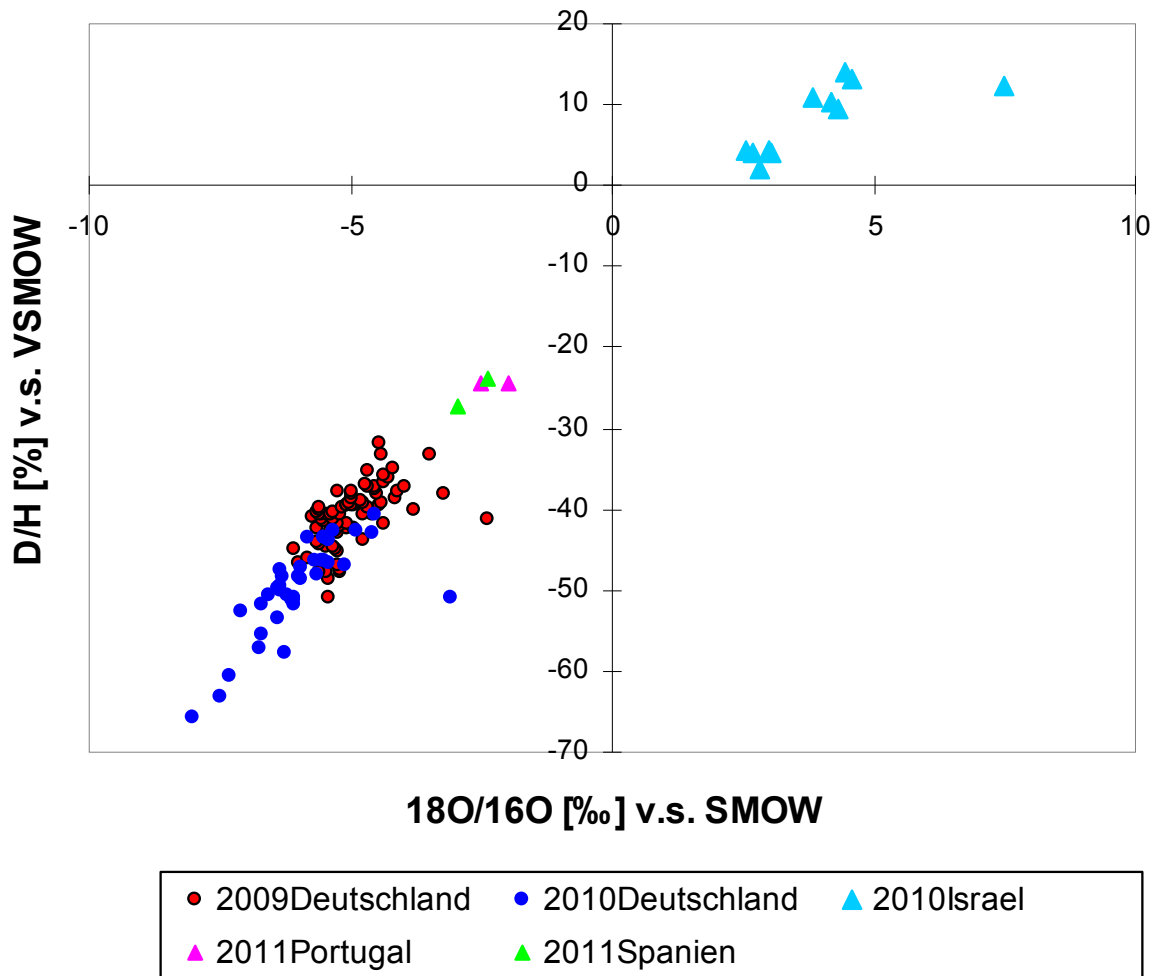


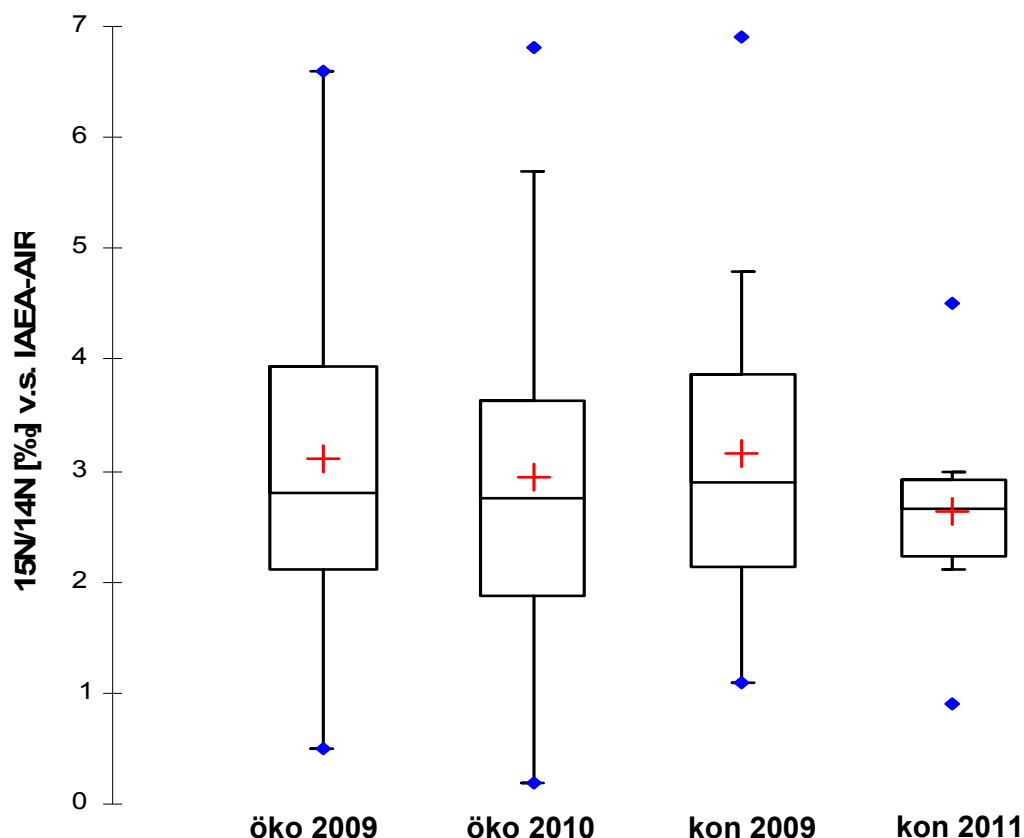
Abbildung 8: D/H und ¹⁸O/¹⁶O-Isotopenverhältnisse von Referenzmöhren aus unterschiedlichen Regionen von Deutschland, Spanien, Portugal und Israel und Erntejahren

Die D/H- und ¹⁸O/¹⁶O-Isotopenverhältnisse des Gewebewassers sind dabei jederzeit geeignet, eine Differenzierung von deutschen Möhren gegenüber israelischen, portugiesischen und spanischen Möhren zu gewährleisten.

Die Differenzierung der deutschen Proben ist dabei ebenfalls unabhängig von den Jahren 2009 und 2010, das heißt die D/H- und ¹⁸O/¹⁶O-Isotopenverhältnisse im Gewebewasser können als robuste Signaturen zur Differenzierung von deutschen Proben verwendet werden.

3.1.5.2 Möglichkeiten der Unterscheidung von ökologischem und konventionellem Weizen

Die Analyse der ¹⁵N/¹⁴N-Isotopenverhältnisse von 58 ökologischen und 23 konventionellen Referenzproben weist derzeit keine Differenzierungsmöglichkeit auf. Beide Probenkollektive weisen nahezu identische Isotopenverhältnisse mit einem angereicherten Mittelwert von +3 ‰ auf (Abbildung 9).



Statistik	öko 2009	öko 2010	kon 2009	kon 2011
Anzahl der Beobachtungen	22	36	18	6
Minimum	0,500	0,200	1,100	0,900
Maximum	6,600	6,800	6,900	4,500
1. Quartil	2,100	1,875	2,125	2,225
Median	2,800	2,750	2,900	2,650
3. Quartil	3,950	3,625	3,875	2,925
Mittelwert	3,105	2,953	3,161	2,633
Standardabweichung (n)	1,493	1,534	1,306	1,073
Standardabweichung (n-1)	1,528	1,556	1,343	1,176

Abbildung 9: Vergleich und Statistik der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse von Getreide aus unterschiedlichen Erntejahren (2009/2010) in Deutschland

Entsprechend muss derzeit auf Grundlage der Verteilung der Boxplots davon ausgegangen werden, dass sowohl die ökologische als auch die konventionelle Landwirtschaft ähnliche Signaturen im Stickstoff des Weizens hinterlassen.

Aufgrund der fehlenden Differenzierungsmöglichkeit der Isotope des Stickstoffs wurden weitere Isotope getestet. Dabei verweisen nun die Isotopenverhältnisse des Kohlenstoffs auf eine neue Differenzierungsmöglichkeit der Referenzen (Abbildung 10).

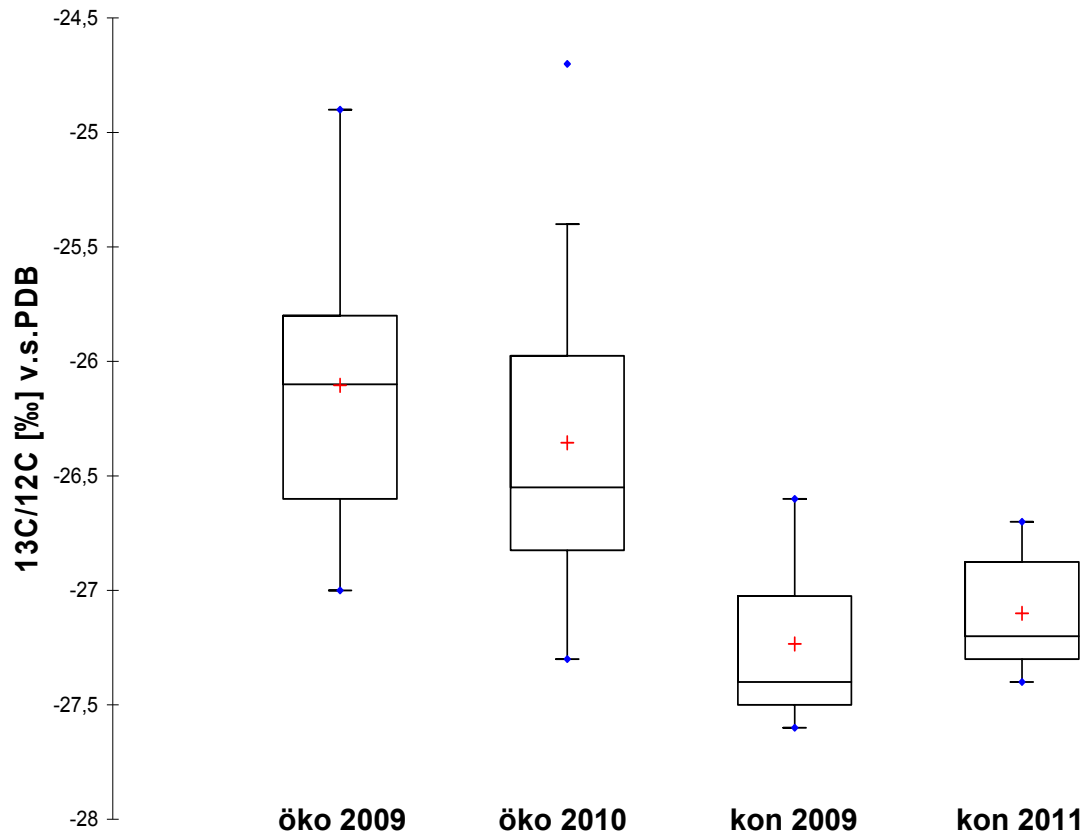


Abbildung 10: Vergleich und Statistik der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse von Getreide aus unterschiedlichen Erntejahren (2009/2010) in Deutschland

Die Isotopenverhältnisse des Kohlenstoffs spiegeln im Wesentlichen die Fotosyntheseart (C4-, CAM und C3-Pflanzen) als auch den Wasserhaushalt der Pflanzen wider (O'Leary 1988).

Die Grundlage ist das Gas-Wasser-Problem der Pflanzen: Werden die Stomata weit geöffnet, um die CO_2 -Aufnahme für die Fotosynthese möglichst wenig zu behindern, nimmt zwangsläufig die Transpiration und damit die Gefahr des Austrocknens der Pflanze zu.

Während dieser CO_2 -Aufnahme findet eine reaktionskinetische Fraktionierung durch das CO_2 -Akzeptor-Enzym RUBISCO statt, das heißt, in der Bindung des CO_2 wird das leichtere Isotop

des Kohlenstoffs bevorzugt. Die Folge sind abgereicherte Isotopenverhältnisse in der Biomasse.

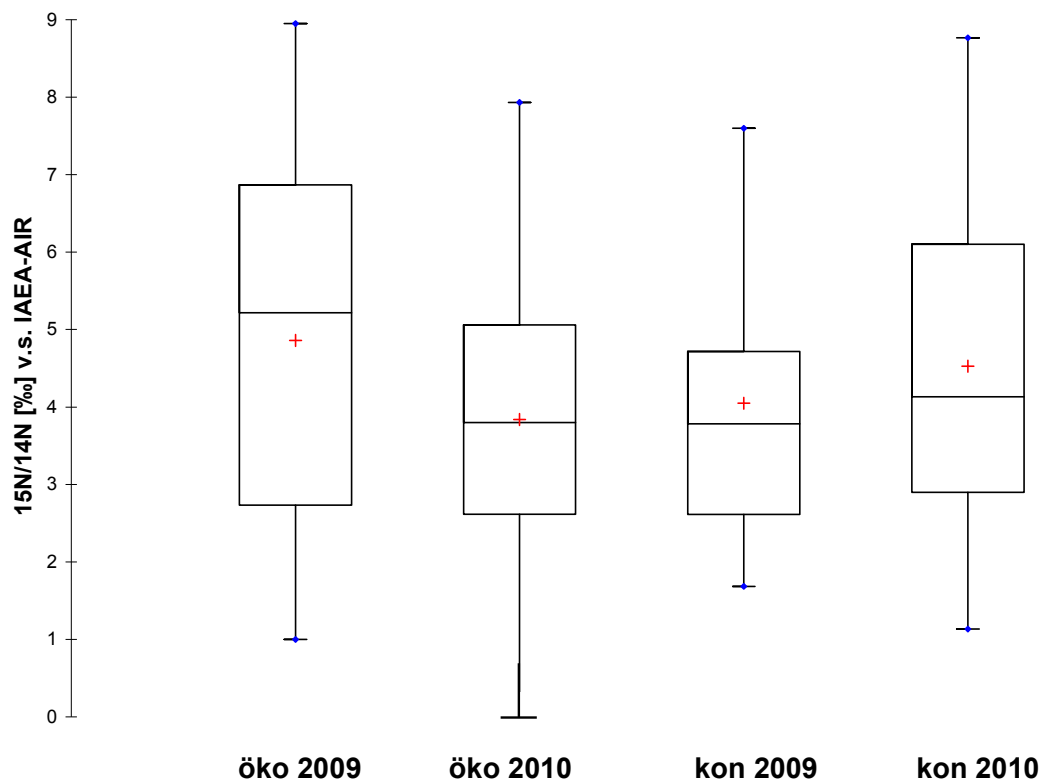
Schließt die Pflanze jedoch die Stomata, um dieser Gefahr zu begegnen, so wird auch die CO₂-Aufnahme blockiert. Die Folge ist, dass das vorhandene CO₂ in den Interzellularen nahezu vollständig genutzt werden muss, sodass dies in der gebildeten Biomasse unter diesen Bedingung zu angereicherten Isotopenverhältnissen des Kohlenstoffs führt. Allgemein zeigen Pflanzen einer Art in ariden Gebieten damit angereichertere ¹³C/¹²C-Isotopenverhältnisse in der Biomasse als in gemäßigten Gebieten (Körner et al., 1991).

Es ist davon auszugehen, dass alle Proben aus Deutschland aus ähnlichen klimatischen Bedingungen stammen. Dennoch weisen die konventionellen Proben abgereicherte Isotopenverhältnisse im Vergleich zu den ökologischen Referenzen auf. Dies kann eine Folge der in der konventionellen Landwirtschaft üblichen Verwendung von Halmverkürzern sein, die in der ökologischen Landwirtschaft verboten ist. Es ist anzunehmen, dass der Einsatz eines derartigen Halmverkürzers dem Wasserdilemma (weniger Biomasse) entgegenwirkt, sodass stärkere Fraktionierungseffekte und damit abgereichertere Isotopenverhältnisse des Kohlenstoffs auftreten müssen.

Diese Arbeitshypothese muss sicherlich in einer weiteren zielgerichteten Forschung bestätigt werden. Derzeit kann nur auf diese Differenzierungsmöglichkeit verwiesen werden, die sicherlich aufgrund der Wiederholung in zwei verschiedenen Jahren (2009 und 2010) gegeben ist. Unter Anwendung der Isotopenverhältnisse des Kohlenstoffs kann derzeit damit eine Differenzierungsgüte der Referenzen von 86 % erreicht werden. Entsprechend wurde diese Differenzierung im Test der Blindproben angewendet.

3.1.5.3 Möglichkeiten der Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Kartoffeln

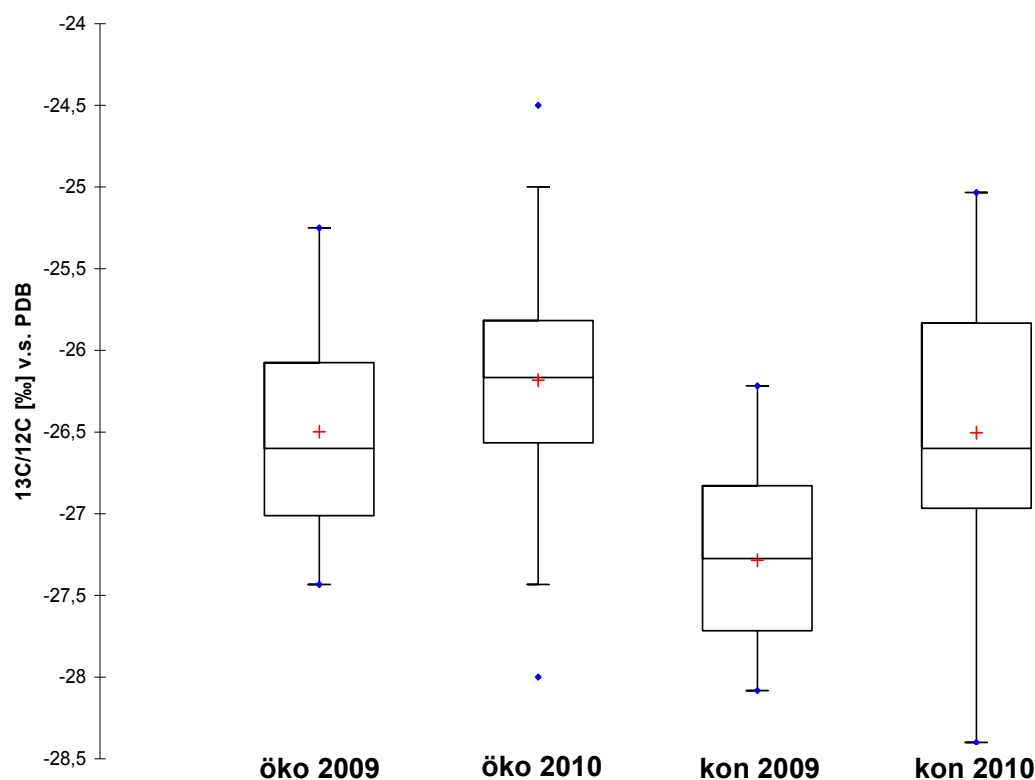
Die Analyse der Isotopenverhältnisse des Stickstoffs in Referenzproben von Kartoffeln aus der ökologischen (40 Proben) und konventionellen Landwirtschaft (33 Proben) zeigt ein ähnliches Ergebnis wie die Analyse des Weizens. Es liegt ebenfalls keine signifikante Differenzierungsmöglichkeit zwischen den Referenzen aus der ökologischen und konventionellen Landwirtschaft unter Berücksichtigung der Isotopenverhältnisse des Stickstoffs vor (Abbildung 11).



Statistik	öko 2009	öko 2010	kon 2009	kon 2010
Anzahl der Beobachtungen	17	23	16	17
Minimum	1,0	0,0	1,7	1,1
Maximum	9,0	7,9	7,6	8,8
1. Quartil	2,7	2,6	2,6	2,9
Median	5,2	3,8	3,8	4,1
3. Quartil	6,9	5,1	4,7	6,1
Mittelwert	4,9	3,8	4,1	4,5
Standardabweichung (n)	2,3	1,8	1,8	2,1

Abbildung 11: Vergleich und Statistik der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse von Kartoffeln aus unterschiedlichen Erntejahren (2009/2010) in Deutschland

Auch die für Weizen alternativ betrachteten Isotopenverhältnisse des Kohlenstoffs zeigen eine uneinheitliche Differenzierung. So liegt im Jahr 2009 ein Trend der ökologischen Kartoffeln zu angereicherten Isotopenverhältnissen (Mittelwert: -26,5 ‰) im Vergleich zu den konventionellen Kartoffeln (Mittelwert: -27,3 ‰) vor. Jedoch ist ein derartiger Trend im Folgejahr 2010 nicht mehr zu erkennen (Abbildung 12). Entsprechend bleibt derzeit offen, ob diese Möglichkeit eine Signifikanz für eine Differenzierung der ökologischen und konventionellen Landwirtschaft aufweist.



Statistik	öko 2009	öko 2010	kon 2009	kon 2010
Anzahl der Beobachtungen	18	23	16	17
Minimum	-27,4	-28,0	-28,1	-28,4
Maximum	-25,3	-24,5	-26,2	-25,0
1. Quartil	-27,0	-26,6	-27,7	-27,0
Median	-26,6	-26,2	-27,3	-26,6
3. Quartil	-26,1	-25,8	-26,8	-25,6
Mittelwert	-26,5	-26,2	-27,3	-26,5
Standardabweichung (n)	0,6	0,8	0,5	0,9

Abbildung 12: Vergleich und Statistik der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse von Kartoffeln aus unterschiedlichen Erntejahren (2009/2010) in Deutschland

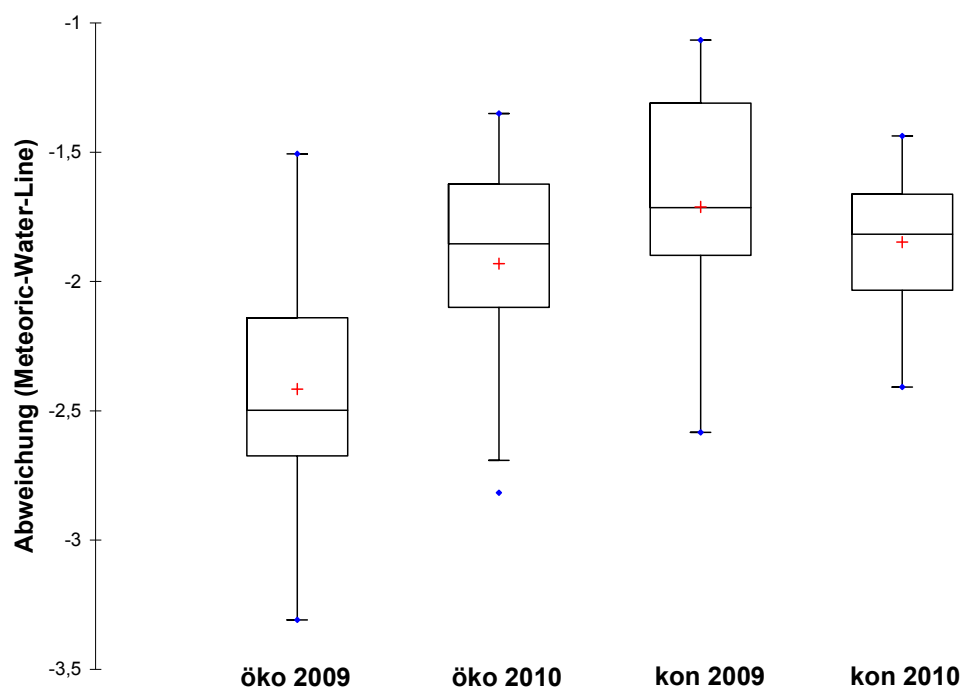
Eine mögliche Arbeitshypothese zur Erklärung dieser Besonderheit kann in der üblichen Verwendung von Totalherbiziden (z. B. Basta) im konventionellen Landbau liegen. Hiermit wird das Laub der Kartoffel in kurzer Zeit abgetötet. Im ökologischen Anbau fehlt dieses abrupte Ende, sodass die Pflanze auch im Endstadium noch Fotosynthese betreibt. Mit der einsetzenden Austrocknung reichern sich jedoch die Isotopenverhältnisse des Kohlenstoffs und damit der Biomasse stärker an. Da das Jahr 2010 im Gegensatz zum Jahr 2009 eher als trocken einzuschätzen war, kann gerade darin die Ähnlichkeit der Isotopenverhältnisse liegen.

Ein weiterer Hinweis für die mögliche Richtigkeit dieser Arbeitshypothese ist in der Abweichung von der Meteoric-Water-Line zu finden. In der Regel folgt das Wasser in Deutschland der nachfolgenden Gleichung, die als „Meteoric-Water-Line“: $D/H = 8 \cdot ^{18}\text{O}/^{16}\text{O} + 10$ in der Literatur bekannt ist (Craig 1961). Vereinfacht zeigt die Gleichung eine direkte Abhängigkeit der Isotopenverhältnisse des Sauerstoffs zu den Isotopenverhältnissen des Wasserstoffs auf.

In der Pflanze werden dagegen die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Isotopenverhältnisse des Gewebewassers stärker angereichert als die D/H-Isotopenverhältnisse. Diese Anreicherung ist ebenfalls abhängig von der Wasserbilanz der Pflanze. Entsprechend entsteht eine abgewandelte Korrelation der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ - zu den D/H-Isotopenverhältnissen. Unter Anwendung der Meteoric-Water-Line kann diese Änderung aufgezeigt werden, indem die Gleichung entsprechend aufgelöst wird:

$$\text{Abweichung} = ((\text{D}/\text{H}-10)/8) - ^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$$

Mit einer Anreicherung der $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -Isotopenverhältnisse, die dabei gegen null streben, wird diese Abweichung negativer. Dies entspricht nun der angeführten Arbeitshypothese, nach der die ökologischen Referenzen im Jahr 2009 eine signifikante negative Abweichung aufweisen (Abbildung 13).



Statistik	öko 2009	öko 2010	kon 2009	kon 2010
Anz. der Beobachtungen	12	23	16	17
Minimum	-3,3	-2,8	-2,6	-2,4
Maximum	-1,5	-1,4	-1,1	-1,4
1. Quartil	-2,7	-2,1	-1,9	-2,0
Median	-2,5	-1,9	-1,7	-1,8
3. Quartil	-2,1	-1,6	-1,3	-1,7
Mittelwert	-2,4	-1,9	-1,7	-1,8
Standardabweichung (n)	0,6	0,4	0,4	0,2

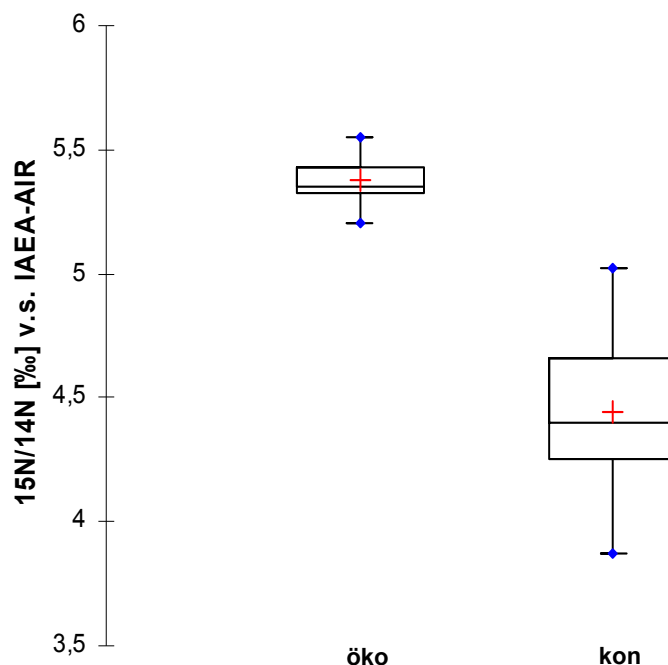
Abbildung 13: Vergleich und Statistik der Abweichung von der Meteoric-Water-Line von Kartoffeln aus unterschiedlichen Erntejahren (2009/2010) in Deutschland

Die logische Konsequenz ist jedoch, dass diese beiden angeführten Wertepaare von den klimatischen Bedingungen des Jahres abhängig sind und somit kein robuster Parameter

gegeben ist bzw. jährlich geprüft werden muss. Natürlich muss diese erste Arbeitshypothese in einer weitergehenden Forschung geprüft und bestätigt werden. Diese erste Bewertungsgrundlage wurde jedoch als Möglichkeit zur Differenzierung der Blindproben verwendet.

3.1.5.4 Möglichkeiten der Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Eiern

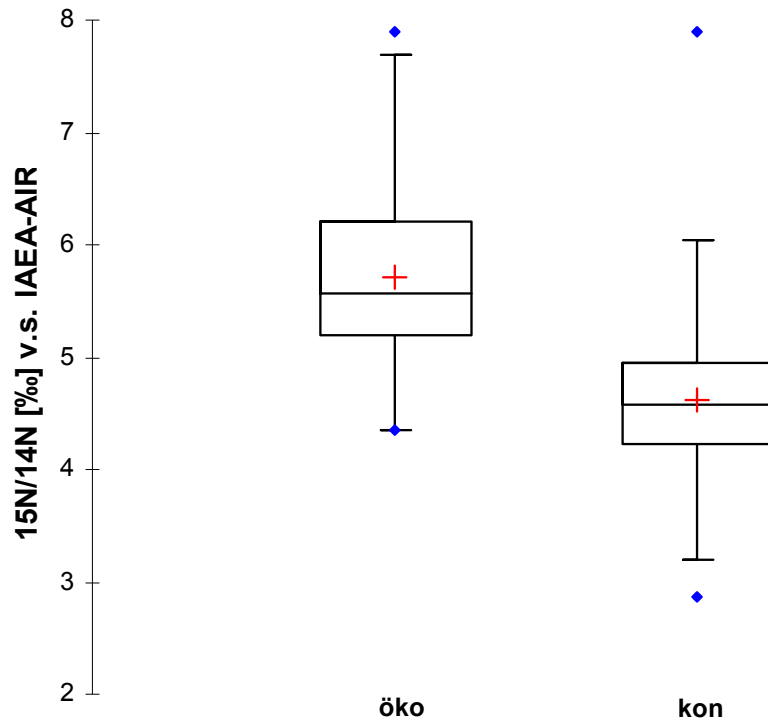
Für die Analyse der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse der Hühnereier konnten 30 Referenzen aus ökologischer und konventioneller Haltung im Rahmen des Projektes zur Verfügung gestellt werden. Die beiden Probenkollektive weisen dabei einen signifikanten Unterschied in den $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenwerten auf (Abbildung 14). Die Hühnereier aus der ökologischen Haltung sind im Mittel mit einem Isotopenwert von +5,4 ‰ angereicherter als die Hühnereier aus der konventionellen Haltung mit einem Isotopenwert von +4,4 ‰. Auch unter Berücksichtigung der Spannweiten der beiden Probenkollektive ist eine vollständige Trennung gegeben.



Statistik	öko	kon
Anz. der Beobachtungen	15	15
Minimum	5,2	3,9
Maximum	5,6	5,0
1. Quartil	5,3	4,3
Median	5,4	4,4
3. Quartil	5,4	4,7
Mittelwert	5,4	4,4
Standardabweichung (n)	0,1	0,3

Abbildung 14: Box-Plot und statische Kenndaten der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse von Hühnereiern aus ökologischer (öko) und konventioneller (kon) Landwirtschaft aus Deutschland. Proben aus vorliegendem Projekt

Aufgrund der geringen Probenanzahl wurden ebenfalls die Referenzdaten der TR Agroisolab GmbH zur Verfügung gestellt. Damit stehen derzeit 650 Hühnereier zur statistischen Auswertung zur Verfügung. Diese umfangreichen Referenzdatensätze bestehen sowohl aus unterschiedlichen europäischen Ländern wie Deutschland, Niederlande, Österreich und Italien als auch aus unterschiedlichen Jahren (Probenahmen zwischen 2003 bis 2010). Eine Bewertung auf dieser Basis kann damit als robust angesehen werden (Abbildung 15).



Statistik	ökologisch	konventionell
Anz. der Beobachtungen	357	292
Minimum	4,4	2,9
Maximum	7,9	7,9
1. Quartil	5,2	4,2
Median	5,6	4,6
3. Quartil	6,2	5,0
Mittelwert	5,7	4,6
Standardabweichung (n)	0,7	0,6

Abbildung 15: Box-Plot und statistische Kenndaten der $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse aus der Gesamtheit konventioneller (kon) und ökologischer (öko) Hühnereier des vorliegenden Projektes sowie den Gesamtdaten der TR Agroisolab GmbH

Die angeführten Mittelwerte können hiermit ebenfalls in diesem großen Probensatz annähernd bestätigt werden. So weist das Probenkollektiv aus der ökologischen Landwirtschaft mit

357 Referenzen einen Mittelwert von +5,7 ‰ und das Probenkollektiv aus der konventionellen Landwirtschaft einen Mittelwert von +4,6 ‰ auf.

Die Standardabweichungen der beiden Probenkollektive von +/-0,64 ‰ beziehungsweise +/-0,69 ‰ in Bezug zu den Mittelwerten verdeutlichen jedoch, dass es eine Schnittmenge geben muss. Unter Berücksichtigung dieser Standardabweichungen können äquivalent zu den Möhren Schranken definiert werden.

Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass ein 2σ -Kriterium der Standardabweichung (95 % Wahrscheinlichkeit) nicht passend für die Beschreibung des Probenkollektivs der ökologischen Haltung ist. Unter Berücksichtigung eines 2σ -Kriteriums sind $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse unterhalb von 4,3 ‰ mit 95 % Wahrscheinlichkeit als auffällig einzustufen. Derartige Isotopenwerte unterhalb von 4,3 ‰ sind jedoch bei 357 untersuchten Referenzen nicht vorhanden. Dabei sollten jedoch statistisch mindestens 17 (5 %) Referenzen diese abgereicherten Werte aufweisen.

Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass im Probenkollektiv der ökologischen Hühnereier nicht von einer vollständigen Normalverteilung auszugehen ist, was sich auch in der kürzeren Ausprägung des zugehörigen Whiskers des Box-Plots nachvollziehen lässt. Auf Grundlage der gesamten Probandaten sind Isotopenwerte unterhalb von 4,5 ‰ mit Wahrscheinlichkeit von über 99 % für die ökologische Landwirtschaft auszuschließen. Isotopenwerte unterhalb von 4,7 ‰ sind damit weiterhin mit Wahrscheinlichkeiten von über 96 % als auffällig zu werten und sollten hinterfragt werden.

Anhand der Quartile kann weiterhin abgeleitet werden, dass 75 % der konventionellen Referenzen abgereicherte Isotopenwerte unterhalb von 5,0 ‰ und 75 % der ökologischen Proben angereicherte Isotopenwerte oberhalb von 5,2 ‰ aufweisen. Daraus ergibt sich zwangsläufig, dass Isotopenwerte von Hühnereiern im Rahmen von $5,1 \pm 0,1$ ‰ weder dem konventionellen noch dem ökologischen Bereich zuzuordnen sind. In diesem Bereich liegt die Wahrscheinlichkeit der Zuordnung für beide Probenkollektive bei circa 50 %. Entsprechend ist die Anwendung der stabilen Isotope des Stickstoffs in diesem Bereich als nicht aussagekräftig zu werten.

Insgesamt liegt die Differenzierungsgüte der beiden Probenkollektive unter alleiniger Berücksichtigung der Isotopenverhältnisse des Stickstoffs bei 77 %. In der Erweiterung des Projektes auf die Frage der Authentizität beziehungsweise lokalen Herkunft wurde im Rahmen der Blindtests ebenfalls der Abgleich der Chargenidentität geprüft. Für diese Möglichkeit wurden alle Isotopenverhältnisse der Bioelemente als Bewertungskriterien herangezogen. Bei den 46 untersuchten Blindproben konnten die Probenpaare identischer Herkunft ermittelt beziehungsweise zugewiesen werden.

3.1.6 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Untersuchung der Isotopenverhältnisse des Stickstoffs zur Unterscheidung von Produkten aus ökologischer und konventioneller Landwirtschaft ist in der Produktgruppe der Hühnereier am weitesten entwickelt. Mit 650 Referenzen kann derzeit mit einer robusten statistischen Wahrscheinlichkeit zur Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Hühnereiern gearbeitet werden.

Es ist darauf zu verweisen, dass die Differenzierung von Produkten aus ökologischer und konventioneller Landwirtschaft in bestimmten Wertebereichen aufgrund von Überlappungen der

Isotopenverhältnisse des Stickstoffs wesentlich erschwert ist. Dies ist insbesondere im Bereich um 5 ‰ gegeben. Dies spiegelt sich im Rahmen des Blindtests wider, da die Fehlaussagen gerade in diesem Bereich getätigt wurden. In diesem Zusammenhang sollte darauf hingewiesen werden, dass die geforderten Schwarz-Weiß-Aussagen in der analytischen Praxis nicht getätigt werden, sondern Auffälligkeiten erst mit einer Wahrscheinlichkeit von über 95 % testiert werden. In der Praxis kann jedoch diese Unschärfe in der Bewertung entsprechend testiert und eine andere Möglichkeit zur Unterscheidung hinzugezogen werden (FAS).

Unterhalb von 4,5 ‰ kann bei Verdachtsproben aufgrund der enormen Datendichte mit einer Wahrscheinlichkeiten von 99 % davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um ein ökologisch erzeugtes Hühnerei handelt. Unterstützend wirkt dabei, dass unterhalb von 4,5 ‰ mehr als 46 % der 292 Hühnereier aus der konventionellen Haltungsform liegen. Folglich kann statistisch nicht jedes als ökologisch deklarierte konventionelle Hühnerei aufgedeckt werden, jedoch nahezu jedes zweite. Die Analytik kann damit ein Qualitätssicherungssystem sinnvoll ergänzen.

Auch die beiden anderen Leitprodukte Möhren und Weizen bieten gute Möglichkeiten, die Herkunft aus der ökologischen Landwirtschaft zu testen. Dies gilt insbesondere für die Fälle, in denen Isotopenwerte mit zusätzlichen Informationen wie der Düngungsart verbunden werden können.

Die Untersuchungsergebnisse der Kartoffelproben zeigen, dass weitergehende Untersuchungen erforderlich sind. So kann die Verlagerung der Vollanalytik (Bulk) zu definierten Fragmenten (z. B. Proteinen) neue Differenzierungsmöglichkeiten aufzeigen. Die alleinige Verwendung der ¹⁵N/¹⁴N-Isotopenverhältnisse zur Unterscheidung von konventionellen und ökologischen Kartoffeln ist derzeit nicht ausreichend beziehungsweise nur unterhalb von 0 ‰ sinnvoll.

3.1.7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Tabelle 8: Geplante Arbeiten und tatsächlich erreichte Ziele im Projektteil Weiterentwicklung der IRMS

Geplante Arbeiten	Tatsächlich erreichte Ziele
<p>Festlegung von wichtigen ökologischen Leitprodukten für die Untersuchung und den Aufbau von authentischen Lieferanten über die Projektteilnehmer und</p> <p>Einbeziehung von Leitprodukten aus der Evaluierung aus den Bereichen Agrarprodukte, tierische und verarbeitete Produkte</p>	<p>In der Auslotung der Möglichkeiten der Probenahmen und Absicherung der Authentizität der Referenzen wurden folgende Produkte evaluiert: Gerste, Mais, Dinkel, Tee, Weizen, Eier, Möhren, Kartoffeln, Tomaten.</p> <p>Im Rahmen der ersten Ergebnisse der Evaluierung wurde der Aufbau der Datenbank auf vier Leitprodukte: Möhren, Weizen, Kartoffeln und Tomaten eingeeignet:</p>
<p>Festlegung von relevanten Informationen zur Produktionsweise (Düngung) und später Abgleich mit den analytischen Parametern zur Verifizierung der Kausalitätskette</p>	<p>Eine vollständige Bereitstellung von Informationen zur Düngung gestaltete sich im Rahmen des Projektes als schwierig. Insbesondere für Möhren konnte jedoch die Düngung aufgeschlüsselt werden. Unter Berücksichtigung dieser Düngung konnte die Differenzierung der Möhren wesentlich gesteigert werden.</p>

Gep plante Arbeiten	Tatsächlich erreichte Ziele
Aufbau signifikanter Datensätze, die eine statistische Differenzierung von ökologischen und konventionellen Produkten erlaubt	Insgesamt stehen 340 Referenzen zur Charakterisierung der vier Leitprodukte zur Verfügung (siehe Tabelle 1). Dabei wurde auf eine umfangreiche Probennahme im Bereich der Hühnereier verzichtet, da hier schon authentische Proben durch die TR Agroisolab GmbH zur Verfügung gestellt werden konnten.
Ausarbeitung statistisch signifikanter Kenngrößen zur Unterscheidung	Im Zuge des Projektes konnten wichtige Schranken ermittelt werden. So sind angereicherte Isotopenverhältnisse in Möhren oberhalb von 8,1 ‰ mit einer Wahrscheinlichkeit von über 95 % für konventionelle Möhren derzeit auszuschließen. Aufgrund des Datenumfangs im Bereich der Hühnereier liegt eine hohe statistische Güte vor. So kann mit einer Wahrscheinlichkeit von über 99 % ein Isotopenverhältnis unterhalb von 4,5 ‰ für ökologische Eier ausgeschlossen werden. Die Unterscheidung von Weizen und Kartoffeln ist auf alleiniger Basis von Stickstoff eher als rudimentär zu werten. Hilfreich sind jedoch andere stabile Isotope, wie zum Beispiel Kohlenstoff, die derzeit eine Differenzierung von 86 % erreichen.
Herstellung der Praxistauglichkeit des Verfahrens zur Herkunftsunterscheidung an Leitprodukten	Die umfangreichen Blindtests wie auch die guten Ergebnisse haben, zumindest im Bereich der Differenzierung von Hühnereiern, Getreide und Möhren, die gute Praxistauglichkeit aufgezeigt. Insbesondere in Kombination von FAS und IRMS kann eine Sicherheit der Aussage von 99 % gewährleistet werden.
Im Verlauf des Projekts neu definierte Ziele	
Ausdehnung der Analytik auf weitere Isotope zur Verbesserung der Differenzierungsmöglichkeiten	Im Rahmen des Projektes wurden weitere stabile Isotope der Bioelemente als Verbesserung der Differenzierungsgüte getestet. Insbesondere die Isotope des Kohlenstoffs ergeben hierbei Erfolg versprechende Ansätze (siehe Weizen).
Einbeziehung der Herkunft als weitere Qualität zum Nachweis der Authentizität ökologischer Produkte	Im Zuge des Projektes wurde der Begriff der Authentizität ebenfalls auf die Herkunft erweitert. Die Anwendungsmöglichkeit konnte dabei erfolgreich zum Beispiel an Möhren aufgezeigt werden.
Überprüfung der Chargenidentität von Hühnereiern	Die Blindtests der Hühnereier wurde im Rahmen des Projektes auf die Fragenstellung der Chargenidentität erweitert. Die 46 untersuchten Proben konnten fehlerfrei einander zugeordnet werden.

3.1.8 Kurze Zusammenfassung des Arbeitsblocks und der wichtigsten Ergebnisse

Der Aufbau von statistisch relevanten Datensätzen hat aufgezeigt, dass die Isotopenverhältnisse des Stickstoffs einerseits Möglichkeiten bieten, Produkte aus der konventionellen und organischen Landwirtschaft zu unterscheiden (siehe Möhren, Hühnereier), dass jedoch die Differenzierungsgüte beziehungsweise Differenzierungsrobustheit von der Anzahl der Referenzen abhängig ist.

Vordergründig verweist häufig eine geringe Anzahl von Referenzen aus der ökologischen und konventionellen Landwirtschaft auf exzellente Differenzierungsmöglichkeiten (Abbildung 14, nur

30 Referenzen). Dies erklärt sicherlich auch, warum aktuelle Studien zu guten Differenzierungen kommen, da häufig die Anzahl der Referenzen ungenügend sind und die Ergebnisse damit leicht überinterpretiert werden (Rogers, 2008; Sturm & Lojen, 2011). Nach Aufbau einer Datenbank mit statistisch relevanter Größe sind vollständige Differenzierungen jedoch häufig nicht mehr haltbar (Hühnereier, Möhren) oder liegen nicht mehr vor (Weizen, Kartoffeln).

Liegt eine statistisch relevante Größe vor (siehe Hühnereier), so kann jedoch weiterführend die Methodik der stabilen Isotope mit hoher Sicherheit angewendet werden. Dabei können die Bereiche mit geringer Aussagekraft berücksichtigt und durch entsprechende Ergänzungsmethoden (FAS) oder weitergehende Informationen (Möhren) ergänzt und eliminiert werden.

Schlussendlich konnte im Rahmen dieser Studie aufgezeigt werden, dass auch weitere Isotope wie zum Beispiel Kohlenstoff Möglichkeiten der Differenzierung von Produkten aus ökologischer und konventioneller Landwirtschaft bieten.

3.2 Weiterentwicklung der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie (FAS)

Tabelle 9: Übersicht der Arbeitsschritte bei der FAS

Arbeitsschritt	2009				2010				2011			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Produkt: Eier												
Grundlagen für Datenablage und Datenbank		A	E									
Aufbau signifikanter Datensätze Referenzproben (Phase 1)			A	X	E							S. 61
Ausarbeitung statistisch signifikanter Kenngrößen zur Unterscheidung				A	X	X	E					S. 63
Codierte Proben (Phase 2)						A	X	E				S. 63
Praxisproben									A		E	S. 66
Einarbeitung der Angaben aus den Begleitfragebögen							A	X	X	E		S. 65
Produkt: Weizen												
Grundlagen für Datenablage und Datenbank	A	X	X	E								
Aufbau signifikanter Datensätze Referenzproben (Phase 1 u. 2)	A	X	X	X	X	X			X	E		S. 69
DOK 2007 und 2009		A	X	X	X	X				E		S. 67
Ausarbeitung statistisch signifikanter Kenngrößen zur Unterscheidung				A	X	X	X			X	E	S. 67 S.69f
Codierte Proben (Phase 2 u. 3)				A	X	X	X	X	X	X	E	S. 72
Keimtest											AE	S. 74
Lagertest									A	E		S. 74
Einarbeitung der Angaben aus den Begleitfragebögen							A			X	E	S. 75

3.2.1 Methodenbeschreibung: FAS

Die Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie (FAS) ist ein optisches Verfahren, bei dem die Lichtemission einer Probe mit Fotomultiplier gemessen wird. Einheitliche Messbedingungen werden durch definierte optische Anregung der Probe bei konstanter Helligkeit und anschließende definierte Messzeitintervalle für 100 Messpunkte erreicht.

Das Wort „Fluoreszenz“ in der Verfahrensbezeichnung soll auf die in der Literatur beschriebene größere Wellenlänge des emittierten Lichts im Verhältnis zum anregenden Licht hinweisen. Fluoreszenz im Sinne von Emissionen im Zeitbereich bis zehn bis vier Sekunden ist nicht gemeint, da sich die Lichtemission im Zeitbereich von Sekunden bis Minuten erstrecken kann. Die Emission wird daher hier auch als Lumineszenz bezeichnet. Die Messanlage ist in Abbildung 16 schematisch dargestellt.

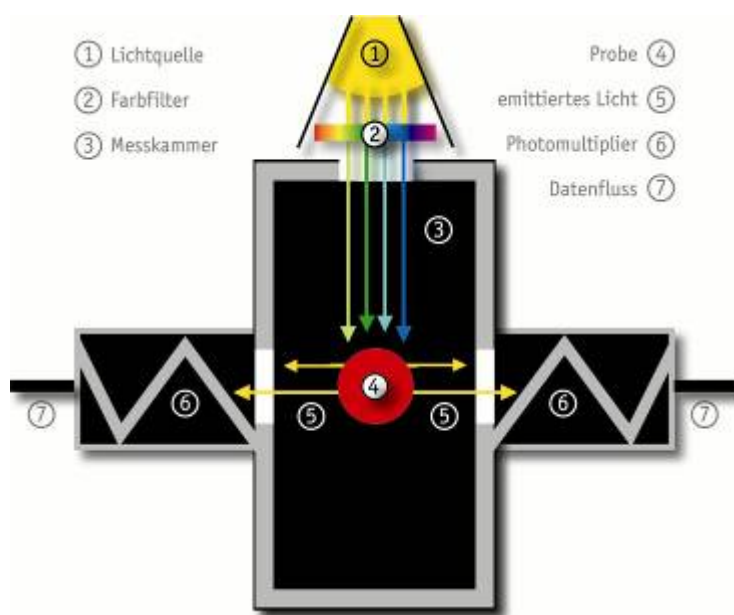


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Messanlage für Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie (Quelle: Strube & Stolz, 2004)

Durch Variation der Anregungswellenlänge und Messung der Lichtemission im verfügbaren Wellenlängenbereich des Fotomultipliers werden die jeweiligen Kurvenverläufe nach Lichtanregung erhalten. Die Emission der Probe ist nach der Anregung am höchsten und klingt in einem probencharakteristischen Zeitraum ab.

Jeweils gleiche Kurvenabschnitte dieser Abklingkurven bilden ein Spektrum nach Anregung, welches für jede Probenart spezifisch auftritt. Veränderungen innerhalb dieser Spektren der Probenart korrelieren mit Qualitäts- beziehungsweise Erzeugungskriterien, zum Beispiel Reifestadium bei Äpfeln, Fütterung und Haltungsbedingungen von Legehennen. Bestimmte Veränderungen ließen sich unter kontrollierten Bedingungen den Kulturverfahren systematisch zuordnen (Strube & Stolz, 1999; Strube & Stolz, 2001; Strube & Stolz, 2002).

In Abbildung 17 werden beispielhaft für diese Spektren die mittleren Kurvenabschnitte R40 (6,1 bis 10 Sekunden) von getrocknetem Weizen aus ökologischem beziehungsweise konventionellem Anbau für die Anregungs-Wellenlängenbereiche jeweils nebeneinander dargestellt.

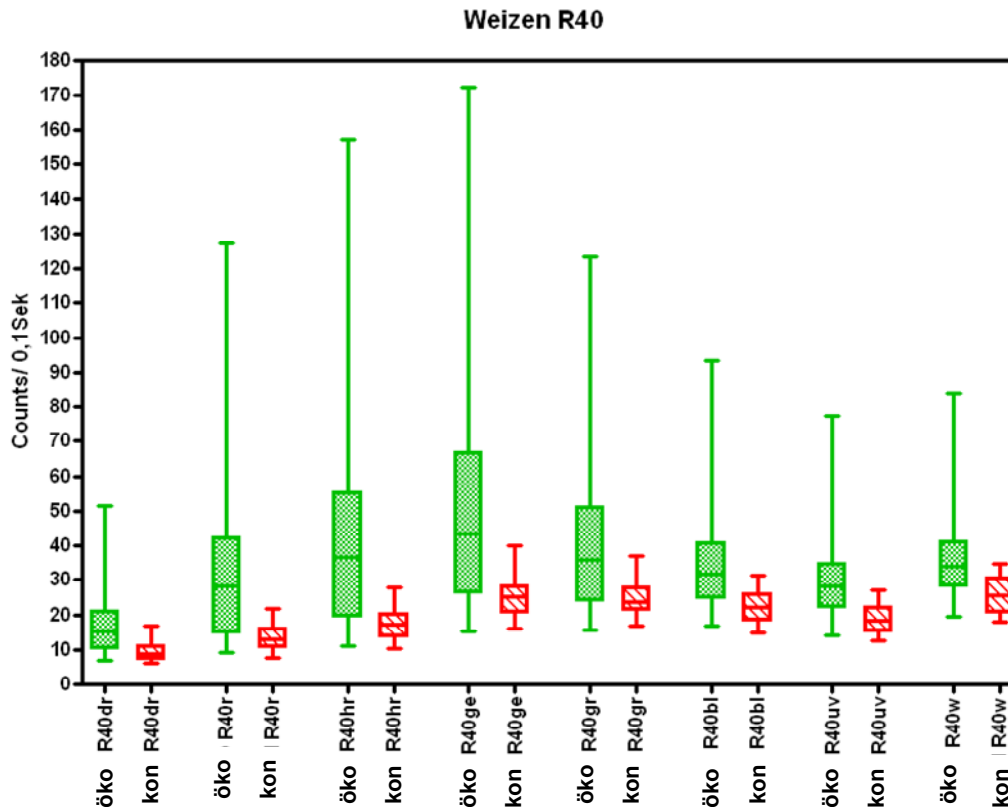


Abbildung 17: Spektrum nach optischer Anregung für getrockneten Weizen. In Phase 1 bis 4 dieser Arbeit, aus ökologischem (öko, n = 77 Proben, links) und konventionellem (kon, n = 33 Proben, rechts) Anbau nacheinander für die Wellenlängenbereiche dunkelrot (dr), rot (r), hellrot (hr), gelb (ge), grün (gr), blau (bl), uv und weiß

Zur Messung werden primär gleiche Volumina von möglichst unzerkleinerten Pflanzenteilen, zum Beispiel Weizen- oder Maiskörner, Möhrenstücke oder ganze Äpfel, verwendet.

Als Ursache dieser Lumineszenz ist physikalisch ein Übergang von Molekülen in angeregte Zustände aufgrund der Bestrahlung mit Energie in Form von Licht denkbar. Die Abgabe dieser Energie ist vermutlich von Verzögerungen über Zwischenniveaus beziehungsweise durch internen Absorptionsaustausch begleitet. Da pflanzliche Proben komplexe Biopolymere sind, erscheint die längere Zeitdauer von Sekunden und Minuten für die verzögerte Lumineszenz mit einer Vielzahl von Austauschprozessen und Zwischenniveaus plausibel. Unterschiede im Spektrum einer Probenart könnten so als strukturelle Unterschiede im Gesamtgefüge angesehen werden (Strube & Stolz, 2007).

Modelle zur Ursachen der Lumineszenz wurden in der Literatur zum Beispiel von F.A. Popp und Y. Yan diskutiert (Popp & Yan, 2002).

3.2.2 Planung und Ablauf

Für die Untersuchung mit der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie (FAS) wurden unter Berücksichtigung von Beschaffungsaufwand, Stand der Methodenentwicklung und Zeitbedarf gemeinsam mit den Projektteilnehmern die Leitprodukte Hühnereier und Weizen ausgewählt.

Der erste Projektabschnitt beinhaltete die Untersuchung von Proben bekannter Herkunft beziehungsweise Erzeugungsweise als Referenzproben zum Aufbau produktspezifischer Datenbanken und zur Ermittlung von statistisch signifikanten Kenngrößen zur Unterscheidung. An der Erstellung von Proben-Begleitfragebögen wurde mitgewirkt.

Ergebnisdaten verschiedener Erntejahre der Untersuchungen von Weizen des gut dokumentierten Weizen-Anbau-Versuchs vom Projektpartner FiBL (DOK-Feldversuch) wurden für den Datenbankeintrag neu zusammengestellt. Ergebnisse von Messungen an Hühnereiern aus früheren Projekten mit gut dokumentierten Herkunftsangaben konnten für die Datenbank aufbereitet werden.

Im zweiten Projektabschnitt wurden vom Projektpartner FiBL verschlüsselte Proben versendet und anhand der ermittelten FAS-Kenngrößen bewertet.

Für Weizen wurden die Projektabschnitte nacheinander für Proben aus dem Erntejahr 2008 und 2009 und anschließend mit Proben aus dem Erntejahr 2010 durchgeführt. Es erfolgten Vergleichsmessungen mit zuvor eingefrorenem Probenmaterial (Lagertest) und eine Überprüfung der Keimfähigkeit nach dem Trocknungsprozess an ausgewählten Proben. Einige Proben wurden vom Projektpartner doppelt, einmal als Referenzprobe und dann codiert, versendet.

Eine Untersuchung von Hühnereiern im Praxistest an anonymisierten Proben, ausgewählt vom Projektpartner GfRS, wurde abschließend durchgeführt.

Für einen Vergleich der Probenbewertung zwischen den Methoden FAS und IRMS wurden die Ergebnisse für vergleichbare Proben separat in einer einfachen Bewertungsskala von $-1 = \text{kon}$ bis $+1 = \text{öko}$ angegeben.

3.2.3 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Biologische Systeme zeichnen sich dadurch aus, dass sie nach Anregung mit Licht Abklingzeiten in der Größenordnung von Sekunden bis Stunden aufweisen, während die Verweildauer von optischen Wellen in toter Materie schon nach kurzer Zeit (10^{-9} bis 10^{-4} Sekunden) beendet ist (Bischof, 1995).

Für die Messung der induzierten Lumineszenz (delayed luminescence) wird die Probe unter definierten Bedingungen einige Sekunden mit Licht bestrahlt und das anschließend emittierte Licht gemessen. Dotter von Eiern aus Freilandhaltung hatten signifikant höhere Strahlungsintensitäten gegenüber den Eiern aus Käfig und Bodenhaltung. Die Werte der Auslaufhaltung lagen dazwischen und unterschieden sich von allen anderen Haltungen signifikant (Köhler, 2001).

In Übereinstimmung mit der Arbeit von Köhler (2001) wiesen Dotter aus verschiedenen Haltungsformen unterschiedliche Emissionsniveaus auf. Während sich Dotter der konventionellen Haltungsformen („Käfig“, „Boden“ und „Freiland“) bezüglich der Nachleuchtintensität nur geringfügig unterschieden, hoben sich die Biodotter wie auch diejenigen aus kleinbäuerlicher Haltung in der Regel sehr deutlich durch höhere Messwerte ab (Egerer, 2009).

Bei der Vitalitätsbestimmung von Getreide spielen nicht so sehr die absoluten Werte der Biophotonengrößen, sondern die Werteverhältnisse beziehungsweise -korrelationen eine Rolle (Zeiger & Popp, 1997).

Unter gleichen Messbedingungen lassen sich Samen am Gelb/Blau-Verhältnis unterscheiden. Vermutlich entspricht ein geringes Gelb/Blau-Verhältnis einem höheren Grad von „Samenartigkeit“ oder Samenruhe (Dormanz). Von dieser Unterscheidungsmöglichkeit wird bei der Differenzierung von Weizen aus konventionellem und ökologischem Anbau Gebrauch gemacht (Meier-Ploeger et al., 2003).

Die Untersuchungen mit der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie (FAS) wurden an einer von Dr. Jürgen Strube konzipierten Messanlage durchgeführt. Das Verfahren zur Untersuchung von Weizen wurde an diesem Messgerät im Rahmen des Projektes 02OE170 validiert (Meier-Ploeger et al., 2003; Strube & Stolz, 2007; Strube & Stolz, 2010).

Zur Beleuchtung wird ein Projektor Braun NOVAMAT 130AF mit Standardobjektiv COLOR PAXON 2,8/85 mm MC und Halogenlampe 24 V/150 W verwendet. Unterschiedliche Spektralbereiche zur optischen Anregung werden durch Schott-Standard-Farbglassfilter RG695 (Dunkelrot), RG630 (Rot), OG590 (Hellrot), OG530 (Gelb), VG6 (Grün), BG12 (Blau) u. UG11 (UV) ermöglicht. Die Probe ist in einer Quarzglas „Suprasil“-Küvette circa 44 Zentimeter von der Lichtquelle in einer lichtdichten Probenkammer im temperierten Raum positioniert. Die Kammer verfügt über eine sensorisch kontrollierte Öffnung für die Probenaufgabe und drei pneumatisch gesteuerte Verschlüsse (Shutter), einer für die Beleuchtung und zwei für die Messung. Zur Messung der Photonenemission sind zwei verschiedenartige Fotomultiplier angeschlossen. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse des Fotomultipliers EMI 9202 QA, Hochspannungserzeugung mit Thorn EMI PM28B, nachgeschaltete Elektronik für Single-Photon-Counting mit Thorn EMI Amplifier Discriminator C604-A, Eigenrauschen circa 1,3 Counts/100 Millisekunden, Durchmesser der Fotokathode 48 Millimeter (S20), Spektralbereich circa 260–850 Nanometer, Kühlung primär durch Peltierelemente (-30 °C), sekundär im Wasserumlaufverfahren (12 °C) dokumentiert.

Für die Anregung von getrocknetem Weizen mit BG12 (Blau), UG11 (UV) und ohne Farbfilter (Weiß) werden reflektive ND-Filter (Graufilter) mit Transmission 10 % für Blau und Weiß und Transmission 32 % für UV vorgeschaltet, um Überschreitungen des Counter-Messbereiches zu verhindern.

Der Messvorgang wird computertechnisch gesteuert und bezüglich möglicher Einflusskriterien wie Kühltemperatur, Helligkeit, Kammerverschluss, Spannungsversorgung et cetera programm-überwacht. Die Funktionskontrolle der Fotomultiplier erfolgt an jedem Messtag mit Selbsttest und Beleuchtungsmessungen anhand von Prüfkörpern.

3.2.4 Material und Methoden

Hühnereier

In der ersten Projektphase wurden 30 Hühnereierproben als Referenzmaterial mit detaillierten Angaben unter anderem zu Herkunft, Haltung, Fütterung, Hühnerrasse und Gesamtanzahl der Legehennen im Betrieb im Sommer 2009 untersucht. Davon waren 15 Proben von Produzenten aus einem ökologischen (öko) Anbauverband und 15 Proben von konventionellen (kon) Eierproduzenten.

In der zweiten Projektphase wurden 37 codierte Proben im Sommer 2010 gemessen und entsprechend bewertet. Nach der Bewertung wurden 33 Proben vom Projektpartner FiBL decodiert. Im Praxistest wurden zehn Proben im Februar 2011 und neun weitere Proben im Oktober/November 2011 untersucht.

Die Hühnereier wurden nach Probeneingang im Kühlschrank bei 7 °C gelagert und bei 15–17 °C gemessen. Für die Messung wurde der Eidotter vom Eiklar getrennt und in eine Kunststoffspritze aufgezogen. Diese Arbeit wird unter schwachem Rotlicht bei Messtemperatur durchgeführt. Vom Eidotter wurden acht Gramm in einen Quarztiegel (d = 30 mm; h = 38 mm) abgefüllt und in die lichtdichte Probenkammer gestellt.

Die Beleuchtung erfolgte nacheinander mit den Beleuchtungsfarben Gelb, Blau und Weiß. Nach der jeweiligen Beleuchtungsdauer von einer Minute werden circa 0,2 Sekunden für das Verschließen der Probenkammer benötigt. Anschließend wurden 100 Messwerte im Intervall von einer Sekunde jeweils mit zwei getrennt positionierten Fotomultipliern aufgenommen.

Von jeder Probe wurden die Dotter einzeln beziehungsweise Mischproben von jeweils zwei Dottern gemessen.

Weizen

Als Referenzproben wurden im ersten Teilabschnitt (Phase 1) 39 Weizenproben aus den Erntejahren 2008 beziehungsweise 2009 untersucht. Davon waren 20 Proben aus ökologischem (öko) und 19 Proben aus konventionellem Anbau. Anschließend wurden 19 codierte Weizenproben untersucht und zusätzlich zwei Weizenproben der Sorte Naturastar, die dem entsprechenden Anbauverfahren zugeordnet werden sollten (Phase 2). Nach der Bewertung wurden 18 Proben von den Projektpartnern decodiert und die Angaben aus den Proben-Begleitfragebögen mit in die Datenbank integriert.

Im zweiten Teilschritt (Phase 3) im Frühjahr 2011 wurden 21 Weizenproben aus dem Erntejahr 2010 als Referenzproben untersucht, wobei 17 Proben im Anbau ökologischer (öko) und vier Proben konventioneller Herkunft (kon) waren. Vom Projektpartner FiBL wurden im gleichen Zeitraum 33 codierte Weizenproben zur Prüfung für die FAS versendet (Phase 4) und anhand der ermittelten Kenngrößen bewertet.

Zusätzlich wurden jeweils acht Weizenproben der Sorte Runal aus den Weizen-Anbau-Versuchen des DOK-Feldversuchs der Erntejahre 2007 und 2009 als verschlüsselte Proben untersucht. Nach den Angaben des Projektpartners waren es jeweils vier Feldwiederholungen aus zwei unterschiedlichen Kulturverfahren. Für das Erntejahr 2007 des DOK-Feldversuchs wurde zunächst sehr wenig Probematerial zur Verfügung gestellt, daher folgte eine zweite Lieferung. Die Proben wurden gleichfalls nach der Bewertung decodiert.

Bei Probeneingang wurde von jeder Weizenprobe eine Teilmenge eingefroren. Die restliche Probenmenge wurde mittels Analysensieb Maschenweite 4,0 Millimeter beziehungsweise 2,8 Millimeter von Verunreinigungen getrennt und anschließend in jeweils mindestens sechs Teilmengen (Chargen) von circa 30 Gramm unterteilt. Die Teilmengen wurden auf Aluschalen im Exsikkator über Indikator-Kieselgel (KC-Trockenperlen® Orange CHAMELEON) circa zwei Wochen bei Raumtemperatur und circa zwei Wochen im Trockenschrank bei 40 °C gemeinsam mit den Teilmengen anderer Proben der gleichen Probenserie getrocknet. Die Äquilibrierungs- und Trockendauer ist abhängig vom Wassergehalt der Proben und der Häufigkeit des Trockenperlentauschens. Von jeder Charge wurde dreimal an verschiedenen Tagen eine Teilmenge von circa 18 Gramm (25 ml) in einer zylindrischen Suprasil-Küvette von jeweils zwei Seiten gemessen.

Die Probe wird fünf Sekunden beleuchtet, nach 0,2 Sekunden Kammerverschlusszeit werden im Intervall von 0,1 Sekunden jeweils 100 Messwerte von den zwei Fotomultipliern aufgenommen. Als Beleuchtungsfarben werden nacheinander Dunkelrot, Rot, Hellrot, Gelb,

Grün, Blau, UV sowie weißes Licht (ohne Filter) gewählt. Jede Farbwahl wird dreimal wiederholt. Die Kurvenabschnitte sind über alle drei Kurven der Farbe gemittelt.

3.2.5 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.2.5.1 Statistik und grafische Darstellung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm jmp Version 5.1. Grafische Darstellungen sind mit GraphPad Version 4.03 oder jmp Version 5.1 erstellt.

Zur Trennung der Varianten wurden Varianzanalysen (ANOVA) und anschließende Mittelwertvergleiche (Tukey-Kramer HSD Test, $\alpha = 0.05$) durchgeführt.

3.2.5.2 Hühnereier: Referenzproben

Die Proben wurden mit gelbem, blauem und weißem Licht angeregt. Der mittlere Kurvenverlauf aller gemessenen Emissionskurven der jeweils 15 Proben einer Erzeugervariante (Referenzproben aus Phase 1) nach Anregung mit Weiß ist in Abbildung 18 dargestellt. Die in der Literatur angegebene höhere Dotterlumineszenz von Eiern aus ökologischer Erzeugung wird anhand der Kurvenverläufe deutlich.

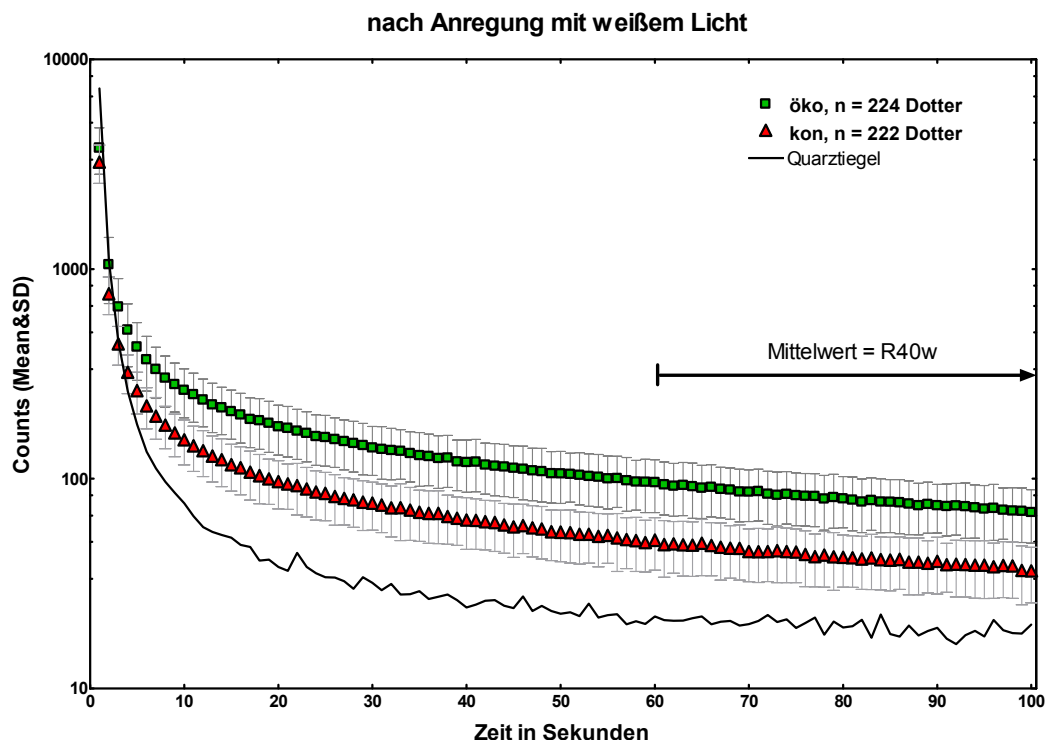


Abbildung 18: Mittlerer Kurvenverlauf (Mean & SD) der Lichtemission nach einer Minute Anregung mit weißem Licht von Eidotter. Dargestellt sind jeweils 15 Proben aus ökologischer und 15 Proben aus konventioneller Erzeugung

Von den 30 Referenzproben sind anhand der Dotterlumineszenz R40w (Mittelwerte der Kurvenabschnitte 61–100 Sekunden nach Anregung mit Weiß) 26 Proben (87 %) signifikant trennbar.

Den mittleren Kurvenverlauf dieser Proben nach Anregung mit Gelb zeigt Abbildung 19. Die Kurvenenden (langfristiger Bereich) sind nur wenig niedriger im Vergleich zur Anregung mit Weiß. Mittels Diskriminanzanalyse nach den Erzeugungsvarianten über alle Mittelwerte der Proben wurde deutlich, dass sich die Kurvenabschnitte 21–100 Sekunden nach Anregung mit Gelb (R80ge) zur Differenzierung der Erzeugungsvarianten in gleicher Weise eignen wie R40w.

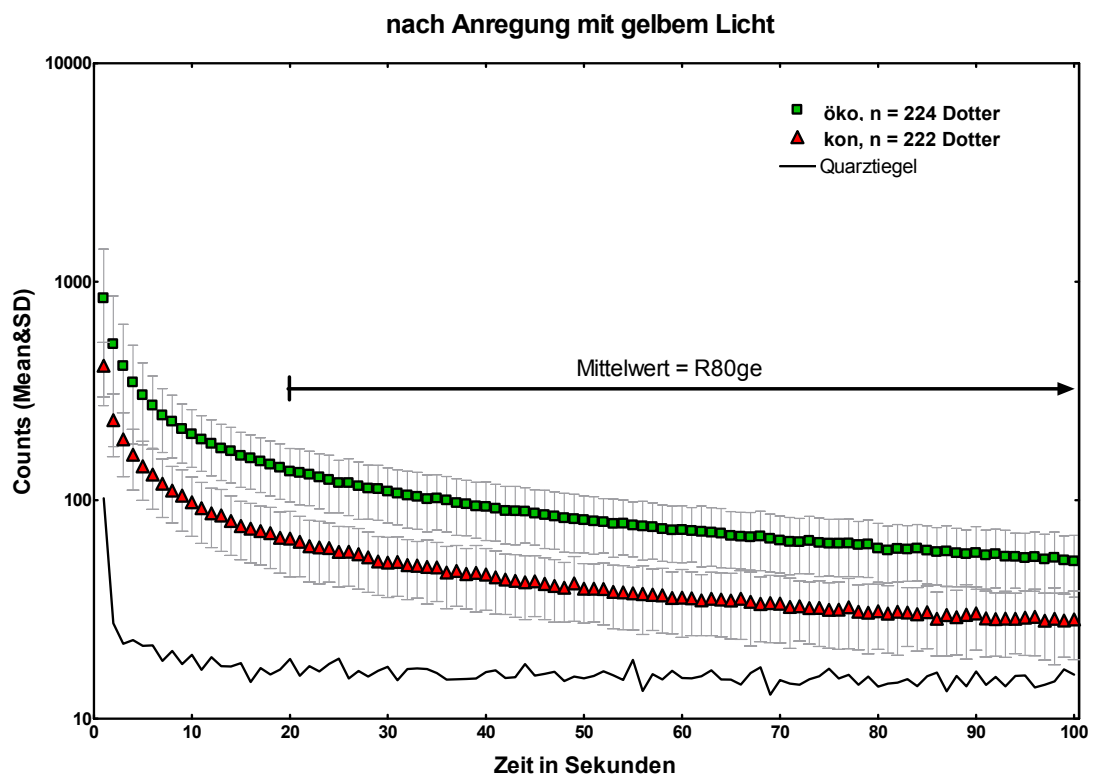


Abbildung 19: Mittlerer Kurvenverlauf (Mean&SD) der Lichtemission nach einer Minute Anregung mit gelbem Licht von Eidotter. Dargestellt sind jeweils 15 Proben aus ökologischer und 15 Proben aus konventioneller Erzeugung

Interessant ist, dass sich die Zahlenwerte von R40w und R80ge relativ wenig unterscheiden. Die Anregung mit gelbem Licht als Teilbereich des weißen Spektrums ist für die Trennung der Varianten anhand der Dotterlumineszenz vermutlich entscheidend.

Als weitere Trenngröße wurde das Verhältnis der Mittelwerte der Kurvenabschnitte 21–100 Sekunden nach Anregung mit Gelb zu diesem Kurvenabschnitt nach Anregung mit Blau (R80geDbI) ermittelt.

Die zusammengefassten Ergebnisse in den drei Differenzierungsgrößen R40w, R80ge und R80geDbI für die Erzeugervarianten der Referenzproben sind in Abbildung 20 grafisch aufgeführt, die Mittelwerte werden jeweils darunter angegeben. Die Grafik zeigt den rechnerisch ermittelten Grenzwert zwischen den Varianten (Mittelwert) als Linie. Dieser Zahlenwert

verdeutlicht in etwa den Grenzbereich (für diesen Fotomultiplier unter den eingestellten Messbedingungen), ist jedoch aufgrund der Probenauswahl der Referenzproben noch ungenau.

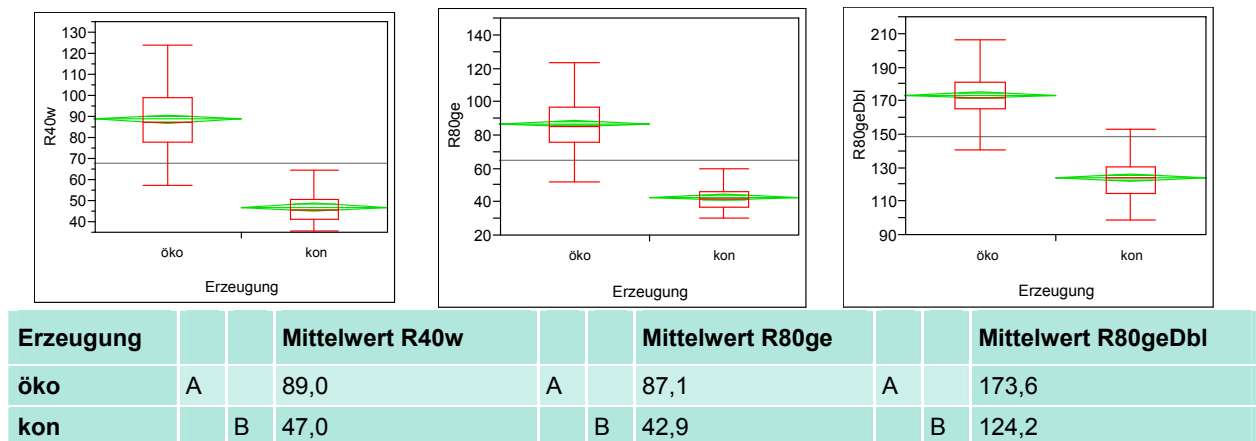


Abbildung 20: Linke Grafik R40w [Counts/Sek], mittlere Grafik R80ge [Counts/Sek], rechte Grafik R80geDbI [%] von Eidotter der Referenzproben. Dargestellt sind jeweils 15 Proben aus ökologischer (öko) und 15 Proben aus konventioneller (kon) Erzeugung, darunter Tukey-Kramer HSD Test. $q^* 1,96731$; Alpha 0,05; Proben, die nicht durch denselben Buchstaben verbunden sind, unterscheiden sich signifikant

Da die konventionellen Proben überwiegend aus Bodenhaltung waren und nur eine Öko-Probe mit Haltung im Wintergarten, könnte hier der Eindruck entstehen, dass nur die Haltungsformen Boden beziehungsweise Freiland getrennt wurden. Ergebnisse aus anderen Probenserien zeigen bei der Kenngröße R40w jedoch Abstufungen verschiedener Haltungsformen innerhalb der Varianten.

Als Bewertungsgrundlage für die codierten Proben wurden für den Fotomultiplier EMI 9202 für die Messgröße R40w > circa 60 Counts/Sekunde und in R80geDbI > circa 155 % für BIO-Eier bestimmt. Bei konventioneller Erzeugung wurden für die Messgrößen R40w < circa 55 Counts/Sekunde und in R80geDbI < circa 145 % und geringere Streuung der Messwerte erwartet. In den Bereichen dazwischen wurde tendenziell beurteilt.

3.2.5.3 Hühnereier: codierte Proben

Die Ergebnisse der codierten Proben sind zusammen mit denen der Referenzproben für die ermittelten Kenngrößen R40w und R80geDbI in Abbildung 21 beziehungsweise Abbildung 22 dargestellt. Von den 33 verschlüsselten Proben wurden 31 Proben (94 %) korrekt bewertet. Für 23 Proben war eine sichere Bewertung möglich. Zehn Proben wurden unter Bezugnahme aller Messwerte tendenziell zugeordnet, da sie nicht in allen Kenngrößen beider Fotomultiplier eindeutig eingegliedert werden konnten. Für zwei dieser Proben traf die Prognose nicht zu.

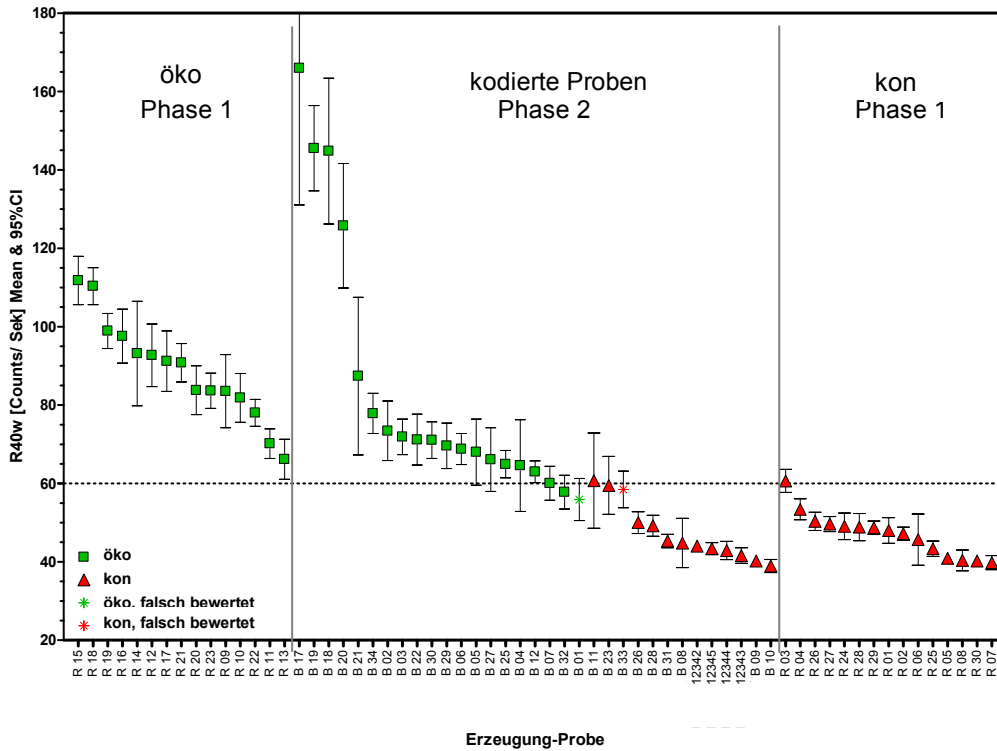


Abbildung 21: R40w (Mittelwerte und 95 % CI der Kurvenabschnitte 61–100 Sekunden nach Anregung mit Weiß) von Hühnereiprobe (Eidotter) Phase 1 (Referenzproben) und Phase 2 (codierte Proben)

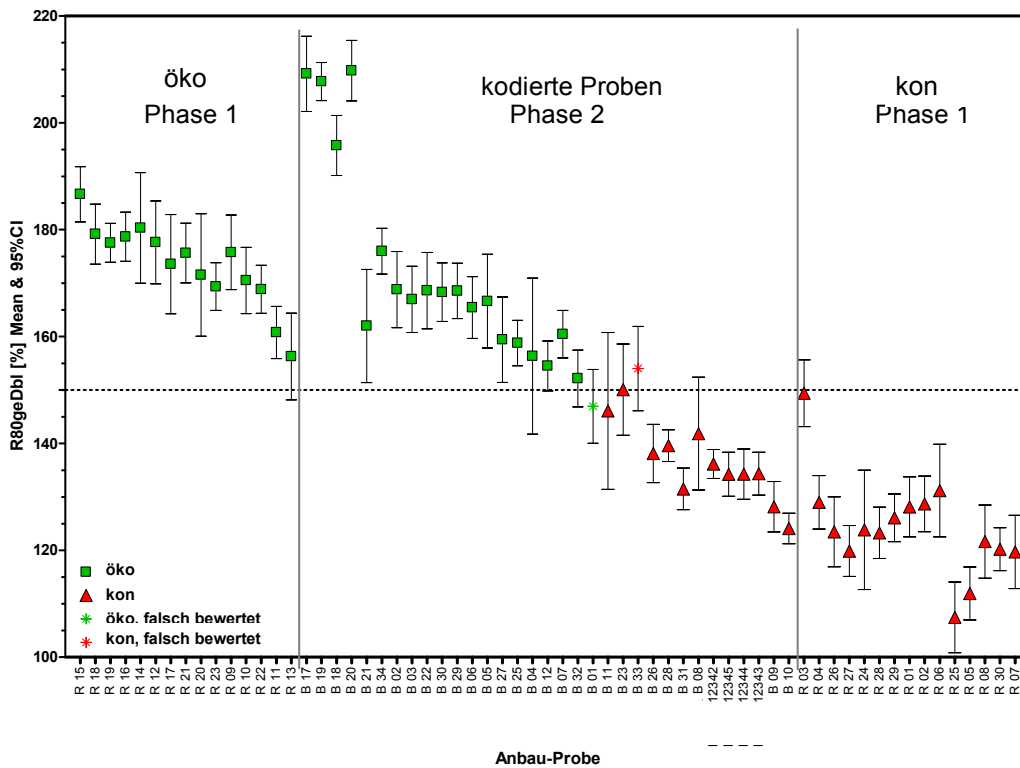


Abbildung 22: R80geDbI (Mittelwerte und 95 % CI der prozentualen Kurvenverhältnisse 21–100 Sekunden nach Anregung mit Gelb zur Anregung mit Blau) von Hühnereiprobe (Eidotter) Phase 1 (Referenzproben) und Phase 2 (codierte Proben), Probenreihenfolge analog

Zum Vergleich mit der IRMS wurden die Ergebnisse nach den getroffenen Bewertungsrichtlinien in eine einfache Bewertungsskala gebracht. Dafür wurden anhand der Gesamtmittelwerte und Standardabweichungen für beide Erzeugervarianten Bereiche festgelegt, die als sicher mit öko (+1) bewertet werden können ($R40w > 84$ Counts/Sekunde und $R80geDbI > 170$ %) beziehungsweise sicher mit kon (-1) prognostiziert wurden ($R40w < 45$ Counts/Sekunde und $R80geDbI < 130$ %). Als absolute Grenze wurde $R40w$ mit 55 Counts/Sekunde und $R80geDbI$ 143 % angenommen, dazwischen wurde in 0,1-Schritten abgestuft.

In Abbildung 23 sind die vom Erzeuger angegebenen Haltungformen Freiland, Wintergarten (nur eine Probe) und Boden für die Bewertungsgrößen $R40w$ und $R80geDbI$ dargestellt. Freilandhaltung bei konventioneller Erzeugung führt zum Anstieg der Bewertungsgrößen.

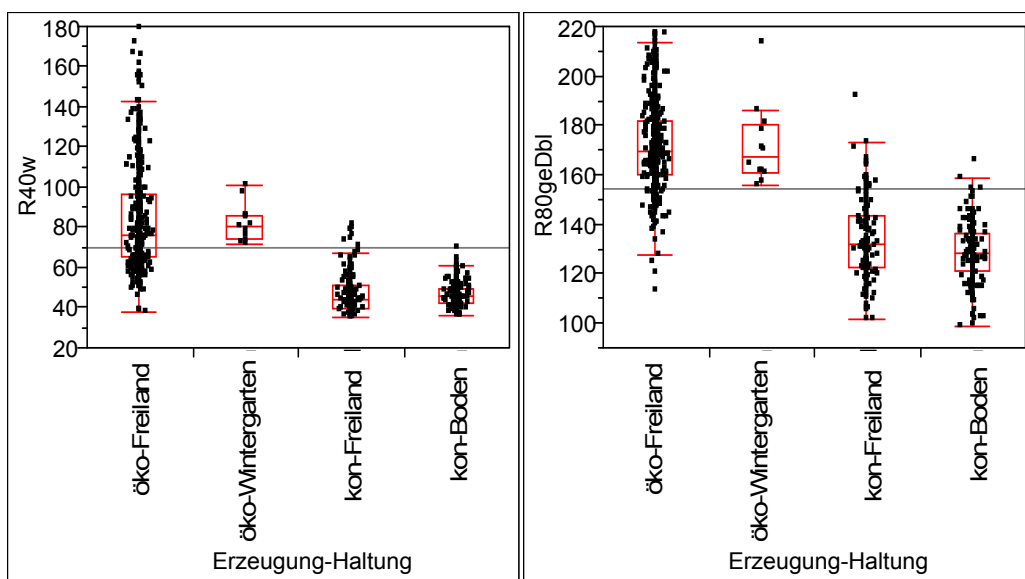


Abbildung 23: $R40w$ [Counts/Sek] und $R80geDbI$ [%] von Hühnereiprüfungen (Eidotter) Phase 1 (Referenzproben) und Phase 2 (codierte Proben) nach Angaben der Haltungform. Die Eidotter-Messungen sind einzeln als Punkte dargestellt, die Box umfasst 50 % der Datenpunkte, der Strich in der Box kennzeichnet den Medianwert

3.2.5.4 Hühnereier: Praxisproben

Die Ergebnisse der Praxisproben sind in Abbildung 24 grafisch dargestellt. Die Angaben zu den Varianten basieren auf Decodierungsangaben des Projektpartners GfRS.

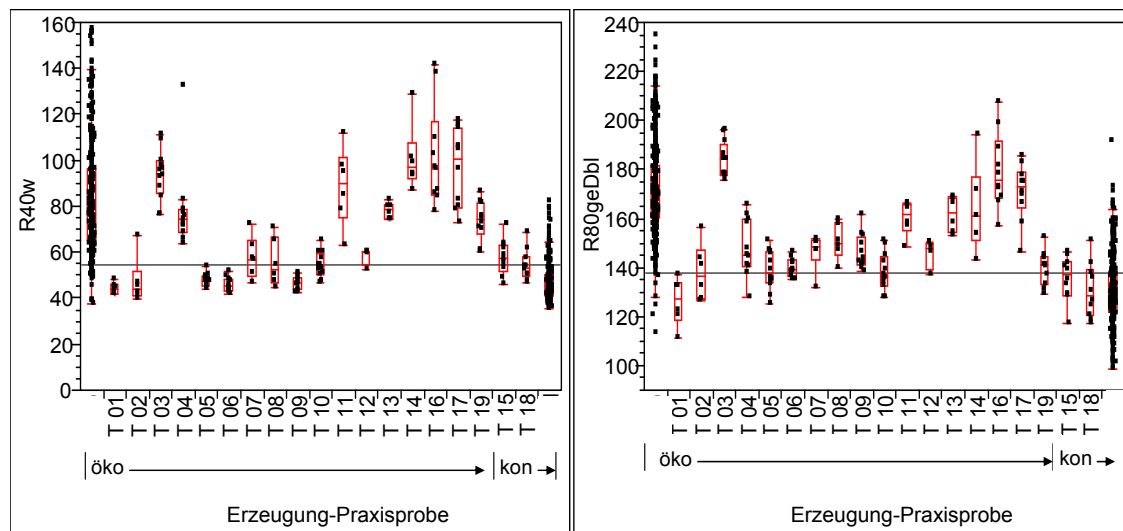


Abbildung 24: Linke Grafik R40w, rechte Grafik R80geDbI von zehn Hühnereierproben im Vergleich zu den Ergebnissen der Varianten von 63 Proben aus Phase 1 und 2. Die Eidottermessungen sind einzeln als Punkte dargestellt, die Box umfasst 50 % der Datenpunkte, der Strich in der Box kennzeichnet den Medianwert

Problematisch war bei der Untersuchung der Praxisproben die geringere Anzahl Eier je Probe, die durch Transportschäden teilweise noch reduziert wurde. Hinsichtlich der ermittelten Beurteilungsgrenzen lag Unsicherheit bezüglich der sich von den vorigen Untersuchungen unterscheidenden Jahreszeit vor. Es wurden aufgrund von Versuchsergebnissen zum Einfluss von Tageslicht und Fütterung (Köhler, 2001) leichte Verschiebungen der Beurteilungsgrenzen aufgrund anderer Tageslichtverhältnisse beziehungsweise weniger Grünfütterverwendung vermutet. Von den 19 Proben wurden acht gegenteilig beurteilt, zwei Proben wurden aufgrund ihrer Lage im Grenzbereich nicht beurteilt. Die Fehlerquote erscheint hier nicht zufriedenstellend, ist jedoch auch auf fehlende Referenzprobendaten aus diesem jahreszeitlichen Bereich und noch zu geringer Erfahrung im Auswerteverfahren zurückzuführen. Unter Annahme eines möglicherweise jahreszeitlich bedingten verminderten Grenzwertes der Kenngröße R80geDbI von 138 % wäre nur eine Probe falsch beurteilt worden. Der vermutete Grenzwert ist in der Grafik R80geDbI, Abbildung 24, eingetragen.

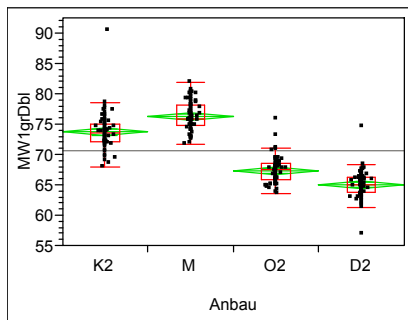
3.2.5.5 Weizen: DOK-Proben

Die jeweils acht Weizenproben aus dem DOK-Anbauversuch Ernte 2007 beziehungsweise Ernte 2009 wurden zur Messung nacheinander mit den über die Farbfilter zur Verfügung stehenden Wellenlängenbereichen Dunkelrot (dr), Rot (r), Hellrot (hr), Gelb (ge), Grün (gr), Blau (bl), UV und Weiß (w) angeregt. Mit dem von J. Strube (Strube & Stolz, 2010) beschriebenen Gelb/Blau-Verhältnis war in den Kurvenabschnitten R40 (R40geDbI, 6,1–10 Sekunden nach Anregung mit Gelb zu diesem Kurvenabschnitt nach Blau) eine Trennung in beiden Anbaujahren nicht möglich.

Zum Vergleich wurden die Weizenmessungen der DOK-Anbaujahre 1999, 2002, 2003, 2004, 2005 und 2006, die mit unterschiedlichen Äquilibrierungsverfahren und Messaufwand in früheren Projekten bereits an dem Gerät gemessen wurden, noch einmal neu zusammengestellt. Die Mittelwerte wurden nicht über Tagesmittelwerte oder Jahresmittelwerte normiert und sind aufgrund zwischenzeitlich geänderter Geräteeinstellungen zum Beispiel bezüglich Helligkeit und Spannungswahl am Fotomultiplier zwischen den Erntejahren nicht dem Absolutwert nach vergleichbar. Lediglich die Lage der Proben eines Erntejahres zueinander (gleiche Messeinstellung) und die Streuung der Messpunkte kann beurteilt werden. Es wurden nur Messdaten mit dem oben angegebenen Fotomultiplier-Typ und Messintervall 100 Millisekunden verwendet. Aus der Zusammenstellung wurde deutlich, dass sich die konventionellen Anbauvarianten in drei von sechs Erntejahren im Parameter R40geDbI signifikant, in den weiteren drei Jahren tendenziell unterscheiden. Die ökologischen Proben hatten ein geringeres Gelb/Blau-Verhältnis.

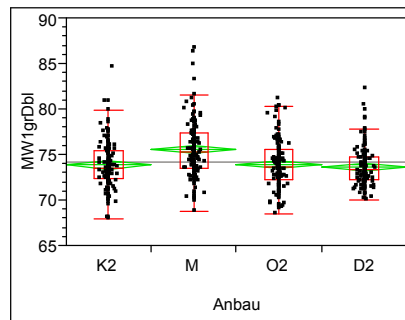
Während der retrospektiven Datenanalyse zeigte sich, dass bei den Untersuchungsreihen dieser Unterschied im vorderen Kurvenbereich Gelb/Blau 0,2 bis 0,3 Sekunden nach der Beleuchtung (Mw1geDbI) und in gleicher Weise auch in dem Verhältnis Grün/Blau (Mw1grDbI) markanter auftrat. Aufgrund der besseren Trennschärfe von Mw1grDbI gegenüber Mw1geDbI und R40geDbI wurde dieses Grün/Blau-Verhältnis zur weiteren Auswertung verwendet. Die grafische Zusammenstellung dieses Verhältnisses Mw1grDbI für die genannten DOK-Anbaujahre ist in Abbildung 25 angegeben.

1999 Sorte: Tamaro



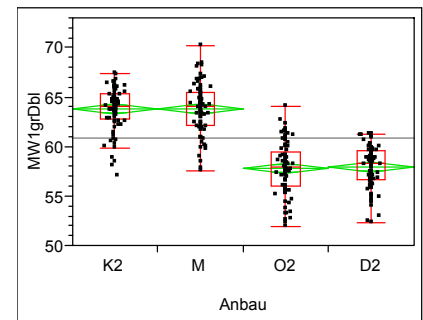
Anbau				Mittel
M	A			76,4
K2		B		73,8
O2			C	67,4
D2			D	65,1

2002 Sorte: Tamaro



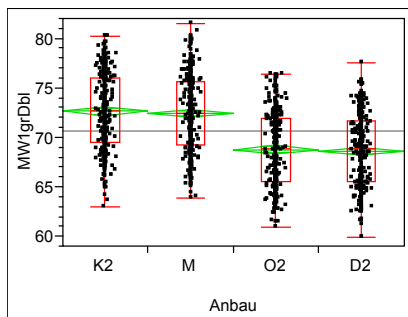
Anbau				Mittel
M	A			75,7
O2		B		73,9
K2		B		73,9
D2		B		73,7

2003 Sorte: Titlis



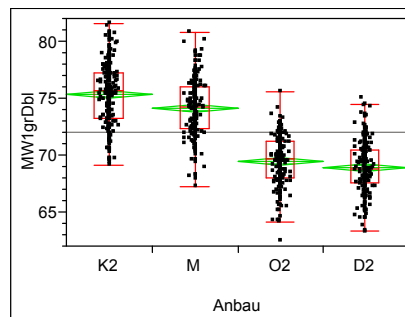
Anbau				Mittel
M	A			63,9
K2	A			63,8
D2		B		58,0
O2		B		57,8

2004 Sorte: Titlis



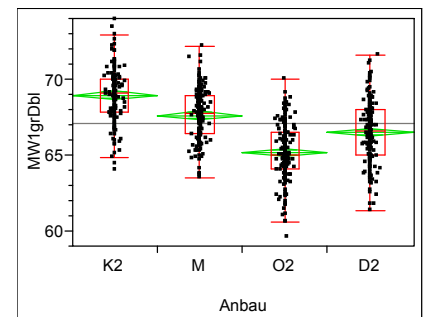
Anbau				Mittel
K2	A			72,7
M	A			72,5
O2		B		68,8
D2		B		68,7

2005 Sorte: Titlis



Anbau				Mittel
K2	A			75,4
M		B		74,2
O2			C	69,5
D2			C	69,0

2006 Sorte: Runal



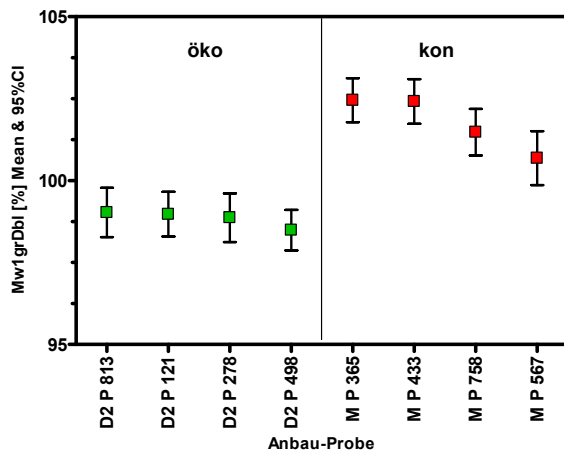
Anbau				Mittel
K2	A			69,0
M		B		67,7
D2			C	66,5
O2			D	65,2

Abbildung 25: Grafische Darstellung von Mw1grDbl in Prozent für Weizen DOK-Feldversuch verschiedener Erntejahre, darunter die jeweiligen Mittelwertvergleiche für alle Paare nach Tukey-Kramer HSD. Verhältnis 0,2 bis 0,3 Sekunden nach Anregung mit Grün zu diesem Kurvenabschnitt nach Blau. Bezeichnung für Anbau: K2 = mineralisch + Mist, M = mineralisch, O2 = organisch, D2 = biologisch-dynamisch

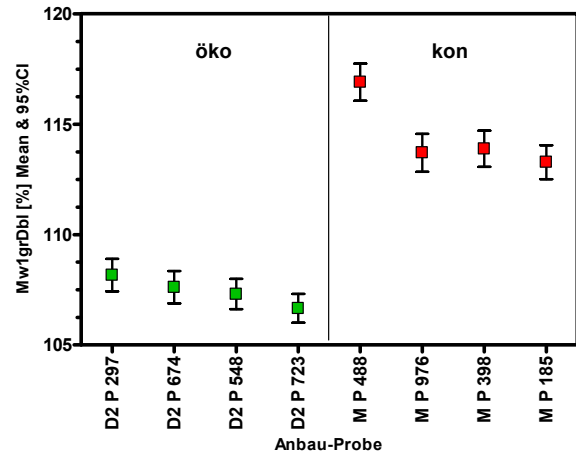
In diesem Parameter waren die konventionellen von den ökologischen Anbauvarianten in fünf von sechs Anbaujahren signifikant trennbar. Der hier untersuchte DOK-Weizen wurde deshalb in diesem kurzfristigen Kurvenbereich Mw1geDbl und Mw1grDbl betrachtet und danach bewertet. Die Bewertung und Prognose wurde im Bericht 1101 W vom 22. Februar 2011 dokumentiert. Die anschließende Decodierung durch den Projektpartner bestätigte die Prognose der Anbaugruppen. Die grafische Darstellung der Verhältnisse Mw1grDbl von den DOK-Weizenproben Ernte 2007 und Ernte 2009 sowie die zugehörigen Mittelwertvergleiche sind in Abbildung 26 zusammengestellt.

Die jeweils zwei Probengruppen wurden korrekt angegeben und dem Anbauverfahren konventionell/mineralisch beziehungsweise biologisch/organisch richtig zugeordnet.

Ernte 2007



Ernte 2009



Anbau-Probe				Mittelwert
M P 365	A			102,5
M P 433	A			102,4
M P 758	A	B		101,5
M P 567		B		100,7
D2 P 813			C	99,0
D2 P 121			C	99,0
D2 P 278			C	98,9
D2 P 498			C	98,5

Anbau-Probe				Mittelwert
M P 488	A			116,9
M P 398		B		113,9
M P 976		B		113,9
M P 185		B		113,3
D2 P 297			C	108,2
D2 P 674			C	107,6
D2 P 548			C	107,3
D2 P 723			C	106,7

Abbildung 26: Mw1grDbl in Prozent (0,2 bis 0,3 Sekunden nach Anregung mit Grün zur Anregung mit Blau), Mittelwert und 95 % Konfidenzintervall von DOK-Weizenproben der Ernte 2007 und 2009. Proben, die nicht durch denselben Buchstaben verbunden sind, unterscheiden sich signifikant. Bezeichnung für Anbau: M = mineralisch (kon), D2 = biologisch-dynamisch (öko)

Außerdem wurde bei den DOK-Weizenproben ein konträres Verhalten der öko/kon-Proben zwischen dem Grün/Blau-Verhältnis und UV/Blau-Verhältnis im vorderen Kurvenabschnitt beobachtet. Das deutet auf eine Verschiebung im „Spektrum nach Anregung“ hin, wie sie bei Strube und Stolz (2004) beschrieben wird. Die Anregung mit nahem UV-Licht ist aufgrund des Spektrums der Halogenlampe und des Materials einiger optischer Bauteile eingeschränkt und konnte bisher noch nicht konstant genutzt werden. Die Eignung von Kurvenverhältnissen mit Anregung nach UV für die Anbautrennung muss noch geprüft werden.

3.2.5.6 Weizen: Referenzproben

Von 20 Öko-Weizenproben Phase 1 (Referenzproben) hatten 16 Proben ein signifikant höheres Verhältnis im Kurvenbereich R40 Gelb/Blau (R40geDbl, 6,1–10 Sekunden nach Anregung mit Gelb) in einer Größenordnung von > 150 %. Eine Öko-Referenzprobe lag innerhalb der 17 konventionellen Proben mit niedrigerem R40geDbl < 130 %, fünf Proben ordneten sich im mittleren Bereich ein. Diese Anordnung entsprach nicht dem bei Strube und Stolz (2010)

beschriebenen niedrigen Gelb/Blau-Verhältnis für Öko-Weizenproben, wie es bei dem DOK-Feldversuch verschiedener Anbaujahre ermittelt wurde.

Zur Trennung der Varianten wurden mit Diskriminanzanalysen weitere Parameter errechnet, die bei der Bewertung der codierten Proben in Phase 2 in Betracht gezogen wurden. Das Verhältnis vom erstem Kurvenmesswert zum Mittelwert des hinteren Kurvenabschnittes (21. bis 100. Messwert [Mw1/R80ge]), ist dabei ein Maß, wie schnell die Kurve nach der Beleuchtung mit Gelb abklingt, und war bei den ökologischen Proben mit höheren R40ge-Werten kleiner als bei den konventionellen Proben. Das Verhältnis R40 nach Anregung mit Hellrot beziehungsweise ohne Filter Weiß (R40hrDw) ist vergleichbar mit R40geDbl.

In der am niedrigsten liegenden Öko-Weizenprobe aus Phase 1 (P 2212) wurde von uns eine geringe Menge (0,003 mg/kg) des Halmverkürzers Chlormequat festgestellt. Dieser Wirkstoff ist im ökologischen Anbau nicht zugelassen und wird üblicherweise nicht in Öko-Proben gefunden. Der Befund gibt Anlass zur Frage, ob dieser als Öko ausgewiesene Weizen tatsächlich als Bioweizen bezeichnet werden kann. Eine weitere chemische Untersuchung von Öko-Proben, die nach der Bewertung mit FAS als konventionelle Proben beurteilt wurden, war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, wäre jedoch zukünftig zu überlegen.

Die 21 Referenzproben aus der Ernte 2010 (Phase 3) hatten mit 17 Öko-Weizenproben ein deutliches Missverhältnis in den Varianten. Einige Öko-Proben waren bei Probeneingang im März 2011 in allgemein schlechtem Zustand mit Käferbefall.

Die Mittelwerte mit Standardfehlern der Kurvenabschnitte R40 nach Anregung mit Gelb (R40ge) und nach Anregung mit Blau (R40bl), aus deren Einzelwerten jeweils das Verhältnis R40geDbl errechnet wird, sind in Abbildung 27 zu den Referenzproben aufgetragen. Es wird deutlich, dass ein großer Anteil an Öko-Proben durch einen wesentlich höheren R40ge-Wert auffällt (> 40 Counts/0,1s), diese Proben haben ein hohes R40geDbl-Verhältnis >150 %.

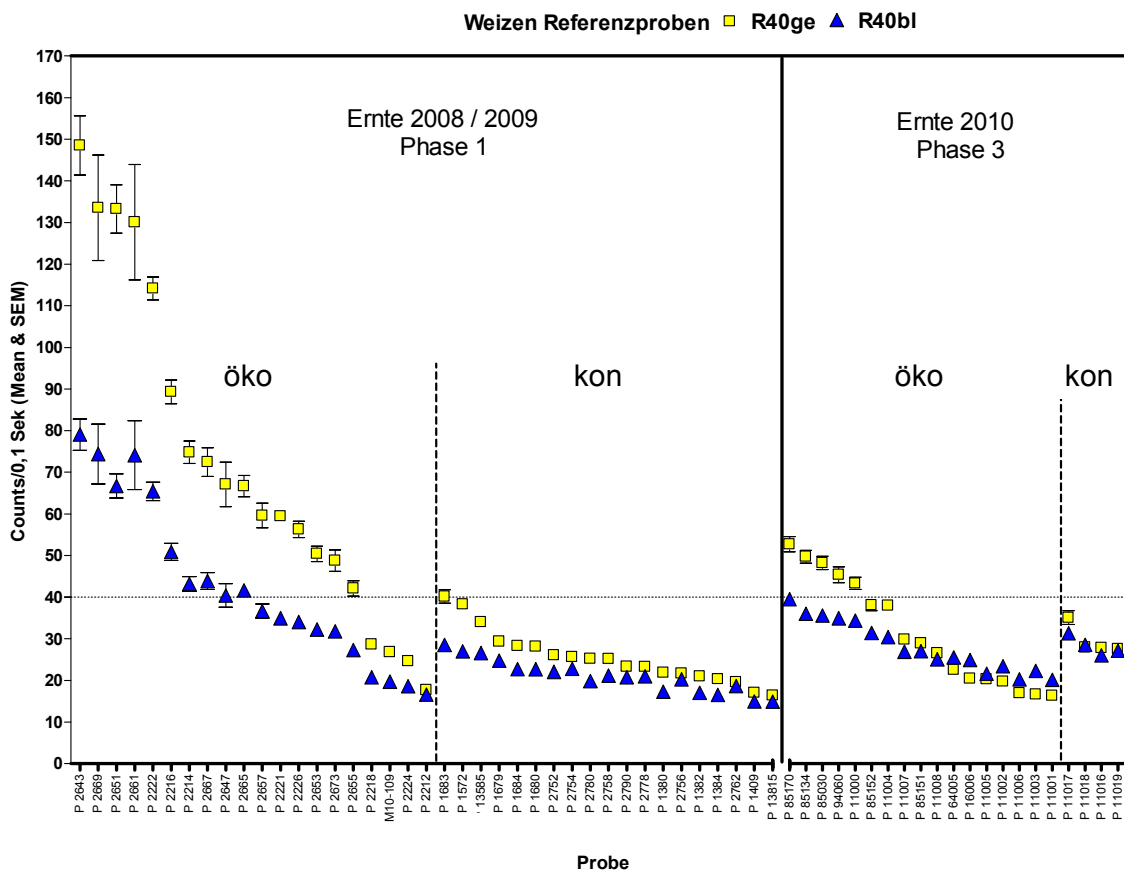


Abbildung 27: R40ge und R40bl in Counts/0,1 Sekunde für Weizen-Referenzproben Ernte 2008 beziehungsweise 2009 (Phase1) und Ernte 2010 (Phase 3), Mittelwerte und Standardfehler

Die kon-Proben zeigen mit niedrigeren R40ge < 40 Counts/0,1 Sekunde noch ein Verhältnis R40ge/DbI > 100 %. Eine Gruppe von Öko-Proben mit ebenfalls niedrigen R40ge < 40 Counts/0,1 Sekunde kann in diesem Parameter von den konventionellen Proben nicht unterschieden werden, eine weitere Gruppe hebt sich mit einem deutlich niedrigen R40ge < 20 Counts/0,1 Sekunde unterhalb des R40bl Wertes liegend mit einem R40ge/DbI < 100 % wieder von den konventionellen Proben ab.

Die Unterteilung der Öko-Weizenproben in verschiedene Gruppen wurde erst bei der Bewertung der codierten Proben aus der Ernte 2010 berücksichtigt, für die Bewertung der verschlüsselten Proben aus der Ernte 2008 beziehungsweise 2009 war das noch nicht der Fall.

Die Proben aus Ernte 2010 mit R40ge < circa 40 Counts/0,1 Sekunde wurden, wie bei der Beurteilung der DOK-Weizenproben, zusätzlich im ersten Kurvenabschnitt Mw1ge/DbI beziehungsweise Mw1gr/DbI betrachtet. Die Anfangswerte der Kurven nach den Beleuchtungsfarben Gelb (Langpassfilter mit > ca. 550 nm) und Grün (Bandpassfilter ca. 500–550 nm) sind nach Grün etwa um den Faktor 6 bis 10 größer, die Lage der Varianten zueinander ist in beiden Verhältnissen Mw1ge/DbI und Mw1gr/DbI gleich.

3.2.5.7 Weizen: codierte Proben

Von 18 codierten Proben aus Ernte 2008 beziehungsweise 2009 (Phase 2) wurden 14 (78 %) korrekt nach den Anbauvarianten unterschieden. Vier Öko-Proben (drei davon Mischproben), wurden als konventionelle Proben beurteilt (zwei davon tendenziell). Da die Beurteilung nur mit R40geDbI und Mw1/R80ge anhand der ermittelten Wertebereiche aus Phase 1 erfolgte, wurden alle Proben mit niedrigerem R40geDbI < circa 140 % den konventionellen Proben zugeordnet. Eine Prüfung dieser Proben am Kurvenbeginn, wie sie für Weizen aus dem DOK-Anbau im Verhältnis Mw1grDbI erfolgte, wurde noch nicht angewandt. Bei einigen der Proben vom 28. Mai 2010 war an dem Tag sichtbar Käferbefall festgestellt worden, zwei davon waren Öko-Proben, die mit kon bewertet wurden.

Bei den 33 codierten Proben aus Ernte 2010 (Phase 4) wurde diese Prüfung durchgeführt. Für zwei Proben konnte keine sichere Aussage zum Anbau getroffen werden. Drei konventionelle Proben wurden tendenziell mit öko, vier Öko-Proben tendenziell mit kon beurteilt, davon war eine Öko-Probe mit konventionellem Saatgut angebaut und zwei Öko-Proben waren Sortenmischungen. 24 Proben (73 %) wurden korrekt beurteilt.

Die grafische Darstellung für alle Ergebnisse der codierten Proben im Parameter R40geDbI [%] ist in Abbildung 28 abgebildet. Für Proben mit R40geDbI < 150 % wird in Abbildung 29 das kurzfristige Verhältnis Mw1grDbI [%] dargestellt. In den Grafiken sind Proben, die gegenteilig beurteilt wurden, mit „falsch bewertet“ angegeben.

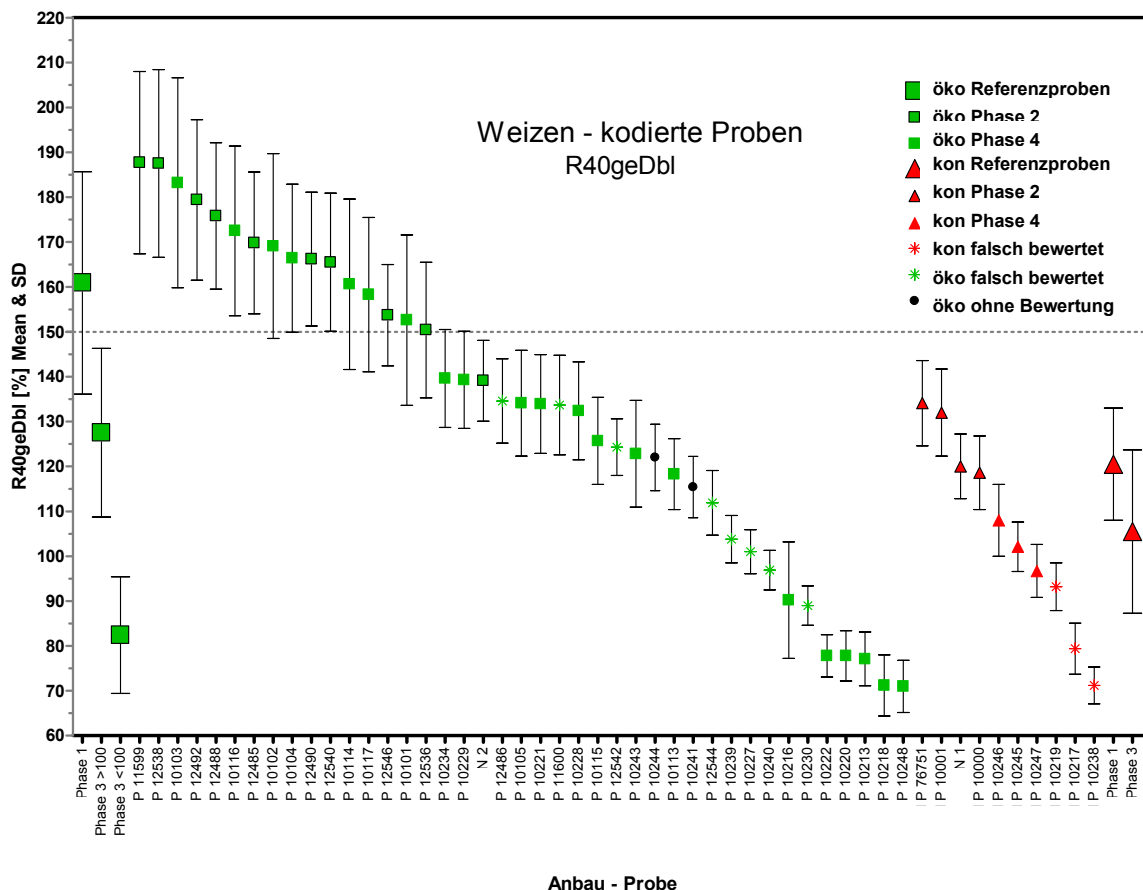


Abbildung 28: R40geDbI [%] Weizen, codierte Proben aus Phase 2 und Phase 4. Mittelwerte mit Standardabweichung in den Anbauvarianten absteigend geordnet, rechts und links die Mittelwerte der Referenzproben aus Phase 1 und Phase 3

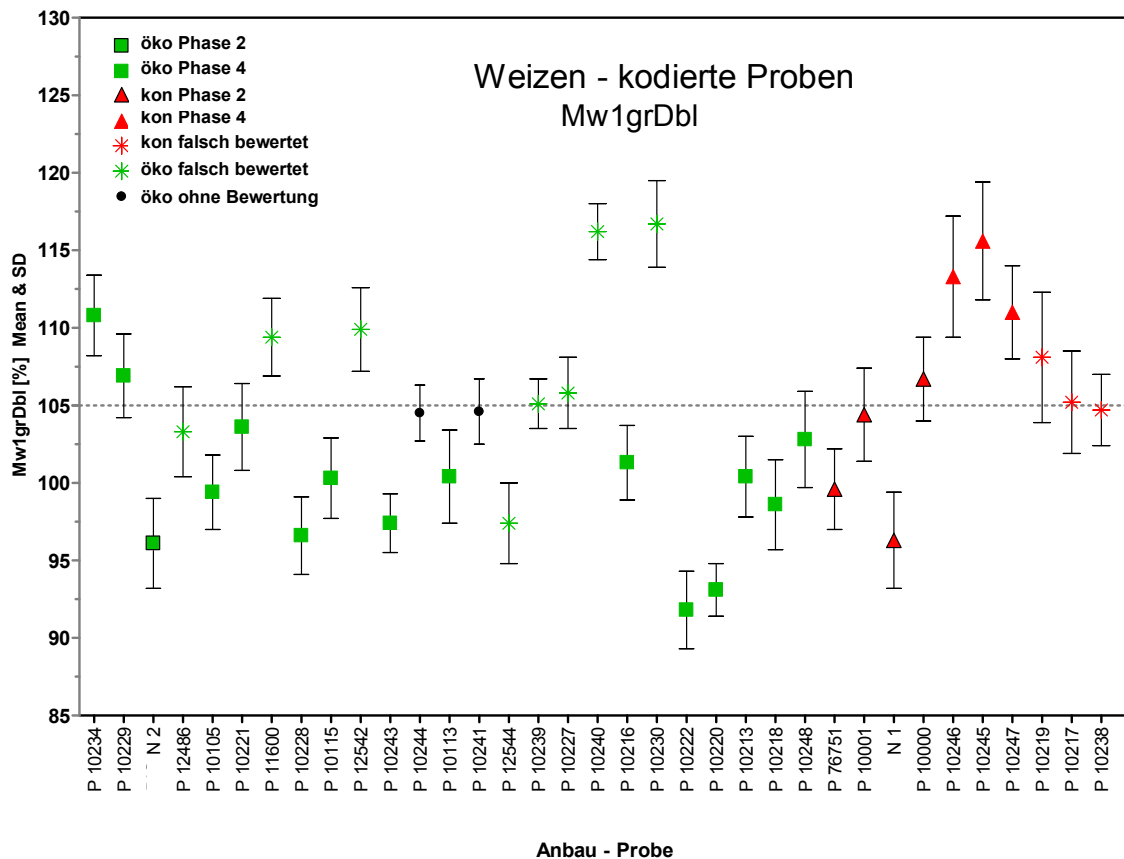


Abbildung 29: Mw1grDbl [%] Weizen, codierte Proben aus Phase 2 und Phase 4 mit R40geDbl < 150 %. Mittelwerte mit Standardabweichung in den Anbauvarianten, Probenreihenfolge wie in Abbildung 28

Mit dem Parameter R40geDbl war eine sichere Trennung von ÖkoProben mit hoher Lichtemission R40ge > 40 Counts/0,1 Sekunde nach Anregung mit Gelb möglich. Öko-Proben mit R40geDbl < 150 % sind in diesem Parameter nicht alle signifikant verschieden von den konventionellen Proben. Für diese Öko-Proben wird ein niedriges Verhältnis Mw1grDbl erwartet. Zur Bewertung wurden die Ergebnisse des zweiten Fotomultipliers und der Parameter Mw1/R80ge hinzugezogen.

Zum Vergleich mit der IRMS wurden die Ergebnisse in eine einfache Bewertungsskala umgesetzt. Dafür wurde Weizen mit R40geDbl > 160 % mit +1 = öko bewertet und < 90 % wiederum 0,8 = öko. Der Zwischenbereich wurde abgestuft, wobei der Bereich um 125 bis 130 % als Grenzbereich mit 0 und zwischen 95 und 125 negativ kon vergeben wurde. Für Mw1grDbl wurden die Proben mit R40geDbl < 150 % abgestuft mit: > 105 negativer Wert = kon, < 105 positiver Wert = öko. Analog wurde für Mw1/R80ge der mittlere Bereich um 350 bis 500 negativ mit kon vergeben. Alle verfügbaren Ergebnisse führten zur Endbewertung.

Nach diesem Bewertungssystem sind im Moment nur eindeutig Öko-Proben bestimmbar (+1), für die Bewertung von konventionellen Proben bleibt immer ein Unsicherheitsfaktor und die Bewertung mit -1 ist nicht möglich.

Das Verhältnis Mw1grDbl war zur Anbautrennung der codierten Proben für sich allein nicht ausreichend, wie das bei DOK-Weizen der Fall ist. Untersuchungen an Weizen aus einem anderen Feldversuch konnten belegen, dass zwischen organisch gedüngten und mineralisch gedüngten Proben anhand Mw1grDbl nur optimal differenziert werden kann, wenn die

Lichtverhältnisse während des Wachstums gleich gut sind und die Stickstoffversorgung etwa vergleichbar.

3.2.5.8 Weizen: Keim- und Lagertest

Von den Weizenproben wurden bei Probeneingang jeweils 100 Gramm in einer Plastikschele eingefroren (ca. $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$) und gelagert. Aus diesen Lagerproben wurden 57 Proben (Phase 1 und Phase 2) nach etwa einem Jahr wieder aufgetaut und in jeweils drei Teilmengen erneut getrocknet und gemessen. Der Vergleich zwischen dem Ergebnis der Originalprobe und der Lagerprobe ist für R40geDbI [%] in Abbildung 30 grafisch dargestellt. Nach der Lagerzeit von circa einem Jahr bei $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ waren die Proben noch sehr gut nach dem Anbau differenzierbar. Durchschnittlich wurden in R40geDbI 97 % für Mw1grDbI 100 % des vor der Lagerzeit gemessenen Verhältnswertes ermittelt.

Nach Lagerung von einem Jahr bei $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ waren die Weizenproben mit der FAS-Bewertung ebenso differenzierbar wie bei der Untersuchung nach Probeneingang.

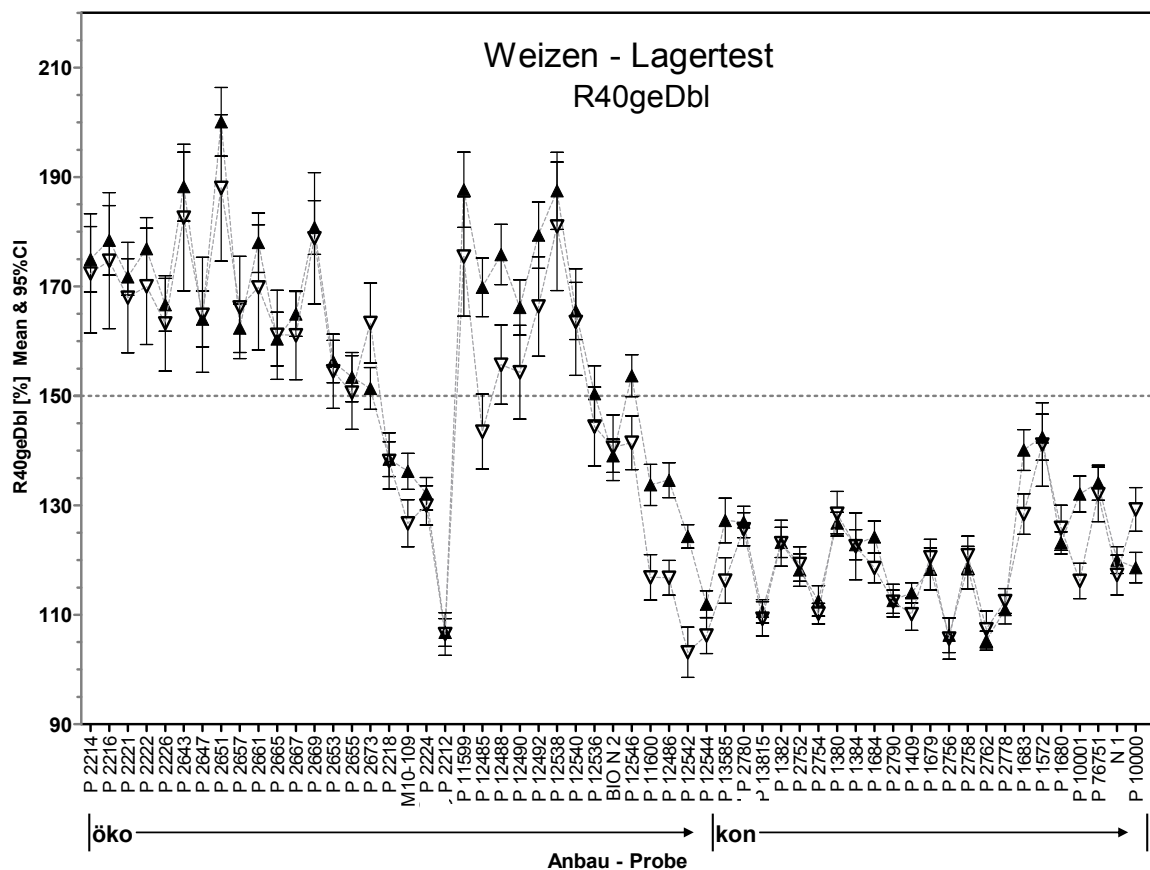


Abbildung 30: R40geDbI [%] Weizen aus Phase 1 und Phase 2, ▲ = original, ▽ = circa ein Jahr gefroren gelagert, Mittelwerte & 95 % Konfidenzintervall

Mit acht ausgewählten Weizenproben (öko P 2212, öko P 2222, öko P 2651, öko P 12492, kon P 1572, kon P 2756, kon P 13815, kon N1) wurde ein Keimversuch durchgeführt. Parallel wurden jeweils zwei Teilmengen der aus der Originalprobe äquilibrierten und gemessenen Probe (OrigProb) und jeweils zwei Teilmengen der aufgetauten, äquilibrierten und gemessenen

Probe (LagerProb) verwendet. Somit ergaben sich für jede der gewählten Proben vier Keimschalen à 100 Weizenkörner, jeweils zwei original-getrocknete und zwei aus dem Lagertest. Nach sechs Tagen war bei fünf Proben (öko P 2212, öko P 2222, kon P 2756, kon P 13815, kon N1) zwischen den Schalen der OrigProb und der LagerProb kein Unterschied feststellbar, die Keimlinge waren 5 bis 7 Zentimeter groß.

Bei einer Probe (öko P 2651) trat ein Unterschied zwischen den Schalen der OrigProb und der LagerProb auf, jedoch war das Keimverhalten allgemein schlechter. Eine Probe (kon P 1572) war mit nur 30 % gut gekeimten Körnern mit einer Keimlingshöhe von 2 bis 4 Zentimeter und weiteren 30 % beginnender Keimung deutlich im Verzug. Eine Probe (öko P 12492) war mit jeweils nur zwei bis fünf kleinen Keimlingen sehr schlecht keimfähig.

Die Ursache für das schlechte Keimverhalten der Probe (öko P12492), welche sich auch im Lagertest noch deutlich als Öko-Probe darstellte, ist unklar. Hier kann nur durch weitere Untersuchungen geklärt werden, ob die Bewertung der FAS eine Keimfähigkeit einschließt.

Der Keimtest zeigt, dass die Proben nach dem Trockenprozess zur Messung mit der FAS und auch mit eingebundener Lagerung bei -26 °C im Allgemeinen nach dem Untersuchungsverlauf noch keimfähig sind.

3.2.5.9 Weizen: Praxistest

Die Praxistauglichkeit des Verfahrens wurde insofern geprüft, dass der Projektpartner 15 Proben aus der Referenzprobenreihe Phase 3 noch ein zweites Mal in die Probenreihe der codierten Proben (Phase 4) integrierte. Etwa ein Drittel dieser Proben lag im Grenzbereich der Bewertungsgrößen. Von den 15 Proben waren nach der Bewertungsskala fünf Proben vollkommen identisch bewertet worden, bei weiteren sechs Proben war durch das empirische Bewertungsverfahren lediglich ein Unterschied von $\pm 0,1$ beziehungsweise $\pm 0,2$ entstanden. Davon war eine Probe in Phase 3 mit 0,2 öko bewertet und in Phase 4 nicht bewertet, zwei weitere öko-Proben in Phase 3 mit 0 und in Phase 4 mit konventioneller Tendenz ($-0,2$) beziehungsweise ökologischer Tendenz ($+0,2$) angegeben worden.

Zwei Proben wurden mit einer tendenziellen Bewertung zur Anbauvariante immer noch richtig erkannt. Eine als Referenzprobe öko nach der Bewertungsskala mit 0,8 bewertete Probe wurde in Phase 4 tendenziell als konventionelle Probe mit $-0,2$ angesehen und eine konventionelle Probe (vorher $-0,5$) wurde mit tendenziell öko bewertet. Für diese „Doppelproben“ werden in Abbildung 31 die Kenngrößen $R40geDbl$ [%] und $Mw1/R80ge$ mit Mittelwerten & 95 % Konfidenzintervall abgebildet.

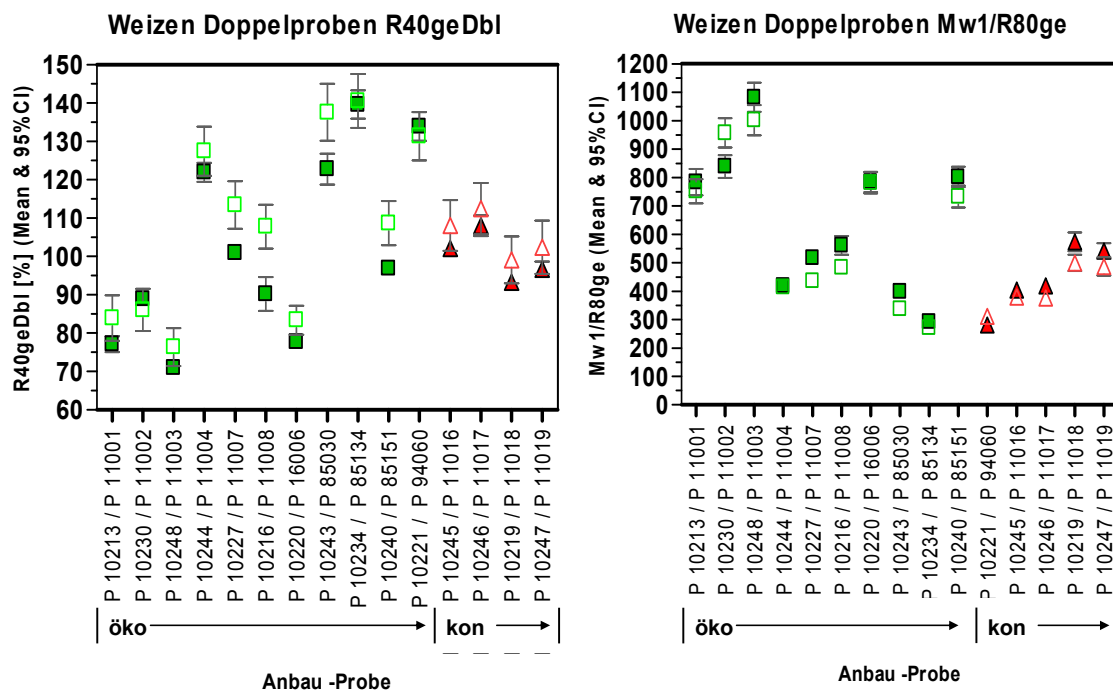


Abbildung 31: R40geDbI [%] Weizen-Doppelproben, Mittelwerte & 95 % Konfidenzintervall.

■ = öko Phase 4, □ = öko Phase 3, ▲ = kon Phase 4, △ = kon Phase 3

Die Ergebnisse aus Phase 3 waren bei diesen Proben in Phase 4 unter Beachtung der vorliegenden Probenstreuungen gut reproduzierbar. Die Angaben aus der Bewertungsskala machen deutlich, dass dieses empirische Bewertungsverfahren über mehrere Messgrößen noch stabilisiert werden kann.

3.2.6 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit bestätigt und verbessert die Möglichkeit der Differenzierung von Hühnereiern nach der unterschiedlichen Haltung und Fütterung der Legehennen durch Messung der Dotter-Lumineszenzen nach Lichtanregung. Die Arbeit schließt sich damit an Untersuchungen von Köhler (2001) und Egerer (2009) an. Die Anregung wurde mit drei verschiedenen Wellenlängenbereichen durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass die Anregung mit gelbem Licht (Filter OG530) mit der Anregung ohne Filter (weißes Licht) vergleichbar ist und dass ein Verhältniswert R80geDbI zur zusätzlichen Bewertung sinnvoll ist. Die genaue Angabe von Zahlenwerten ist für ein kalibriertes Messgerät möglich und fördert die Transparenz der Bewertung. Die Zahlenangaben sind jedoch gerätespezifisch und vermutlich geringfügig jahreszeitenabhängig.

Das Verfahren kann zur Prüfung von Hühnereiern verwendet und gegebenenfalls im Messablauf verkürzt werden. Bei regelmäßigen Untersuchungen und dem weiteren Aufbau von Datenbanken mit Referenzproben in verschiedenen Jahreszeitbereichen wird sich die Bewertung vereinfachen. Zudem wird bei Vorliegen eines ausreichend großen repräsentativen

Querschnitts deutlich werden, wie hoch der Anteil an Öko Proben im Grenzbereich tatsächlich ist. Zurückliegende Untersuchungen konnten für Bio-Eidotter bestimmter Erzeugerverbände bemerkenswert höhere Dotter-Lumineszenzen von $R40w > 100$ Counts/Sekunde feststellen, was diese von konventionellen Proben deutlich (Faktor bei $R40w > 2$) unterscheidet. Nach dem Praxistest ist noch keine abschließende Aussage zur Erfolgsquote der Beurteilung der Anbauvarianten von Hühnereierproben mit der FAS möglich. Im Blindversuch wurden 94 % der Proben richtig eingeschätzt. Gegebenenfalls wäre eine Kombination mit einem weiteren Verfahren, vornehmlich bei Proben im Grenzbereich, zu überlegen.

Das Verfahren der FAS ist umwelt- und ressourcenschonend, zudem relativ einfach zu handhaben. Denkbar wären ein Einsatz zum Beispiel in Ökokontrollstellen oder im Handel zur Prüfung von Biolieferanten zur regelmäßigen Überwachung und die anschließende Prüfung von Gründen, wenn auffällig geringe Lumineszenzen gemessen werden.

Bei entsprechender Akzeptanz der Methode ist die Herstellung eines vereinfachten Messgerätes speziell zur Untersuchung von Eiern denkbar. Da keine aufwendige Probenvorbereitung nötig ist, könnte die Messung gegebenenfalls vor Ort geschehen.

Die Ursachen für die unterschiedlichen Dotter-Lumineszenzen sind noch nicht ausreichend erforscht. Das Verfahren kann im Moment hauptsächlich durch kontinuierliche Messung von dokumentierten Proben als Standardproben und Proben aus dem Überwachungsbereich zur Analyse weiterentwickelt werden. Eine Einbindung des Verfahrens in wissenschaftlich betreute Versuche in der Legehennenzucht könnte zu einer wesentlichen Unterstützung der Ursachenerforschung beitragen und aufbauend auf die Arbeit von Köhler (2001) weitere Einflussgrößen spezifizieren.

Die Differenzierung von Weizen mit der FAS hinsichtlich der Anbauvarianten wurde im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt. Mit insgesamt 130 Weizenproben, darunter 13 Sortenmischungen, wurde erstmals eine größere Probenanzahl unter vergleichbaren Bedingungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, anhand von Referenzprobandaten unbekannte Proben mit einer Erfolgsquote von circa 80 % zu klassifizieren.

Die Ergebnisse verbinden verschiedene Aussagen aus der Literatur. Öko-Weizenproben zeigen eine höhere Lumineszenz nach Anregung mit Licht, das wurde am Messparameter $R40ge$ für eine Gruppe Öko-Proben dargestellt. Im kurzfristigen Bereich, am Anfang der Abklingkurve, ist dieser Unterschied stärker von vergleichbaren Wachstumsbedingungen der Pflanzen (Licht) abhängig. Diese Probengruppe hat nach höheren Anregungswellenlängen (Rot, Gelb) vielfach im gesamten Kurvenverlauf nach Anregung (bis zehn Sekunden) höhere Lumineszenz als die konventionellen Proben. Bei diesem Weizen mit sehr hoher Lumineszenz konnten die nachfolgenden Aussagen zum geringeren Gelb/Blau-Verhältnis im hier gemessenen $R40$ -Zeitbereich (6,1–10 Sekunden im Kurvenverlauf nach Anregung) nicht bestätigt beziehungsweise noch nicht bestätigt werden.

Öko-Weizenproben haben „ein geringeres Gelb/Blau-Verhältnis“ (Meier-Ploeger et al., 2003) in $R40$ als konventionelle Proben; das wurde für eine weitere Gruppe Öko-Proben nachgewiesen und konnte für Weizen aus verschiedenen früheren Anbaujahren des DOK-Versuchs zur Trennung verwendet werden. Für solche Öko-Proben mit niedrigem $R40ge_{dbl}$ wurde eine höhere Lumineszenz im kurzfristigen Kurvenbereich $Mw1w$ (nach Weiß) beschrieben (Strube & Stolz, 2007), was für Weizen unter gleicher Licht- und vergleichbarer Nährstoffversorgung zutrifft und für diese Arbeit nicht zur Trennung genügte. Diese Probengruppe hat ein geringeres Gelb/Blau-Verhältnis und, wie in dieser Arbeit angewandt, geringeres Grün/Blau-Verhältnis im kurzfristigen Bereich ($Mw1$).

Zur Trennung von Weizen „spielen nicht so sehr die absoluten Werte der Biophotonen-Größen sondern die Werte-Verhältnisse“ (Zeiger & Popp, 1997) eine Rolle; das wurde hier anhand von R40geDbl, Mw1grDbl und Mw1/R80ge dargestellt und zur Trennung nach den Anbauvarianten öko oder kon genutzt.

Mit diesem Verfahren kann ein großer Teil der Öko-Weizenproben signifikant von den Kon-Weizenproben differenziert werden.

Öko-Proben zeigen größere Variabilität in den Kurvenverläufen nach Lichtanregung, während Kurven der konventionellen Proben in einem nicht variablen Bereich bleiben. Ob diese Charakteristik sortenabhängig ist, ist noch zu prüfen. Einige Sorten (Impression, Cubus, Tommi) wurden hier ausschließlich von konventionellen Erzeugern angebaut, andere Sorten (Achat, Capo, Romanus) ausschließlich von ökologischen Erzeugern. Öko-Proben traten zum Beispiel in der Sorte Capo mit hoher Lumineszenz $R40ge > 40$ beziehungsweise hohem $R40geDbl$ und gleichfalls mit niedrigem Verhältnis $R40geDbl < 100 \%$ auf.

Die Ergebnisse bieten eine Grundlage für die Untersuchung und Beurteilung von Weizen und weiteren Getreidearten bezüglich der Trennung nach den Anbauverfahren.

Die FAS hat die Möglichkeit, unzerstörte Proben anhand ihres unterschiedlichen Verhaltens in Bezug auf Licht zu untersuchen, und führt damit ganzheitlich angelegte Betrachtungen an der Struktur der Probe durch. Dieser Untersuchungsansatz könnte für Ökoweizenproduzenten und Biohändler, die eine möglichst einfache Überprüfung für ihre Weizenprodukte wünschen und sich mit dem Ergebnis gegenüber den konventionellen Proben abgrenzen wollen, genutzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Trockenprozess bereits verkürzt, erscheint mit einem Zeitraum von etwa vier bis sechs Wochen bis zum Untersuchungsergebnis jedoch immer noch optimierbar. Die Anwendung von Trockenkammern statt Exsikkator ist zu überlegen.

Weiterführende Untersuchungen an dokumentiertem Probenmaterial und gerätetechnische Verbesserungen sind anzustreben.

3.2.7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Eine Gegenüberstellung der geplanten zu den tatsächlich erreichten Aufgaben ist in Tabelle 10 angegeben. Die geplanten Ziele wurden erreicht.

Für eine Verbesserung der Trennschärfe wird in beiden Produktgruppen noch Potenzial gesehen.

Tabelle 10: Geplante Arbeiten und tatsächlich erreichte Ziele im Projektteil Weiterentwicklung der FAS

Geplante Arbeiten	Tatsächlich erreichte Ziele
Festlegung von wichtigen ökologischen Leitprodukten für die Untersuchung und den Aufbau von authentischen Lieferanten über die Projektteilnehmer	Festlegung von zwei Leitprodukten: Weizen und Hühnereiern. Damit war eine größere Probenanzahl innerhalb der Probenart möglich. Die ursprünglich geplante Anzahl von insgesamt circa 100 Proben konnte mit 133 Weizenproben und 86 Hühnereierproben nicht nur erreicht, sondern übertroffen werden. Die zum Teil schwierige Probenbeschaffung von authentischen Lieferanten, sichtbar an verhältnismäßig wenig Weizen-Referenzproben aus konventionellem Anbau der Ernte 2010, wurde vom Projektpartner FiBL sehr gut koordiniert.
Aufbau produktspezifischer Datensätze, die eine statistische Differenzierung von ökologischen und konventionellen Produkten mittels FAS erlaubt. Einbeziehung von Leitprodukten aus der Evaluierung aus den Bereichen Agrarprodukte und tierische Produkte	Aufbau einer Datenbank für die FAS- Messdaten von Weizen, mit unter anderem Weizen aus dem DOK-Versuch verschiedener Anbaujahre. Aufbau einer Datenbank mit FAS- Messdaten von Hühnereiern aus abgeschlossenen Untersuchungen und Verknüpfung mit zusätzlichen Angaben zu den Proben, sofern vorhanden. Alle im Projekt gemessenen Datensätze für Weizen und Hühnereier wurden in eine Access Datenbank eingepflegt. Eine Verknüpfung mit den weiteren Angaben aus den Begleitfragebögen wurde ermöglicht. Die statistische Auswertung erfolgte unter anderem im Programm jmp mit Varianzanalyse (ANOVA) und Mittelwertvergleichen nach Tukey- Kramer HSD Test $\alpha = 0.05$.
Ausarbeitung statistisch signifikanter Kenngrößen zur Unterscheidung	Für Hühnereier wurden die Kenngrößen R40w [Counts/Sek], R80ge [Counts/Sek] und R80geDbI [%] zur Unterscheidung der Anbauvarianten statistisch ermittelt und an codierten Proben getestet. Für Weizen konnte mit den statistisch bestimmten Kenngrößen R40geDbI [%], Mw1grDbI [%] und Mw1/R80ge die Trennung von ökologischem und konventionellem Weizen jeweils in bestimmten Bereichen dargestellt werden.
Herstellung der Praxistauglichkeit des Verfahrens zur Herkunftsunterscheidung an Leitprodukten	Die Praxistauglichkeit des Verfahrens wurde bei Hühnereiern getestet. Die Untersuchung von Hühnereiern ist zeitnah möglich. Die Bewertung der Probenreihe war zunächst nicht zufriedenstellend, bei rückwirkender Fehleranalyse gut ausgefallen. Es sind noch weitere Referenzprobenreihen in anderen Jahreszeiträumen notwendig, um neben aktuellen Kennwerten auch die Erfahrungsgrundlage zur korrekten Bewertung zu verbessern. Die Praxistauglichkeit bei Weizenproben wurde insofern getestet, dass der Projektpartner 15 Proben aus der Referenzprobenreihe Phase 3 noch ein zweites Mal in die Probenreihe der codierten Proben Phase 4 mit integrierte. Etwa ein Drittel dieser Proben war mit der Lage in Grenzbereichen der Kenngrößen in beiden Phasen schwierig beziehungsweise nicht zu differenzieren. Die restlichen zwei Drittel konnten sicher dem Anbauverfahren zugeordnet werden. Anhand eines Lagertests und eines Keimversuches wurden Untersuchungen zu praxisrelevanten Fragen wie Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nach Probenaufbewahrung und Veränderungen am Untersuchungsgut durchgeführt.

3.2.8 Kurze Zusammenfassung des Arbeitsblocks und der wichtigsten Ergebnisse

Im Rahmen dieses Projektes wurden mit der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie (FAS) 82 Proben Hühnereier und 130 Proben Weizen nach ihrer Herkunft aus ökologischer (öko) oder konventioneller (kon) Erzeugung untersucht.

Die FAS ist ein physikalisch-optisches Verfahren, wobei Proben mit Licht verschiedener Wellenlänge angeregt und anschließend das von der Probe zurückgestrahlte Licht in einem bestimmten Zeitbereich gemessen wird.

Anhand von Referenzprobenmessungen wurden für Hühnereier die Bewertungskenngrößen R40w (Mittelwert Zeitbereich 61 bis 100 Sekunden nach Anregung), R80ge (Mittelwert 21 bis 100 Sekunden nach Anregung) und R80geDbI (Gelb/Blau-Verhältnis im R80-Zeitbereich) zur öko- beziehungsweise kon-Trennung statistisch ermittelt. Es wurde dargestellt, dass es möglich ist, in diesen Kenngrößen Grenzwerte zur Differenzierung anzugeben.

Mit dem beschriebenen Verfahren wurden circa 90 % der codierten Proben korrekt beurteilt. Ein Praxistest verlief vermutlich aufgrund nicht beachteter Verschiebungen der Grenzbereiche durch veränderten Jahreszeitenraum auf den ersten Blick nicht zufriedenstellend.

Mit zwei Weizen-Referenzprobenserien und der statistischen Analyse über Ergebnisse aus Untersuchungen von Weizen verschiedener Anbaujahre des DOK-Anbauversuchs wurden die Kenngrößen R40geDbI (Gelb/Blau-Verhältnis 6,1 bis 10 Sekunden nach Anregung), Mw1grDbI (Grün/Blau-Verhältnis 0,2 bis 0,3 Sekunden nach Anregung) und Mw1/R80ge (Verhältnis vom ersten zum mittleren hinteren Kurvenabschnitt nach Anregung mit Gelb) zur Trennung öko beziehungsweise kon bestimmt. Mit einem hier dargestellten Bewertungsverfahren war es möglich, circa 80 % der codierten Proben korrekt zu klassifizieren.

Weizenproben aus dem DOK-Anbauverfahren 2007 und 2009 wurde mit den Kenngrößen korrekt den Anbauvarianten zugeordnet.

Der Weizen war nach dem Untersuchungsverfahren in einem Test noch keimfähig und konnte auch nach einjähriger Lagerung bei -26 °C mit der Methode differenziert werden.

Die Analyse der Ergebnisse verdeutlichte, dass verschiedentlich noch Untersuchungsbedarf besteht und eine Verbesserung der Trennschärfe und Verkürzung des zeitlichen Aufwandes durch Weiterentwicklung des Verfahrens noch erreicht werden könnte.

Die Methode kann zur Bewertung von Hühnereiern hinsichtlich öko-kon bereits unter Einsatz von authentischen Referenzproben eingesetzt werden.

3.3 Weiterentwicklung von Profiling-Techniken: Metabolom

Tabelle 11: Übersicht der Arbeitsschritte beim Metabolom-Profiling

Arbeitsschritt	2009				2010				2011				2012			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
GC-MS Analytik, cv. Runal, Ernte 2007	A	X	X	X	X	X	E	S. 86								
GC-MS Analytik, 10 Sorten, Ernte 2007		A	X	X	X	X	X	X	E	S. 89 - 90						
GC-MS Analytik, cv. Runal, Ernte 2009						A	X	X	X	X	E	S. 91 - 92				
GC-MS Analytik, cv. Runal, Ernte 2010									A	X	X	E	S. 91 - 92			
3 Jahresvergleich cv. Runal, GC-MS Daten										A	X	E	S. 91 - 92			
Maschinelle Klassifikation/Blindversuch									A	X	X	E	S. 93			
Beschreibung der Arbeit i. d. Projektverlängerung													A	X	E	S. 93
HPLC-MS Analytik auf Sekundärmetabolite						A	X	X	E	S. 100						

3.3.1 Methodenbeschreibung: Profiling-Techniken

Zur Unterscheidung zwischen ökologisch und konventionell angebauten Pflanzen ist die analytische Bestimmung einzelner Inhaltsstoffe ein Ansatzpunkt, der aber aus konzeptionellen Gründen nur ein verhältnismäßig kleines Spektrum der möglichen Änderungen erfassen kann. Ein weiterer Nachteil der Analytik auf einzelne Inhaltsstoffe besteht darin, dass abgeschätzt werden muss, bei welcher Substanz möglicherweise Konzentrationsunterschiede auftreten könnten. Die Auswahl der untersuchten Substanzen ist bei Analytik von einzelnen Inhaltsstoffen also nicht neutral. Eine Reihe von relativ neuen methodischen Konzepten, die die oben beschriebenen Nachteile der gezielten Analytik auf einzelne Inhaltsstoffe weitgehend überwinden, wird mit dem Begriff „Profiling-Techniken“ bezeichnet. Grundsätzlich ermöglichen die Profiling-Techniken die Erfassung der gesamten Bandbreite der Substanzen auf den Ebenen der Ribonukleinsäuren (mRNA), der Proteine und auch der Stoffwechselmetabolite. Der betrachteten Substanzklasse entsprechend werden die methodischen Konzepte mit den Begriffen Transcriptomics, Proteomics und Metabolomics umschrieben. Ein wesentliches Charakteristikum der Profiling-Techniken ist also, dass in einem Analysengang die Konzentrationen einer großen Zahl von Substanzen weitgehend ohne „parteiische“ Vorauswahl bestimmt werden können. Somit erhöht sich bei Einsatz der Profiling-Techniken die Chance, Unterschiede in ökologisch und konventionell angebauten Pflanzen zu detektieren.

Die Arbeiten im Rahmen dieses Forschungsprojekts wurden fokussiert auf eine Auswahl von Profiling-Techniken, die geeignet sind, das Metabolom und das Proteom zu analysieren. Im weiteren Verlauf dieses Kapitels werden die grundsätzlichen methodischen Schritte der eingesetzten Profiling-Techniken beschrieben und erläutert.

Metabolom-Profilung mit Gaschromatografie-Massenspektroskopie

Unter Gaschromatografie-Massenspektroskopie (GC-MS) ist die Verbindung eines Gaschromatografen mit einem Massenspektrometer zu verstehen. Die zu untersuchenden Proben werden zuerst zerkleinert (beziehungsweise geschrotet) und homogenisiert. Anschließend erfolgt die Probenaufbereitung, bei der die enzymatische Aktivität der biologischen Proben möglichst rasch gestoppt werden muss (z. B. durch Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und Gefriertrocknung). Danach erfolgt die eigentliche Extraktion der Metabolite mit organischen Lösungsmitteln und gegebenenfalls Hitzeeinwirkung. Um eine möglichst große Zahl an Metaboliten der GC-MS-Analytik zugänglich zu machen, müssen die hydrophilen funktionellen Gruppen der Metabolite chemisch maskiert, das heißt derivatisiert werden. Damit werden die Flüchtigkeit und die thermische Stabilität der Metabolite erhöht. Im Anschluss daran wird das derivatisierte Metabolitengemisch im Gaschromatografen aufgetrennt. Die einzelnen Verbindungen wandern bei hoher Temperatur mit unterschiedlichen Retentionszeiten durch eine Kapillarsäule. Die Geschwindigkeit, mit der eine Substanz die Kapillarsäule durchquert, ist charakteristisch für diese Substanz und hängt von den Arbeitsbedingungen der Gaschromatografie ab. Die nacheinander auftretenden Derivate werden anschließend im Massenspektrometer ionisiert. Durch den Ionisierungsprozess entstehen für jede Substanz Zerfallprodukte mit einer bestimmten Molekularmasse und Ladung. Diese ionisierten Fragmente werden durch Ionenfallen, Quadrupolanalysatoren oder Flugzeitanalysatoren der Masse nach aufgetrennt. Im Analysator werden ihre Massenspektren gemessen und rechnergestützt aufgezeichnet. Für die Identifizierung der Metabolite werden ihre Massenspektren mit denen von gleichfalls per GC-MS vermessenen Standardsubstanzen oder mit bekannten Substanzen in Metaboliten-Datenbanken (z. B. NIST Database, Golm Metabolom Database) verglichen. Die Quantifizierung der Metaboliten erfolgt automatisch mit spezieller Software mittels Integration der gemessenen Peaks der Massenspektren. Die Datenauswertung zur Detektion von Unterschieden in ökologischen und konventionellen Proben wird mit verschiedenen, rechnergestützten Statistikwerkzeugen durchgeführt.

Protein-Profilung mit zweidimensionaler Gelelektrophorese

Die Proben werden zerkleinert beziehungsweise geschrotet. Aus der geschroteten Probe werden die Proteine extrahiert. Dieser Proteinextrakt wird von unerwünschten Verbindungen gereinigt, welche die Auftrennung der Proteine in der zweidimensionalen Gelelektrophorese stören könnten. Für die Proteinauftrennung in der ersten Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese wird der gereinigte Proteinextrakt einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) unterzogen. In der IEF werden die Proteine aus dem zu untersuchenden Extrakt auf der Basis ihrer Ladungseigenschaften in einem pH-Gradientengel aufgetrennt: durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandert jedes Protein im pH-Gradientengel zu seinem charakteristischen isoelektrischen Punkt, bei dem das betreffende Protein keine Nettoladung besitzt. In einem zweiten Schritt werden die Proteine, welche in der IEF nach ihrem isoelektrischen Punkt sortiert wurden, senkrecht zur ersten Dimension in einer zweiten Elektrophorese, der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), nach ihrer Größe aufgetrennt. Das 2D-Gel wird anschließend digital fotografiert und mithilfe eines Bildauswertungsprogramms ausgewertet. Dabei werden die 2D-Gelreplikate zu virtuellen 2D-Mittelwertgelen verarbeitet. Auf Basis der 2D-Mittelwertgele wird dann ein Vergleich des relativen Gehalts jedes einzelnen Proteins mithilfe von Statistikwerkzeugen durchgeführt. Für die Identifikation der Proteine aus den 2D-Gelen werden diese zuerst zu Peptiden verdaut, welche anschließend in einem Matrix-

unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometer (MALDI-TOF-MS/MS) analysiert werden. Die experimentell erhaltenen Spektren der Peptidmassen werden genutzt, um mithilfe von spezieller Software in öffentlich zugänglichen Datenbanken letztlich die Proteinidentifizierung vorzunehmen.

3.3.2 Planung und Ablauf

Es wurden zwei verschiedene Weizenkontingente des sehr gut kontrollierten DOK-Feldversuchs aus der Nähe von Basel/Schweiz verwendet (Mäder et al., 2006). Das erste Probenkontingent bestand aus der Weizensorte Runal, von der Material der Ernten 2007, 2009 und 2010 jeweils aus einer ökologischen und einer konventionellen Anbauvariante analysiert wurde. Das zweite Probenkontingent bestand aus insgesamt zehn verschiedenen Weizensorten, die gleichfalls im DOK-Feldversuch unter ökologischen und konventionellen Bedingungen angezogen wurden (Hildermann et al., 2009). Es handelt sich um eine Mischung von Sorten verschiedenster europäischer Herkunft (Deutschland, Schweiz, Frankreich, Österreich, Großbritannien) und verschiedener Züchtungszeitpunkte (von 1840 bis zur Gegenwart). Dieses Probenkontingent ist für die Fragestellung dieses Projekts besonders interessant, da dessen Analyse eine Einschätzung der natürlichen Schwankungsbreite von Metabolit- und Protein-Profilen in Weizen unterschiedlicher genetischer Ausstattung erlaubt. Für diese Untersuchungen stand Material von einem Erntejahr zur Verfügung.

Von allen Weizenproben des DOK-Versuchs wurden Metabolit-Profile für Stoffwechselprodukte des Primärstoffwechsels erstellt. Dazu wurden sämtliche Proben nach Derivatisierung mit Gaschromatografie und Massenspektrometrie (GC-MS) untersucht. Von insgesamt zehn Weizenproben aus der landwirtschaftlichen Praxis, deren Anbauart zunächst verschlüsselt worden war, wurden gleichfalls Metabolit-Profile des Primärstoffwechsels erstellt. Diese Proben wurden von den Projektpartnern ebenfalls mit den Methoden IRMS und FAS analysiert.

Die innerhalb der ursprünglichen Projektlaufzeit mit den Metabolit-Profiling-Methoden erzielten Ergebnisse lieferten Erfolg versprechende Ansatzpunkte für die analytische Unterscheidbarkeit von ökologischem und konventionellem Weizen. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde vom Projektträger, der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), ein Antrag auf Verlängerung und Aufstockung des Arbeitsblocks bis zum 31. August 2012 genehmigt. In der Verlängerungsphase wurden von 8 Weizensorten aus dem DOK-Versuch des Erntejahres 2010 und von 109 verblindeten ökologischen und konventionellen Weizenproben aus der landwirtschaftlichen Praxis Metabolit-Profile mit GC-MS aufgenommen.

3.3.3 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Vor dem Hintergrund von zunehmend anonymisiertem, globalisiertem Lebensmittelhandel und einer Reihe von Lebensmittelskandalen in den letzten Jahren werden vielfältige Anstrengungen unternommen, Methoden zur analytischen Rückverfolgbarkeit sowie zum Nachweis der Authentizität zu entwickeln und zu verbessern (Carcea et al., 2009).

Eine Reihe von methodischen Konzepten, die es erlauben, den Stoffwechsel umfassend zu analysieren, wird mit dem Begriff „Profiling-Techniken“ bezeichnet. Grundsätzlich ermöglichen die Profiling-Techniken die Erfassung der gesamten Bandbreite des Stoffwechsels auf den Ebenen der mRNA (Transcripte), der Proteine und auch der Stoffwechselmetabolite. Der betrachteten Stoffklasse entsprechend werden die Methoden mit den Begriffen Transcriptomics,

Proteomics und Metabolomics umschrieben. Die Metabolomanalytik hat sich zum Ziel gesetzt, alle nicht polymeren Metabolite einer Zelle zu erfassen (Fiehn, 2002). Aufgrund der hohen Diversität der zu untersuchenden Stoffe wie Zucker, Carbonsäuren, Aminosäuren, Nukleotide, Lipide, Hormone, sekundäre Stoffwechselprodukte und Xenobiotika bietet sich die Metabolomanalyse besonders als „Profiling-Methode“ an (Kopka et al., 2004). Zur Analyse dieser komplexen Substanzgemische werden Kombinationen aus verschiedenen Trenntechniken und Strukturinformation gebenden Nachweistechiken eingesetzt. Mithilfe der gut etablierten Gaschromatografie-Massenspektrometrie (GC-MS-Analytik) können einige hundert Analyten getrennt, quantifiziert und zum Teil identifiziert werden. Eine Cluster- und PCA-Analyse der innerhalb des Projekts quantifizierten Metabolite wird zeigen, ob eine Gruppierung der Extrakte, basierend auf ihren verschiedenen Anbaubedingungen, möglich ist.

Die Anwendung von Profiling-Methoden zur Charakterisierung und zum Teil auch Unterscheidung von Pflanzen aus unterschiedlichen, experimentellen Anbausystemen wurde in jüngster Zeit auf der Basis von Transcriptom- (Lu et al., 2005), Metabolom- (Zörb et al., 2006) und Proteomanalysen (Lehesranta et al., 2007, Zörb et al., 2009) beschrieben. Damit ein Einsatz dieser Methoden letztlich auch in der Praxis sinnvoll ist, muss zunächst die natürliche Schwankungsbreite der Metabolite und Proteine im Weizen ermittelt werden. Dazu ist die Untersuchung von Weizen aus mehreren Anbaujahren, von verschiedenen Weizensorten und auch von verschiedenen Anbaustandorten erforderlich. Insbesondere der Fragestellung der Anbaujahre und der verschiedenen Weizensorten wird in dieser Arbeit nachgegangen.

3.3.4 Material und Methoden

Probenmaterial

Sämtliche Weizenproben stammen aus dem DOK-Feldversuch in der Schweiz. Das Probenmaterial wurde freundlicherweise vom Forschungsinstitut für biologischen Landbau, (Schweiz) und von der Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon (Schweiz) zur Verfügung gestellt. Nähere Informationen zu dem seit 1978 bestehenden Feldversuch sind Mäder et al. (2002, 2006) zu entnehmen. Neben der Sorte Runal, die als Langzeitversuch aus den Ernten der Jahre 2007, 2009 und 2010 vorliegt, stehen aus dem Erntejahr 2007 weitere zehn Sorten und aus dem Erntejahr 2010 weitere acht Sorten zur Verfügung (Tabelle 12), die sich in Bezug auf das Zulassungsjahr, den Züchtungsort (geografische Verteilung innerhalb der EU) und die Züchtungsart (konventionell oder ökologisch) unterscheiden (Hildermann et al., 2009).

Jede der Sorten wurde in verschiedenen Anbausystemen kultiviert. Aus den Erntejahren 2007 und 2009 stehen Weizenproben der Sorten aus konventionellem und ökologischem (hier biologisch-dynamischem) Anbau sowie aus einer ungedüngten Nullvariante zur Verfügung. Aus dem Erntejahr 2010 wurden zusätzlich Proben aus einer weiteren ökologischen Anbauvariante (biologisch-organisch) analysiert. Aus jeder Kultivierungsart lagen Proben in vier Feldwiederholungen als biologische Replikate vor. Weiterhin wurden anfänglich zehn und in der Projektverlängerungsphase zusätzlich 109 Weizenproben aus der landwirtschaftlichen Praxis von zunächst unbekannter Herkunft, organisiert im Rahmen des Verbundprojekts, als „Blindproben“ analysiert.

Tabelle 12: Übersicht der verschiedenen Sorten aus dem DOK-Feldversuch.

In Klammern sind Jahr und Land, in dem die Sorte zugelassen wurde, aufgeführt. Im Erntejahr 2007 standen sämtliche Sorten zur Verfügung, im Erntejahr 2010 standen außer Mont Calme 245 und DJ 9714 sämtliche Sorten zur Verfügung.

Alte Sorten	Ökologische Züchtungen	Konventionelle Züchtungen
Rouge de Bordeaux (1840, FR)	CCP (Composite Cross Population, GB, kein Eintrag)	DJ 9714 (kein Eintrag, FR)
Mont Calme 245 (1926, CH)	Scaro (2006, CH)	Antonius (2003, AT)
Probus (1948, CH)	Sandomir (kein Eintrag, DE)	Caphorn (2001, FR)
		Titlis (1996, CH)

Reinigung und Grundcharakterisierung des Getreides

Unter Besatz werden Verunreinigungen des Getreides verstanden, die nicht zum einwandfreien Grundgetreide zählen. Der Besatz wurde mithilfe einer Getreidereinigungsmaschine (Labofix, Schmidt-Seeger, Beilngries, Deutschland) und per Hand aussortiert. Der Anteil des Besatzes lag bei allen Weizensorten zwischen 0 und 3 %. Im Hinblick auf die Profiling-Experimente ist die Entfernung von Besatz aus den Weizenproben sehr wichtig, da eine mögliche Kontamination mit Besatz mit hoher Wahrscheinlichkeit zu Änderungen der Metabolit- und Protein-Profile führen würde. Zur Grundcharakterisierung des Getreides wurden die Parameter Tausendkorngewicht und Rohproteingehalt nach der Methode von Dumas bestimmt.

Metabolit-Profilung

Das Metabolit-Profilung wurde mithilfe der Gaschromatografie und der Massenspektrometrie (GC-MS) durchgeführt, wie bereits durch Zörb et al. (2006) beschrieben. Die GC-MS-Analyse umfasst die Probenvorbereitung (Homogenisierung, Zerkleinerung, Versetzen mit internen Standards, Derivatisierung), die eigentliche Messung der Metabolite in der GC-MS (Trace-GC Ultra Gaschromatograf mit einem angeschlossenen ITQ 900 Ionenfallen-Massenspektrometer, beides ThermoFinnigan) und die Datenauswertung mithilfe verschiedener Software, einschließlich X-Calibur, der webbasierten Software-Plattform MeltDB (Neuweger et al., 2008) und der Statistik-Software R (R Development Core Team, 2008).

3.3.5 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Für die Analyse der Metabolite mittels Gaschromatografie-Massenspektrometrie (GC-MS) wurden vermahlene Weizenkörner aus insgesamt elf verschiedenen Weizensorten untersucht. Analysiert wurden Proben aus konventionellem und ökologischem Anbau. Für jede Weizensorte standen Proben aus beiden Anbauarten in jeweils vier Feldwiederholungen zur Verfügung, jede Probe wurde in Doppelbestimmung analysiert.

Tabelle 13: Identifizierte Metabolite in der Weizensorte Runal aus dem Erntejahr 2007. Die Identifizierung erfolgte durch den Vergleich von Retentionszeit (RT), Retentions Index (RI), dem Massenspektrum vermessener Standardsubstanzen und Datenbankvergleich (NIST, GolmDB). Ribitol diente als interner Standard (IS). Dunkler unterlegte Metabolite zeigen nach dem Student-t-Test einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen den Anbauarten ($p \leq 0.05$).

Aminosäuren (22)		Zucker (7)	Zuckeralkohole (4)	Organische Säuren (10)	Andere (5)
Aminoadiphat (260)	Hydroxyprolin (230)	Arabinose (307)	Mannitol (217)	Zitronensäure (257)	Adenosin (236)
4-Aminobutanoat (304)	Isoleucin (158)	Fructose (307)	<i>myo</i> -Inositol (305)	Fumarsäure (245)	Ethanolamin (174)
α -Alanin (116)	Leucin (158)	Galactose (319)	<i>myo</i> -Inositol-P (318)	Glycerinsäure (189)	Glycerol-3-P (357)
β -Alanin (248)	Lysin (204)	Glucose (319)	Ribitol (IS)	2-Hydroxyglutarsäure (203)	Shikimisäure (204)
Arginin (157)	Methionin (176)	Melibiose (361)		Isozitronensäure (245)	Harnstoff (189)
Asparagin (188)	Phenylalanin (192)	Saccharose (361)		Äpfelsäure (245)	
Aspartat (232)	Prolin (142)	Trehalose (361)		Maleinsäure (245)	
Citrullin (348/142)	Serin (204)			2-Methylcitrat (287)	
Glutamat (154)	Threonin (101)			α -Ketoglutarsäure (198)	
Glycin (174)	Tryptophan (202)			Bernsteinsäure (247)	
Homoserin (218)	Valin (144)				

Einzelne Sorten, exemplarische Ergebnisdarstellung für die Sorte Runal

Für die Sorte Runal konnten 48 Metabolite mithilfe von Datenbanken (NIST, GolmDB) sowie vermessener Standardsubstanzen identifiziert werden (Tabelle 13). Aufgeteilt in fünf Untergruppen wurden 22 Aminosäuren, sieben Zucker, vier Zuckeralkohole, zehn organische Säuren und fünf andere Metabolite identifiziert. Zusätzlich konnten 245 nicht identifizierte Metabolite (TAGs) detektiert werden.

Die Hauptkomponentenanalyse (engl.: Principle Component Analysis, kurz PCA) zeigt eine Gruppierung der Proben nach der jeweiligen Anbauart (Abbildung 32), was auf einen Unterschied der Metabolitkonzentrationen in den Proben aus ökologischem und konventionellem Anbau

hinweist. Eine Separierung der Proben nach ihrer Anbauart wurde für die identifizierten Metabolite in fünf von zehn Sorten und für die TAGs in allen zehn Sorten gefunden (ohne Abbildung).

Um Aufschluss darüber zu erlangen, welche Metabolite in der Weizensorte Runal Konzentrationsunterschiede zwischen den Anbauarten aufweisen, und dadurch eine Separierung der Proben nach der Kultivierungsform zu ermöglichen, sowie zur Überprüfung der Signifikanz wurde ein Student-t-Test durchgeführt. Nach dieser Analyse zeigten zehn der identifizierten Metabolite (dunkel hervorgehoben in Tabelle 13) signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den Anbauarten.

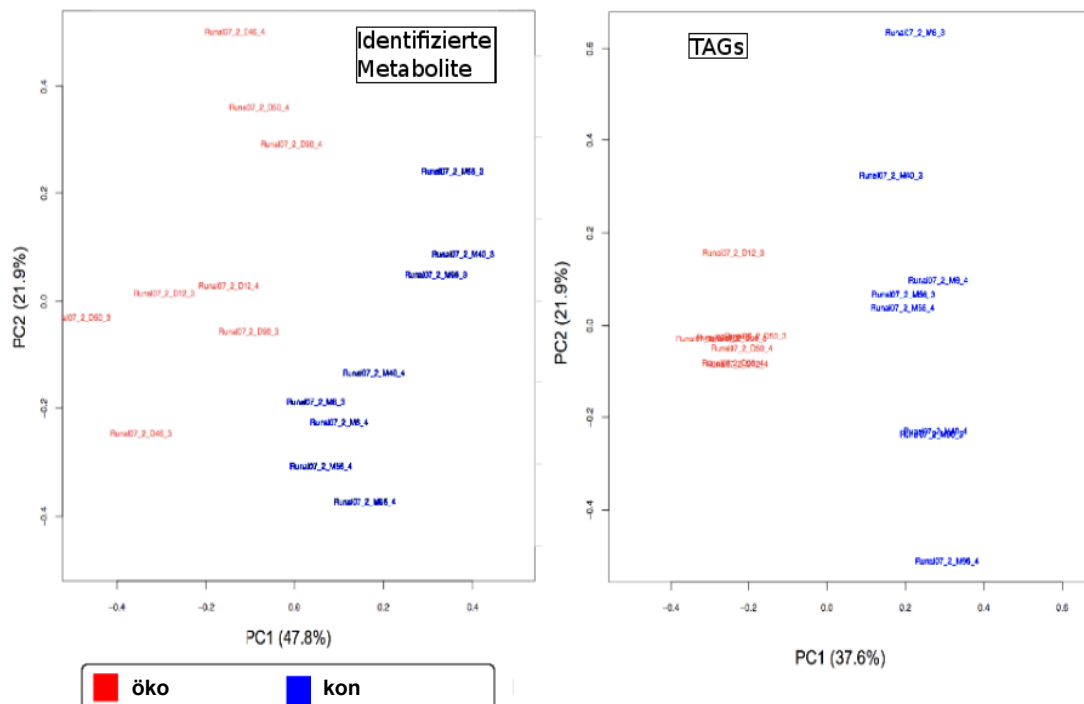


Abbildung 32: Hauptkomponentenanalyse (PCA) des Metabolit-Profiles der Weizensorte Runal aus dem Erntejahr 2007. Nah beieinander liegende Probenbezeichnungen stehen für Proben mit sehr ähnlichen Metabolitzusammensetzungen. Links: identifizierte Metabolite. Rechts: nicht identifizierte Metabolite (TAGs). Rot: Proben aus ökologischer Anbauart. Blau: Proben aus konventioneller Anbauart. In beiden Fällen ist eine deutliche Gruppierung der Proben nach der jeweiligen Anbauart zu erkennen.

3.3.5.1 Datenauswertung über alle elf Weizensorten

Weizenprodukte aus der Praxis bestehen in der Regel aus einer Mischung verschiedener Weizensorten. Aus diesem Grunde sind Metabolite, die über alle Sorten hinweg einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen den Anbauarten zeigen, von besonderem Interesse. In einem gesonderten Experiment wurden die Ergebnisse der Messungen aller einzelnen Sorten zusammengefasst und analysiert. Der Student-t-Test zeigt einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen den Anbauarten bei den fünf Metaboliten myo-Inositol, Tryptophan, Adenosin, Alanin und 4-Aminobutanoat (Abbildung 33).

In Abbildung 33 wird ein deutlicher Einfluss der verschiedenen Sorten auf die Metabolitkonzentration erkennbar. Die Mittelwerte der Metabolitkonzentrationen der Proben aus ökologischer und konventioneller Produktion weisen einen signifikanten Unterschied auf, jedoch zeigen sich zum Teil erhebliche absolute Konzentrationsschwankungen im Vergleich verschiedener Sorten. Eine Grenzwertsetzung für einzelne Metabolite, die eine Charakterisierung der Probe in „ökologisch“ beziehungsweise „konventionell“ über verschiedene Sorten hinweg erlaubt, ist aufgrund dieser Schwankungen nicht realisierbar. Wichtig ist in diesem Zusammenhang jedoch die generelle Tendenz, dass einige Metabolite, nämlich Adenosin und die Aminosäuren Tryptophan, Alanin und 4-Aminobutanoat, grundsätzlich höhere Werte in den Proben aus konventionellem Anbau zeigen und die Werte für myo-Inositol grundsätzlich in Proben aus ökologischem Anbau erhöht sind. Auch in Mais konnte diese Tendenz für myo-Inositol nachgewiesen werden (Röhlig und Engel, 2010).

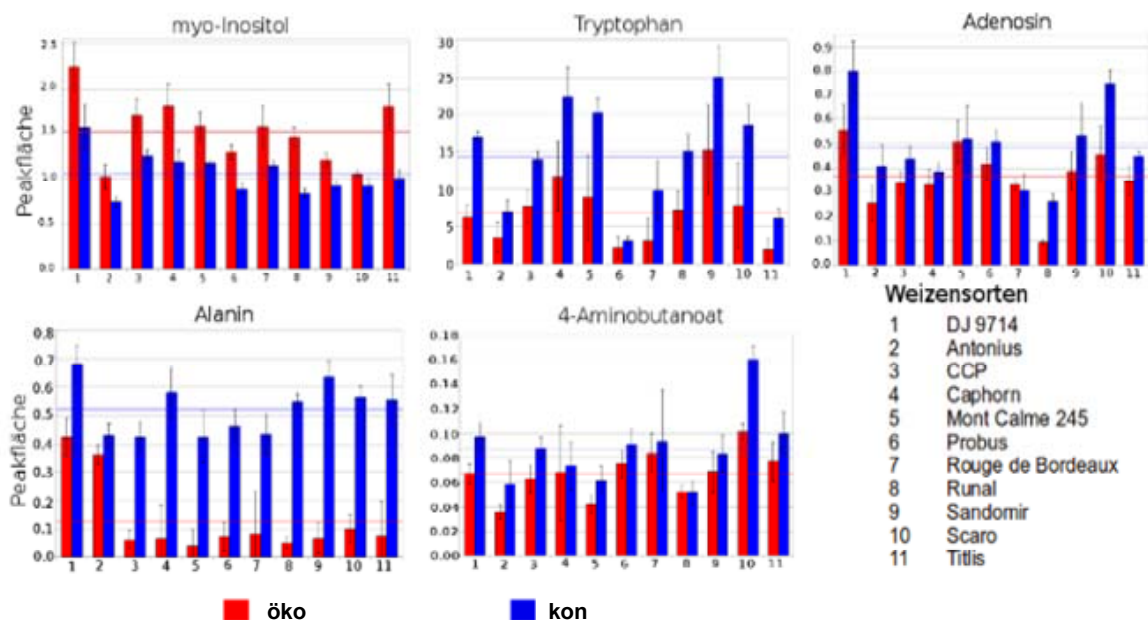


Abbildung 33: Metabolite mit signifikant unterschiedlichen Konzentrationen zwischen den Anbauformen über alle Weizensorten hinweg. Blau: konventionell-mineralisch. Rot: biologisch-dynamisch. Rote und blaue Querbalken in den Diagrammen zeigen den Durchschnittswert.

Neben den identifizierten Metaboliten wurde überprüft, ob es TAGs gibt, die ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den Anbauarten aufweisen. Nach der Überprüfung der Signifikanz mittels des Student-t-Tests zeigen elf TAGs signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen ökologischer und konventioneller Anbauart.

Tabelle 14: Nicht identifizierte Metabolite (TAGs), die nach dem Student-t-Test ($p \leq 0.05$) über alle analysierten Weizensorten hinweg einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen konventioneller und ökologischer Anbauart aufweisen.

Metabolit	Retentionszeit	Typische Masse	p-Wert
TAG 1	2484.5 s	324 m/z	0.00000
TAG 2	1124.5 s	174 m/z	0.00000
TAG 3	1587.0 s	209 m/z	0.00000
TAG 4	2060.7 s	159 m/z	0.00000
TAG 5	2011.9 s	186 m/z	0.00000
TAG 6	2689.2 s	268 m/z	0.00000
TAG 7	1219.3 s	156 m/z	0.00002
TAG 8	2147.4 s	414 m/z	0.00003
TAG 9	1676.6 s	333 m/z	0.00008
TAG 10	2618.5 s	411 m/z	0.00035
TAG 11	1789.4 s	279 m/z	0.00068

Exemplarisch wurden für die ersten sechs dieser signifikanten TAGs die Konzentrationen in den einzelnen Sorten präsentiert (Abbildung 34). Auch hier werden die zum Teil erheblichen Konzentrationsschwankungen der Metabolite zwischen den einzelnen Sorten deutlich. Vier der sechs Metabolite zeigen höhere Konzentrationen in den Proben aus ökologischer Produktion. Alle Metabolite zeigen aber auch hier die generelle Tendenz: sie weisen in einer der beiden Anbaumethoden konsequent über alle Sorten hinweg erhöhte Werte auf.

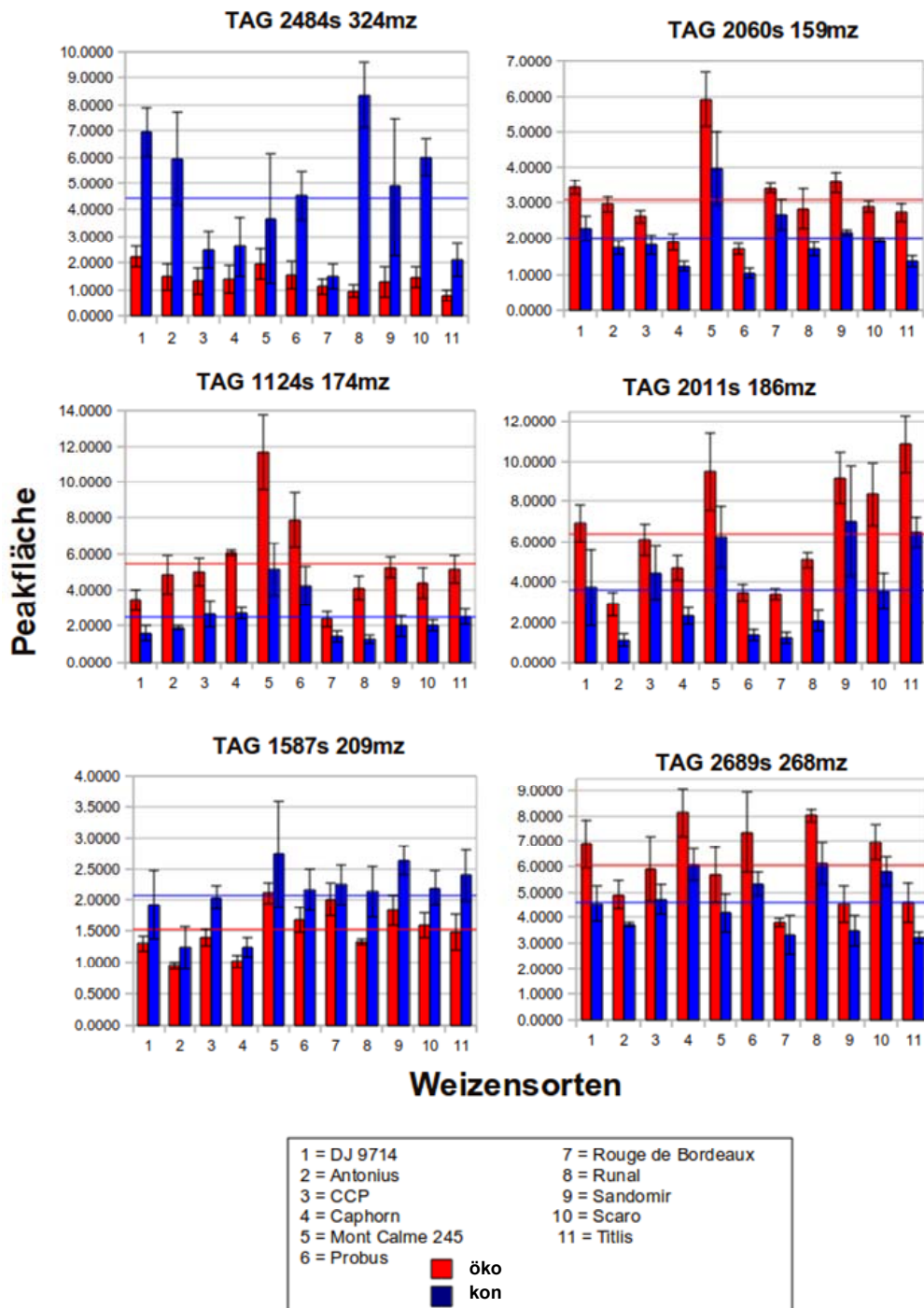


Abbildung 34: Nicht identifizierte Metabolite (TAGs), die über alle Sorten hinweg einen signifikanten Unterschied in der Konzentration zwischen ökologischer und konventioneller Anbauart zeigen. Blau: konventionell. Rot: ökologisch. Blaue beziehungsweise rote Querbalken geben den jeweiligen Mittelwert aller Proben wieder.

3.3.5.2 Jahresvergleich der Weizensorte Runal

Ein Vergleich der Sorte Runal über drei Anbaujahre sollte Aufschluss über einen saisonalen Einfluss auf das Metabolom geben. Die Proben aus dem Erntejahr 2007 wurden hierzu ein zweites Mal analysiert. Diese Wiederholungsmessung in unmittelbarer zeitlicher Nähe zu den

Proben aus den Erntejahren 2009 und 2010 wurde durchgeführt, um gerätetechnisch bedingte Unterschiede in den Ergebnissen zu minimieren. Aufgrund technischer Neuerungen der Auswertungssoftware war es möglich für den Jahresvergleich verbesserte Analysemethoden anzuwenden. Die auftretenden Unterschiede zwischen den beiden Messungen der Sorte Runal aus dem Erntejahr 2007 können neben möglichen gerätetechnisch bedingten Schwankungen auch hierdurch zu erklären sein (Abbildung 35).

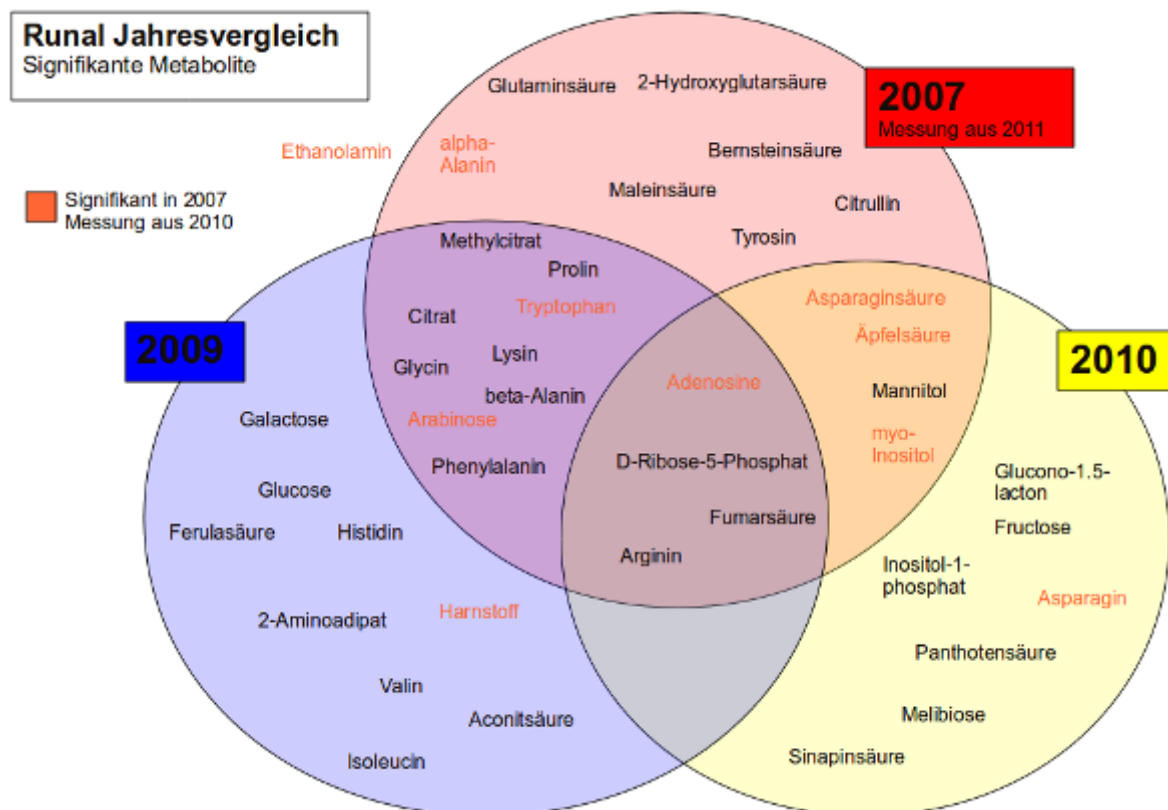


Abbildung 35: Jahresvergleich der Metabolite mit signifikanten Konzentrationsunterschieden in Weizenproben der Sorte Runal aus konventioneller und ökologischer Anbauart. Für den Jahresvergleich wurden die Proben aus den drei Jahrgängen in zeitlicher Nähe (in 2011) vermessen, um gerätetechnische Einflüsse auf die Ergebnisse zu minimieren. Zusätzlich war die Runalernte 2007 im Zusammenhang mit dem Sortenversuch im Jahr 2010 analysiert worden. Metabolite, die in der Messung von 2010 signifikante Unterschiede zwischen den Anbauarten zeigen, sind in der Abbildung orange dargestellt.

Um Erkenntnis darüber zu erlangen, welche Metabolite in den einzelnen Jahrgängen signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den Anbauarten aufweisen, wurde der Student-t-Test als Signifikanztest angewendet. Danach zeigten 24 Metabolite im Jahr 2007 einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen den Anbauarten. Im Jahr 2009 waren es ebenfalls 24 Metabolite, 2010 waren es 15 Metabolite. Die vier Metabolite Adenosin, Fumarat, Arginin und D-Ribose-5-Phosphat zeigten in allen drei Jahrgängen signifikante Unterschiede (Abbildung 35). Die erste Analyse des Erntejahres 2007 hatte zehn signifikant verschiedene Metabolite ergeben (siehe „Einzelne Sorten, exemplarische Ergebnisdarstellung für die Sorte Runal“), von denen im zweiten Analysengang wiederum sieben Metabolite als signifikant identifiziert wurden. Die geringere Anzahl an signifikant verschiedenen Metaboliten im ersten Analysengang ist zum großen Teil darauf zurückzuführen, dass in diesem

Analysengang die betreffenden Metabolite unterhalb der Nachweisgrenze lagen und damit in keiner der beiden Anbauarten detektiert wurden.

In allen drei Jahrgängen wurden zusätzlich zu den Proben aus ökologischem (biologisch-dynamisch) und konventionellem Anbau eine ungedüngte Variante als Nullvariante und aus der Ernte 2010 zusätzliche Proben aus ökologischer Anbauart (organisch-biologisch) analysiert. In allen drei Jahrgängen gruppieren sich die Proben in der PCA entsprechend der konventionellen, ökologischen und ungedüngten Anbauart (Abbildung 36).

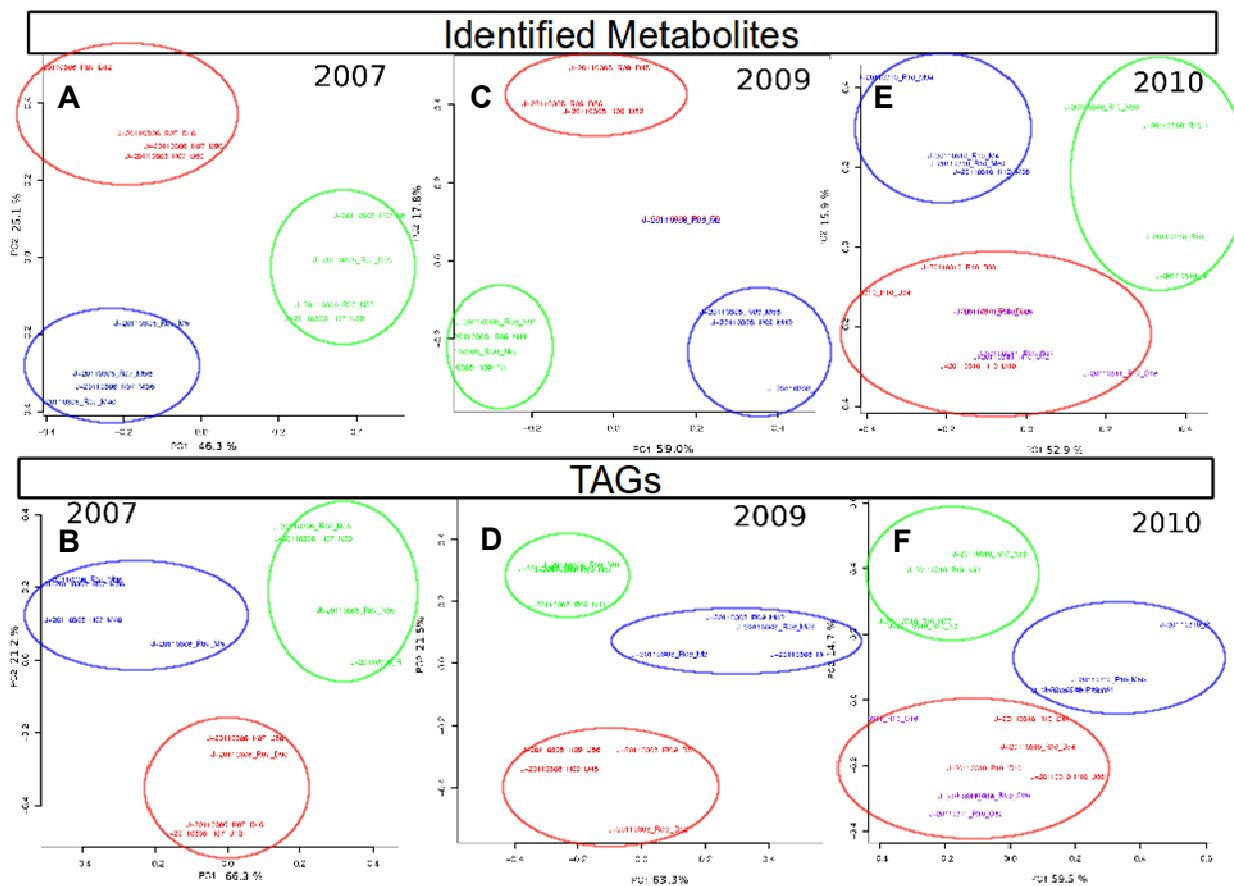


Abbildung 36: PCA mit identifizierten Metaboliten und mit TAGs der Weizensorte Runal aus den Jahrgängen 2007, 2009 und 2010. Farbcodierung: rot steht für ökologisch, blau steht für konventionell, grün steht für Nullvariante; in 2010 steht lila zusätzlich für biologisch-organisch.

Lediglich bei den identifizierten Metaboliten in 2009 ergab sich für zwei von den acht Feldreplikaten eine Überlagerung von ökologischen und konventionellen Proben (Abbildung 36 C). Bei den ökologischen Proben in 2010 ist eine Differenzierung der biologisch-dynamischen und organisch-biologischen Proben mittels PCA nicht möglich (Abbildung 36 E und F). Die relativ ähnliche Behandlung des Getreides im Rahmen der ökologischen Anbauweisen macht dieses Ergebnis erklärbar. Die beiden Gruppen aus ökologischer Produktion wurden daher als „ökologische Fraktion“ zusammengefasst. Die Proben aus konventionellem Anbau und die der Nullvariante lassen sich auch in 2010 von der ökologischen Fraktion differenzieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Metabolitkonzentrationen im Weizen sowohl einem sortenspezifischen Einfluss als auch saisonalen Schwankungen unterliegen. Dennoch war in der PCA sowohl im Jahresvergleich der Sorte Runal als auch in den einzelnen Sorten eine deutliche Gruppierung der Proben nach der Anbauart feststellbar. Eine weitere wichtige Beobachtung ist, dass einige Metabolite wie myo-Inositol, Tryptophan, Adenosin und Alanin bei einer Anbauform über die drei Anbaujahre und über die Sorten hinweg in der Regel konstant höhere oder niedrigere Konzentrationen aufweisen. Dieses relativ regelmäßige Muster an Konzentrationsverhältnissen von Metaboliten in ökologischem und konventionellem Weizen ist vielversprechend für die Nutzung in sogenannten maschinellen Klassifikationsverfahren. Ergebnisse der Anwendung dieser Klassifikationsverfahren werden im Folgenden im Zusammenhang mit Analysen von Weizenproben aus der Praxis präsentiert.

3.3.5.3 Maschinelle Klassifikationsverfahren und erster Blindversuch

Maschinelle Klassifikationsverfahren sind in der Informatik ein Teilbereich des maschinellen Lernens. Bei diesen Verfahren wird ein Algorithmus verwendet, um charakteristische Muster in Datensätzen zu detektieren und die Daten auf dieser Basis in definierte Klassen einzuteilen („training“). Der „trainierte“ Algorithmus wird anschließend dazu verwendet, diese Muster in weiteren Datensätzen zu finden und diese anhand der Mustererkennung den zuvor „erlernten“ Klassen zuzuordnen. Für die im Folgenden präsentierten Ergebnisse wurde eine Kombination der maschinellen Klassifikationsverfahren „Random Forrest“ (RF) und „Support Vector Machine“ (SVM) eingesetzt (Kuhn, 2008).

Zum Training der Klassifikationsverfahren RF und SVM wurden zunächst nur 80 % der vorhandenen Datenbasis verwendet. Diese Datenbasis umfasste die zehn Sorten aus dem Erntejahr 2007 und die Analyse der drei Anbaujahre der Sorte Runal (N.B. die Daten beider Analysen der Sorte Runal in 2007 wurden verwendet). Der Erfolg des Trainings wurde mit den restlichen 20 % der Datenbasis überprüft: RF und SVM ordnete sämtliche Weizenproben den „Klassen“ ökologisch oder konventionell korrekt zu. Es ist nicht auszuschließen, dass dieses positive Ergebnis auch wegen der relativ homogenen Proben, die sämtlich von einem Standort des DOK-Versuchs stammen, erzielt wurde. Die Güte und damit Nutzbarkeit eines Klassifikationsverfahrens muss letztlich durch die korrekte Zuordnung von Proben aus der Praxis nachgewiesen werden. Ausgerichtet auf dieses Ziel wurden in einem Blindversuch, der durch die Partner des Verbundprojekts organisiert worden war, zehn Weizenproben aus der Praxis von zunächst unbekannter Herkunft untersucht. Nach Aufnahme der Metabolit-Profile mit GC-MS wurden die Daten mit den zuvor trainierten Klassifikationsmodellen analysiert. In diesem Fall ordneten RF und SVM neun von zehn Proben unbekannter Herkunft der richtigen Anbauart, ökologisch oder konventionell, zu. Eine fälschlicherweise als konventionell eingeschätzte Probe stammt aus einem Betrieb, der sich in der Umstellungsphase von konventioneller zu ökologischer Produktion befand.

3.3.5.4 Erweiterung der Metabolit-Profil-Datenbasis mit definierten Weizenproben in der Projektverlängerungsphase

Zur Vergrößerung der Datenbasis mit definierten Weizenproben wurden die acht Weizensorten Probus, Sandomir, Titlis, Caphorn, Scaro, Antonius, CCP und Rouge de Bordeaux aus dem DOK-Versuch des Erntejahres 2010 verwendet (vergleiche Tabelle 12). Von sämtlichen

Weizensorten wurden mit der GC-MS in den zwei Anbauformen konventionell und ökologisch (biologisch-dynamisch) jeweils von vier Feldreplikaten Metabolit-Profile aufgenommen. Die erstellten Chromatogramme wurden mit denen, die bereits zuvor im Projekt erarbeitet worden waren, aligniert. Dieser Datenpool umfasste insgesamt 336 Chromatogramme, die von ökologischem und konventionellem DOK-Weizen der Anbaujahre 2007 (11 Sorten), 2009 (1 Sorte) und 2010 (9 Sorten) stammten.

Innerhalb dieses Datenpools konnten die ökologischen und konventionellen Proben leider nicht mit der Kombination der Klassifikationsverfahren RF und SVM, wie in Kapitel 3.3.5.3 beschrieben, unterschieden werden. Eine Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass wegen der unterschiedlichen Anzahl der Chromatogramme die Auswahl an Metaboliten, die in beide Experimente einfließen konnten, unterschiedlich war. Eine Analyse des Datenpools sämtlicher Metabolite mit PCA ergab ebenfalls keine Gruppierung, bei der ökologische und konventionelle Proben klar getrennt waren (ohne Abbildung).

In einem weiteren Schritt wurde das Klassifikationsverfahren SVM eingesetzt, um die Wichtigkeit der Metabolite des Datenpools im Hinblick auf ihren Beitrag zur Unterscheidung der Anbauart zu ermitteln. Die SVM sortiert die Metabolite auf einer Skala von 100 bis 0, wobei ein größerer Wert einen höheren Beitrag des Metaboliten zur Unterscheidung der Anbauart bedeutet (Abbildung 37). Bei Setzung eines Schwellenwertes von 50 für die Wichtigkeit, wurden im Datenpool 14 Metabolite identifiziert, die besonders zur Unterscheidung der Anbauart beitragen. Die Auswahl dieser Metabolite korreliert sehr gut mit den Metaboliten, für die in verschiedenen Erntejahren und Sorten signifikante Konzentrationsunterschiede in den Anbauformen gefunden wurden (vergleiche Abbildung 33 und Abbildung 35).

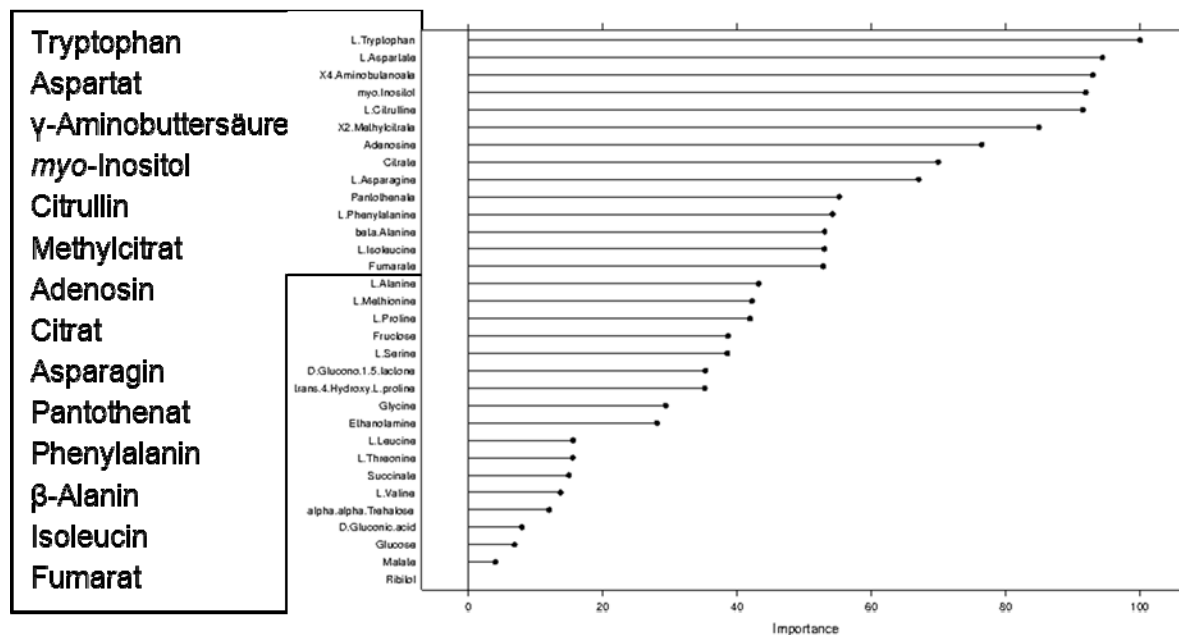


Abbildung 37: Vierzehn Metabolite sind zur Unterscheidung zwischen ökologischen und konventionellen Proben innerhalb des Probenpools besonders wichtig. Das Klassifikationsverfahren SVM wurde eingesetzt, um in dem Probenpool aus drei Erntejahren mit bis zu elf Sorten pro Ernte und daraus resultierend 336 Chromatogrammen Metaboliten zu identifizieren, die für die Unterscheidung der Anbauart besonders wichtig sind.

Ein PCA-Ergebnis auf Basis der 14 mit SVM klassifizierten Metabolite ist in Abbildung 38 gezeigt. Ein Teil der Sorten aus dem Anbaujahr 2007 bildet gut separierte ökologische und konventionelle Gruppen (Ellipsen A und B in Abbildung 38). Dagegen konnten die Sorten, die in

den Jahren 2009 und 2010 angebaut wurden, in dieser Analyse in den Hauptkomponenten 1 und 2 der PCA nicht differenzierbar gruppiert werden. Auffällig im PCA-Ergebnis ist die klar erkennbare Trennung nach den Anbaujahren 2007 und 2010 (grüne und blaue versus rötliche und orange Punkte in Abbildung 38).

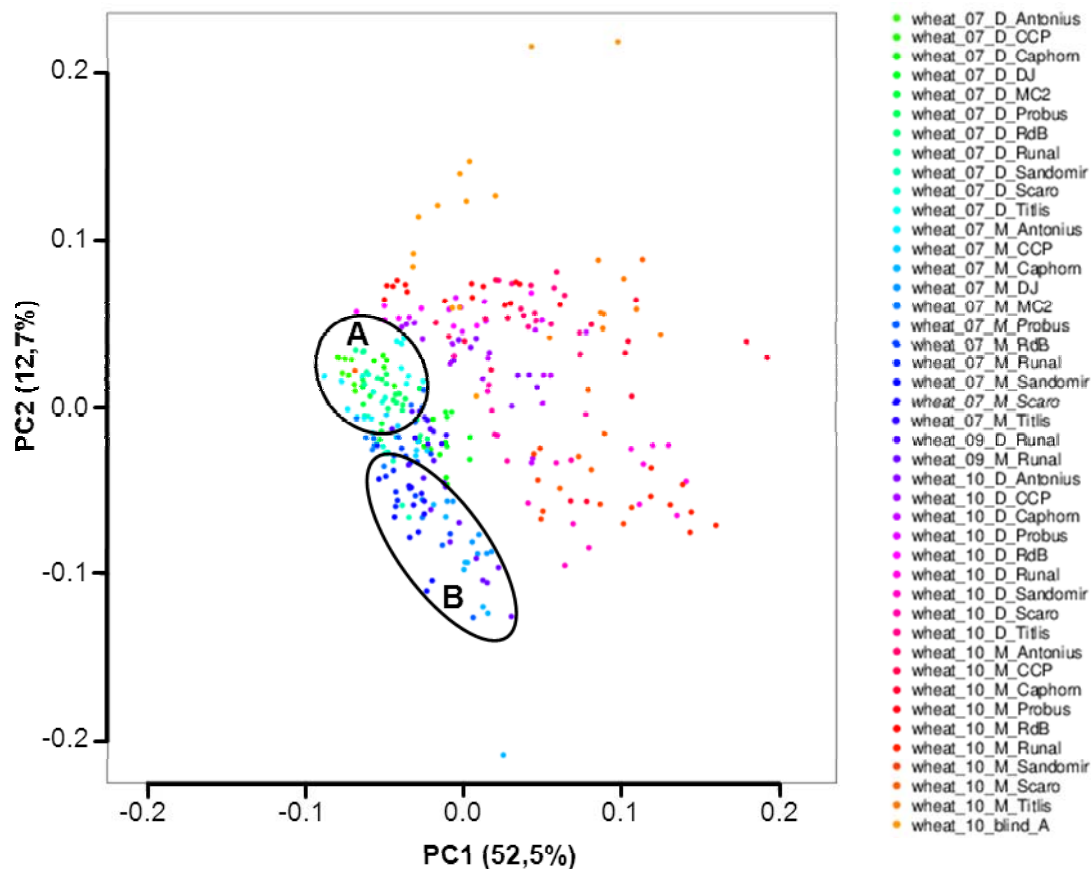


Abbildung 38: PCA auf Basis der mit SVM ermittelten 14 für die Unterscheidung der Anbauart wichtigsten Metabolite. Die Metabolitdaten von sämtlichen verfügbaren Sorten der Anbaujahre 2007, 2009 und 2010 sind in das Experiment eingeflossen. Ellipse A enthält hauptsächlich ökologische Proben aus dem Jahr 2007, Ellipse B enthält hauptsächlich konventionelle Proben aus dem Jahr 2007. Die in verschiedenen Rot- und Orangetönen gefärbten Punkte zeigen die ökologischen und konventionellen Proben ohne differenzierbare Gruppierung aus dem Jahren 2009 und 2010. Grün = Ernte 2007 – ökologischer Anbau; Blau = Ernte 2007 – konventioneller Anbau; Rot = Ernte 2010 – ökologischer Anbau; Orange = Ernte 2010 – konventioneller Anbau.

Eine individuelle PCA-Analyse für die drei Sorten Runal, Antonius und Rouge de Bordeaux über drei bzw. zwei Anbaujahre zeigt ebenfalls eine deutliche Gruppierung nach Anbaujahren (Abbildung 39). Mit SVM Vorselektion der Metabolite nach Wichtigkeit wird innerhalb der Anbaujahre die Gruppierung von ökologischen und konventionellen Proben der drei Sorten in der PCA verbessert (Abbildung 39).

Sowohl die Betrachtung des DOK-Gesamtdatenpools aus drei Anbaujahren als auch die beispielhafte Analyse individueller Sorten über drei bzw. zwei Anbaujahre zeigen als eindeutiges Ergebnis, dass der saisonale Einfluss der jeweiligen Wachstumsperiode auf die Metabolit-Profile von entscheidender Bedeutung ist. Auch zwischen den individuellen Sorten existieren Unterschiede, die jedoch weniger stark ausgeprägt sind als die saisonalen Unterschiede. Beide Trends sind in sehr guter Übereinstimmung mit GC-MS basierten

Metabolit-Profil-Analysen von Mais aus ökologischer und konventioneller Anbauweise (Röhlig et al. 2009; Röhlig und Engel, 2010).

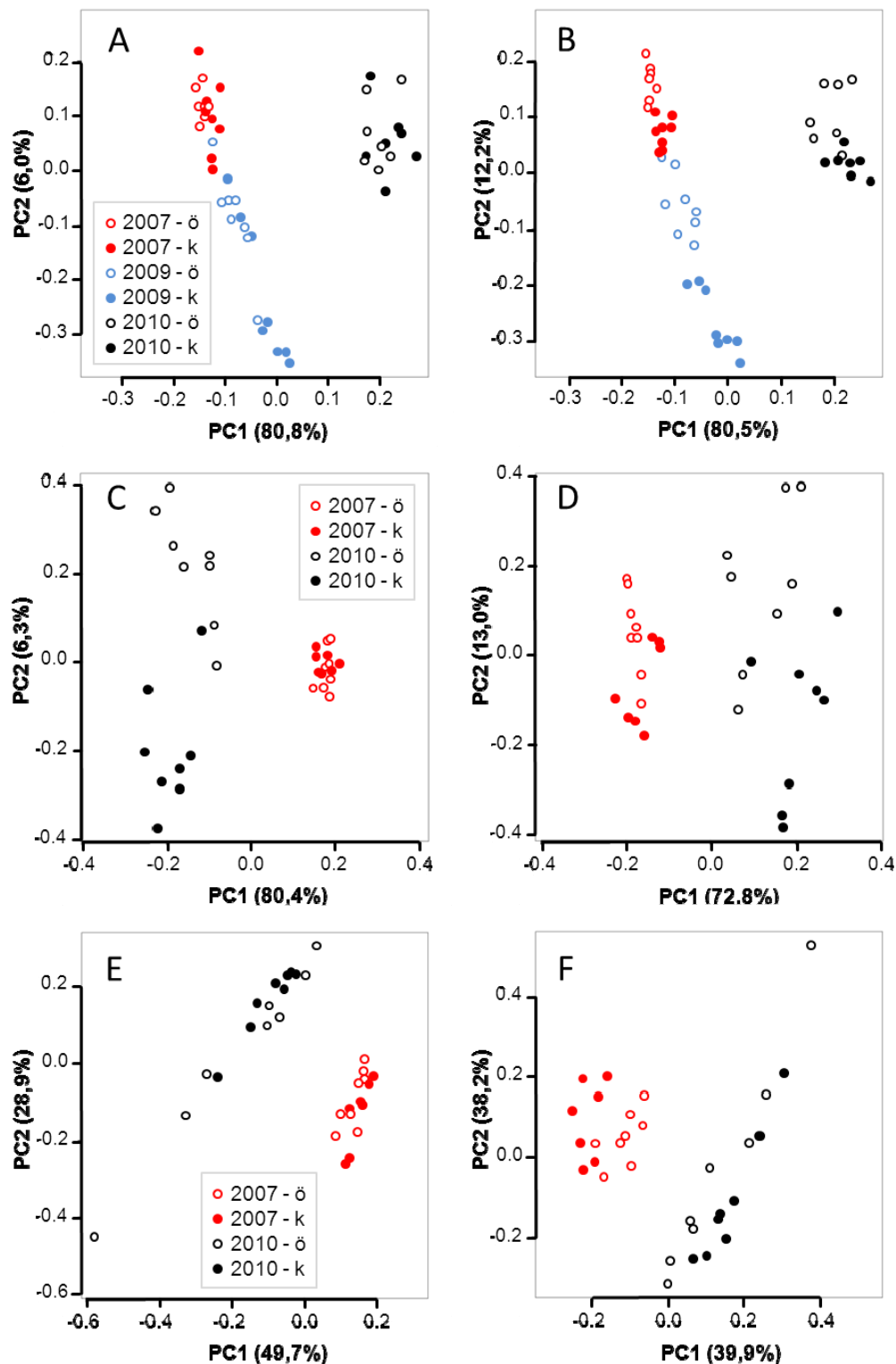


Abbildung 39: Unterscheidung der Anbaumethode mithilfe der PCA auf Basis von Metabolitdaten individueller Sorten in verschiedenen Anbaujahren. A, B Sorte Runal, C, D Sorte Antonius, E, F Sorte Rouge der Bordeaux. PCA-Analysen in der linken Hälfte (A, C, E) durchgeführt mit sämtlichen Metaboliten. PCA-Analysen in der rechten Hälfte (B, E, F) durchgeführt nach SVM Vorauswahl der für die Anbauart wichtigsten Metabolite.

3.3.5.5 Vorhersage der Anbauart bei verblindeten Proben und Tests auf Probenidentität

Die Klassifikationsverfahren SVM und RF konnten in ersten Experimenten bei neun von zehn Proben erfolgreich die Anbauart vorhersagen (vergleiche Kapitel 3.3.5.3). Hauptziel der hier vorgestellten Arbeiten war, mit einer größeren Anzahl von verblindeten, ökologischen und konventionellen Weizenproben aus der landwirtschaftlichen Praxis zu prüfen, ob mit ähnlichen Methoden eine Vorhersage der Anbauart erzielt werden kann. Vom Projektpartner GfRS wurden 53 Weizenproben aus den Erntejahren 2010/2011 zur Verfügung gestellt; im Folgenden GfRS Probenpool genannt. Weitere 56 Weizenproben stammten aus einem Fundus an Proben, der dem MRI jährlich im Rahmen von Forschungsaufgaben zur Verfügung steht. In diesem MRI Probenpool aus dem Erntejahr 2011 waren 28 Sorten und eine Sortenmischung vertreten; die Anbauggebiete verteilten sich gleichmäßig über Deutschland. Wie zuvor beschrieben, wurden von sämtlichen Proben Metabolit-Profile in Duplikatanalysen aufgenommen.

Die Analyse des GfRS Probenpools auf Basis der bekannten ökologischen und konventionellen Weizenproben wurde unter Einsatz von SVM und PCA durchgeführt. Die verblindeten GfRS Proben bildeten eine fast vollständig von den ökologischen und konventionellen Proben isolierte Gruppe (Abbildung 40 A). Eine PCA ohne SVM Vorauswahl der Metabolite zeigte kein besseres Ergebnis hinsichtlich der Zuordnung der verblindeten Proben. Bei SVM Vorselektion auf Metabolite, die für das jeweilige Erntejahr wichtig sind, ergibt sich für die bekannten Weizenproben eine gute Separierung nach den einzelnen Jahren (Abbildung 40 B); ein Ergebnis, dass mit den zuvor durchgeführten Analysen übereinstimmt (siehe Abbildung 39). Bemerkenswert ist, dass die verblindeten Proben, die aus den Erntejahren 2010 und 2011 stammten, auch in dieser Analyse eine fast vollständig separierte Gruppe bildeten (Abbildung 40 B). Hinsichtlich des GfRS Probenpools ist festzustellen, dass eine Zuordnung zur Anbauart auf Basis der vorhandenen Metabolitdaten der DOK-Proben verschiedener Anbaujahre nicht erfolgreich war.

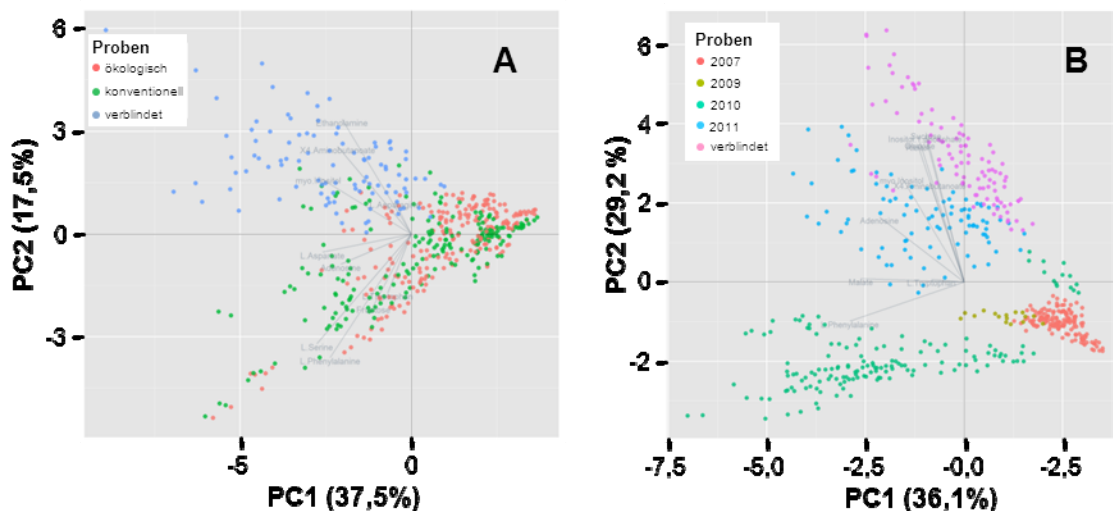


Abbildung 40: Auswertung der Metabolitprofile mithilfe der PCA aus ökologischen, konventionellen und verblindeten Weizenproben (GfRS). A: PCA-Analyse durchgeführt nach SVM Vorauswahl der für die Anbauart wichtigsten Metabolite. Der GfRS Probenpool bildete eine nahezu separate Gruppe, die Unterscheidung in ökologische und konventionelle Proben war nicht möglich. B: PCA-Analyse durchgeführt nach SVM Vorauswahl der für das Erntejahr wichtigsten Metabolite. Die DOK-Proben gruppieren nach Anbaujahr (2007-2010), der GfRS (verblindet) und der MRI Probenpool (2011) liegen nah beieinander, bilden jedoch separate Gruppen.

Für die Praxis in den Ökokontrollstellen ist häufig die Beantwortung der Frage, ob ein Muster mit einer Rückstellprobe identisch ist, von hoher Relevanz. Ausgerichtet auf diese Fragestellung hatte die GfRS zunächst drei Proben jeweils in Duplikaten zur Verfügung gestellt. Mit dieser geringen Probenzahl gelang es, in einer PCA eine klar separierte Gruppierung der drei Probenpaare zu erreichen (ohne Abbildung). Innerhalb des 53 Proben umfassenden GfRS Probenpools waren gleichfalls Duplikatproben enthalten. Für 15 Probenpaare wurde auf Basis eines PCA-Ergebnisses eine Vorhersage zur Identität getroffen, jedoch waren nur fünf dieser Probenpaare tatsächlich identisch. Als Fazit aus diesem Ergebnis wurde gezogen, dass die Bestimmung der Probenidentität mit der vorliegenden Methode nur für geringe Probenzahlen möglich scheint. Die Anwendbarkeit der Methode für die Bestimmung der Probenidentität müsste durch weitere Experimente mit geringeren Probenzahlen geprüft werden.

Die Analyse des verblindeten MRI Probenpools wurde zunächst ebenfalls auf Basis der bekannten ökologischen und konventionellen Weizenproben unter Einsatz von SVM Vorselektion und PCA durchgeführt. Auch in diesem Fall war keine sinnvolle Gruppierung der Blindproben zu einer der beiden Anbauarten zu erzielen (ohne Abbildung). Eine Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass die DOK-Weizenproben zu geringe Übereinstimmungen in ihren Metabolit-Profilen im Vergleich zu Proben aus der landwirtschaftlichen Praxis haben, die sich aus verschiedenen Sorten und Anbauorten rekrutieren. Um den MRI Probenpool weitergehend analysieren zu können, wurden vier ökologische und konventionelle Proben decodiert. Diese acht Proben dienten dann als sogenannte Anker, mit denen eine SVM Vorselektion der für die Anbauart wichtigsten Metabolite durchgeführt wurde. Die vorselektionierten Metabolite wurden benutzt, um eine PCA durchzuführen und um eine Vorhersage der Anbauform der verblindeten Proben zu treffen (Abbildung 41). In dieser Analyse war die Vorhersage der Anbauart für 64,4 % der Proben korrekt. Der linke Teil der PCA, d. h. auf der x-Achse von 0 bis -6, enthielt insgesamt weniger Proben und besser separierte Ankerproben der beiden Anbauarten (Abbildung 41). Damit verbunden ergab sich in der linken PCA-Hälfte eine mit 69,2 % etwas bessere korrekte Vorhersage, als in der rechten PCA-Hälfte, wo die korrekte Vorhersage bei 62,3 % lag.

Insgesamt gesehen war die Vorhersage der Anbauart bei verblindeten Proben auf der Basis von Metabolit-Daten, die auf Weizenproben verschiedener Sorten und Anbaujahre des DOK-Versuchs beruhten, nicht erfolgreich. Zu diesem Ergebnis können Schwankungen in der analytischen Bestimmung der Metabolite beigetragen haben. Die Hauptursache liegt mit großer Wahrscheinlichkeit in wachstumsperiodenabhängigen Schwankungen, die die Metabolit-Profile in den einzelnen Anbaujahren stark beeinflussen. Möglich ist weiterhin, dass die genetische Ausstattung und die Anbauregion der verblindeten Sorten im Vergleich zum DOK-Weizenmaterial dazu beigetragen haben, dass keine bessere Vorhersage erzielt werden konnte. In diesem Zusammenhang ist das Ergebnis mit dem MRI Probenpool interessant: die geringe Anzahl von acht Ankerproben, die aus dem gleichen Anbaujahr stammten und eine ähnlich weite geographische Verbreitung wie die verblindeten Proben hatten, erlaubten eine korrekte Vorhersage in 64,4 % der Fälle. Die Beschränkung auf ein Anbaujahr und eine ähnliche geographische Verbreitung sind in diesem Fall offenbar vorteilhafte Bedingungen für die Treffsicherheit der Vorsage. In weitergehenden Experimenten zur Unterscheidung der Anbauart können diese Bedingungen getestet werden.

von Interesse sein. Diese Limitation in der Analytik kann durch die Verwendung einer Flüssigchromatografie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) in Verbindung mit der Elektrospray-Ionisierung (ESI) und einem Massenspektrometer (MS) überwunden werden. Wir haben daher in der Berichtsperiode Methanol-Extrakte aus Weizenproben des DOK-Feldversuchs erstellt und diese per HPLC-ESI-MS analysiert. Weiterhin haben wir zwei Proben vom Projektpartner KWALIS erhalten (Probe P2762 – Anbau konventionell; Probe P2651 – Anbau ökologisch), die bei der dortigen Messung besonders deutliche Unterschiede zeigten. Alle Daten der Proben können exportiert und dezentral mit der Software MeltDB ausgewertet werden.

Die Messung der Extrakte durch HPLC-ESI-MS zeigte nach entsprechender Optimierung eine sehr gute Auftrennung der Metabolite (Abbildung 42). Insgesamt konnten über 100 verschiedene Metabolite detektiert werden, von denen bisher jedoch nur einige zur Kontrolle der Analyse mit Referenzen identifiziert wurden. Der Schwerpunkt wurde dabei auf phenolische Verbindungen gelegt.

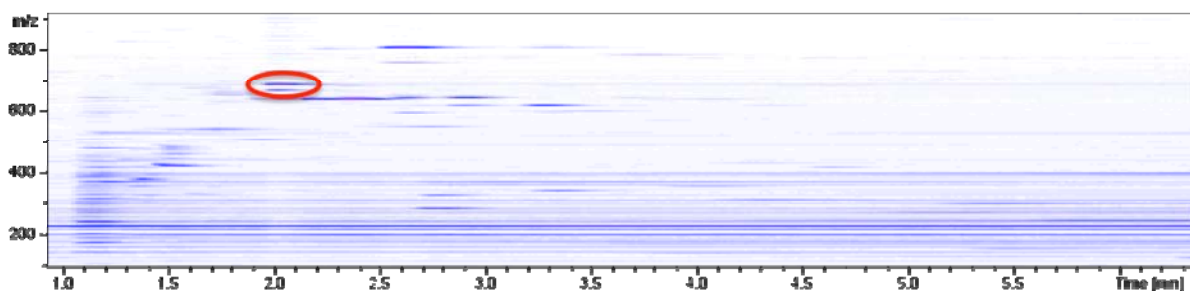


Abbildung 42: Analyse eines Extraktes aus Weizen (Probe P2651 – Anbau ökologisch; erhalten von KWALIS) mithilfe der HPLC-ESI-MS. Ausschnitt (1–6 Minuten, m/z 100–900) aus dem Gesamtchromatogramm der Probe. Im Unterschied zur GC-MS-Analyse der gleichen Probe werden mithilfe der HPLC-ESI-MS auch Metabolite mit hohen Massen gut detektiert. Der rote Kreis bezeichnet eine Verbindung, die genauer analysiert wurde.

Als Referenzen wurden Kaffeesäure, Ferulasäure, p-Coumarsäure, Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure und trans-Zimtsäure vermessen. Einzelne unbekannte Metabolite wurden über ihr Massenspektrum genauer analysiert. Als Beispiel sei hier eine Verbindung mit der Masse von 680,48 Dalton gezeigt (Abbildung 42, roter Kreis). Das Massenspektrum dieser Verbindung zeigte eine Fragmentierung die auf ein Konjugat mit dem Zucker Fucose hindeutet (Abbildung 43). Verbindungen dieser Art sind per GC-MS kaum oder nicht zu analysieren; die HPLC-ESI-MS Analytik erweist sich hier als komplementär.

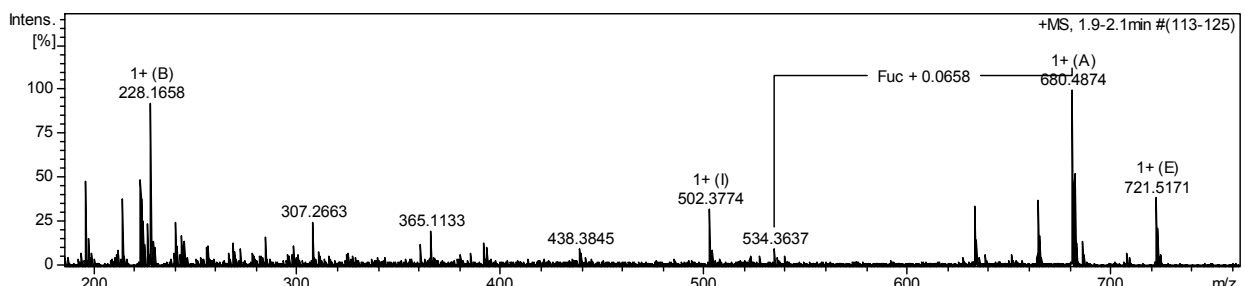


Abbildung 43: Massenspektrum der Komponenten der Probe P2651 (Anbau ökologisch, erhalten von KWALIS) bei 1,9–2,1 Minuten. Die Hauptkomponente zeigt eine Masse von 680,48 Dalton. Die Differenz zur Masse bei 534,36 Dalton deutet auf die Abspaltung eines Zuckers (Fucose oder massengleicher Desoxyzucker) im ESI-Prozess hin. Dies konnte über ein MS/MS-Experiment bestätigt werden.

Ein ausführlicher Vergleich per HPLC-ESI-MS-Analysen wurde bisher für die Proben P2762 (konventionell) und P2651 (ökologisch), beide erhalten von KWALIS, sowie die Proben D50, D90 (beide biodynamisch) und M40 und M56 (beide konventionell) durchgeführt. Diese Proben stammen von der Sorte Runal aus dem Erntejahr 2007. Für die phenolischen Inhaltsstoffe konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Anbaumethode gefunden werden. Dies entspricht den Befunden der Publikation Stracke et al. (2009), in der ebenfalls Proben aus unterschiedlichen Anbaumethoden, gleichfalls aus dem DOK-Versuch, in Bezug auf Phenole und auch Carotinoide untersucht wurden.

Hinsichtlich der Sekundärmetabolite haben sowohl die eigenen Untersuchungen als auch die Arbeiten von Stracke et al. (2009) gezeigt, dass bei Weizen innerhalb des DOK-Versuchs relative geringe und keine über verschiedene Jahrgänge konstanten Unterschiede in den großen Stoffgruppen der phenolischen Substanzen und der Carotinoide auftraten. Wegen dieser Befunde und auch vor dem Hintergrund, dass die Metabolit-Profilings-Arbeiten mittels GC-MS wesentlich mehr Erfolg versprechende Ergebnisse ergeben haben, wurden die Arbeiten zur Detektion von Sekundärmetaboliten im Rahmen dieser Arbeiten nicht weiterverfolgt.

3.3.6 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die in Kapitel 3.3.5 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Metabolitkonzentrationen in ökologischem und konventionellem Weizen aus dem DOK-Versuch sowohl sortenspezifischen als auch wachstumsperiodenabhängigen Schwankungen unterliegen. Eine wesentliche Erkenntnis der Ergebnisse ist, dass ein Datenpool, der auf mehreren Wachstumsperioden beruht, nicht geeignet ist, Weizen aus ökologischer und konventioneller Anbauart zu unterscheiden. Dagegen wurden innerhalb einer Wachstumsperiode des DOK-Weizens in den Metabolit-Profilen und bei einzelnen Metaboliten Muster gefunden, die die Differenzierung der Anbauart des Weizens erlauben. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Aufnahme von Metabolit-Profilen eines geeigneten ökologischen und konventionellen Probenpools von jeder neuen Weizenernte für die Umsetzung in der Praxis erforderlich wäre. Bevor eine solche Anwendung denkbar ist, müssen weitere Forschungsarbeiten an Proben aus der landwirtschaftlichen Praxis durchgeführt werden. Ein ökologischer und konventioneller Probenpool, der für diese Arbeiten geeignet erscheint, sollte die gegenwärtig eingesetzten Weizensorten und auch eine definierte Region (z. B. mehrere Bundesländer innerhalb Deutschlands) repräsentieren. Wenn in diesem Probenpool eine Differenzierung von ökologischem und konventionellem Weizen gelingt, wäre ein nächster Schritt, auch verblindete Proben aus dem gleichen Anbaujahr und der gleichen Region zu differenzieren.

Bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse

Verschiedene Ergebnisse des Projekts wurden bisher in insgesamt acht Vorträgen und mit zwei Postern auf wissenschaftlichen Tagungen und Konferenzen vorgestellt (siehe Kapitel 5). Ein Manuskript zur Publikation in einer wissenschaftlichen Fachzeitschrift ist in Bearbeitung. Es ist geplant, die Ergebnisse auf weiteren wissenschaftlichen Tagungen zu präsentieren.

3.3.7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Eine Gegenüberstellung der geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen ist in Tabelle 15 gezeigt. Die geplanten Ziele wurden erreicht.

Tabelle 15: Geplante Arbeiten und tatsächlich erreichte Ziele im Projektteil Weiterentwicklung von Profiling-Techniken: Metabolom

Geplante Arbeiten	Tatsächlich erreichte Ziele
Erstellung komplexer Metabolit-Profile von Weizen (cv. Runal) des DOK-Versuchs mithilfe von GC-MS aus drei Erntejahren. Untersuchung einer konventionellen und einer ökologischen Anbauvariante	Ziel vollständig erreicht. Zusätzlich zu den geplanten Anbauformen konnten exemplarisch weitere Anbauformen des DOK-Versuchs (Null- und O-Variante) untersucht werden.
Erstellung komplexer Metabolit-Profile für zehn verschiedene Weizensorten des DOK-Versuchs. Untersuchung einer konventionellen und einer ökologischen Anbauvariante	Ziel vollständig erreicht.
Vergleich von identischen Proben mit FAS, IRMS und Metabolit-Profiling	Ziel vollständig erreicht. Insgesamt zehn identische Weizenproben wurden mit sämtlichen drei methodischen Ansätzen untersucht.
Analyse von Sekundärstoffwechsel-Metaboliten an ausgewählten ökologischen und konventionellen Weizenproben aus dem DOK-Versuch	Ziel zum Teil erreicht. Sekundärstoffwechsel-Metabolite wurden exemplarisch untersucht. Diese Arbeiten und die Arbeiten von Stracke et al. (2009) ergaben nur geringfügige Unterschiede in Sekundärmetaboliten des DOK-Weizens. Diese Arbeiten wurden daher nicht weiterverfolgt.
Datenauswertung unter Anwendung von Bioinformatik	Ziel vollständig erreicht. Die Datenaufarbeitung und -auswertung erfolgte zum überwiegenden Teil mit der Softwareplattform MeitDB der Universität Bielefeld.
Projektverlängerungsphase	
Zur Vergrößerung der Datenbasis mit definierten Weizenproben und damit zur Absicherung des Klassifizierungsmodells werden acht verschiedene Weizensorten aus dem DOK-Versuch aus einem weiteren Erntejahr (2010) untersucht.	Ziel vollständig erreicht. Die Metabolit-Profile der 8 Weizensorten in den beiden Anbauformen ökologisch und konventionell mit jeweils 4 Feldreplikaten aus dem Erntejahr 2010 wurden erstellt. Die bioinformatische Datenbearbeitung und Auswertung sind abgeschlossen.
Überprüfung der Profiling-Technik GC-MS-Analytik in Verbindung mit Klassifizierungsmodellen an einer größeren Zahl von ökologischen und konventionellen Weizenproben aus der landwirtschaftlichen Praxis. Bei der Probenauswahl wird berücksichtigt, dass sowohl Weizen unterschiedlicher geografischer Herkunft, als auch von verschiedenen Landwirten zur Verfügung steht. Insgesamt werden 100 Weizenproben aus der landwirtschaftlichen Praxis untersucht.	Ziel vollständig erreicht. Es wurden 109 Weizenproben aus der landwirtschaftlichen Praxis untersucht. Die Proben wurden vom Projektpartner GfRS zur Verfügung gestellt oder stammten aus Beständen des MRI. Die Anbauform, ökologisch oder konventionell, wurde erst nach Fertigstellung der Analysen und Auswertungen eröffnet. Mithilfe von Klassifizierungsmodellen und Hauptkomponentenanalysen wurden in einigen Fällen erfolgreich die verblindeten Proben den Anbauformen ökologisch oder konventionell zugeordnet. Die Verlässlichkeit der Zuordnung ist jedoch für eine Anwendung in der Praxis nicht ausreichend.
Für die Praxis in den Ökokontrollstellen ist häufig auch die Beantwortung der Frage, ob ein Muster mit einer Rückstellprobe identisch ist, von hoher Relevanz. Da jede Probe zweifach eingewogen und zweifach per GC-MS analysiert wird, wird dieser Fragestellung in der Auswertung nachgegangen.	Ziel vollständig erreicht. Der Test wurde in der Form erweitert, dass ein Pool von Proben, bei dem die Duplikate verblindet waren, untersucht wurde. In einigen Fällen konnten die Duplikate nach GC-MS Analyse korrekt vorhergesagt werden.

3.3.8 Kurze Zusammenfassung des Arbeitsblocks und der wichtigsten Ergebnisse

In den einzelnen Sorten und im Jahresvergleich der Sorte Runal zeigen die Proben in der PCA unter Verwendung der identifizierten Metabolite und/oder TAGs eine eindeutige Gruppierung nach der jeweiligen Anbauart. Für die Sorte Runal aus dem Erntejahr 2007 konnten exemplarisch 48 Metabolite identifiziert werden, von denen zehn Substanzen nach dem Student-t-Test einen signifikanten Unterschied in den Metabolitkonzentrationen zwischen ökologischer und konventioneller Anbauart aufweisen. Über alle elf analysierten Weizensorten aus der Ernte 2007 zeigen fünf identifizierte Metabolite und elf TAGs signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den Anbauarten. Die Registrierung der durch die Kultivierungsart bedingten Änderungen des Metaboloms wird erschwert durch deutliche sortenabhängige und wachstumsperiodenabhängige Schwankungen im Metabolom. Dennoch konnte unter diesen Bedingungen aufgezeigt werden, dass einige Metabolite mit signifikanten Unterschieden zwischen den Anbauarten in der Regel über alle Sorten erhöhte beziehungsweise niedrigere Werte aufweisen. Dieses Ergebnis lässt die Ausbildung definierter wiederkehrender Muster im Metabolom von Weizenproben aus ökologischer und konventioneller Produktion vermuten, die mittels Klassifikationsverfahren erfassbar sein könnten.

Zusätzlich zu den identifizierten Substanzen konnte eine große Anzahl nicht identifizierter Metabolite, hier TAGs, detektiert werden. Diese TAGs zeigen ebenfalls signifikante Konzentrationsunterschiede in Proben aus ökologischem und konventionellem Anbau sowie sortenspezifische und wachstumsperiodenabhängige Beeinflussung.

Die Anwendung der Klassifikationsverfahren Random Forest und Support Vector Machine auf eine Unterpopulation der DOK-Weizenproben und auf zehn Weizenproben unterschiedlicher Herkunft aus der Praxis hat ein vielversprechendes Ergebnis gezeigt. Neun der zehn Weizenproben konnten der jeweiligen Anbauart korrekt zugeordnet werden. Eine Vergrößerung der Datenbasis mit Proben verschiedener Sorten des DOK-Feldversuchs aus einem weiteren Anbaujahr offenbarte den großen Einfluss, den saisonale Effekte der Wachstumsperiode auf den Gesamtdatenpool haben. Diese wachstumsperiodenabhängigen Schwankungen im Metabolom wurden als die Hauptursache dafür angesehen, dass in einem größeren Pool von 109 verblindeten Proben aus der landwirtschaftlichen Praxis keine verlässliche Vorhersage der Anbauform getroffen werden konnte. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Aufnahme von Metabolit-Profilen in einem geeigneten ökologischen und konventionellen Probenpool von jeder neuen Weizenernte für die Umsetzung der Unterscheidbarkeit in der Praxis erfolgreich sein könnte.

Die Autoren danken Nikolas Kessler und Heiko Neuweiger, Universität Bielefeld, für die engagierte Unterstützung bei der bioinformatischen Auswertung und Analyse der Metabolit-Profile.

3.4 Weiterentwicklung von Profiling-Techniken: Proteom

Tabelle 16: Übersicht der Arbeitsschritte beim Proteom-Profiling

Arbeitsschritt	2009				2010				2011				2012			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
2D-GE, cv. Runal, Ernte 2007	A	X	X	X	X	X	E	S. 106 - 108								
2D-GE, 10 Sorten, Ernte 2007				A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	E		
2D-GE, cv. Runal, Ernte 2009						A	X	X	X	X	X	X	E			
2D-GE, cv. Runal, Ernte 2010									A	X	X	X	E	S. 112 - 113		
Auswertung 2D-Gele und Proteinidentifizierung			A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	S. 108 ff	X	E	

3.4.1 Planung und Ablauf

Die untersuchten Weizenkontingente stammen, wie im Kapitel 3.3.2 des Projektteils „Weiterentwicklung von Profiling-Techniken: Metabolom“ beschrieben, aus dem DOK-Feldversuch. Mithilfe von zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-GE) wurden komplexe Protein-Profile von der Weizensorte Runal aus drei Anbaujahren und von zehn weiteren Sorten aus einem Anbaujahr erstellt. Die Proteinidentifizierung erfolgte über eine massenspektrometrische Methode (MALDI-TOF-MS/MS). Die Datenauswertung (Bioinformatik) für beide Proteinanalysebereiche wurde jeweils mit spezieller Software durchgeführt (Details in Kapitel 3.4.3). Ziel der Arbeiten ist die Erstellung von differenziellen Proteinexpressionsprofilen für ökologischen und konventionellen Weizen aus dem DOK-Versuch. Unterschiede in den Proteinexpressionsprofilen wären potenziell als Biomarker für ökologische oder konventionelle Anbauweise nutzbar.

3.4.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Der konzeptionelle Hintergrund zu Profiling-Techniken und deren Einsatz zur Unterscheidung von Pflanzen aus verschiedenen Anbausystemen wurde bereits im Projektteil „Metabolom“ (Kapitel 3.3.3) beschrieben. Die dort eingeführten Konzepte sind auch für die Proteomanalytik gültig.

Das grundsätzliche Ziel der Proteomanalytik ist, die Gesamtheit der Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organs qualitativ und quantitativ zu erfassen und ihre Funktion zu bestimmen. Wegen technischer Beschränkungen – zum Beispiel liegen Proteine in geringen Konzentrationen vor oder sind nicht extrahierbar, nicht lösbar und anschließend nicht separierbar – kann gegenwärtig nur ein relativ kleiner Anteil der gesamten Proteinpopulation betrachtet werden (Rose et al., 2004). In einem Vorläuferprojekt (02OE069) im Bundesprogramm Ökologischer Landbau wurden von ökologisch und konventionell angebautem Weizen (cv. Titlis) aus dem kontrollierten DOK-Feldversuch bereits Protein-Profile

aufgenommen (Zörb et al., 2009). Mithilfe von 2D-GE, Bildauswertung und Proteinidentifizierung über MALDI-TOF-MS wurden die relativen Gehalte von circa 1.000 Proteinen in ökologischem und konventionellem Weizen bestimmt. Die unter stringenten Bedingungen durchgeführte Bildanalyse ergab, dass die Gehalte von 16 Proteinen in Weizen aus zwei Anbaujahren in den ökologischen und konventionellen Anbauvarianten signifikant verschieden waren. Diese 16 Proteine bilden eine Signatur, anhand derer die DOK-Weizenmuster der verschiedenen Anbauvarianten unterschieden werden können. Unter diesen 16 Proteinen sind Speicherproteine, Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels, eine Peroxidase und einige Proteine mit unbekannter Funktion (Zörb et al., 2009). Die konkrete Fragestellung für dieses neue Forschungsprojekt lautet, ob die Signatur von 16 Proteinen auch bei Weizen aus weiteren Anbaujahren und unterschiedlicher genetischer Herkunft, das heißt bei unterschiedlichen Sorten, gilt. Letztlich wird mit diesen Experimenten die natürliche Schwankungsbreite der Expression der Weizenproteine in verschiedenen Sorten ermittelt. Die Ermittlung der Schwankungsbreite ist Vorbedingung, wenn ein Authentizitätstest für die Praxis tauglich sein soll.

3.4.3 Material und Methoden

Das Probenmaterial sowie die Methoden zur Grundcharakterisierung des Getreides wurden im Projektteil „Metabolom“ (Kapitel 3.3.4) beschrieben.

Das Protein-Profilung wurde wie von Zörb et al. (2009) beschrieben durchgeführt. Zunächst erfolgte die Proteinaufarbeitung aus trockenem Weizenschrot mittels TCA-Aceton-DTT-Fällung und anschließendem Lösen der Proteine in hoch konzentriertem Harnstoff und Detergens. Damit ist die Extraktion löslicher und auch teilweise membranständiger Proteine möglich; eine Diskriminierung von spezifischen Proteingruppen wird weitestgehend vermieden. Die Proteinextrakte wurden einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) unterzogen, in der eine Auftrennung der Proteine nach Ladungseigenschaften erfolgt. Im Anschluss an die IEF wurden die Proteine in Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) nach Molekülgröße getrennt, dann angefärbt und die Ergebnisse (Gele) schließlich digitalisiert. Die Auswertung der Gele (Fotodokumentation und Bildanalyse) erfolgte mit der Spezial-Software „Delta2D“, DECODON GmbH, Greifswald, nach etablierten Methoden (Berth et al., 2007). Für jede Weizensorte standen Proben aus den Anbauarten ökologisch und konventionell in jeweils vier Feldwiederholungen zur Verfügung. Von jeder Probe wurden mindestens drei Gelreplikate erstellt und zur Auswertung mithilfe der Delta2D-Software verwendet. Die Delta2D-Software erlaubt die Ermittlung und den Vergleich der gefärbten Proteine („Spotintensitäten“) in den einzelnen 2D-Gelreplikaten. Eine Überprüfung der Signifikanz von Konzentrationsunterschieden zwischen ökologischer und konventioneller Anbauart erfolgte mittels t-Test. Hierzu wurden ausschließlich Proteine herangezogen, deren Spotintensität in den Anbauarten mindestens um den Faktor 2 differiert. Der Faktor 2 wird allgemein in der Proteomforschung eingesetzt, um sicher zu gehen, dass die Unterschiede auf biologische Effekte zurückzuführen sind und nicht auf natürlichen oder experimentell bedingten Schwankungen der Proteine basieren. Um tatsächliche differenzielle Spots von Artefakten zu unterscheiden, wurde eine visuelle Prüfung unter Berücksichtigung der 3D-Ansicht der Proteinspots durchgeführt. Bei der Prüfung wurden sowohl Vorkommen, Spotform als auch Intensität der signifikanten Proteinspots in den einzelnen Gelbildreplikaten aller Sorten berücksichtigt.

Proteinspots wurden zur Identifizierung aus ausgewählten 2D-Gelen ausgestochen, tryptisch verdaut und einer Matrix-unterstützten Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-

Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS/MS) (UltrafleXtreme, Bruker Daltonics) unterzogen. Resultierende Massenspektren wurden genutzt, um mithilfe der Software Mascot (Perkins et al., 1999) öffentlich zugängliche Datenbanken zu durchsuchen und damit Proteine zu identifizieren.

3.4.4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

3.4.4.1 Analyse der Sorte Runal aus dem Anbaujahr 2007

Für die Sorte Runal aus dem Erntejahr 2007 konnten insgesamt 845 Proteinspots auf einem Fusionsgel dargestellt werden. Ein Fusionsgel ist eine Synthese aller ökologischen und konventionellen Gelreplikate, die bei der Gelauswertung mit der Delta2D-Software erstellt wird. Das Fusionsgel enthält alle Proteine, die in den unterschiedlichen Proben beobachtet wurden. Von den 845 Spots zeigen 38 einen signifikanten Konzentrationsunterschied (t-Test mit $p \leq 0.05$) zwischen den konventionellen und ökologischen Anbauformen. Nach Überprüfung der signifikanten Spots in Bezug auf Güte der Spotdetektion, 3D-Visualisierung und Intensitäten in den einzelnen Gelreplikaten wurden 14 der 38 Spots als zuverlässig signifikant eingestuft. Die restlichen 24 Spots wurden für die weitere Analyse nicht berücksichtigt. Die Positionen der 14 „zuverlässigen“ Proteine im 2D-Gelbild sind in Abbildung 44 unter Angabe der Spot-ID in einem ökologischen und einem konventionellen Gelreplikate dargestellt.

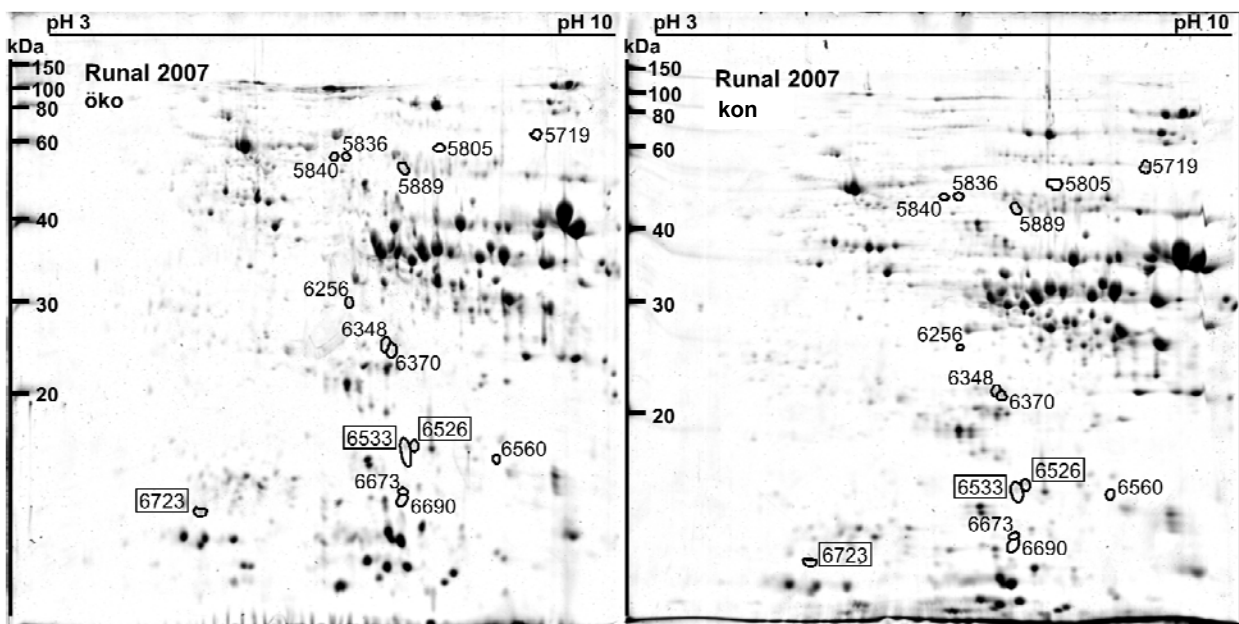
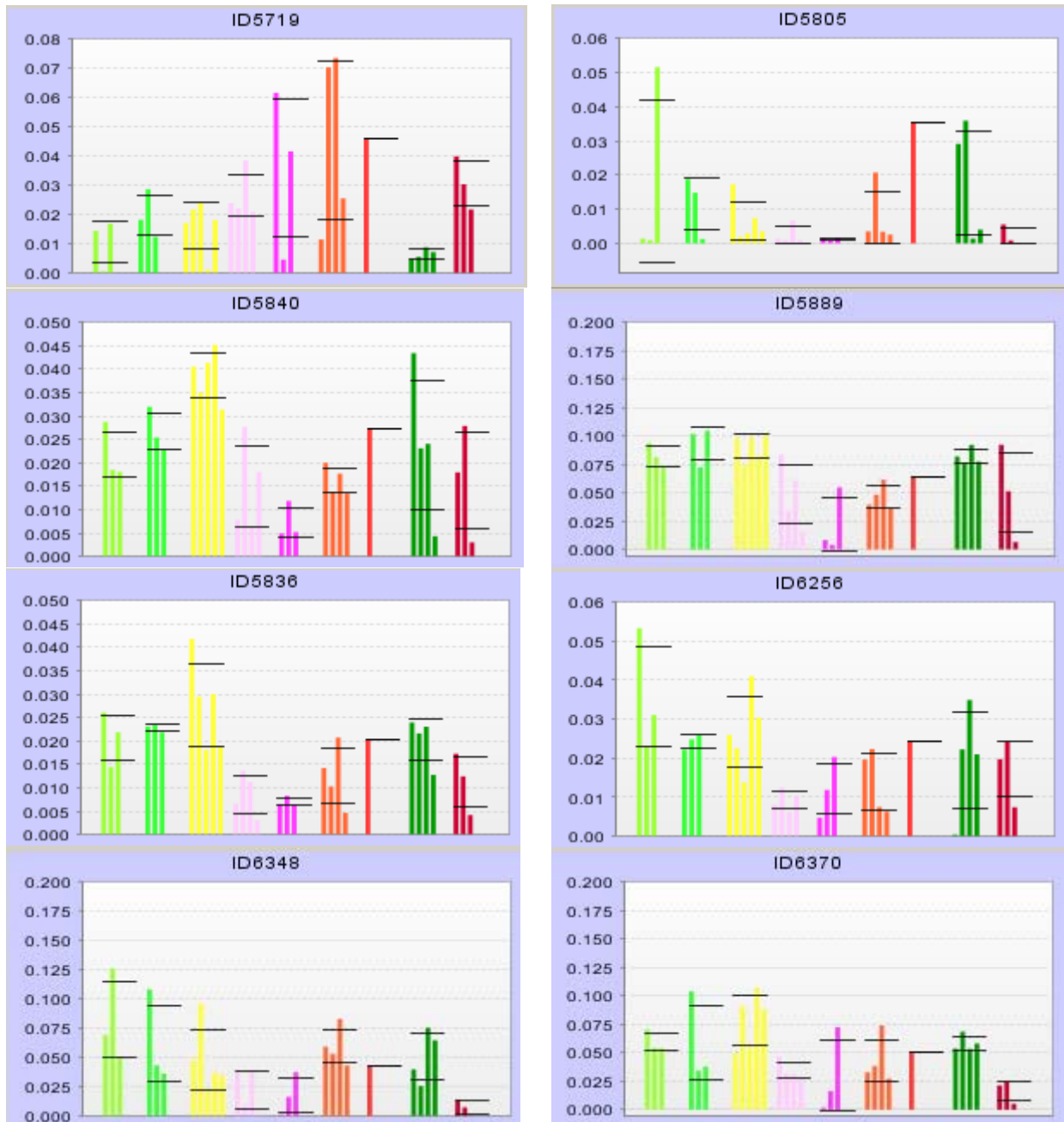


Abbildung 44: Elektrophoretische Trennung der Proteine der Sorte Runal aus dem Erntejahr 2007.

Auftrennung von Weizenkornproteinen durch kombinierte isoelektrische Fokussierung und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Aufgetrennt wurden 300 Mikrogramm Gesamtprotein aus Weizenschrot; Molekulargewicht (kDa) vertikal; pH-Wert horizontal. Die Spoterkennung mit Zuweisung der ID erfolgte auf einem Fusionsgel aller Replikate aus konventioneller und ökologischer Anbauart. Markierte Proteine weisen nach dem t-Test einen signifikanten Unterschied zwischen den Replikaten beider Anbauarten auf ($p \leq 0.05$). Hervorgehobene IDs zeigen Proteine mit Datenbankzuweisungen nach Mascot-Datenbanksuche. Dargestellt sind beispielhafte Replikate aus ökologischer (links) und konventioneller Anbauart (rechts).

Von den 14 signifikanten Proteinen zeigt lediglich das Protein ID 5719 erhöhte Werte in den Replikaten der konventionellen Anbauart (Abbildung 45). Bei den 13 anderen Proteinen weisen die Intensitäten insgesamt höhere Werte in den Replikaten der ökologischen Anbauart auf. In Abbildung 45 sind die Spotintensitäten von elf der 14 signifikanten Proteine dargestellt. Die Intensitäten der drei weiteren Proteine (Spot-ID 6723, ID 6526 und ID 6533) werden im Folgenden unter „Proteinidentifikation via MALDI-TOF-MS und Datenbankabfrage“ gesondert betrachtet.



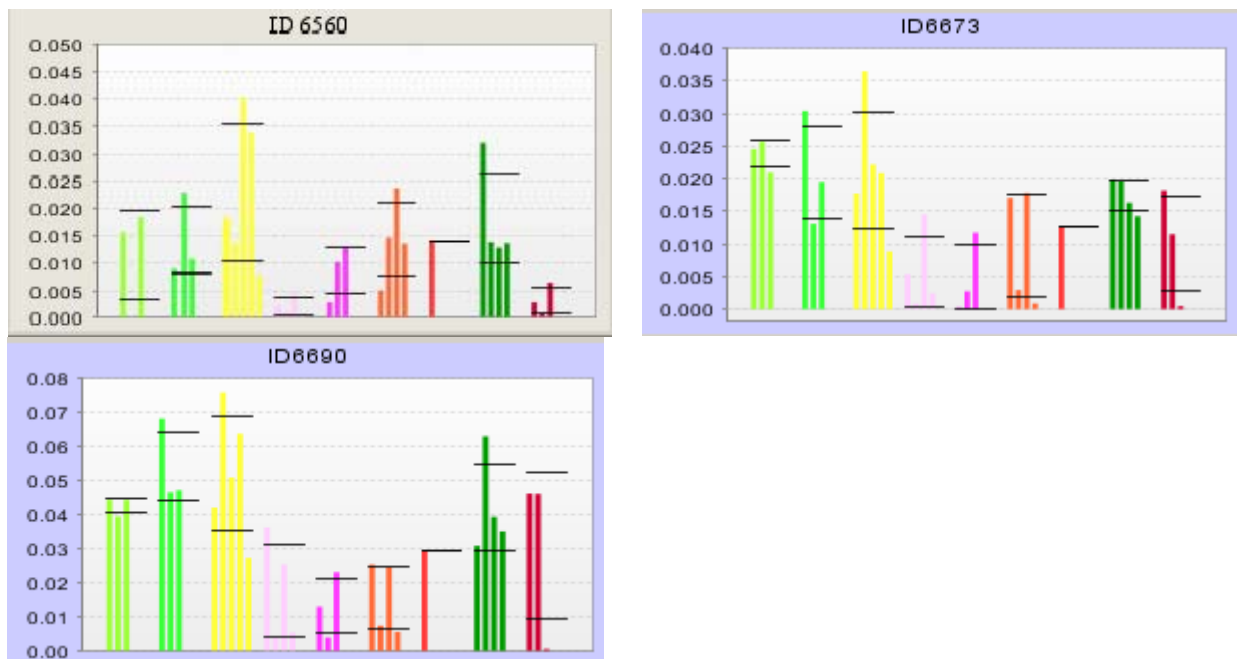


Abbildung 45: Konzentration spezifischer Proteine („Spotintensitäten“) mit signifikant unterschiedlicher Abundanz. Proteine in Weizenproben aus unterschiedlichem Anbau.
 Y-Achse: Spotintensität, relative Einheiten. X-Achse: Replikate der Sorte Runal 2007.
 Grüngelbe/hellgrüne/gelbe/dunkelgrüne Balken: Replikate aus ökologischem Anbau.
 Dunkelrote/rosa/pink/orange Balken: Replikate aus konventionellem Anbau. Hellroter Balken: Intensität des Proteinspots auf dem Fusionsgel aller Replikate.

3.4.4.2 Proteinidentifikation via MALDI-TOF-MS/MS und Datenbankabfrage

Aus ausgewählten 2D-Gelen der Sorte Runal wurden Proteine nach tryptischem Verdau massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF-MS/MS analysiert. Drei identifizierte Spots (ID 6723, ID 6526 und ID 6533) weisen nach dem t-Test signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den Gelreplikaten aus konventionellem und ökologischem Landbau auf ($p \leq 0.05$). Diese Spots werden im Folgenden näher beschrieben. Eine Gesamtübersicht über die identifizierten Proteine folgt im Kapitel 3.4.4.4.

Spot-ID 6723

Der markierte Bereich in der 3D-Ansicht zeigt den Bereich der Spotdetektion für die Protein ID 6723 auf dem Fusionsbild aller Replikate der Sorte Runal 2007 (Abbildung 46 A). Das Protein zeigt eine Erhöhung in der ökologischen Anbauart in einem Intensitätsbereich von 0 bis 0,125 relativen Einheiten (Abbildung 46 B).

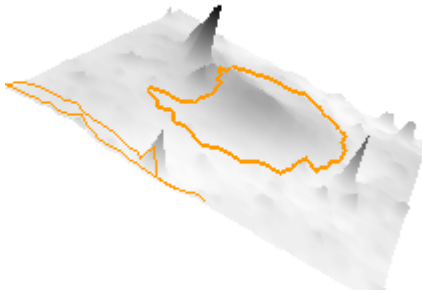
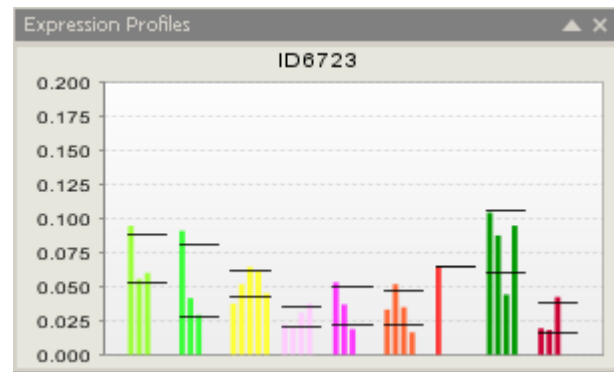
A**B**

Abbildung 46: Quantifikation des Proteins Spot-ID 6723 aus ökologischem bzw. konventionellem Anbau im Erntejahr 2007. A: 3D-Ansicht. Detektierter Spot ist stark orange umrandet. B: Expressionsprofile aller Gelreplikate: Y-Achse: Spot-Intensität, relative Einheiten. X-Achse: Replikate der Sorte Runal 2007. Grüngelbe/hellgrüne/gelbe/dunkelgrüne Balken: Replikate aus ökologischem Anbau. Dunkelrote/rosa/pink/orange Balken: Replikate aus konventionellem Anbau. Hellroter Balken: Intensität des Proteinspots auf dem Fusionsgel aller Replikate.

Aus einem ausgewählten 2D-Gelbild wurde dieser Spot herausgepickt, tryptisch zu Peptiden verdaut und anschließend mittels MALDI-TOF-MS/MS analysiert. Der Peptide Mass Fingerprint (PMF, Abbildung 47 A) alleine lieferte keinen Treffer bei der Datenbankabfrage mithilfe der Mascot-Software. Jedoch konnte mit der im PMF detektierten, intensivsten Masse (1861.8402 m/z) im MS/MS-Modus (Abbildung 47 B) ein Fragmentspektrum aufgenommen werden, welches durch Datenbankabgleich dem Protein „B5B0D5: Major allergen CM16 OS = Triticum aestivum“ – entspricht einem α -Amylase/Trypsininhibitor – zugeordnet wurde (Abbildung 48). Die dem Fragmentspektrum entsprechende Sequenz ist in Abbildung 48 rot markiert.

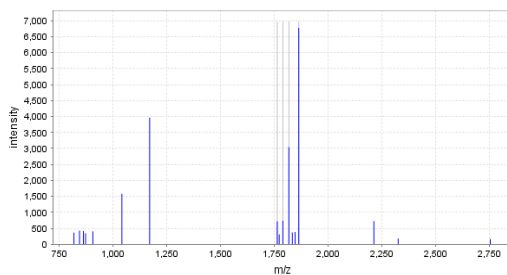
A**B**

Abbildung 47: MALDI-TOF-MS/MS-Spektren des Proteins aus Spot-ID 6723. A =Peptide Mass Fingerprint (PMF). B = MS/MS Ion Search (MIS). Identifizierung via MIS: Datenbank Triticum. Precursor 1861.8402 m/z

Protein: B5B0D5Major allergen CM16 OS = *Triticum aestivum* PE = 2 SV = 1MASESNCVLLLA AVLVSIFA AVAAIGNEDCTP WMSTLITPLPSCR DYVEQQACRIETPGSP
YLA KQQCCGELANIPQQRCQALRYFMGPKSRPDQSGLMELPGCPREVQMD FVRILVT
PGYCNLTTVHNTPYCLAMEESQWS

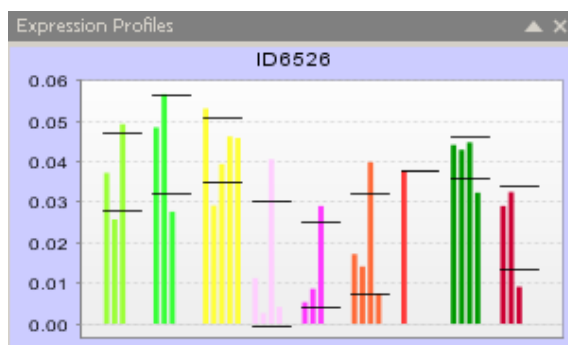
Legend: selected peptide hit/other (annotated) peptide hits

Coverage: 29.4 % (7 peptides)

Abbildung 48: Datenbankzuweisung des Proteins in Spot-ID 6723. Zuweisung erfolgte automatisiert mithilfe der Mascot-Datenbankabfrage auf Basis der detektierten rot markierten Peptidsequenz nach Messung im MS-Modus auf dem Precursor 1861.8402 m/z.

Spot-ID 6526

Abbildung 49 zeigt die 3D-Ansicht und die Spotintensitäten des Proteins ID 6526. Insgesamt zeigen sich auch hier höhere Werte in den Replikaten aus ökologischer Anbauart. Die stärkste Intensität in diesem Spot (circa 0,06 relative Einheiten) ist nahezu um die Hälfte geringer als die stärkste Intensität im Spot 6723.

A**B****Abbildung 49: Quantifikation des Proteins in Spot-ID 6526 aus ökologischem bzw.**

konventionellen Anbau im Erntejahr 2007. A: 3D-View. Detektierter Spot ist stark orange umrandet. B: Expressions-Profile aller Gelreplikate. Y-Achse: Spot-Intensität, relative Einheiten. X-Achse: Replikate der Sorte Runal 2007. Grüngelbe/hellgrüne/gelbe/dunkelgrüne Balken: Replikate aus ökologischem Anbau. Dunkelrote/rosa/pink/orange Balken: Replikate aus konventionellem Anbau. Hellroter Balken: Intensität des Proteinspots auf dem Fusionsgel aller Replikate.

Der aus ausgewählten Gelen entnommene und massenspektrometrisch analysierte Spot mit der ID 6526 wurde ebenfalls im MS/MS-Modus untersucht und Datenbankhits zugewiesen. In diesem Fall ergaben sich für die Spot-ID 6526 drei verschiedene Treffer aus der Datenbank, nämlich „High mobility globular protein“, „Cyclophilin“ und „Avenin-like protein“. Die nicht eindeutige Identifizierung kann mehrere Ursachen haben. Zum einen stammen die Treffer aus der massenspektrometrischen Analyse zwei verschiedener 2D-Gelreplikate. Möglicherweise wurden wegen Lauf- und Färbedifferenzen in den beiden verschiedenen Gelreplikaten nicht exakt die gleichen Spots erfasst. Zum anderen erfolgt bei der MALDI-TOF-MS/MS ein viermaliger Laserbeschuss der gleichen Position des MALDI-Targets. Hier kann es zum Herauslösen unterschiedlicher Peptidsequenzen in den vier Messschritten kommen, wenn eine

Überlagerung zweier verschiedener Proteine in einem Spot vorlag. Dies könnte bei einer Kombination der Fall sein. Eine eindeutige Zuordnung zu einem der drei Datenbanktreffer ist in diesem Fall ohne eine weitere analytische Abklärung nicht möglich.

Spot-ID 6533

Das Protein ID 6533 weist insgesamt die höchsten Spotintensitäten der drei identifizierten Spots auf (Abbildung 50). Die Intensitäten liegen im Bereich von 0 bis 0,155 (relative Einheiten). Ebenso wie bei den beiden zuvor dargestellten Proteinspots sind hier höhere Intensitäten in den Replikaten aus ökologischem Landbau auszumachen.

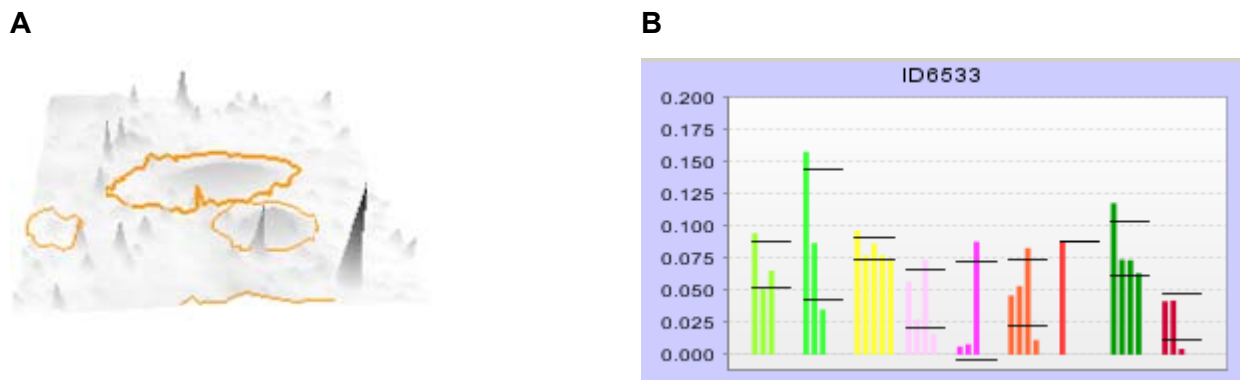


Abbildung 50: Quantifikation des Proteins in Spot-ID 6533 aus ökologischem bzw. konventionellen Anbau im Erntejahr 2007. A: 3D-View. Detektierter Spot ist stark orange umrandet. B: Expressions-Profile aller Gelreplikate. Y-Achse: Spot-Intensität, relative Einheiten. X-Achse: Replikate der Sorte Runal 2007. Grüngelbe/hellgrüne/gelbe/dunkelgrüne Balken: Replikate aus ökologischem Anbau. Dunkelrote/rosa/pink/orange Balken: Replikate aus konventionellem Anbau. Hellroter Balken: Intensität des Proteinspots auf dem Fusionsgel aller Replikate.

Die massenspektrometrische Proteinidentifizierung von Spot-ID 6533 erfolgte wie zuvor beschrieben: Mit der im PMF detektierten Masse (1561.733 m/z, Abbildung 51 A) wurde im MS/MS-Modus (Abbildung 51 B) ein Fragmentspektrum aufgenommen, welches durch Datenbankabgleich dem Protein „Endogenous α -amylase/subtilisin inhibitor,“ zugeordnet werden konnte (Abbildung 52). Die dem Fragmentspektrum entsprechende Sequenz ist in Abbildung 52 rot markiert.

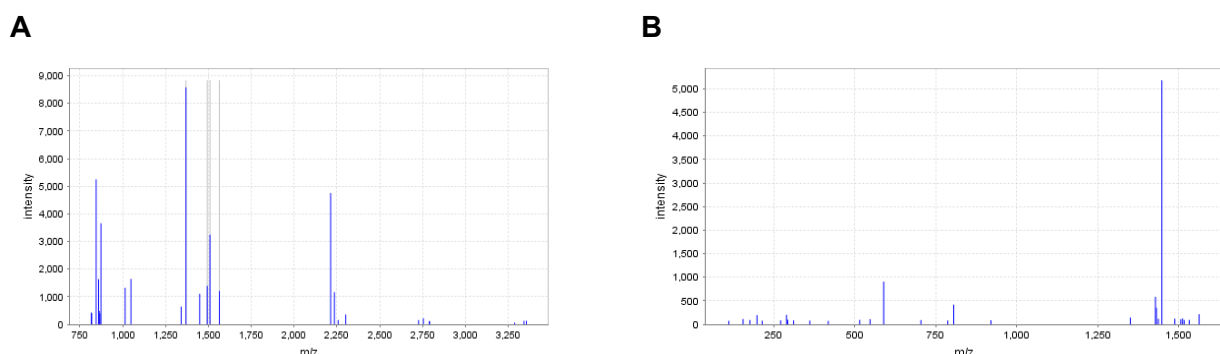


Abbildung 51: MALDI-TOF-MS/MS-Spektren des Proteins aus Spot 6533. A = Peptide Mass Fingerprint (PMF). B = MS/MS Ion Search (MIS). Identifizierung via MIS: Datenbank Triticum. Precursor 1561.733 m/z.

Protein: P16347Endogenous α -amylase/subtilisin inhibitor OS=Triticum aestivum PE=1 SV=1DPPPVHDTDGNELRADANYVLPANRAHGGGLTMAPGHGRRCP LFVSQEADGQRDGLPVRI
APHGGAPSDKIIRLSTDVRI SFRAYTTCVQSTEW HIDSELVSGRRHVITGPVRDPSPSGRENAF
RIEKYSGAEVHEYKLMACGDSCQDLGVFRDLKGGAWFLGATEPYHVVVFKKAPPA

Legend: selected peptide hit / other (annotated) peptide hits

Coverage: 21.7 % (5 peptides)

Abbildung 52: Datenbankzuweisung des Proteins ID 6533. Zuweisung erfolgte automatisiert mithilfe der Mascot-Datenbankabfrage auf Basis der detektierten rot markierten Peptidsequenz nach Messung im MIS-Modus auf dem Precursor 1561.733 m/z.

3.4.4.3 Analyse der Sorte Runal aus den Anbaujahren 2009 und 2010

Im Erntejahr 2009 wurden in der Sorte Runal insgesamt 830 Proteinspots auf dem Fusionsgel aller Replikate detektiert (ohne Abbildung). Die Auswertung der Spotintensitäten ergab, dass in diesem Erntejahr kein Spot signifikante Unterschiede zwischen ökologischer und konventioneller Anbauform aufwies.

Im Erntejahr 2010 konnten für die Sorte Runal insgesamt 815 Proteinspots auf dem Fusionsgel aller Replikate detektiert werden. Drei dieser 815 Spots zeigen einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen den Replikaten der konventionellen und ökologischen Anbauformen ($p \leq 0.05$ im t-Test). Die Positionen der signifikanten Proteine sind in Abbildung 53 unter Angabe der Spot-ID in einem exemplarischen 2D-Gelbild dargestellt.

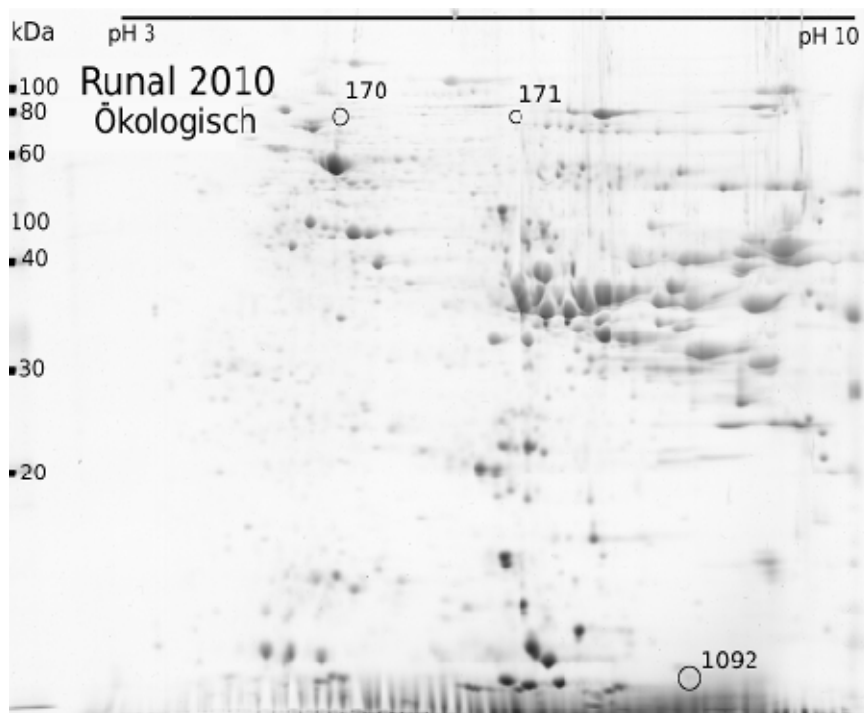


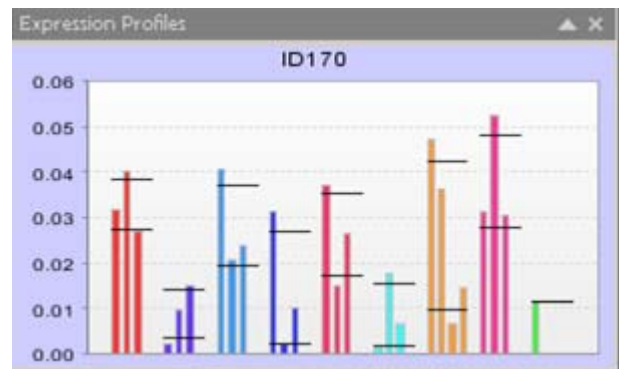
Abbildung 53: 2D-Gelbild der elektrophoretischen Trennung der Proteine der Sorte Runal aus dem Erntejahr 2010. Die Spoterkennung mit Zuweisung der ID erfolgte auf einem Fusionsgel aller Replikate aus konventioneller und ökologischer Anbauart. Markierte Proteine weisen nach dem t-Test einen signifikanten Unterschied zwischen den Replikaten beider Anbauarten auf ($p \leq 0.05$).

Die Proteine ID 170 und ID 171 wiesen höhere Intensitäten in den Replikaten aus ökologischem Anbau auf, Protein ID 1092 zeigte hingegen höhere Intensitäten in den Replikaten aus konventionellem Anbau (Abbildung 54). Die drei signifikanten Spots zeigten große Intensitätsunterschiede in den Intensitäten auf. Die höchsten Spotintensitäten waren im Protein ID 1092 vorhanden, mit Werten bis zu 0,125 relativen Einheiten (Abbildung 54 F). Die geringsten Intensitäten zeigen sich im Protein ID 171 mit Maximalwerten bis zu 0,0125 relativen Einheiten (Abbildung 54 D). Protein ID 170 lag mit Maximalintensitäten von bis zu 0,06 relativen Einheiten über den Werten des Proteins ID 171, aber noch deutlich unter den Maximalwerten des Proteins ID 1092 (Abbildung 54 B).

A



B



C



D



E



F

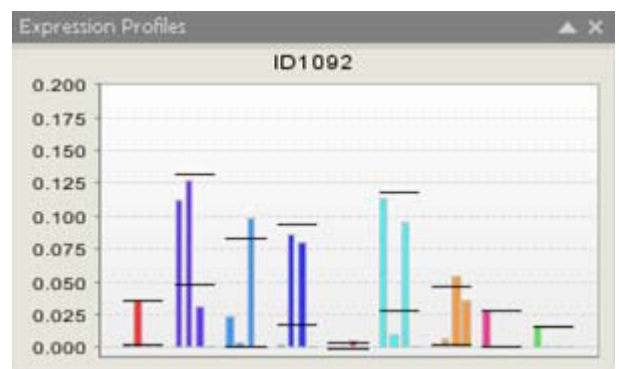


Abbildung 54: Quantifikation des Proteins aus Spot-ID 1092. A/C/E: 3D-Ansicht signifikanter Spots aus der Sorte Runal aus der Ernte 2010. Ein detektierter Spot ist stark orange umrandet. B/D/F: Expressions-Profile aller Gelreplikate. Y-Achse: Spotintensität, relative Einheiten. X-Achse: Replikate der Sorte Runal 2010. Hellblaue/dunkelblaue/eisblaue/lila Balken: Replikate aus konventionellem Anbau. Hellrote/rote/pink/orange Balken: Replikate aus ökologischem Anbau. Hellgrüner Balken: Intensität des

Proteinspots auf dem Fusionsgel aller Replikate. A, B: Spot-ID 170; C, D: Spot-ID 171; E, F: Spot-ID 1092.

Den signifikanten Spots aus der Ernte 2010 konnten keine Datenbanktreffer aus der Proteinanalyse mittels MALDI-TOF-MS/MS zugeordnet werden.

Beim Vergleich der Protein-Profile der Jahrgänge 2007, 2009 und 2010 fällt zunächst auf, dass im Verhältnis zur Gesamtzahl mehrerer Hundert detektierter Proteine nur sehr wenige Proteine mit signifikanten Konzentrationsunterschieden in ökologischem und konventionellem Weizen gefunden wurden. Weiterhin waren die Unterschiede über die drei Jahrgänge nicht konstant: 14 signifikanten Proteinen aus 2007 stehen drei signifikante Proteine aus 2010 gegenüber, dabei war keins dieser Proteine in den beiden Jahren identisch. Auch mit dem Jahr 2009 gab es keine Übereinstimmungen; signifikante Proteine wurden gar nicht detektiert. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass jahreszeitliche Effekte einen wesentlich größeren Einfluss auf die Proteinkonzentration haben als die Anbaumethode. Eine weitere Einordnung dieser Ergebnisse, auch im Hinblick auf die Zielsetzung des Projekts, erfolgt im Zusammenhang mit der Analyse des Sortenversuchs im Kapitel 3.4.4.5.

3.4.4.4 Gesamtübersicht der in der Sorte Runal identifizierten Proteine

Zur Identifizierung von Proteinen und somit zur Charakterisierung des Weizenproteoms wurden insgesamt 658 Proteine aus ausgewählten 2D-Gelbildern massenspektrometrisch via MALDI-TOF-MS/MS analysiert. Die Datenbankabfrage mithilfe der Mascot-Software lieferte 278 Proteinidentifizierungen. 167 dieser identifizierten Proteine konnten den auf einem Fusionsbild der Sorte Runal ermittelten Spots zugewiesen werden (Abbildung 55). Eine tabellarische Beschreibung der dargestellten, identifizierten Proteine ist in einer separaten Datei auf Organic eprints verfügbar. Die unter Abschnitt 3.4.4.1 in der Sorte Runal identifizierten Proteine ID 6526, ID 6533 und ID 6723 entsprechen den Proteinen Nr. 122, 123 und 147 in Abbildung 55.

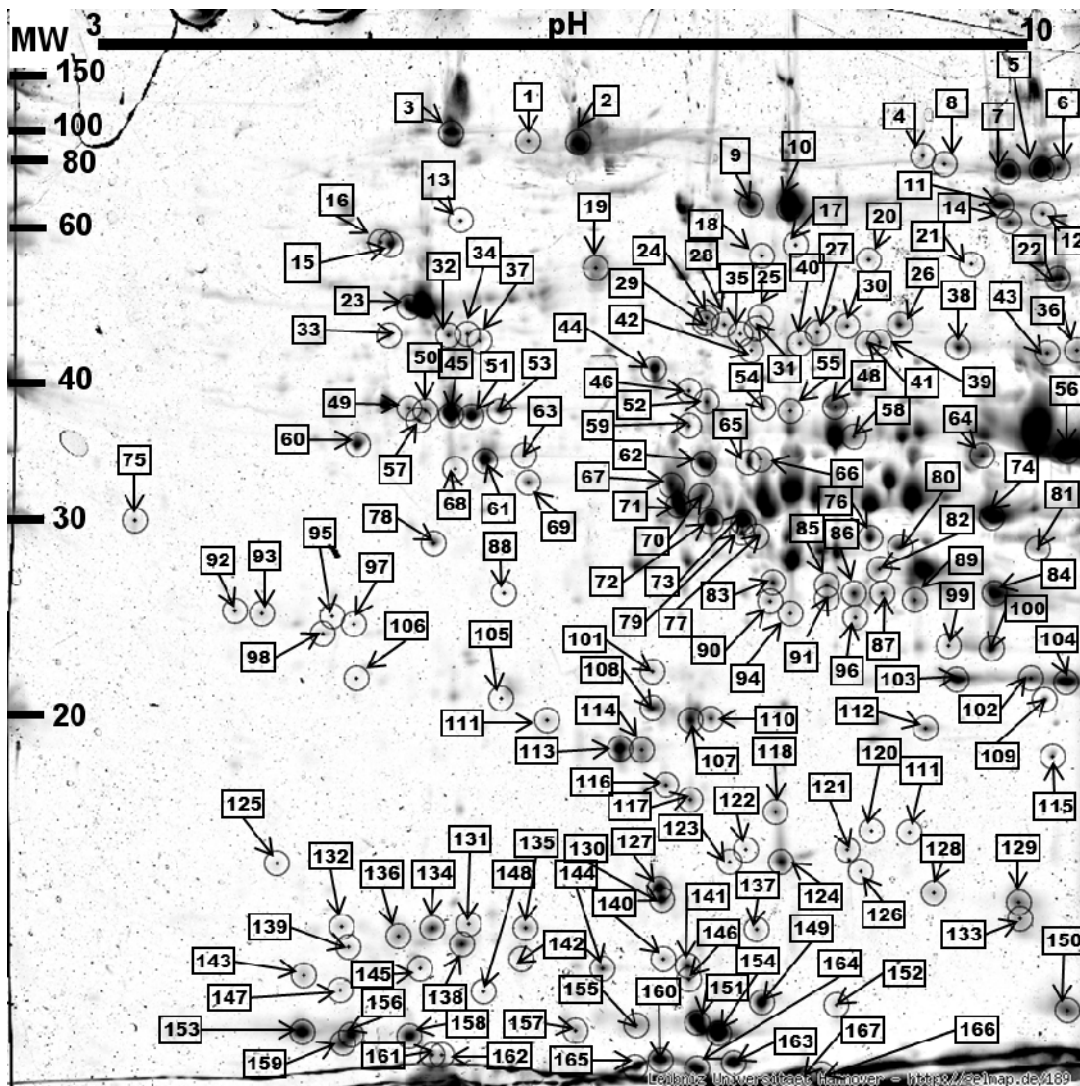


Abbildung 55: Identifizierte Proteine im Weizenproteom der Sorte Runal. Identifizierte Proteine sind in einem mit der Software Delta-2D aus allen Replikaten der Sorte Runal, Ernte 2007, erstellten Fusionsbild markiert. Eine Beschreibung der identifizierten Proteine befindet sich in Tabelle A1 (als separate Datei auf Organic eprints verfügbar).

3.4.4.5 Der Sortenvergleich aus dem Anbaujahr 2007

Für den Sortenvergleich aus dem Erntejahr 2007 standen die zehn Weizensorten Probus, Scaro, DJ 9714, Antonius, Rouge de Bordeaux, CCP, Sandomir, Mont Calme 245, Caphorn und Titlis zur Verfügung. Von jeder Sorte wurden die biologischen Feldreplikate zu je einem ökologischen und einem konventionellen Pool zusammengefasst. Aus den Poolproben jeder Sorte wurden jeweils drei technische Gelreplikate erstellt, sodass zur Analyse von jeder Sorte je drei konventionelle und drei ökologische 2D-Gelbilder zur Verfügung standen. Die Proteinspots wurden auf Fusionsgelen aus allen ökologischen und konventionellen 2D-Gelbildreplikaten detektiert. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen Mittelwertvergleich von Spotintensitäten der ökologischen und konventionellen Poolreplikate. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden dieser Tabelle ebenfalls die Ergebnisse des Jahresvergleichs der Sorte Runal hinzugefügt.

Tabelle 17: Ergebnis des Sortenvergleichs der 10 Weizensorten aus der Ernte 2007 und des Jahresvergleichs der Sorte Runal aus den Erntejahren 2007, 2009 und 2010. Proteine mit einer zwischen den Anbauarten um den Faktor 2 differierenden Spotintensität wurden zur Überprüfung der Signifikanz mittels t-Test herangezogen. Um tatsächliche differenzielle Spots von Artefakten zu unterscheiden, wurde eine visuelle Prüfung unter Berücksichtigung der 3D-Ansicht der Proteinspots durchgeführt. Bei der Prüfung wurden sowohl Vorkommen, Spotform als auch Intensität der signifikanten Proteinspots in den einzelnen Gelbildreplikaten aller Sorten berücksichtigt.

Sorte	Ernte	Gesamtzahl detektierter Spots	Spots mit 2-facher Differenz	Signifikanz 99 %	Signifikanz 95 %	Differenzielle Spots nach visueller Prüfung	Identifizierte Proteine
Probus	2007	937	475	31	80	10	5
Scaro	2007	879	264	4	18	2	1
DJ 9714	2007	831	196	5	17	5	4
Antonius	2007	889	445	47	119	19	5
Rouge de Bordeaux	2007	778	201	1	5	2	0
CCP	2007	742	204	2	5	1	0
Sandomir	2007	739	271	8	17	4	1
Mont Calme 245	2007	777	202	1	5	1	1
Caphorn	2007	813	94	2	8	4	1
Titlis	2007	1081	272	7	23	8	2
Runal	2007	845	113	15	38	14	3
Runal	2009	830	16	0	0	0	0
Runal	2010	518	29	1	3	3	0

Die in den Fusionsbildern der verschiedenen Sorten insgesamt detektierten Spots liegen zwischen 739 bei Sandomir und 1081 bei Titlis. Betrachtet man den Jahresvergleich mit der Sorte Runal zusätzlich, weist diese Sorte aus dem Anbaujahr 2010 mit lediglich 518 Spots die geringste Anzahl insgesamt detektierter Spots auf. Die Anzahl von Proteinspots mit signifikanten Unterschieden zwischen den Anbauarten variierte zwischen den Sorten und auch in den drei überprüften Jahrgängen der Sorte Runal stark. Im Sortenversuch wurden minimal ein differenzieller Spot für Mont Calme sowie CCP und maximal 19 differenzielle Spots für Antonius gefunden. In einem ähnlichen Bereich bewegten sich die signifikant verschiedenen Spots im Jahresvergleich der Sorte Runal (Tabelle 17).

In den einzelnen Sorten als verlässlich eingestufte differenzielle Proteinspots sind unter Angabe der sortenspezifischen Spot-ID in Tabelle 18 gelistet. Die Positionen der Proteinspots in den entsprechenden Fusionsbildern ist in einer separaten Datei zu entnehmen (verfügbar auf Organic eprints). Einige Proteine in den individuellen Sorten konnten durch einen visuellen Abgleich der Spotpositionen mit dem Fusionsbild der Sorte Runal aus dem Jahr 2007 (Abbildung 55) provisorisch identifiziert werden. Entsprechenden Proteinen sind in Tabelle 18 Nummern in Klammern zugewiesen, die mit den Nummern aus Abbildung 55 korrespondieren. Eine Aufstellung der provisorisch identifizierten Proteine ist in Tabelle 19 gegeben.

Tabelle 18: In ökologischer und konventioneller Anbauart signifikant differenzielle Proteine in verschiedenen Weizensorten aus dem Erntejahr 2007. Die sortenspezifischen Spot-IDs sind angegeben. Identifizierte Proteine wurden in Klammern mit der Nummer der entsprechenden Proteinspots aus Abbildung 55 versehen. Über Sortengrenzen hinweg identische Proteine, die in der gleichen Anbauart signifikant unterschiedlich waren, sind dunkel hinterlegt.

Mont Calme 245	Antonius	Scaro	Probus	Titlis	Sandomir	DJ 9714	Caphorn	CCP	Rouge de Bordeaux
376 (12)	6696 (12)	3490 (27)	2558 (89)	14149 (121)	12175	4724	152	10453	8202
	7591 (154)	3387	1980	14262	12092 (98)	4660	526		8904
	7550 (151)		2629 (108)	13498	11871	4757 (17,18)	1008		
	7566		2859 (142)	13468	12135	4647 (9)	1083 (149)		
	7658		2889	13505		4819 (20)			
	7259 (112)		2956 (160)	13691					
	7251		2243 (66)	14267 (137)					
	7016		2352	13665					
	6962		2857	14262					
	7053		2407						
	7258								
	7008								
	7292								
	7287								
	6912								
	6955								
	6903								
	6407 (6)								
	6464								

Wie schon im Dreijahresvergleich der Sorte Runal festgestellt, zeigte sich insgesamt ein inhomogenes Bild der in den einzelnen Sorten differenziell auftretenden Proteine. Dies gilt sowohl hinsichtlich der Anzahl als auch der Proteinart. Nur in drei Fällen konnten über zwei Sorten hinweg identische, in den gleichen Anbauarten signifikant unterschiedliche Proteine gefunden werden. So entspricht das Protein ID 6696 aus Antonius dem Protein ID 376 aus Mont Calme 245. Dies ist das einzige in zwei Sorten vorkommende Protein, das identifiziert werden konnte. Es handelt sich um ein Protein mit Ähnlichkeit zu einer „Nicht-Ribosomalen Peptid Synthetase“, das in beiden Sorten in der konventionellen Anbauart signifikant erhöht war, siehe Nr. 12 in Tabelle 19. Des Weiteren entspricht das Protein ID 1980 (Probus) dem Protein ID 3387 (Scaro) und ID 4724 (DJ 9714) entspricht ID 152 (Caphorn), siehe Tabelle 18.

Für dieses heterogene Ergebnis ergibt sich eine Erklärungsmöglichkeit aus der provisorischen Proteinidentifizierung der insgesamt im untersuchten Sortenpool differenziell auftretenden Proteine. Die überwiegende Mehrheit dieser Proteine besitzt im Weizen eine Protein-Speicherfunktion (Shewry et al., 2009), wobei drei verschiedene Klassen an Speicherproteinen in Tabelle 19 auffallen: Klasse 1) vier Proteine, die in den engen Verwandtschaftskreis der Glutenine und Gliadine fallen (Nr. 6; 9; 66; 121), Klasse 2) fünf α -Amylase Inhibitoren, auch CM-Proteine genannt (Nr. 123; 147; 151; 154; 160) und Klasse 3) acht Globulin-Proteine, die zu den 7S Speicherglobulinen gehören und in der Aleuronschicht und im Weizenembryo gefunden werden (Nr. 17; 18; 20; 27; 89; 137; 142; 149). Auffällig ist, wie die Expressionsmuster der drei Proteingruppen in den Anbauarten ausfallen. Die Klasse 1 Proteine, Glutenine, Gliadine und Avenin-ähnliche, sind in sämtlichen Fällen im konventionellen Anbau erhöht, die Klasse 2

Proteine, α -Amylase Inhibitoren, sind ausschließlich im ökologischen Anbau erhöht, und die Klasse 3 Proteine, 7S Speicherglobuline, bieten kein einheitliches Expressionsbild hinsichtlich der Anbauart. Für das Expressionsmuster der Klasse 1 ergibt sich eine plausible, pflanzenphysiologische Erklärung: Glutenine und Gliadine werden bei sehr guter und schnell verfügbarer Stickstoffversorgung der Weizenpflanzen vermehrt im Korn gebildet. Korrespondierend mit dem gefundenen Proteinexpressionsmuster treffen diese Bedingungen insbesondere auf den konventionellen Anbau zu. In Bezug auf die Lebensmittelherstellung sind Glutenine und Gliadine Proteine, die für die Backfähigkeit von Weizenmehl sehr wichtig sind. Die menschliche Ernährung betreffend ist anzumerken, dass Menschen, die an Zöliakie leiden, diese Proteine vollständig meiden müssen. Die Klasse 2 Proteine, diverse α -Amylase Inhibitoren, haben neben der Proteinspeicherfunktion auch eine Aufgabe in der Abwehrstrategie der Pflanzen gegen Fressfeinde (hauptsächlich diverse adulte und larvale Insekten). Hinsichtlich der menschlichen Ernährung sind verschiedene α -Amylase Inhibitoren als Auslöser für Bäckerasthma, Lebensmittelallergie und Dermatitis bekannt (Shewry et al., 2009). Der Trend, dass α -Amylase Inhibitoren im ökologischen Weizen erhöht waren, wurde bei den verschiedenen Sorten ausschließlich im Anbaujahr 2007 gefunden. Dagegen waren in den Jahren 2009 und 2010 bei Runal und in den Jahren 2003 und 2005 in der Weizensorte Titlis (Zörb et al., 2009) α -Amylase Inhibitoren beim Vergleich von ökologischem und konventionellem Weizen nicht auffällig. Daher ist das Ergebnis als charakteristisch für das Anbaujahr 2007 zu betrachten. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die identifizierten Proteine fast ausschließlich Speicherproteine umfassen. Die Speicherproteine konnten in drei Klassen gruppiert werden, von denen eine ausschließlich in konventioneller und eine ausschließlich in ökologischer Anbauart erhöht war. Das inhomogene Bild auf der Ebene der Expression der individuellen Proteine in den verschiedenen Sorten wird dadurch relativiert, dass sich fast alle betroffenen und identifizierten Proteine zu wenigen Speicherproteinklassen zusammenfassen lassen.

Als Fazit ist weiterhin festzustellen, dass die 16 Proteine, die über zwei Anbaujahre (2003, 2005) bei der Sorte Titlis stabil differenziell zwischen ökologisch und konventionell waren (Zörb et al., 2009), in den Arbeiten hier nicht als signifikant unterschiedlich gefunden wurden. Eine bessere Korrelation ergibt sich, wenn auch in diesem Fall die betroffenen Proteinklassen betrachtet werden. In der Arbeit von Zörb et al. (2009) gehörten 50 % der identifizierten Proteine zu den Speicherproteinen der oben beschriebenen Klasse 1, die sämtlich im konventionellen Weizen signifikant erhöht waren. In diesem Aspekt korrelieren die Arbeiten aus 2003/2005 und aus dem Sortenversuch 2007 gut.

In der Gesamtschau ist zu bilanzieren, dass individuelle, signifikant differenzielle Proteine eine hohe Sorten- und Jahresvariation zwischen ökologischen und konventionellen Proben aufweisen. Dagegen konnten in einigen Anbaujahren und auch über Sortengrenzen hinweg stabile Expressionsunterschiede bei Betrachtung der zu den Speicherproteinen gehörenden Glutenine, Gliadine und Avenin-ähnlichen-Proteine gefunden werden. Weitergehende Forschungsarbeiten können klären, ob eine sichere Unterscheidung von ökologischem und konventionellem Weizen auf Basis der Analyse von Proteinklassen wie Speicherproteinen möglich ist.

Tabelle 19: Proteinidentitäten im Sortenversuch. Proteine aus dem Sortenversuch wurden durch visuellen Abgleich der Spotpositionen mit dem Fusionsbild der Sorte Runal aus dem Jahr 2007 provisorisch identifiziert. Mehrfachnennungen bei einigen Spot-IDs wurden beibehalten, wenn eine eindeutige Zuweisung ohne weitergehende massenspektrometrische Analyse nicht möglich war. Details zur Proteinidentifikation sind Abbildung 55 zu entnehmen.

Nummer im Fusionsbild	Beschreibung	Abkürzung	Signifikant erhöht in Anbauart	Signifikant erhöht in Sorte
6	Glu-B1-1b HMW glutenin subunit	HMW Glu-B1-1b	kon	Antonius
9	Y-type HMW glutenin	HMW Y-type	kon	DJ 9714
12	Weakly similar to Non-ribosomal peptide synthetase modules and related proteins-like	N-rpsm	kon	Antonius, Mont Calme 245
17	Similar to Embryo globulin	EG (17)	öko	DJ 9714
18	Similar to Embryo globulin	EG (18)	öko	DJ 9714
20	Globulin 3	Glob3	kon	DJ 9714
27	Similar Embryo globulin	EG (27)	kon	Scaro
66	α -gliadin	AG (66)	kon	Probus
89	Globulin 1	Glob1	kon	Probus
98	Similar to late embryogenesis abundant protein D-34-like	D-34	kon	Sandomir
108	Peroxiredoxin	Perox	öko	Probus
112	Homologue to Thaumatin-like protein	Thaum	kon	Antonius
121	Putative avenin-like	Av (121)	kon	Titlis
122a	High mobility globular protein	HMG	öko	Runal
122b	Cyclophilin	Cyc		
122c	Similar to Avenin-like protein	Av (122)		
123	Endogenous α -amylase/subtilisin inhibitor	EndAA	öko	Runal
137	Globulin 3C	Glob3C	kon	Titlis
	Similar to Embryo globulin	EG (137)		
142	Globulin 3B	Glob3B	öko	Probus
147	α -Amylase/Trypsin Inhibitor	CM16	öko	Runal
149	Similar to Embryo globulin	EG (149)	kon	Caphorn
151	α -amylase/Trypsin inhibitor	CM3	öko	Antonius
154	α -amylase/Trypsin inhibitor	0.19	öko	Antonius
160	α -amylase/Trypsin inhibitor CM 1 oder CM 2	CM1/CM2	öko	Probus

3.4.5 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse der auf 2D-GE basierten Proteomanalysen sind in drei Anbaujahren und beim Vergleich von 10 weiteren Sorten in einem Anbaujahr auf Basis von individuellen Proteinen nicht konstant genug, um einen Biomarker für die Anbauart identifizieren zu können. Ein positives Ergebnis ist, dass auch im Vergleich mit Arbeiten von Zörb et al. (2009) in einigen Anbaujahren und über Sortengrenzen hinweg stabil signifikante Unterschiede bei der Speicherproteinklasse, die Glutenine, Gliadine und Avenin-ähnliche-Proteine umfasst, zwischen den Anbauarten gefunden wurden. Forschungsarbeit ist notwendig, um abzuklären ob diese

Unterschiede bei einer Speicherproteinklasse und ggf. weiteren zu identifizierenden Proteinklassen stabil genug sind, um ökologischen und konventionellen Weizen differenzieren zu können.

Bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse

Verschiedene Ergebnisse des Projekts wurden bisher in insgesamt acht Vorträgen und mit zwei Postern auf wissenschaftlichen Tagungen und Konferenzen vorgestellt (siehe Kapitel 5). Es ist geplant, die Ergebnisse auf weiteren wissenschaftlichen Tagungen zu präsentieren.

3.4.6 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Eine Gegenüberstellung der geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen ist in Tabelle 20 gezeigt. Die geplanten Ziele wurden erreicht.

Tabelle 20: Geplante Arbeiten und tatsächlich erreichte Ziele im Projektteil Weiterentwicklung von Profiling-Techniken: Proteom

Geplante Arbeiten	Tatsächlich erreichte Ziele
Erstellung komplexer Protein-Profile von Weizen (cv. Runal) des DOK-Versuchs mithilfe von Gesamtprotein-extrakten, 2D-GE und Proteinidentifizierung mit MALDI-TOF-MS/MS aus drei Erntejahren. Untersuchung einer konventionellen und einer ökologischen Anbauvariante	Ziel vollständig erreicht. Komplexe Protein-Profile sind für die drei Weizenernten des DOK-Versuchs erstellt.
Erstellung komplexer Protein-Profile für zehn verschiedene Weizensorten des DOK-Versuchs, mit gleichen Techniken, die für die Sorte Runal eingesetzt wurden (s. o.). Untersuchung einer konventionellen und einer ökologischen Anbauvariante	Ziel vollständig erreicht. Komplexe Protein-Profile sind für zehn Weizenernten des DOK-Versuchs angefertigt.
Bildauswertung und Auswertung der MALDI-TOF-MS/MS Daten zur Proteinidentifizierung unter Anwendung von Bioinformatik	Ziel vollständig erreicht. Bildauswertung, Proteinidentifizierung und Gesamtbetrachtung des Datenpools sind erstellt.

3.4.7 Kurze Zusammenfassung des Arbeitsblocks und der wichtigsten Ergebnisse

Für die Arbeiten des Projektteils „Proteom“ wurden eine ökologische und eine konventionell angebaute Variante des Weizens aus dem DOK-Feldversuch verwendet. Dabei wurden die Weizensorte Runal über drei Anbaujahre und zehn weitere Weizensorten in einem Anbaujahr untersucht. Komplexe Protein-Profile aus Weizenschrot wurden mithilfe von zweidimensionaler Gelelektrophorese und softwareunterstützter Bildauswertung aufgenommen. Die Proteinidentifizierung aus den Gelen erfolgte mit massenspektrometrischen Methoden (MALDI-TOF-MS/MS) und Datenbankabgleich. Die Proteinidentifizierung lieferte bei 278 von 658 Proteinspots positive Ergebnisse. Dies entspricht einer Identifizierungsquote von 42 %, einem Wert, der für ein nicht sequenziertes Genom wie das von Weizen als sehr gut einzuschätzen ist. Beim Vergleich der Protein-Profile der Jahrgänge 2007, 2009 und 2010 wurde deutlich, dass im Verhältnis zur Gesamtzahl mehrerer Hundert detektierter Proteine nur sehr wenige Proteine mit signifikanten Konzentrationsunterschieden in ökologischem und konventionellem Weizen

vorkommen. Weiterhin waren die Unterschiede über die drei Anbaujahre nicht konstant: 14 signifikanten Proteinen aus 2007 standen drei signifikante Proteine aus 2010 gegenüber, dabei ist keins dieser Proteine in den beiden Jahren identisch. Auch mit dem Jahr 2009 gab es keine Übereinstimmungen; signifikante Proteine wurden gar nicht detektiert. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass jahreszeitliche Effekte einen wesentlich größeren Einfluss auf die Proteinkonzentration haben als die Anbaumethode. Die Ergebnisse des Sortenvergleichs im Anbaujahr 2007 spiegeln die Resultate des Jahrgangvergleichs: relativ wenige individuelle Proteine mit signifikanten Unterschieden wurden in den verschiedenen Sorten gefunden. Auch eine Übereinstimmung der Identität dieser Proteine über die Sortengrenzen hinweg war die Ausnahme. Die Proteinidentifizierung erlaubte eine Zusammenfassung der individuellen Proteine zu Proteinklassen. In dieser Betrachtung wurde deutlich, dass in einigen Anbaujahren und auch über Sortengrenzen hinweg stabile Expressionsunterschiede bei der Speicherproteinklasse, die Glutenine, Gliadine und Avenin-ähnlichen-Proteine umfasst, gefunden wurden. Weitergehende Forschungsarbeiten können klären, ob eine sichere Unterscheidung von ökologischem und konventionellem Weizen auf Basis der Analyse von Proteinklassen wie Speicherproteinen möglich ist.

4 Praxistests

Tabelle 21: Übersicht der Arbeitsschritte im Rahmen der Praxistests

Arbeitsschritt	2009				2010				2011				2012			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Auswahl von Leitprodukten	S. 122															
Beschaffung Referenzproben		A	X	X	X	X	X	X	E							
Einengung der Leitprodukte			S. 122													
Beschaffung Blindproben			A	X	X	X	X	X	E							
Einfordern von Zusatzinformationen zur Erzeugung des Produkts			A	X	X	X	X	X	E							
Erweiterung der Fragestellung auf Herkunftsnachweis						A	X	X	X	E						
Beschaffung Praxisproben								A	X	X	E					
Zusatzmodul Wasserzeichen											A	X	E	S. 133ff		
Auswertung Untersuchungsergebnisse			A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	E	S. 124ff		

4.1 Planung und Ablauf

Zunächst wurde im Rahmen des Projekttreffens „Leitprodukte“ am 28. April 2009 in Frankfurt festgelegt, welche Produkte in der ersten Analyserunde beprobt und untersucht werden sollten. Zusammen mit den Praxispartnern und den Laboren wurden die Zusatzinformationen definiert, die für die Labore erforderlich erschienen, um die Analyseergebnisse richtig einzuordnen.

Auf Grundlage der ersten Analyseergebnisse, die im Rahmen des Projekttreffens am 19. Januar 2010 vorgestellt und diskutiert wurden, wurde die Liste der Leitprodukte angepasst. Die folgenden Produkte galten auf Grundlage der Analyseergebnisse aus der ersten Probenahmerunde für die Untersuchungsmethode IRMS als vielversprechend: Eier, Weizen, Möhren, Tomaten. Bei der FAS-Methode wurde mit den Produkten Weizen und Eiern weitergearbeitet. Weiterhin wurde im Rahmen eines Projekttreffens festgelegt, die IRMS-Methode zu erweitern, um Aussagen hinsichtlich der Fragestellung „Stimmt die Herkunft oder die Identität im Vergleich zu einem Rückstellmuster?“ treffen zu können.

Auf dem Projekttreffen am 22. September 2010 wurde der Probenahmeplan für die Referenzproben und die Praxisproben aktualisiert. Bis zum Ende des Berichtszeitraums konnten für die Labore folgende Zahlen von Blindproben bereitgestellt werden:

- 61 Weizenproben
- 38 Eierproben
- 73 Karottenproben

- 40 Kartoffelproben
- 12 Tomatenproben
- 3 Karottensaftproben

Ergänzend wurden von der GfRS noch 18 Eierproben im Rahmen eines weiteren Praxisversuchs zur Verfügung gestellt.

4.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Der wissenschaftliche Stand ist in der in Arbeitsblock 2 erstellten Literaturübersicht ausführlich dargestellt.

Für die beteiligten Labore war es in der Vergangenheit schwierig, Referenzproben mit den erforderlichen Zusatzinformationen zu erhalten, um die Analyseergebnisse richtig einzuordnen. Über die Zusammenarbeit im Projekt mit Praxispartnern konnten solche Proben für die Untersuchung bereitgestellt werden.

4.3 Material und Methoden

Im Rahmen des Projektes wurde mit den Projektpartnern ein Probenahmeplan festgelegt, in dem der Umfang und die Art der Proben festgelegt wurden. Des Weiteren wurden Probenahmeprotokolle und -begleitzpapiere erstellt, damit die Labore die notwendigen Probeninformationen erhielten.

Die Probenbeschaffung wurde vom FiBL Deutschland und den Praxispartnern auf Grundlage des Probenahmeplans koordiniert. Die Proben wurden an das FiBL gesendet und von dort an die Labore weitergeschickt. Damit war bei den Blindproben auch die Anonymität der Proben sichergestellt.

Die Proben stammten zum überwiegenden Teil von Kunden der als Praxispartner am Projekt beteiligten Kontrollstelle GfRS und der Marktgesellschaft der Naturland-Betriebe. Demnach war die Herkunft der Proben nicht gleichmäßig über verschiedene Betriebstypen und Regionen verteilt. Im Einzelnen stellt sich bei den Hauptprodukten die Probenherkunft wie folgt dar:

➤Weizen

35 Proben stammten aus Bayern, neun Proben aus Ostdeutschland, drei Proben aus Südniedersachsen/Nordhessen, drei Proben stammten aus Südhessen und eine Probe aus der Nähe von Offenburg. Darüber hinaus wurden noch 14 Proben aus Italien untersucht.

➤Eier

Bei den Eiern stammten 22 der Proben aus dem nördlichen Niedersachsen, Nord-Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern. Zwei Proben stammten aus Nordrhein-Westfalen und acht aus dem östlichen Baden-Württemberg beziehungsweise Bayern. Sechs der Proben stammten aus dem nördlichen Österreich.

› Karotten

Bei den Karotten stammten 22 der Proben aus Niedersachsen und 38 Proben aus Nordrhein-Westfalen. Dazu kamen elf Proben aus Südeuropa (Frankreich, Spanien, Portugal und Italien) sowie 13 Proben aus Israel.

› Kartoffeln

Bei den Kartoffeln stammten 39 Proben aus Bayern und eine Probe aus Nordhessen.

4.4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

4.4.1 Fragestellung: Unterscheidung ökologisch/konventionell

Schwerpunkt im Projekt war die Fragestellung, ob Produkte ökologisch oder konventionell erzeugt wurden. Nachfolgend ist das Ergebnis der Untersuchung der Blindproben durch die Labore AgroisioLab (Isotopen) und Kwalis (FAS) dargestellt:

Weizen-Blindproben AgroisioLab

Untersucht wurden 60 Proben, davon 47 ökologische und 13 konventionelle:

- › 47 (78,3 %) der Proben wurden richtig bewertet, 13 (21,7 %) falsch.
- › 44 der 47 Ökoweizenproben wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 93,6 %.
- › 3 der 13 konventionellen Weizenproben wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 23,1 %.

Weizen-Blindproben Kwalis

Untersucht wurden 49 Proben, davon 39 ökologische und 10 konventionelle:

- › 38 (77,6 %) der Proben wurden richtig bewertet, 11 (22,4 %) falsch.
- › 31 der 39 Ökoweizenproben wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 79,5 %.
- › 7 der 10 konventionellen Weizenproben wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 70 %.

Trefferquote Weizen-Blindproben Agroisolab und Kwalis

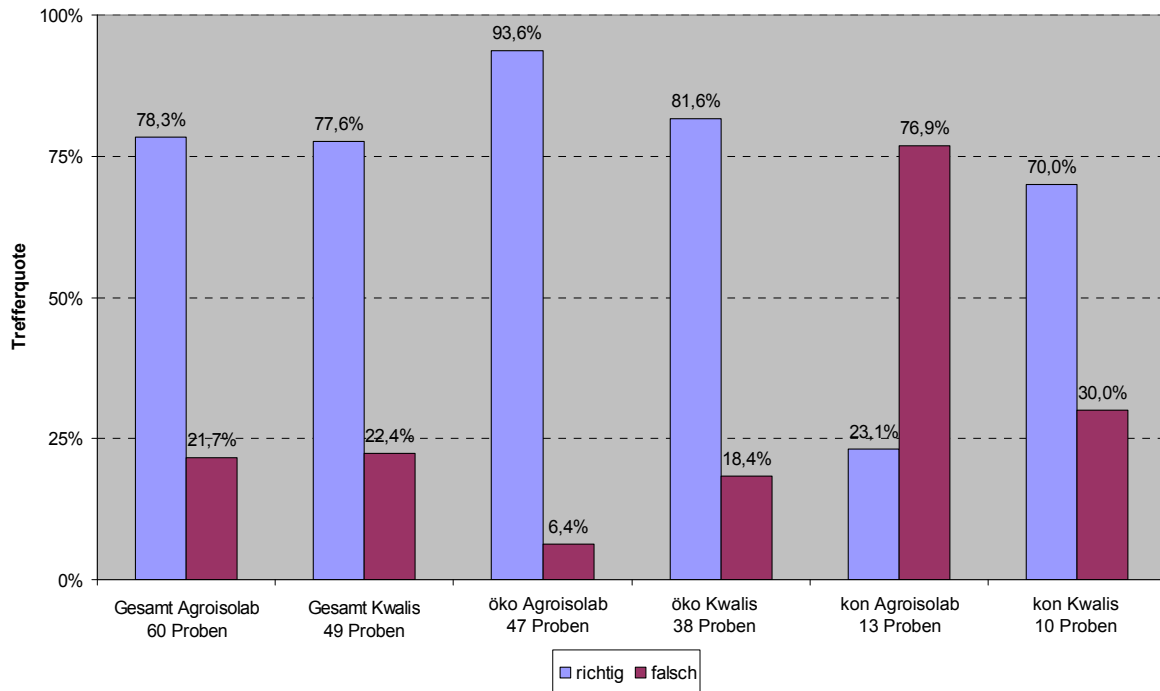


Abbildung 56: Trefferquote für die Differenzierung von ökologisch und konventionell erzeugter Weizen-Blindproben mittels IMRS (Agroisolab) und FASD (Kwalis)

4.4.1.1 Eier-Blindproben Agroisolab

Untersucht wurden 29 Proben, davon 20 ökologische und 9 konventionelle:

- 26 (89,7 %) der Proben wurden richtig bewertet, 3 (10,3 %) falsch.
- 17 der 20 Ökoeierproben wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 85 %.
- 9 der 9 konventionellen Eierproben wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 100 %.

4.4.1.2 Eier-Blindproben Kwalis

Untersucht wurden 30 Proben, davon 20 ökologische und 10 konventionelle:

- 28 (93,3 %) der Proben wurden richtig bewertet, 3 (6,7 %) falsch.
- 20 der 21 Ökoeierproben wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 95,2 %.
- 8 der 9 konventionellen Eierproben wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 88,9 %.

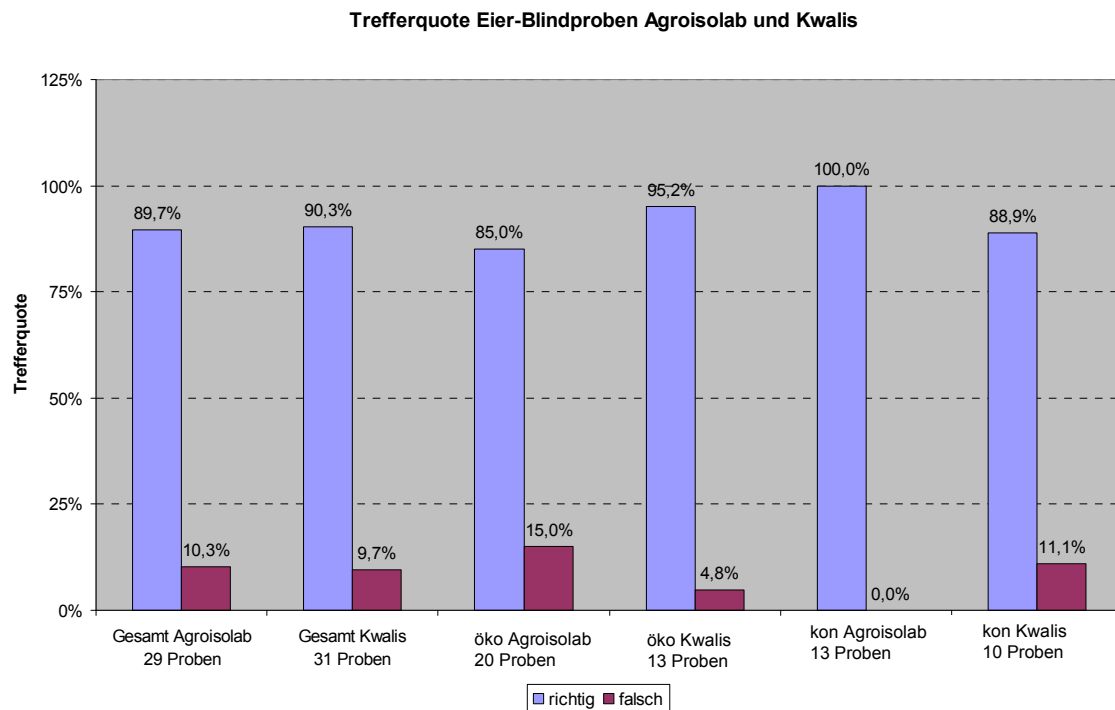


Abbildung 57: Trefferquote für die Differenzierung von ökologisch und konventionell erzeugter Eier-Blindproben mittels IMRS (Agroisolab) und FAS (Kwalis)

Möhren-Blindproben Agroisolab

Untersucht wurden 73 Proben, davon 51 ökologische und 22 konventionelle:

- 51 (69,9 %) Proben wurden richtig bewertet, 22 (30,1 %) falsch.
- 37 der 51 Ökomöhren wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 72,5 %.
- 13 der 22 konventionellen Möhren wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 59,1 %.

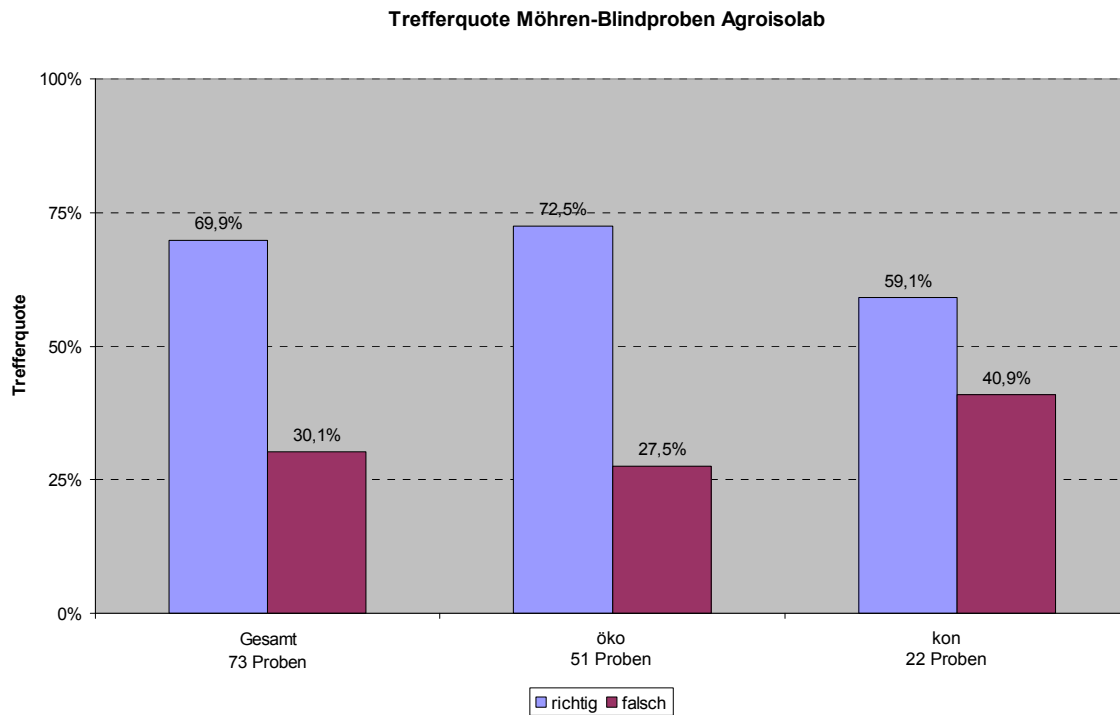


Abbildung 58: Trefferquote für die Differenzierung von ökologisch und konventionell erzeugter Möhren-Blindproben mittels IMRS (Agroisolab)

Kartoffel-Blindproben Agroisolab

Untersucht wurden 39 Proben, davon 24 ökologische und 15 konventionelle:

- 26 (66,7 %) Proben wurden richtig bewertet, 13 (33,3 %) falsch.
- 19 der 24 Ökokartoffeln wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 79,2 %.
- 7 der 15 konventionellen Kartoffeln wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 46,7 %.

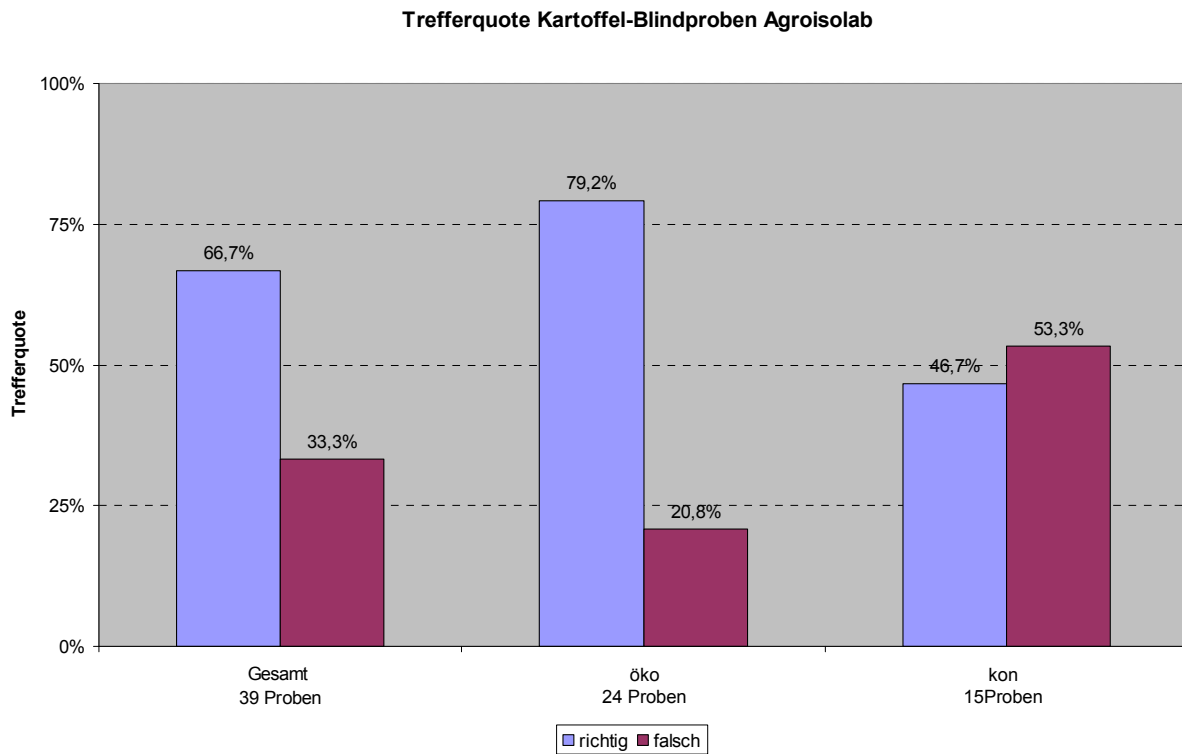


Abbildung 59: Trefferquote für die Differenzierung von ökologisch und konventionell erzeugter Kartoffel-Blindproben mittels IMRS (Agroisolab)

Tomaten-Blindproben Agroisolab

Untersucht wurden 12 Proben, davon 7 ökologische und 5 konventionelle:

- 11 (91,7 %) Proben wurden richtig bewertet, 1 (8,3 %) falsch.
- 7 der 7 ÖkotoMATen wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 100 %.
- 4 der 5 konventionellen Tomaten wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 80 %.

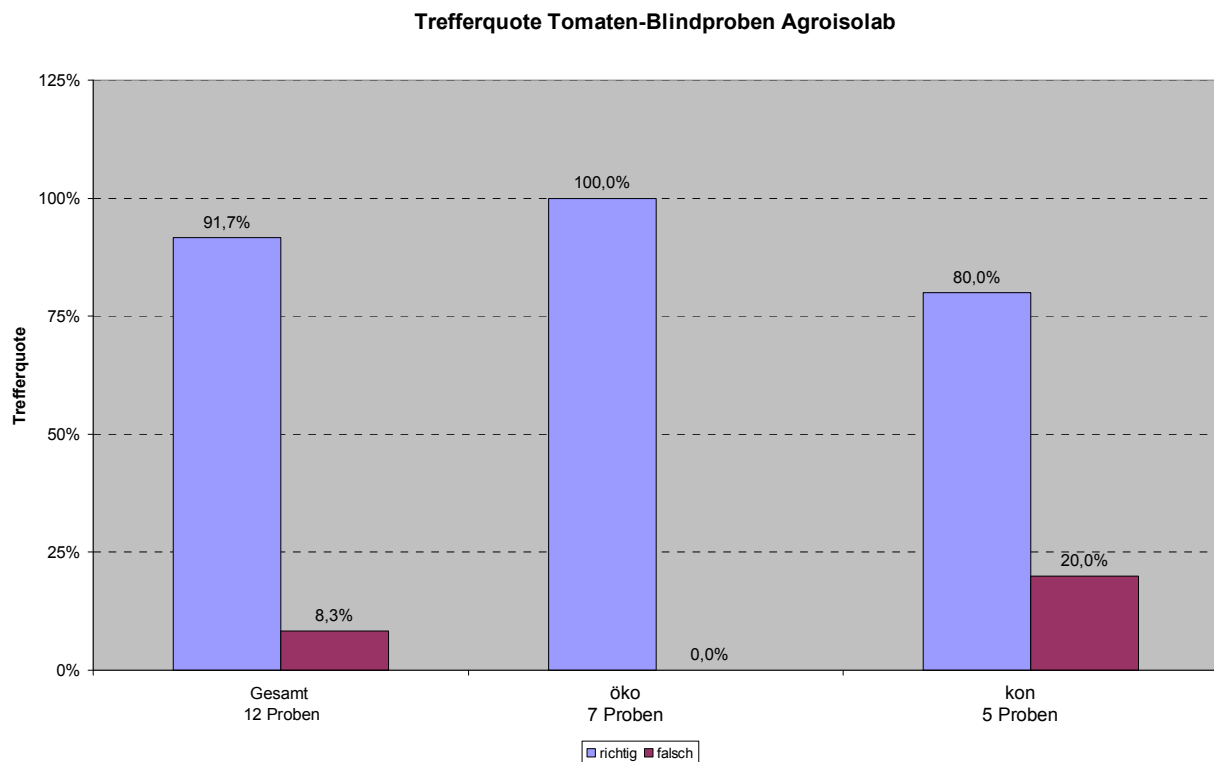


Abbildung 60: Trefferquote für die Differenzierung von ökologisch und konventionell erzeugter Tomaten-Blindproben mittels IMRS (Agroisolab)

Wie die Ergebnisse zeigen, erreichten beide Methoden hohe Trefferquoten von circa 90 % bei der Untersuchung von Eierproben. Hier wurden etwa 9 von 10 Proben richtig eingestuft.

Bei den Weizenproben erreichten beide Methoden eine Trefferquote von knapp 80 %. Hier wurden etwa 8 von 10 Proben richtig eingestuft.

Bei den Kartoffel- und Karottenproben erreichte die Isotopenanalyse eine Trefferquote von knapp 70 %. Es wurden etwa 7 von 10 Proben richtig eingestuft.

Auch bei den Tomaten wurde mit über 90 % eine gute Trefferquote erreicht. Aufgrund des geringen Probenumfangs ist die Aussagefähigkeit dieses Ergebnisses jedoch eingeschränkt.

Um die guten Ergebnisse bei Eiern abzusichern, wurden von der Ökokontrollstelle GfRS ergänzend 17 Praxisproben gezogen. Die Probenahme erfolgte im Rahmen unangekündigter Inspektionsbesuche bei Biobetrieben und Packstellen für Bioeier sowie bei einem konventionellen Eierhändler (Eier aus Freilandhaltung) im Zeitraum Februar bis Oktober 2011.

Agroisolab gab zu allen 17 Proben eine Prognose ab, während Kwalis zu 14 der untersuchten Proben eine Prognose abgab.

Eier-Praxisproben Agroisolab

Untersucht wurden 17 Proben, davon 15 ökologische und zwei konventionelle:

- 11 (64,7 %) der Proben wurden richtig bewertet, 6 (35,3 %) falsch.
- 11 der 15 Ökoeierproben wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 73,3 %.
- 0 der 2 konventionellen Eierproben wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 0 %.

Eier-Praxisproben Kwalis

Untersucht wurden 14 Proben, davon 12 ökologische und 2 konventionelle:

- 8 (57,1 %) der Proben wurden richtig bewertet, 6 (42,9 %) falsch.
- 8 der 12 Ökoeierproben wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 66,7 %.
- 0 der 2 konventionellen Eierproben wurden richtig eingestuft. Dies entspricht 0 %.

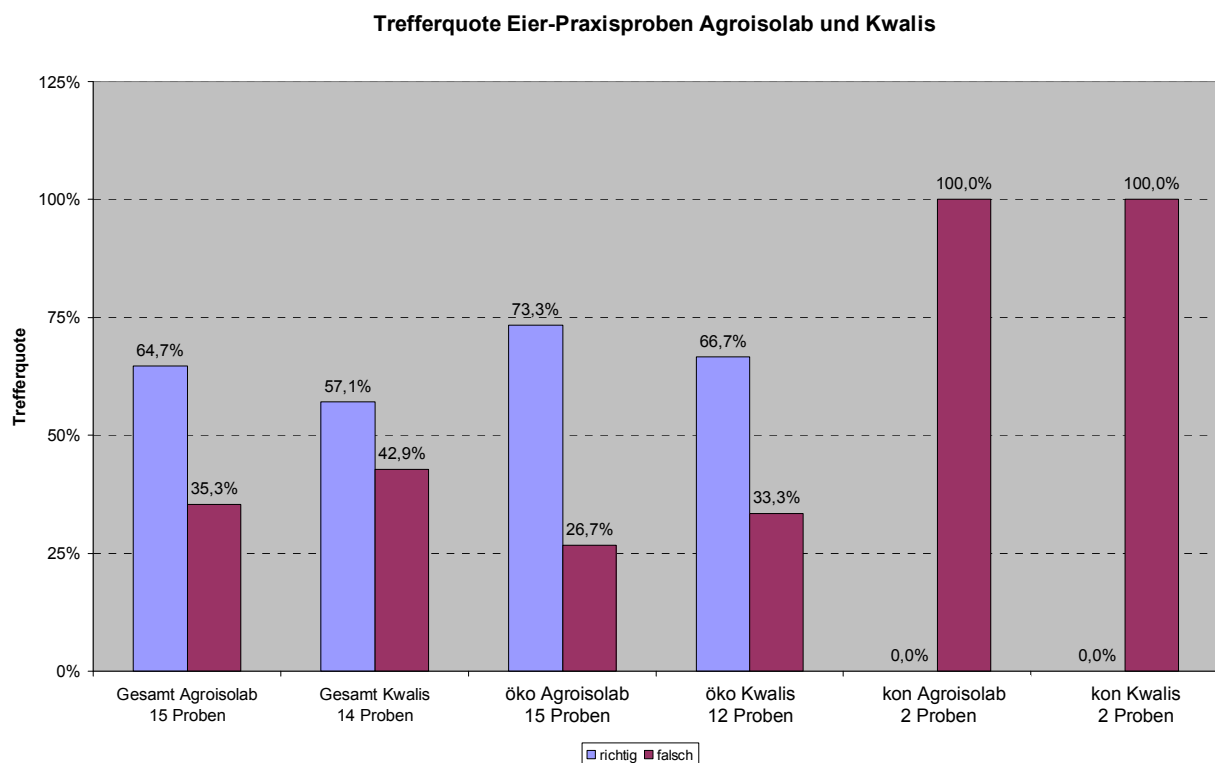


Abbildung 61: Trefferquote für die Differenzierung von ökologisch und konventionell erzeugter Eier-Praxisproben mittels IMRS (Agroisolab) und FAS (Kwalis)

Die Diskrepanz der Treffgenauigkeit zwischen den Blindproben, die mit 89,7 % bei der IMRS und 93,3 % bei der FAS sehr hoch war, und den Praxisproben, die mit 64,7 % bei der IMRS beziehungsweise 57,1 % bei der FAS deutlich niedriger lag, lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass von den Betrieben, von denen die Praxisproben stammen, im Vorfeld keine Referenzproben untersucht wurden und deshalb der Referenzdatenbestand für die Praxisproben nicht repräsentativ war.

4.4.2 Fragestellung: Ist die Herkunft plausibel?

Ergänzend zu der Hauptfragestellung des Projektes (Unterscheidung ökologisch/konventionell) wurde im Laufe des Projektes festgelegt, die IRMS-Methode zu erweitern, um Aussagen hinsichtlich der Fragestellung „Stimmt die Herkunft oder die Identität im Vergleich zu einem Rückstellmuster?“ treffen zu können. Dieser Fragestellung wurde sowohl bei den Eierproben als auch bei den Möhrenproben nachgegangen. Bei den Eiern musste Agroisolab 22 Eier-Blindproben bereits zuvor untersuchten Referenzmustern zuordnen. Dabei konnten alle 22 Eier-Blindproben den richtigen Referenzmustern zugeordnet werden.

Bei den Karotten musste Agroisolab zu allen untersuchten Karottenblindproben eine Aussage dazu treffen, ob die beprobten Produkte aus Israel oder Deutschland stammten (Tabelle 22). Das Ergebnis stellt sich wie folgt dar:

Tabelle 22: Herkunftsaussagen Agroisolab zu Blindproben Karotten

Anzahl Proben	Aussage	Tatsächliche Herkunft
40	99,9 % nicht Israel, derzeit DE	Deutschland
2	Süd-DE, Osteuropa möglich	Gobetto/Italien (Nord)
2	nicht DE, nicht Israel, Italien möglich	Verona/Italien (Nord)
2	nicht DE	Israel
13	99,9 % nicht DE, derzeit Israel	Israel
14	99,9 % nicht DE, derzeit Israel/Süd	Israel
73 Proben gesamt		

Wie das Ergebnis zeigt, waren die getroffenen Aussagen zur Herkunft der Proben in fast allen Fällen korrekt. Lediglich bei den beiden Proben aus Gobetto/Italien (Nord) gab es eine Diskrepanz zwischen der Herkunft und der Aussage des Labors.

Diese Diskrepanz kann durch die Aufgabenstellung begründet werden, die die Prüfung der Herkünfte aus Deutschland und Israel zu prüfen beinhaltete. Das Labor verfügte zum Zeitpunkt des Tests nur über diese Vergleichsreferenzen aus dem Projekt. Die Blindproben, die nicht direkt zugeordnet werden konnten wurden infolge dessen durch Erfahrungswerte des Labors eingeordnet. In einer nachfolgenden Machbarkeitsstudie (Kapitel 4.5.1 Konzept Wasserzeichen) wurden die Möglichkeiten der Stabil-Isotopentechnik anhand des Nachweises von regionalen Produkten (Weizen, Kartoffel, Möhren) aufgezeigt.

4.5 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass beide Methoden für die Anwendung im praktischen Kontrollverfahren zur Unterscheidung zwischen ökologisch und konventionell erzeugten Produkten noch nicht ausreichend abgesichert sind. Aussagekräftige Ergebnisse erhält man, wenn eine ausreichende Anzahl von Referenzproben der beprobten Betriebe zugrunde liegen. Das legt allerdings den Verdacht nahe, dass mit den Analyseergebnissen derzeit nicht die Fragestellung „ökologisch/konventionell“ beantwortet werden kann, sondern vielmehr die Frage, ob das untersuchte Produkt von einem bestimmten Betrieb, einer Gruppe von Referenzbetrieben oder einer Referenzregion stammt.

Prüfung der Warenherkunft im Kontrollverfahren für Öko-Produkte und Produkte mit Regionalkennzeichnung

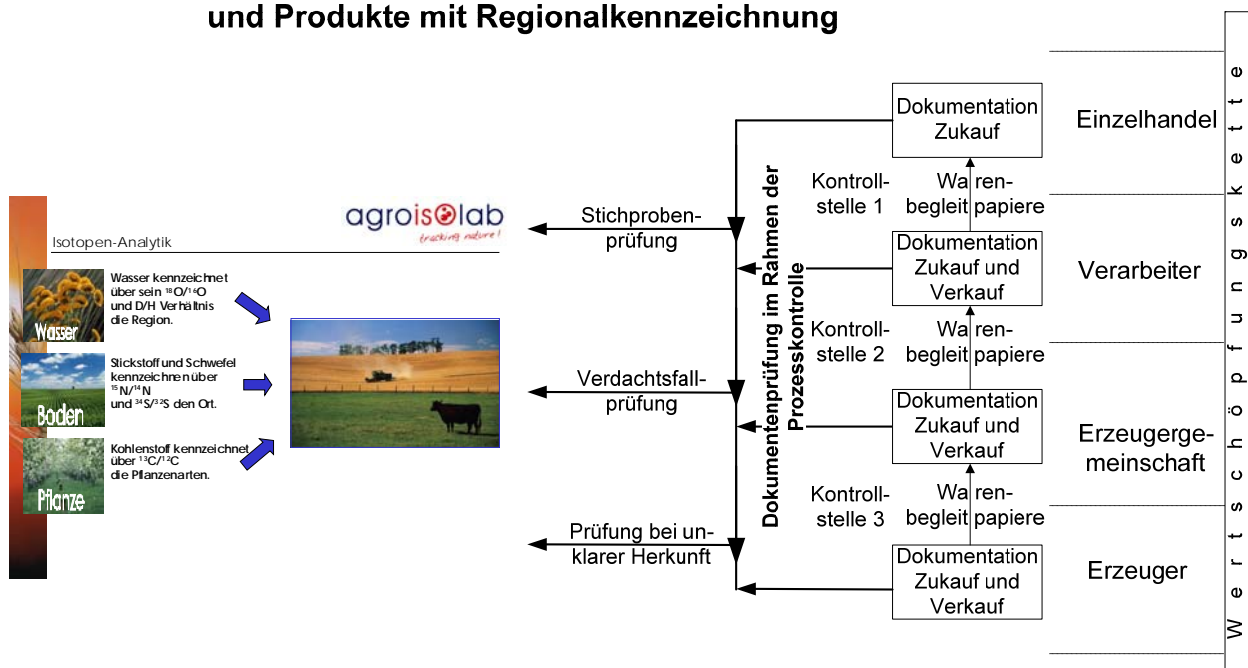


Abbildung 62: Isotopenanalytik zur Absicherung der Warenherkunft als ergänzendes Element der Prozesskontrolle

Die Praxistests zeigen, dass die IMRS-Methode zur Absicherung der Herkunft eines Produktes von einem bestimmten Betrieb, einer Gruppe von Betrieben oder aus einer bestimmten Region in vielen Fällen schon jetzt ein geeignetes Instrument ist. Als Standardmethode für die Praxis kann sich die IMRS dann entwickeln, wenn es gelingt, die Verfahren für die Probenahme, Probenaufbereitung und Analytik der Isotopenlabore zu standardisieren und eine gemeinsame Referenzdatenbank aufzubauen.

4.5.1 Konzept Wasserzeichen

Um den Aspekt der Herkunftsabsicherung weiterzuverfolgen, wurde unter dem Titel „Wasserzeichen“ im Rahmen einer Projektaufstockung ein erstes Konzept für die Umsetzung eines Folgeprojektes zur Absicherung der regionalen Herkunft von Produkten entworfen. Im Rahmen eines Kleinversuches wurden aus einer definierten Region durch zwei Isotopenlabore (Agroisolab GmbH und das Untersuchungsamt Oberschleißheim) analysiert, um die Ergebnisse als Referenzmuster zu verwenden. In einem zweiten Schritt wurden Blindproben analysiert und mit den Referenzdaten verglichen. Aufgabenstellung war die eindeutige Zuordnung der Blindproben zu den regionalen Referenzmustern beziehungsweise die Beantwortung der Fragestellung, welche Probe nicht aus der Region stammt.

Die regionale Herkunftsbestimmung wurde an drei verschiedenen Agrarprodukten (Karotten, Kartoffeln und Getreide) geprüft. Dazu wurden jeweils drei direkte authentische Referenzen aus den Regionen Unterfranken und Hessen zur Verfügung gestellt und anhand von jeweils zwei bis drei Blindproben der jeweiligen Agrarprodukte die Möglichkeit der stabilen Isotope der Bioelemente getestet.

Ziel des Konzeptes ist der Aufbau einer Referenzdatenbank, wie in folgender Abbildung dargestellt:

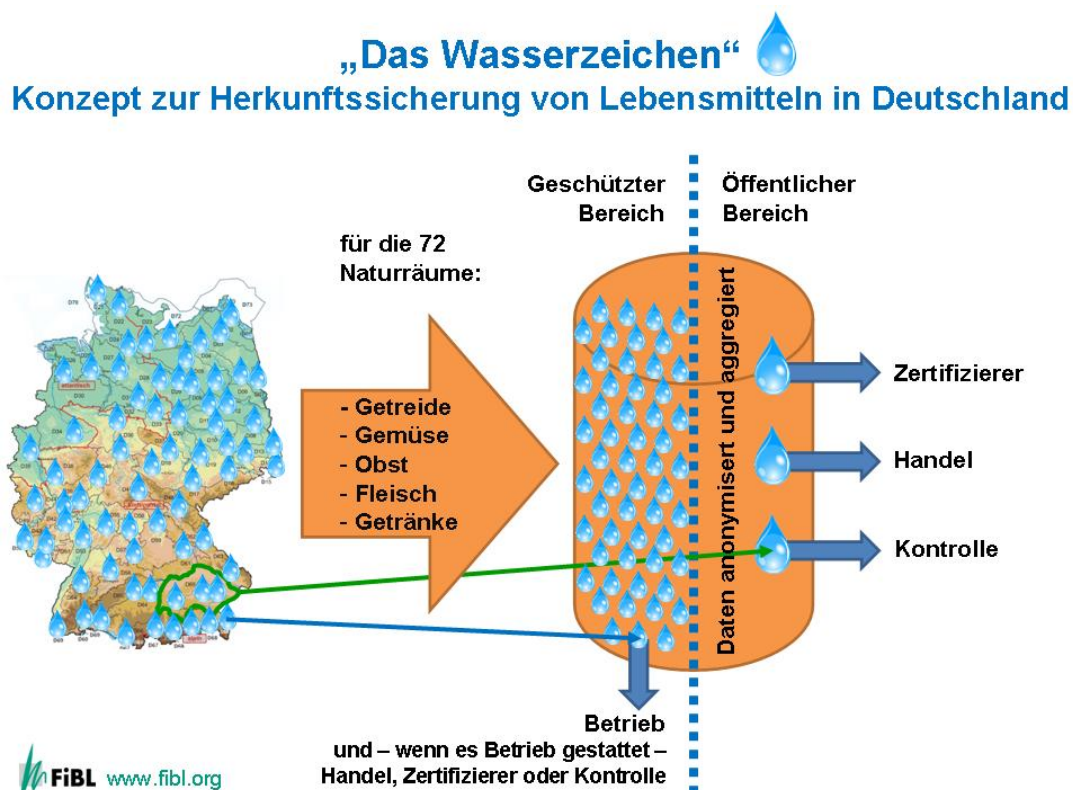


Abbildung 63: Aufbau einer Datenbank mit Isotopenreferenzdaten für verschiedene Produkte und regionale Herkünfte

Die Datenbank ist in zwei Bereiche aufgeteilt:

- › Ein geschützter Bereich, in dem die Rohdaten jedes einzelnen Betriebes liegen, die nur freigegeben werden, wenn der Betrieb dies ausdrücklich erlaubt
- › Ein öffentlicher Bereich, in dem die anonymisierten und aggregierten Daten bereitgestellt werden, die auf Anfrage zum Beispiel von Zertifizierern, Handel, Kontrolle oder anderen genutzt werden können

Mit einer solchen Datenbank würde ein zusätzliches Instrument sowohl für das Kontrollverfahren als auch für die firmeninterne Qualitätssicherung geschaffen. Auf Basis der Referenzdatenbank könnten zum Beispiel die folgenden typischen praxisrelevanten Fragestellungen beantwortet werden:

- › Deklariertes Herkunftsland: Kommt der Spargel tatsächlich, wie deklariert, aus Deutschland oder könnte es sich auch um Ware aus Südeuropa handeln?
- › Deklarierte Region: Stammt das Putenfleisch, wie deklariert, aus Norddeutschland?
- › Deklarierter Erzeugerbetrieb: Wurden die Kartoffeln tatsächlich auf den Feldern des angegebenen Produzenten geerntet oder könnte es sich auch um zugekaufte Ware handeln?
- › Im Falle eines Lebensmittelkandals: Stammen die Eier tatsächlich aus einer bestimmten Region oder von einem bestimmten Betrieb?
- › Im Falle einer öffentlich gewordenen Reklamation: Stammt das Produkt tatsächlich aus dem deklarierten Betrieb?

4.5.1.1 Ergebnisse der Machbarkeitsstudie „Konzept Wasserzeichen“

Die Ergebnisse der Agroisolab GmbH waren jederzeit geeignet, die Blindproben entweder dem korrekten Referenzbetrieb zuzuordnen oder die Herkunft auszuschließen (Abbildung 64 bis Abbildung 66). Diese Güte der korrekten Zuordnung konnten in dieser Untersuchung im Untersuchungsamt Oberschleißheim zu diesem Zeitpunkt nicht erreicht werden.

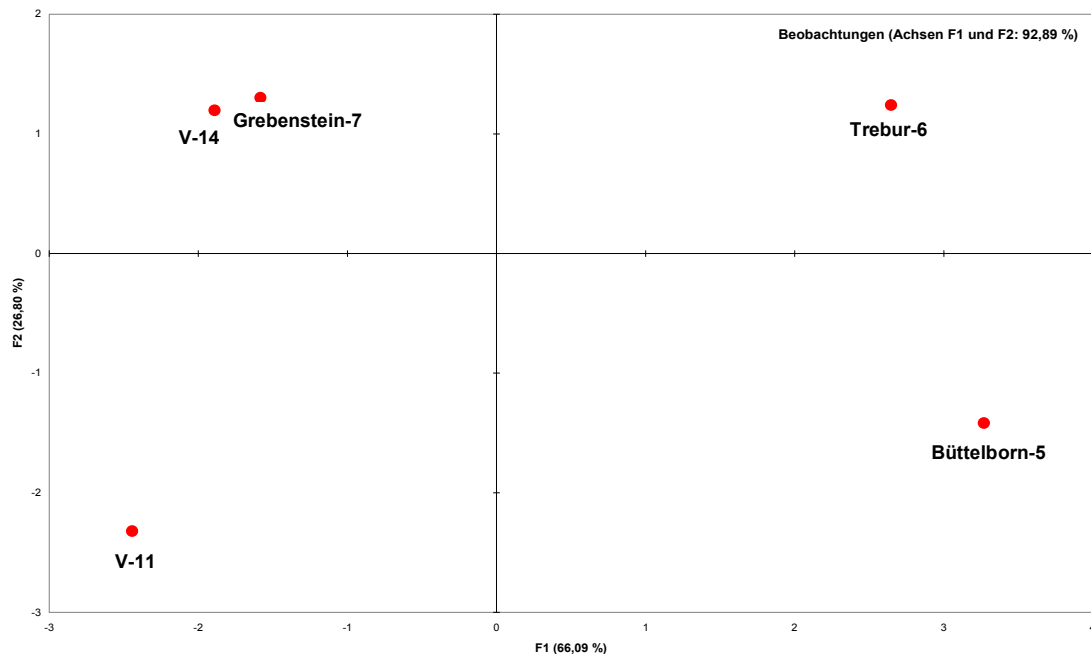


Abbildung 64: Hauptkomponentenanalyse der Bioelemente in Kartoffeln. Nur die Blindprobe V-14 stammte aus Grebenstein. Die weitere Probe V-11 wies Signaturen auf, die weder Grebenstein noch den beiden weiteren Referenzen zuzuordnen war.

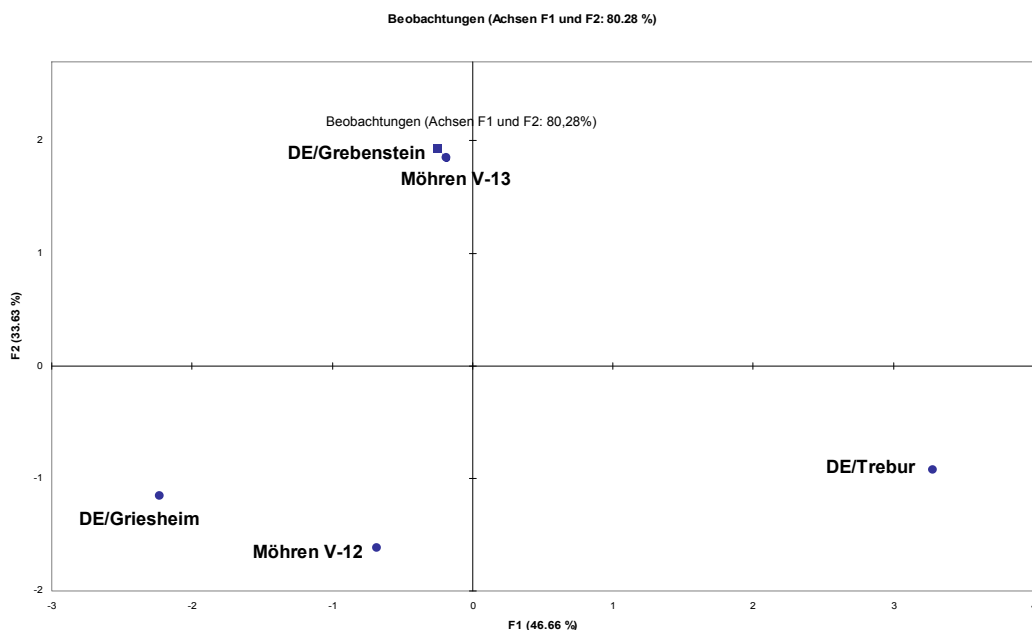


Abbildung 65: Hauptkomponentenanalyse der Bioelemente in Möhren. Nur die Blindprobe V-13 stammte aus Grebenstein/Hessen. Die weitere Probe V-12 war gemäß den Isotopensignaturen nicht zuzuordnen.

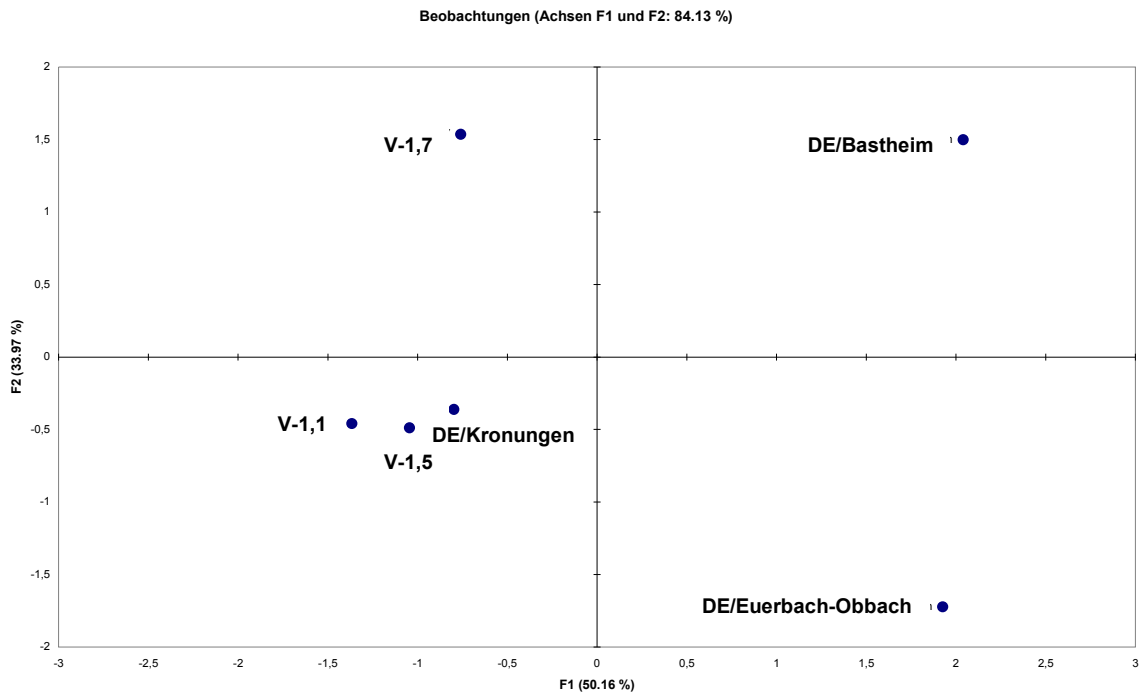


Abbildung 66: Hauptkomponentenanalyse der Bioelemente in Getreide in der Organik (DH, ^{13}C , ^{15}N , ^{34}S). Die Blindprobe V1,7 stammte nicht aus der Region, dagegen wurden die beiden Verdachtsproben korrekt der Referenz aus Kronungen zugeordnet.

Diese Unterschiede widersprechen nicht den Möglichkeiten der stabilen Isotope, sondern sind auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen. So ist es notwendig zu den Produkten umfangreiche Kenntnisse zu haben, sodass der methodische Ansatz der Untersuchung optimal angepasst werden kann. Die Kartoffel weist z.B. einen Lagerungseffekt in den Isotopenverhältnissen des Gewebewassers auf, d.h. die Kartoffel trocknet durch die Lagerung langsam aus, dies führt zu einer geringen Anreicherung der Sauerstoff und Wasserstoff-Isotopenverhältnisse im Gewebewasser (siehe Abbildung 67). Für eine großräumige Differenzierung von z.B. Frühjahrskartoffeln aus Israel, Ägypten oder Tunesien gegenüber deutscher Ware, hat dieser geringe Effekt keinerlei Bedeutung. Für eine kleinräumige Differenzierung kann dies jedoch einen Zuordnungsfehler hervorrufen.

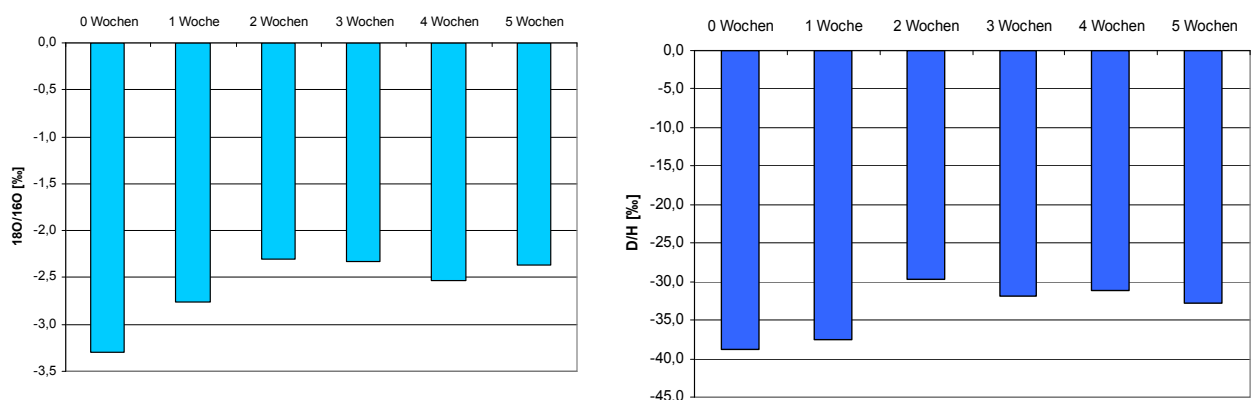


Abbildung 67: Einfluss der Lagerung auf die $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ und D/H Isotopenverhältnisse des Gewebewassers in der Kartoffel.

Daher wurden neben den Isotopenverhältnissen des Gewebewassers ebenfalls die Isotopenverhältnisse der Organik als Gedächtnis des Wassers von der Agroisolab GmbH hinzugezogen. Damit konnte entsprechend eine signifikante Differenzierung gewährleistet werden.

Eine Konsequenz aus diesem Kenntnisstand ist, dass die zur Bewertung heranzuziehende Probenmatrize in Leitmethoden zu vereinheitlichen ist. Dies gilt entsprechend für die Art der Aufarbeitung (z.B. Extraktionen), da diese ebenfalls Auswirkungen auf die Isotopensignaturen haben kann. Auch die Art der Messungen bis zu den Bezugsstandards ist noch nicht vollständig harmonisiert. Dies kann durch Routinevergleichstests der Labore schnell erreicht werden. Zu diesem Zweck finden seit dem Jahr 2012 freiwillige und regelmäßige (alle zwei Monate) Vergleichbarkeitsstudien unter den deutschen Isotopenlaboren (zehn Labore) statt. Ziel ist, die Vergleichbarkeit weiter auszubauen und diese auch in der Routine zu gewährleisten.

Diese ersten Ergebnisse bestätigen den Eindruck, dass die Isotopenanalytik hinsichtlich dieser Fragestellung sehr gute Ergebnisse liefert. Wichtig ist in diesem Zusammenhang aber auch die Erkenntnis, dass bei einer Beteiligung mehrerer Labore die Verfahren für die Probenahme, Probenaufbereitung und Analytik vereinheitlicht werden müssen, um möglichst homogene Ergebnisse zu erhalten.

4.6 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Im Projektantrag wurden für diesen Arbeitsblock die folgenden Ziele formuliert:

- Anwendbarkeit der Methoden in der Unterscheidung zwischen ökologischen und konventionellen Produkten
- Anwendbarkeit der Methoden zur zweifelsfreien physischen Identifizierung der Ware
- Anwendbarkeit der Methoden in der firmeninternen Qualitätssicherung
- Anwendbarkeit der Methoden in der Ökokontrolle
- Betriebswirtschaftliche Abklärung hinsichtlich Aufwand in der Nutzung und Etablierung der Methoden für aussagekräftige Ergebnisse

Im Rahmen des Arbeitsblocks wurde die Anwendung der Methoden durch die Untersuchung von Referenz- und Blindproben in der Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Produkten sowie der Anwendbarkeit der IMRS zur Abklärung der Herkunft von Produkten geprüft. Mittels Proben, die im Rahmen von Stichprobenkontrollen einer Kontrollstelle gezogen oder über eine Abpackstelle und einen Regionalmarkeninhaber beschafft wurden, wurde die Aussagekraft für das Kontrollverfahren und die firmeninterne Qualitätssicherung überprüft. Die Frage der Analysekosten wurde im Rahmen der Literaturstudie und der geführten Interviews behandelt. Eine abschließende Gesamtkostenkalkulation kann erst erfolgen, wenn klar ist, wie viele Proben und analytische Messungen für ein aussagekräftiges Ergebnis benötigt werden.

4.7 Kurze Zusammenfassung des Arbeitsblocks und der wichtigsten Ergebnisse

Im Rahmen des Arbeitsblocks wurde mittels einer Versuchsreihe mit Referenz-, Blind- und Praxisproben die Praxistauglichkeit der Methoden IMRS und FAS hinsichtlich der Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Produkten getestet. Untersucht wurden die Produkte Eier und Weizen mit beiden Methoden sowie Kartoffeln, Möhren, Tomaten und Möhrensaft mit IMRS. Darüber hinaus wurde der Fragestellung nachgegangen, inwieweit sich die IMRS-Methode zur Verifizierung der Herkunft eines Produktes von einem bestimmten Betrieb oder aus einer bestimmten Region eignet.

Die Praxistests zeigten, dass beide Methoden nur dann gute Ergebnisse leisten, wenn eine ausreichend gute Referenzbasis vorhanden ist, anhand derer die Ergebnisse der untersuchten Blind- beziehungsweise Praxisproben verglichen werden können. Dies legt den Schluss nahe, dass die Methoden insbesondere für die Fragestellung geeignet sind, ob eine untersuchte Probe mit den Eigenschaften der zuvor untersuchten Referenzproben übereinstimmt.

Bezüglich der mit der IMRS untersuchten Fragestellung, ob ein Produkt von einem bestimmten Betrieb, einer Gruppe von Betrieben oder aus einer bestimmten Region stammt, sind die Ergebnisse vielversprechend. Um die Methode hinsichtlich dieser Fragestellung zu einem gängigen Qualitätssicherungsinstrument zu entwickeln, bedarf es allerdings einer Standardisierung der Verfahren für die Probenahme, Probenaufbereitung und Analytik sowie des Aufbaus einer gemeinsamen Referenzdatenbank. Dieser Ansatz wird mit dem Konzept „Wasserzeichen“ weiterverfolgt werden.

5 Wissenstransfer und Erstellung eines Leitfadens

Wissenstransfer

Über die Platzierung des Themas auf der BioFach sowie der Wissenschaftstagung 2011 wurden die Ergebnisse des Projekts über Vorträge und Veröffentlichungen kommuniziert.

Bis zum Ende des Projekts im November 2012 wird zusätzlich ein Faltblatt erarbeitet, in dem die wesentlichen Ergebnisse des Projekts dargestellt werden. Zudem wird das Thema zur nächsten Wissenschaftstagung im Jahr 2013 in Bonn angemeldet.

Veranstaltungen

- › Das Projekt wurde auf der BioFach 2010 am 19. Februar 2010 unter dem Veranstaltungstitel „Über die Möglichkeiten von differenzierenden Methoden im Kontrollverfahren und der In-house-Qualitätssicherung in Deutschland“ vorgestellt. Die Präsentationen wurden auf der FiBL-Homepage (www.biofach.fibl.org/de/biofach-2010.html) eingestellt, sodass sich Interessierte über den bisherigen Projektverlauf informieren können. Zudem wurde auf der FiBL-Homepage eine Präsentation des Projekts aufgeschaltet.
- › Des Weiteren wurde ein Beitrag für die Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau 2011 erfolgreich eingereicht („Neue Analysemethoden und ihre Anwendungsmöglichkeiten für die Qualitätssicherung und Kontrolle“ siehe Kapitel 8, Anhang).

Vorträge

- › Neue Analysemethoden und ihre Anwendungsmöglichkeiten für die Qualitätssicherung und Kontrolle. Boner, M., Bonte, A., Hermanowski, R., Hofem, S., Huber, B., Landau, B., Langenkämper, G., Mäder, R., Mende, G., Neuendorff, J. und Niehaus, K. (2011): Neue Analysemethoden und ihre Anwendungsmöglichkeiten für die Qualitätssicherung und Kontrolle. [New analysis methods and their application possibilities for quality assurance and inspection.] Vortrag at: 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Gießen, 15.–18. März 2011. Beitrag Archiviert unter: <http://orgprints.org/17573/>
- › Boner, M., Hofem, S.: The usage of stable isotopes to prove the authenticity of organic food, especially organic eggs and organic beef. International Workshop on Organic Food Authentication: Challenge or Utopia, JRC-IRMM, Geel, Belgium, 30. November bis 1. Dezember 2009.
- › Bonte, A., Neuweiger, H., Hildermann, I., Mäder, P., Niehaus, K., Langenkämper, G.: Use of protein- and metabolite profiling techniques on wheat grain in search of biomarkers distinguishing samples grown under different agricultural systems. p. 92. Book of abstracts. 5th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, 1.–4. November 2011, eds. Pulkrabová J. and Tomaniová M, Institute of Chemical Technology, Prague.
- › Bonte, A., Langenkämper, G., Niehaus, K., Hildermann, I., Mäder, P.: Protein- and metabolitprofiling of wheat grain grown under organic and conventional agricultural systems. European PhD Conference in Food Science and Technology. Technische Universität Berlin, 8–10. September 2010.

- › Bonte, A., Kessler, N.; Neuweiger, H., Hildermann, I., Mäder, P.; Langenkämper, G., Niehaus, K.: Using Proteome- and Metabolome Profiling-Techniques for Biomarker Search on Wheat Grain grown under different agricultural Systems. p 31. Book of abstracts. Fera/JIFSAN 13th Symposium 'New developments in food science: realising the potential of 'omics' technologies', Sand Hutton, York, UK, 13.-15. Juni 2012.
- › Langenkämper, G., Bonte, A., Neuweiger, H., Hildermann, I., Mäder, P., Niehaus, K.: Organic vs. conventional farming of wheat: influence on metabolite profiles. p. 21. Book of abstracts, Max Rubner Conference, Max Rubner Institut, Karlsruhe, 9.–11. October 2011.
- › Langenkämper, G.; Bonte, A.; Niehaus, K.: Weiterentwicklung von Profiling-Methoden zur Unterscheidung von ökologischem und konventionellem Weizen. 60. Tagung für Getreidechemie in Detmold, 24.–25. Juni 2009.
- › Langenkämper, G., Bonte, A., Thonar, C., Mäder, P., Niehaus, K.: Protein- und Metabolitprofile von Weizen aus ökologischem und konventionellem Anbau. 63. Tagung für Getreidechemie in Detmold, 20.-21. Juni 2012
- › Langenkämper, G.; Bonte, A.; Zörb, C.; Niehaus, K.: Protein and metabolite profiles of organic and conventional wheat grains from the DOK field trial. In: Proceedings of the International workshop on Organic Food Authentication: Challenge or Utopia? Joint Research Centre – Institute for Reference Materials and Measurements, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2009, p. 19, Conference in Geel, Belgium, 30. November – 1. December 2009.

Poster

- › Bonte, A., Niehaus, K., Zörb, C., Langenkämper, G.: Weiterentwicklung von Profiling-Methoden zur Unterscheidung von ökologischem und konventionellem Weizen. Poster am Ausstellerstand des BMELV (MRI) auf der BioFach, Nürnberg, 17.–20. Februar 2010.
- › Bonte, A., Neuweiger, H., Hildermann, I., Mäder, P., Langenkämper, G., Niehaus, K.: Search for biomarkers to discriminate organic from conventional wheat using metabolite profiles. p. 58. Book of abstracts. Trends in Metabolomics – Analytics and Applications, DECHEMA Conference, Frankfurt a. M., 19.–20. May 2011.

Flyer

- › Weiterentwicklung von Profiling-Methoden. Unterscheidung von ökologischem und konventionellem Weizen. Flyer des Max Rubner-Instituts; Quelle: http://www.mri.bund.de/no_cache/de/veroeffentlichungen/verbraucherinformationen/unterscheidung-von-oekologischem-und-konventionellem-weizen.html.

Veröffentlichungen

- › Boner, M., Bonte, A., Hermanowski, R., Hofem, S., Huber, B., Landau, B., Langenkämper, G., Mäder, R., Mende, G., Neuendorff, J., Niehaus, K., Stolz, P.: Neue Analysenmethoden und ihre Anwendungsmöglichkeiten für die Qualitätssicherung und Kontrolle. Es geht ums Ganze: Forschen im Dialog von Wissenschaft und Praxis. Beiträge zur 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Gießen, 16.–18. März 2011, Band 1: Boden–Pflanze–Umwelt,

Lebensmittel und Produktqualität, S. 358–361. 2011, Hrsg. Leithold, G., Becker, K., Brock, C., Fischinger, S., Spiegel, A.-K., Spory, K., Wilbois, K.-P., Williges, U., Verlag Dr. Köster, Berlin.

- Bonte, A., Neuweiger, H., Hildermann, I., Mäder, P., Niehaus, K., Langenkämper, G.: Use of protein- and metabolite profiling techniques on wheat grain in search of biomarkers distinguishing samples grown under different agricultural systems. p. 92. Book of abstracts. 5th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prague, 1.–4. November 2011, eds. Pulkrabová J. and Tomaniová M, Institute of Chemical Technology, Prague.
- Frükschütz, L.: Kann man Bio sicher erkennen? BioHandel, 2013, (02/13), 33-35.
- Henryson, A., Hermanowski, R., Mäder, R., Wirz, A.: Eine sinnvolle Ergänzung zur Ökokontrolle. Ökologie & Landbau, 2012, 164 (4/2012), 46-48.
- Langenkämper, G., Bonte, A., Neuweiger, H., Hildermann, I., Mäder, P., Niehaus, K.: Organic vs. conventional farming of wheat: influence on metabolite profiles. p. 21. Book of abstracts, Max Rubner Conference, Max Rubner Institut, Karlsruhe, 9.–11. October 2011.

6 Zusammenfassung

Insbesondere in Zweifelsfällen sollten Verfahren zur Verfügung stehen, die Rückschlüsse zulassen, ob ein Produkt ökologisch oder konventionell erzeugt wurde. Ziel des Projektes war es dementsprechend, diskriminierende Methoden zu evaluieren und diese nach vorgängig festgelegten Kriterien, wie Anwendungsmöglichkeiten und Aussagesicherheit für Qualitätssicherungssysteme in den Unternehmen, aber ebenso für die Anwendung im Kontrollsystem durch Kontrollstellen und den zuständigen Behörden, zu bewerten.

Die **Methodenübersicht** erbrachte das Ergebnis, dass bei Lebensmitteln tierischen Ursprungs die Fettsäureanalytik und die Stabil-Isotopen-Analytik (alleine oder in Kombination) vielversprechend für die Differenzierung von konventionellen und ökologischen Produkten wie Kuhmilch, Kuhmilchprodukten, Hühnereiern und Lachs sind. Andere Erfolg versprechende Methoden sind die Analytik der Isomere des Carotins Astaxanthin für die Diskriminierung von Wildlachs sowie konventionellem und ökologischem Zuchtlachs und die Überprüfung der korrekten Anwendung von Tetracyclin-Antibiotika in der Schweine- und Geflügelhaltung anhand von Fluoreszenzmikroskopie von Knochenschnitten. Bei den pflanzlichen Lebensmitteln werden in der Praxis ökologisch erzeugte und konventionelle Produkte häufig mit dem Nachweis von chemisch-synthetischen Pflanzenschutzmitteln unterschieden. Andere Methoden für die Differenzierung zwischen ökologischen und konventionellen Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs machen sich die Unterschiede zwischen den Anbausystemen zunutze, welche sich auf die Stoffwechselprodukte (Proteom, Metabolom, Inhaltstoffe) und in den Verhältnissen der Stabil-Isotope auswirken.

Im Rahmen des Projekts wurden die **Stabil-Isotopen-Methode**, die **Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie** und **Profiling-Techniken** auf ihre Eignung geprüft.

Mit der **Stabil-Isotopen-Methode** können die natürlichen nicht radioaktiven Isotopenverteilungen der Bioelemente (COHNS) erfasst werden. Dazu werden spezielle Isotopenmassenspektrometer (IRMS) genutzt, die in Kombination mit Elementaranalysatoren und Austauschverfahren die jeweiligen Isotopenverhältnisse aus den Produktengasen (N_2 , CO_2 , SO_2 , H_2 , CO) bestimmen. Die natürliche Isotopenverteilung spiegelt einen physikalischen Fingerabdruck in der Natur wider und kann für vielfältige Fragestellungen hinsichtlich der Authentizität genutzt werden. Die Grundlage der Stabil-Isotopen-Methode ist der Aufbau von Referenzdatenbanken, die eine Differenzierung nach Herkunft und Anbauweise (ökologisch/konventionell) ermöglichen. So spiegeln zum Beispiel die Isotopenverhältnisse des Stickstoffs die Düngung im ökologischen und konventionellen Landbau und die Isotope des Gewebewassers die regionalen und länderspezifischen Unterschiede wider. In der Aufarbeitung wurde den Proben entsprechend in Gewebewasser (Gefriertrocknung) und Trockenmasse separiert und es wurden die jeweiligen Isotopenverhältnisse bestimmt. Insgesamt wurden neun Produkte evaluiert und die Datenbank wurde auf vier Leitprodukte (Weizen, Möhren, Kartoffeln und Hühnereier) konzentriert. Insgesamt wurden im Projekt 816 Proben auf die Isotopenverhältnisse der Bioelemente analysiert. Die erstellten Datenbanken wurden mit 329 Blindproben geprüft. Es konnte aufgezeigt werden, dass die stabilen Isotope signifikante Differenzierungsmöglichkeiten für Produkte aus ökologischer und konventioneller Landwirtschaft bieten, insbesondere wenn eine Verknüpfung mit Informationen über die Düngungsart gewährleistet werden kann. Dabei sind nicht nur die Isotope des Stickstoffs hilfreich, sondern auch andere Isotope wie der Kohlenstoff (Weizen). Die Signifikanz der Bewertung ist abhängig von der Güte der Datenbank. So wurden die besten Ergebnisse in den Blindtests für Hühnereier (ökologisch/konventionell) erzielt, bei denen mehr als 600

Referenzdatensätze zur Verfügung standen. Ein wesentlicher Vorteil ist dabei die Darstellung der Wahrscheinlichkeit, mit der die Aussage charakterisiert werden kann. Daneben wurde die Anwendung der stabilen Isotope zur Herkunftsüberprüfung und zum Chargenabgleich (Hühnereier) ausgetestet. Hierbei konnte die Stärke des physikalischen Fingerabdrucks aufgezeigt werden, da die Proben fehlerfrei differenziert werden konnten.

Mit der **Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie (FAS)** wurden Hühnereier und Weizenproben untersucht. Die FAS ist ein Verfahren, bei dem nach definierter optischer Anregung die Lichtemission einer Probe zeitabhängig gemessen wird. Verschiedene Untersuchungen belegen probentypische Kurvenverläufe dieser Lichtemission und deren Korrelation mit charakteristischen Merkmalen der Proben. Probenvorbereitung, Messbedingungen und die Bewertung der Kurvenverläufe müssen probenspezifisch erforscht werden. Für Hühnereier und Weizen wurde die Methodik, aufbauend auf Ergebnissen aus verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten, weiterentwickelt. Mithilfe von authentischen Referenzproben wurden statistisch signifikante Kenngrößen zur Unterscheidung nach ökologischer und konventioneller Erzeugung bestimmt und mit den bekannten Kenngrößen abgeglichen. Für die Ergebnisse konnten probenspezifische Datenbanken erstellt und mit Messergebnissen aus früheren Untersuchungen erweitert werden. Die ermittelten Parameter zur Differenzierung wurden mit codierten Probenserien getestet. Zur Problematik der Lagerung von Weizenproben und möglichen Veränderungen während der Untersuchung erfolgten Testversuche. Bei Hühnereiern konnten circa 90 % der Proben korrekt durch die Parameter R40w, R80ge und R80geDbI unterschieden werden. Für einen Praxistest wurde retrospektiv eine mögliche jahreszeitliche Verschiebung der ermittelten Grenzbereiche dargestellt. Für Weizenproben wurde eine Unterteilung in Gruppen in den Parametern R40geDbI und Mw1/R80ge festgestellt. Innerhalb einer Gruppe konnte die Unterscheidung der Anbauvarianten mit Ergebnissen aus DOK-Weizenproben verschiedener Erntejahre anhand des kurzfristigen Grün/Blau-Verhältnisses Mw1grDbI belegt werden. Mit einem weiterentwickelten Bewertungsverfahren wurden circa 80 % der codierten Weizenproben korrekt differenziert. Proben aus den DOK-Versuchen der Erntejahre 2007 und 2009 wurden alle richtig nach konventioneller oder ökologischer Erzeugung gruppiert. Nach einer einjährigen Lagerung von Weizenproben bei -26 °C konnte die Differenzierung der Proben reproduziert und die Keimfähigkeit in Testversuchen nachgewiesen werden.

Mit **Profiling-Techniken** werden in einem Analysengang ganze Substanzklassen in biologischen Proben wie Weizen erfasst. Zur Analyse der Stoffwechselprodukte, hier Metabolite genannt, wurde die Gaschromatografie-Massenspektrometrie eingesetzt. Die Erfassung der Weizenproteine erfolgte mit zweidimensionaler Gelelektrophorese und Massenspektrometrie. Für das Profiling wurden zwei Weizenkontingente des DOK-Feldversuchs (Schweiz), jeweils aus einer ökologischen und einer konventionellen Anbauvariante, verwendet. Vom ersten Kontingent, der Sorte Runal, wurde Material aus drei Ernten analysiert. Das zweite Kontingent bestand aus insgesamt zehn verschiedenen Weizensorten. Die Auswahl der Proben erlaubt eine Einschätzung der natürlichen Schwankungsbreite der Metabolit- und Proteinprofile in mehreren Wachstumsperioden und bei verschiedenen Sorten. Metabolit-Profiling leistete eine Unterscheidung nach Anbauart für die einzelnen Sorten und für den Weizen der drei einzelnen Anbaujahre. Jedoch wurde die Erfassung der anbauartbedingten Änderungen des Metaboloms erschwert durch deutliche sorten- und wachstumsperiodenabhängige Schwankungen im Metabolom. Dennoch konnte gezeigt werden, dass einige Metabolite mit signifikanten Unterschieden zwischen den Anbauarten in der Regel über alle Sorten erhöhte bzw. niedrigere Werte aufweisen. Mathematische Klassifikationsverfahren zeigen vielversprechende Ergebnisse, Weizen einer Wachstumsperiode aufgrund der Anbauart zuzuordnen zu können. Das Protein-Profiling mit der Sorte Runal ergab in drei Erntejahren wenige Proteine, die

anbauartsspezifisch verschieden stark auftraten. Im Jahresvergleich zeigten sich keine Übereinstimmungen der jeweils differenziell auftretenden Proteine. Eine Ursache für dieses heterogene Ergebnis könnte sein, dass jahreszeitliche Schwankungen einen größeren Einfluss auf die Proteingehalte haben als die Anbaumethode. Der Sortenvergleich des Anbaujahrs 2007 spiegelte die Ergebnisse des Jahrgangvergleichs: wenige individuelle Proteine mit signifikanten Unterschieden wurden in den verschiedenen Sorten gefunden. Die Proteinidentifizierung erlaubte eine Zusammenfassung der individuellen Proteine zu Proteinklassen. In dieser Betrachtung wurde deutlich, dass im Anbaujahr 2007 und auch über Sortengrenzen hinweg stabile Expressionsunterschiede in Speicherproteinklassen auftraten. Ob mit einer Analyse der Expressionsmuster von Proteinklassen eine sichere Unterscheidung von ökologischem und konventionellem Weizen möglich ist, müssen weitergehende Forschungsarbeiten klären.

Im Rahmen von **Praxistests** wurde mittels einer Versuchsreihe mit Referenz-, Blind- und Praxisproben die Tauglichkeit der Methoden IRMS und FAS hinsichtlich der Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Produkten getestet. Untersucht wurden die Produkte Eier und Weizen mit beiden Methoden sowie Kartoffeln, Möhren, Tomaten und Möhrensaft mit IMRS. Darüber hinaus wurde der Fragestellung nachgegangen, inwieweit sich die IMRS-Methode zur Verifizierung der Herkunft eines Produktes von einem bestimmten Betrieb oder aus einer bestimmten Region eignet. Die Praxistests zeigten, dass beide Methoden nur dann gute Ergebnisse leisten, wenn eine ausreichend gute Referenzbasis vorhanden ist, mit der die Ergebnisse der untersuchten Blind- bzw. Praxisproben verglichen werden können. Dies legt den Schluss nahe, dass die Methoden insbesondere für die Fragestellung geeignet sind, ob eine untersuchte Probe mit den Eigenschaften zuvor untersuchter Referenzproben übereinstimmt. Bezüglich der mit der IRMS untersuchten Fragestellung, ob ein Produkt von einem bestimmten Betrieb, einer Gruppe von Betrieben oder aus einer bestimmten Region stammt, sind die Ergebnisse vielversprechend. Um die Methode hinsichtlich dieser Fragestellung zu einem gängigen Qualitätssicherungsinstrument zu entwickeln, bedarf es allerdings einer Standardisierung der Verfahren für die Probenahme, Probenaufbereitung und Analytik sowie des Aufbaus einer gemeinsamen Referenzdatenbank. Dieser Ansatz wird mit dem Konzept „Wasserzeichen“ weiterverfolgt werden.

7 Literaturverzeichnis

- Andersen, J.-O. (2001): Development and application of the bio-crystallisation method. Biodynamic Research Association Denmark, Report 1.
- Andersen, J.-O., M. Huber, J. Kahl, N. Busscher, und A. Meier-Ploeger (2003): A concentration matrix procedure for determining optimal combinations of concentrations in biocrystallisation. *EdN*, 79: 97–114.
- Angerosa, F., O. Bréas, S. Contento, C. Guillou, F. Reniero, und E. Sada (1999): Application of Stable Isotope Ratio Analysis to the Characterization of the Geographical Origin of Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (3): 1013–1017.
- Anonymus (2004): Jahresbericht 2004 des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit – Teil D – Analytische und diagnostische Arbeiten. Am 26.01.2011 unter http://www.lgl.bayern.de/publikationen/doc/jahresberichte/2004/kapitel_d_2004.pdf abgerufen.
- Balzer-Graf, U. und F. Balzer (1988): Steigbild und Kupferchloridkristallisation – Spiegel der Vitalaktivität von Lebensmitteln. In: *Lebensmittelqualität – ganzheitliche Methoden und Konzepte*. Meier-Ploeger, A., Vogtmann, H., Verlag C. F. Müller Karlsruhe. *Alternative Konzepte* 66: 163–210.
- Balzer-Graf, U. (2001): Vitalqualität – Qualitätsforschung mit bildschaffenden Methoden. *Ökologie und Landbau* 117(1): 22–24.
- Bateman, A. S., S. D. Kelly, und M. Woolfe (2007) Nitrogen isotope composition of organically and conventionally grown crops, *J. Agric. Food Chem.* 55, 2664-2670
- Bateman, A. und S. Kelly (2007): Fertiliser nitrogen isotope signatures. *Isotopes in Environmental and Health Studies* 43 (3): 237–247.
- Bateman, A., S. Kelly, und T. D. Jickells (2005): Nitrogen isotope relationships between crops and fertiliser: implications for using nitrogen isotope analysis as an indicator of agricultural regime. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (14): 5760–5765.
- Battaglini, L. M., M. Renna, A. Garda, C. Lussiana, V. Malfatto, A. Mimosi, und M. Bianchi (2009): Comparing milk yield, chemical properties and somatic cell count from organic and conventional mountain farming systems. *Italian Journal of Animal Sciences* 8 (2): 384–386.
- Beck, A. (2000): Die Qualität wird die Zukunft entscheiden. *Gäa-Journal - Fachmagazin für Öko-Landbau, Markt und Ernährung* 3: 10–11.
- Bergamo, P., E. Fedele, L. Iannibelli, und G. Marzillo (2003): Fat-soluble vitamin contents and fatty acid composition in organic and conventional Italian dairy products. *Food Chemistry* 82: 625–631.
- Berth, M., F.M. Moser, M. Kolbe und J. Bernhardt (2007): The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76:1223–1243.
- Bischof, M. (1995): *Biophotonen – Das Licht in unseren Zellen*, Zweitausendeins Frankfurt/M. ISBN 3-86150-095-7.
- Boner, M. und H. Förstel (2001): Überprüfung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse im Schaum- und Perlwein. *Deut. Weinbau* 15: 18–23.
- Boner, M. und S. Hofem (2009): The usage of stable isotopes to prove the authenticity of organic food especially organic eggs and organic beef. In: *Proceedings of the International*

Workshop on Organic Food Authentication: Challenge or Utopia? Geel, Belgium, 30. November – 01. December 2009. JRC Technical Notes.

Boner, M. (2003): Herkunftsbestimmung von Bioeiern und deren mögliche Differenzierung von konventionellen Eiern mithilfe der stabilen Isotope der Bioelemente. Abschlussbericht des Projekts 02OE542 des Bundesprogramms Ökologischer Landbau.

Beitrag archiviert unter <http://orgprints.org/5947/1/5947-02OE542-agroisolab-boner-2003-isotope.pdf>.

Boner, M. (2006): Überprüfung der Authentizität von Rindfleisch (Bio) mithilfe der stabilen Isotope der Bioelemente. Dissertation vorgelegt bei der Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn.

Beitrag archiviert unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online/landw_fak/2006/boner_markus/0804.pdf.

Brandt, K. und J. P. Molgaard (2001): Organic agriculture: does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods? *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 924–931

Bray, E. A., J. Bailey-Serres, und E. Weretilnyk (2000): Responses to abiotic stress. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. B. B. Buchanan, W. Gruissem, und R. L. Jones (Hrsg.), American Society of Plant Physiologists, Rockville, 1158–1203.

Bunk, B. (2007): MetaQuant: Quantifizierung von GC-MS-basierten Hochdurchsatz-Metabolomdaten. Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. Am 25.01.2011 abgerufen unter http://www-public.tu-bs.de:8080/~bbunk/Diplomarbeit_2007.pdf.

Busscher, N. und J. Kahl (2003): Kupferchlorid-Kristallisation. In: *Ganzheitliche Untersuchungsmethoden zur Erfassung und Prüfung der Qualität ökologischer Lebensmittel: Stand der Entwicklung und Validierung – Abschlussbericht Projekt Bundesprogramm Ökologischer Landbau Nr. 02OE170*. Kahl, J., Busscher, N., Meier-Ploeger, A., Rahmann, K., Strube, J., Stolz, P., Staller, B., Werries, A., Mergardt, G., Mende, G., Negendank, C., Böhm, B., Köhl-Gies, B., Merschel, M., Weirauch, K., Universität Kassel in Kooperation mit KWALIS, Elektrochemisches Qualitätsconsulting GmbH und Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft: 15–60.

Busscher, N., J. Kahl, G. Mergardt, J.-O. Andersen, M. Huber und A. Meier-Ploeger (2003): Vergleichbarkeit von Qualitätsuntersuchungen mit den Bildschaffenden Methoden (Kupferchlorid-Kristallisation). In Freyer, Bernd (Hrsg.): *Ökologischer Landbau der Zukunft – Beiträge zur 7. Wissenschaftstagung zum Ökologischen Landbau (24.–26. Februar 2003)*, S. 217–220. Universität für Bodenkultur Wien, Institut für Ökologischen Landbau.

Beitrag archiviert unter <http://orgprints.org/1027/1/busscher-et-al-2003-CuCl2-Kristallisation.pdf>.

Busscher, N., J. Kahl, J.-O. Andersen, M. Huber, G. Mergardt und A. Meier-Ploeger (2006): Das Verfahren der Biokristallisation und das Konzept der Selbstorganisation. *EdN*, 85, 93–103.

Butler, G., J. H. Nielsen, T. Slots, C. Seal, M. D. Eyre, R. Sanderson und C. Leifert (2008): Fatty acid and fat-soluble antioxidant concentrations in milk from high- and low-input conventional and organic systems: seasonal variation *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 1431–1441.

Butler, G., S. Stergiadis, M. Eyre, C. Leifert, A. Borsari, A. Canever, T. Slots, und J.H. Nielsen (2007): Effect of production system and geographic location on milk quality parameters. *Proceedings of the 3rd QLIF Congress, Hohenheim, Germany, March 20-23, 2007*. Archived at http://orgprints.org/view/projects/int_conf_qlif2007.html.

- Camin, F., A. Moschella, F. Miselli, B. Parisi, G. Versini, P. Ranalli, und P. Bagnaresi (2007): Evaluation of markers for the traceability of potato tubers grown in an organic versus conventional regime. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 1330–1336.
- Camin, F., M. Perini, G. Colombari, L. Bontempo, und G. Versini (2008): Influence of dietary composition on the carbon, nitrogen, oxygen and hydrogen stable isotope ratios in milk. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22: 1690-1696.
- Carcea, M., Brereton, P., Hsu, R., Kelly, S., Marmiroli, N., Melini, F., Soukoulis, C., Wenping, D. (2009): Food authenticity assessment: ensuring compliance with food legislation and traceability requirements. *Quality Assurance and Safety of Crops und Foods* 1:93–100.
- Choi W. J. und H. M. Ro (2003): Patterns of natural ^{15}N in soils and plants from chemically and organically fertilized plants. *Soil Biol. Biochem.* 35:1493.
- Collomb, M., W. Bisig, U. Bütikofer, R. Sieber, M. Bregy, und L. Etter (2008): Fatty acid composition of mountain milk from Switzerland: comparison of organic and integrated farming systems. *International Dairy Journal* 18 (10–11): 976–982.
- Cornish, G. B., D. J. Skylas, S. Siriamornpun, F. Békés, O. R. Larroque, C. W. Wrigley, und M. Wootton (2001): Grain proteins as markers of genetic traits in wheat. *Austrian Journal of Agricultural Research* 52:1161–1171.
- Craig, H. (1961): Isotopic variations in meteoric waters. *Science* 133: 1702.
- Dangour, A., S. Dodhia, A. Hayter, A. Aikenhead, E. Allen, K. Lock, und R. Uauy (2009): Comparison of composition (nutrients and other substances) of organically and conventionally produced foodstuffs: a systematic review of the available literature. Report for the Food Standards Agency.
- Dasko, L., H. Jijakl, und A. Maquet (2009): Application of a metabonomic approach for the discrimination of organically and conventionally grown carrots. In: *Proceedings of the International Workshop on Organic Food Authentication: Challenge or Utopia?* Geel, Belgium, 30. November – 01. December 2009. JRC Technical Notes.
- DeNiro, M. J. und S. Epstein (1978): Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica etl Cosmochimica Acta* 42: 495–506.
- Dennis, M. J. (1998): Recent developments in food authentication. *Analyst* 123: 151R-156R.
- Dewhurst, R. J., W. J. Fisher, J. K. S. Tweed, und R. J. Wilkins (2003): Comparison of grass and legume silages for milk production. 1. Production responses with different levels of concentrate. *Journal of Dairy Science* 86: 2598–2611.
- Egerer, U. (2009): Feldstudie zur Eignung der Biophotonenmessung für die Differenzierung von ökologisch und konventionell erzeugten Hühnereiern. Universität Hohenheim, 182, Dissertation, URL: <http://opus.ub.uni-hohenheim.de/volltexte/2009/404/>.
- Ellis, K. A., G. Innocent, D. Grove-White, P. Cripps, W. G. McLean, C. V. Howard, und M. Mihm (2006): Comparing the Fatty Acid Composition of Organic and Conventional Milk. *Journal of Dairy Sciences* 89:1938–1950.
- Fiehn, O. (2002): Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48: 155–171.
- Fiehn, O., J. Kopka, P. Dormann, T. Altmann, R. N. Trethewey, und L. Willmitzer (2000): Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology* 18: 1157–1161.

Grummer, R. R. (1991): Effect of Feed on the Composition of Milk Fat. *Journal of Dairy Science* 74 (9): 3244–3257.

Hajslova, J., V. Schulzova, L. Vaclavik, und K. Riddellova (2009): Metabolomic profiling employing DART-TOFMS: a challenging tool in organic crops authentication. In: *Proceedings of the International Workshop on Organic Food Authentication: Challenge or Utopia?* Geel, Belgium, 30. November – 01. December 2009. JRC Technical Notes.

Hajslova, J., V. Schulzova, P. Slanina, K. Janne, K. E. Hellenäs, und C. Andersson (2005): Quality of organically and conventionally grown potatoes: Four-year study of micronutrients, metals, secondary metabolites, enzymic browning and organoleptic properties. *Food Additives and Contaminants* 22 (6): 514–534.

Hajslova, J., V. Schulzova, L. Vaclavik, und K. Riddellova (2009): Metabolomic profiling employing DART-TOFMS: a challenging tool in organic crops authentication. In: *Proceedings of the International Workshop on Organic Food Authentication: Challenge or Utopia?* Geel, Belgium, 30. November – 01. December 2009. JRC Technical Notes.

Hammond-Kosack, K. und J. D. G. Jones (2000): Responses to plant pathogens. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. B. B. Buchanan, W. Gruissem, und R. L. Jones (Hrsg.), American Society of Plant Physiologists, Rockville, 1102–1156.

Heaton, S. (2001): *Organic farming, food quality and human health*. Soil Association – Organic standard. Bristol.

Hildermann, I., A. Thommen, D. Dubois, T., Boller, A., Wiemken, P., Mäder (2009): Yield and baking quality of winter wheat cultivars in different farming systems of the DOK long-term trials. *J. Sci. Food Agric.* 89:2477–2491.

Hobson, K. A. und R. G. Clark (1992): Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of ¹³C in tissues. *The Condor* 94: 181–188.

Jahreis, G., J. Fritsche, und H. Steinhart (1996): Monthly variations of milk composition with special regard to fatty acids depending on season and farm management systems – Conventional versus ecological. *European Journal of Lipid Science and Technology* 98 (11): 356–359.

Jellum, E., O. Stokke, und L. Eldjarn (1972): Combined Use of Gas Chromatography, Mass Spectrometry, and Computer in Diagnosis and Studies of Metabolic Disorders. *Clinical Chemistry* 18, 800–809.

Kahl, J. (2006): *Entwicklung, in-house Validierung und Anwendung des ganzheitlichen Verfahrens Biokristallisation für die Unterscheidung von Weizen-, Möhren- und Apfelproben aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten*. Habilitationsschrift für das Fach „Ökologische Lebensmittelqualität“ vorgelegt am Fachbereich Ökologische Agrarwissenschaften der Universität Kassel.

Beitrag archiviert unter <https://kobra.bibliothek.uni-kassel.de/bitstream/urn:nbn:de:hebis:34-2007061118604/1/HABILJKAHL.pdf>.

Kahl, J., M. Huber, N. Busscher, S. Kretschmer, J.-O. Andersen, G. Mergardt, M. Paulsen, P. Doesburg und A. Meier-Ploeger (2005): *Entwicklung der Biokristallisation für die Unterscheidung von Proben mittels computerunterstützter Texturanalyse und visueller Bildauswertung*. 8. Wissenschaftstagung zum Ökol. Landbau, Kassel, March 1–4.

- Kahl, J., N. Busscher, und A. Ploeger (2009): Authentication: Biocrystallisation applied on defined wheat samples. In: Proceedings of the International Workshop on Organic Food Authentication: Challenge or Utopia?, Geel, Belgium, 30. November – 01. December 2009. JRC Technical Notes.
- Kelly, M. L., E. S. Kolver, D. E. Bauman, M. E. Van Amburgh, und L. D. Muller (1998): Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *Journal of Dairy Science* 81: 1630–1636.
- Kelly, M., J. A. Tarbin, H. Ashwin, und M. Sharman (2006): Verification of compliance with organic meat production standards by detection of permitted and nonpermitted uses of veterinary medicines (Tetracycline antibiotics). *Journal of agricultural and food chemistry* 54: 1523–1529.
- Kelly, S. D. und Bateman A. S. (2010): Comparison of mineral concentrations in commercially grown organic and conventional crops – Tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and lettuces (*Lactuca sativa*). *Food Chemistry* 119 (2): 738–745.
- Köhler, B. (2001): Der Einfluß von Haltung, Fütterung und Beleuchtung auf die Biophotonenemission (delayed luminescence) sowie herkömmliche Qualitätsparameter von Hühnereiern. Dipperz, Germany, KWALIS Qualitätsforschung Fulda GmbH. 3-935769-00-8.
- Köhler, B., J. Strube, D. W. Fölsch und K. Lange (1991): Photonenemission – eine neue Methode zur Erfassung der „Qualität“ von Lebensmitteln. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 87 (3): 78–83.
- Kopka, J., A. Fernie, W. Weckwerth, Y. Gibon und M. Stitt (2004): Metabolite profiling in plant biology: platforms and destinations. *Genome Biology* 5:109.1–109.9.
- Körner C.; G.D. Farquhar, und S.C. Wong (1991): Carbon isotope discrimination by plants follows latitudinal and altitudinal trends. *Oecologia*. 88: 30.
- Kornel, B. E., T. Werner, A. Roßmann, und H.-L. Schmidt (1997): Measurement of stable isotope abundances in milk and milk ingredients — a possible tool for origin assignment and quality control. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 205 (1): 19–24.
- Kuhn, M. (2008): Building predictive models in R using the caret package. *Journal of Statistical Software* 28 (5): 1-26.
- Langenkämper, G., C. Zörb, und T. Betsche (2007): Charakterisierung von Getreide aus ökologischem und konventionellem Anbau – Anwendung von „Protein-Profilierung-Techniques“ und Inhaltsstoffanalysen. Abschlussbericht des Projekts 02OE069 des Bundesprogramms Ökologischer Landbau.
Bericht archiviert unter <http://orgprints.org/13501/1/13501-02OE069-mri-bund-langenkemper-2007-getreidecharakterisierung.pdf>.
- Lehesranta, S. J., K. M. Koistinen, N. Massat, H. V. Davies, L. V. Shepherd, J. W. McNicol, I. Cakmak, J. Cooper, L. Luck, S. O. Karenlampi, und C. Leifert (2007): Effects of agricultural production systems and their components on protein profiles of potato tubers. *Proteomics* 7:597–604.
- Lottspeich, F. (1999): Proteomanalyse – ein Weg zur Funktionsanalyse von Proteinen. *Angewandte Chemie* 111: 2630–2647.
- Lu, C. G., M. J. Hawkesford, P. B. Barraclough, P. R. Poulton, I. D. Wilson, G. L. Barker, und K. J. Edwards (2005): Markedly different gene expression in wheat grown with organic or inorganic fertilizer. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences* 272: 1901–1908.

- Macko, S. A., E. Fogel, L. Marilyn; M. H. Engel, und P. E. Hare (1986): Kinetic fractionation of stable nitrogen isotopes during amino acid transamination. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 50 (10): 2143–2146.
- Mäder, P., A. Fließbach, D. Dubois, L. Gunst, P. Fried, und U. Niggli (2002): Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* 296:1694–1697.
- Mäder, P., A. Fließbach, D. Dubois, L. Gunst, W. Jossi, F. Widmer, A. Oberson, E. Frossard, F. Oehl, A. Wiemken, A. Gattinger, und U. Niggli (2006): The DOK experiment (Switzerland). In: Long Term Field Experiments in Organic Farming. ISOFAR Scientific Series No. 1, J. Raupp, C. Pekrun, M. Oltmanns, U. Köpke (Hrsg.), Berlin: Verlag Dr. Köster, S.41–58.
- Majoul, T., E. Bancel, E. Triboi, J. Ben Hamida, und G. Branlard (2003): Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterisation of heat-responsive proteins from total endosperm. *Proteomics* 3: 175–183.
- Manca, G., F. Camin, G. C. Coloru, A. Del Caro, D. Depentori, M. A. Franco, und G. Versini (2001): Characterization of the Geographical Origin of Pecorino Sardo Cheese by Casein Stable Isotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) Ratios and Free Amino Acid Ratios. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (3): 1404–1409.
- Megdal, P. A., N. A. Craft, und G. J. Handelman (2009): A simplified method to distinguish farmed (Salmon solar) from wild salmon: Fatty acid ratios versus Astaxanthin chiral isomers. *Lipids* 44 (6): 56–576.
- Meier-Ploeger, A., J. Kahl; N. Busscher.; G. Mergardt; J. Strube; G. Mende; C. Negendank; P. Stolz; B. Böhm; B. Köhl-Gies; B. Staller; M. Merschel; A. Werries; G. Rahmann; K. Weirauch; D. Treutter; A. Degert und S. Kromidas (2003): Ganzheitliche Untersuchungsmethoden zur Erfassung und Prüfung der Qualität ökologischer Lebensmittel: Stand der Entwicklung und Validierung. Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau, Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), D-53168 Bonn. Bericht archiviert unter <http://www.orgprints.org/4815/>.
- Metges, C., K. Kempe, und H.-L. Schmidt (1990): Dependence of the carbon-isotope contents of breath carbon in milk, serum and rumen fermentation products on the ^{13}C value of food in dairy cows. *British Journal of Nutrition* 63: 187–196.
- Minagawa, M. und E. Wada (1984): Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between ^{15}N and animal age. *Geochimica et Cosmopolita Acta* 48 (5): 1135–1140.
- Molkentin, J. und A. Giesemann (2007): Differentiation of organically and conventionally produced milk by stable isotope and fatty acid analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (1): 297–305.
- Molkentin, J. und A. Giesemann (2010): Follow-up of stable isotope analysis of organic versus conventional milk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398: 1493–1500.
- Molkentin, J. (2009): Authentication of organic milk using $\delta^{13}\text{C}$ and the α -linolenic acid content of milk fat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 785–790.
- Molkentin, J.; H. Meisel, I. Lehmann, und H. Rehbein (2007): Identification of organically farmed Atlantic salmon by analysis of stable isotopes and fatty acids. *European Food Research and Technology* 224 (5): 535–543.

- Nakamura, K., D. A. Schoeller, F. J. Winkler, und H.-L. Schmidt (1982): Geographical variations in the carbon isotope composition of the diet and hair in the contemporary man. *Biomedical Spectrometry* 9 (9): 390–394.
- Nakano A.; Uehara Y. (2003): Effect of organic and inorganic fertilization on yields, ^{15}N and ^{13}C values of tomato. *Plant Soil* 255: 343.
- Neuweger, H., S. P. Albaum, M. Dondrup, M. Persicke, T. Watt, K. Niehaus, J. Stoye, und A. Goesmann (2008): MeltDB: a software platform for the analysis and integration of metabolomics experiment data. *Bioinformatics* 24:2726–2732.
- Nier, A. O. (1947): A mass spectrometer for isotope and gas analysis. *Rev. Sci. Instrum.* 18: 398.
- O’Leary M.H. (1988): Carbon isotopes in photosynthesis. *Bioscience.* 38: 328.
- Oliver, S. G., M. K. Winson, D. B. Kell, und R. Baganz (1998): Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology* 16: 373–378.
- Palmquist, D. L., A. D. Beaulieu, und D. Barbano (1993): Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal of Dairy Science* 76: 1753–1771.
- Perkins, D. N., D. J. C. Pappin, D. M. Creasy, und J. S. Cottrell (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20:3551–3567.
- Popp, F.-A. (1988): Biophotonen-Analyse der Lebensmittelqualität. In: A. Meier-Ploeger und H. Vogtmann (Hrsg.): *Lebensmittelqualität – ganzheitliche Methoden und Konzepte*. Verlag C. F. Müller GmbH, Karlsruhe, 87–112.
- Popp, F. A. und Y. Yan (2002): Delayed luminescence of biological systems in terms of coherent states. In: *Physics Letters A*. Bd. 293, S. 93–97.
- Prosser S. J. (1993): A novel magnetic sector mass spectrometer for isotope ratio determination of light gases. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes.* 125: 241.
- R Development Core Team (2008): *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.
- Rapisarda, P., M. L. Calabretta, G. Romano, und F. Intrigliolo (2005): Nitrogen metabolism components as a tool to discriminate between organic and conventional citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2664–2669.
- Rehbein, H., J. Brüggemann, W. Jira, H. Karl, I. Lehmann, M. Manthey-Karl, H. Meisel, J. Molkentin, J. Oehlschläger, U. Ostermeyer, U. Ruoff, K.-H. Schwind (2003): Entwicklung von Methoden zum Nachweis von ökologisch erzeugten Produkten am Beispiel der Lachszucht. Abschlussbericht des Projekts 02OE073/1 des Bundesprogramms Ökologischer Landbau. Bericht archiviert unter http://orgprints.org/16211/3/16211-02OE073-ble-mri_bund-2003-lachszucht.pdf.
- Rogers, K. (2008): Nitrogen isotopes as a screening tool to determine the growing regimen of some organic and nonorganic supermarket produce from new Zealand. *J. Agric. Food Chem.* 56: 4078.
- Röhlig, R. M. und K.-H. Engel (2010): Influence of the Input System (Conventional versus Organic Farming) on Metabolite Profiles of Maize (*Zea mays*) Kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (5): 3022–3030.

- Röhlig, R. M., J. Eder, und K-H. Engel (2009): Metabolite profiling of maize grain: differentiation due to genetics and environment. *Metabolomics* 5 (4): 459–477.
- Rose, J.K., S. Bashir, J. J. Giovannoni, M. M. Jahn, und R. S. Saravanan (2004): Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J.* 39:715–733.
- Rossmann, A., G. Haberhauer, S. Hölzl, P. Horn, F. Pichlmayer, und S. Voerkelius (2000): The potential of multielement stable isotope analysis for regional origin assignment of butter. *European Food Research and Technology* 211 (1): 32–40.
- Rozumek, M. (2004): Möglichkeiten und Grenzen bildschaffender Methoden. *Lebendige Erde* 55(5): 44–48.
- Ruth, B. und F.-A. Popp, (1976): Experimentelle Untersuchungen zur ultraschwachen Photonenemission biologischer Systeme. *Zeitschrift für Naturforschung* 31c: 741–745.
- Sauter, H., M. Lauer, und H. Fritsch (1991): Metabolic profiling of plants: a new diagnostic technique. *ACS Symposium series – American Chemical Society* 443: 228–299.
- Schudel, P., F. Augstburger, M. Eichenberger, H. Vogtmann und P. Matile (1980): Kompost und NPK-Düngung zu Spinat im Spiegel empfindlicher Kristallisation und analytischer Daten, Teil 1. *Lebendige Erde* 31: 67–70.
- Shearer G.B., D.H. Kohl, und B. Commoner (1974): The precision of determinations of the natural abundance of Nitrogen-15 in soils, fertilizers, and shelf chemicals. *Soil Science* 118 (5): 308–314.
- Shewry, P.R., R. D'Ovidio, D. Lafiandra, J. Jenkins, E. Mills, und F. Bekes (2009): Wheat grain proteins. In: *Wheat: chemistry and technology*, K. Khan und P.R. Shewry (Hrsg.), St Paul: American Association of Cereal Chemists, Inc (AACC), S.223–298.
- Siderer, Y., A. Maquet, und E. Anklam (2005): Need for research to support consumer confidence in the growing organic market. *Trends in Food Science and Technology* 16: 332–343.
- Skyllas, D. J., J. A. Mackintosh, S. J. Cordwell, D. J. Basseal, B. J. Walsh, J. Harry, C. Blumenthal, L. Copeland, C. W. Wrigley, und W. Rathmell (2000): Proteome approach to the characterisation of protein composition in the developing and mature wheat grain endosperm. *Journal of Cereal Sciences* 32: 169–188.
- Soltoft, M., J. Nielsen, K. H. Laursen, S. Husted, U. Halekoh, und P. Knuthsen (2010): Effects of organic and conventional growth systems on the content of flavonoids in onions and phenolic acids in carrots and potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 10323–10329.
- Sponheimer, M., T. F. Robinson, T. E. Cerling, L. Tegland, B. L. Roeder, L. Ayliffe, M. D. Dearing, und J. R. Ehleringer (2006): Turnover of stable carbon isotopes in the muscle, liver, and breath CO₂ of alpacas (*Lama pacos*). *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20: 1395–1399.
- Stracke, B.A., J. Eitel, B. Watzl, P. Mäder, und C. E. Rüfer (2009): Influence of the production method on phytochemical concentrations in whole wheat (*Triticum aestivum* L.): A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.* 57:10116–10121.
- Strube, J. und P. Stolz (1999): Zerstörungsfreie Lebensmitteluntersuchung an Ganzproben mittels Bio-Photonen-Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie. 34. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung (DGQ), 22.–23.03.1999 in Freising-Weihenstephan, 24–254.

- Strube, J. und P. Stolz (2001): Lichtspeicherung und Lebensmittelqualität. *Ökologie und Landbau* 117 (1): 15–19.
- Strube, J. und P. Stolz (2002): Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie zur Bestimmung der Qualität von Äpfeln aus ökologischem Anbau. Vortrag: 37. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung e.V., Hannover, 04.03.2002 - 05.03.2002.
- Strube, J. und P. Stolz (2004): Lebensmittel vermitteln Leben – Lebensmittelqualität in erweiterter Sicht. Dipperz, KWALIS Qualitätsforschung Fulda GmbH. 3-935769-01-6.
- Strube, J. und P. Stolz (2007): Differenzierung und Klassifizierung von Ökoprodukten mittels validierter analytischer und ganzheitlicher Methoden. Abschlussbericht zum Projekt 02OE170/F2 des Bundesprogramms Ökologischer Landbau. Beitrag archiviert unter http://orgprints.org/14072/1/14072-02OE170_F2-kwalis-strube-2007-oekoprodukte.pdf.
- Strube, J. und P. Stolz (2009): Long term fluorescence excitation spectroscopy – a view on its potential for organic food authentication. In: Proceedings of the International Workshop on Organic Food Authentication: Challenge or Utopia? Geel, Belgium, 30. November – 01. December 2009. JRC Technical Notes.
- Strube, J. und P. Stolz (2010): The Application of Fluorescence Excitation Spectroscopy of Whole Sample for Identification of the Culture System of Wheat and Carrots-Method, Validation, Results. *Biological Agriculture and Horticulture* 27: 59–80.
- Sturm, A., S. und Lojen S. (2011): Nitrogen isotopic signature of vegetables from the Slovenian market and its suitability as an indicator of organic production. *Iso. Env. Health Studies*. 47: 214.
- Thorsdottir, I., J. Hill, und A. Ramel (2004): Seasonal variation in cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid content in milk fat from Nordic countries. *J. Dairy Sci.* 87:2800–2802.
- Turner, G. L., F. H. Bergersen, und H. Tantala (1983): Natural enrichment of (¹⁵)N during decomposition of plant material in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 15 (4): 495–497.
- Unkovich, J. und J. Pate (2000): An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crop Res.* 1999: 211.
- Vensel, W. H., C. K. Tanaky, N. Cai, J. H. Wong, B. B. Buchanan, und W. J. Hurkman (2005): Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics* 5: 1594–1611.
- Vetter, W. und M. Schröder (2010): Concentrations of phytanic acid and pristanic acid are higher in organic than in conventional dairy products from the German market. *Food Chemistry* 119 (2): 746–752.
- Weckwerth, W. und Morgenthal, K. (2005): Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discovery Today*, 10 (22): 1551–1558.
- Wijesundera, C., Z. Shen, W. J. Wales, und D. E. Dalley (2003): Effects of cereal grain and fibre supplements on the fatty acid composition of milk fat of grazing dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Research* 70: 257–265.
- Winkler, J. und H.-L. Schmidt (1980): Einsatzmöglichkeiten der ¹³C-Isotopen-Massenspektrometrie in der Lebensmitteluntersuchung. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchungen und Forschung* 94: 85–93.

Wong, J. H., N. Cal, Y. Balmer, C. K. Tanaka, W. H. Vensel, W. J. Hurkmann, und B. B. Buchanan (2004): Thioredoxin targets of developing wheat seeds identified by complementary proteomic approaches. *Pytochemistry* 65: 1629–1640.

Wyss, G. S. und K. Nowack (2006): Konzept zur Beurteilung von Pestizidrückständen in Bioprodukten. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 97(4): 312–322.

Yoneyama, T.; K. Kouno und J. Yazaki (1990): Variation of natural ^{15}N abundance of crops and soils in Japan with special reference to the effect of soil conditions and fertilizer application. *Soil Science and Plant Nutrition*, 36 (4): 667–675.

Yoneyama; T. (1990): Variation of natural nitrogen-15 abundance of crops and soils in Japan with special reference to the effect of soil conditions and fertilizer application. *Soil Sci. Plant. Nutr.* 36: 667.

Zeiger, B. F. und F.-A. Popp (1997): Anwendung der Biophotonenanalyse zur Bestimmung der Vitalität von Getreide-Zusammenfassung der 1995/96 durchgeführten Vitalitätsbestimmungen von Weizen mittels der Biophotonenmethode. Institut für Biophotonik Prof. F.-A. Popp.

Zörb, C., G. Langenkämper, T. Betsche, K. Niehaus, und A. Barsch (2006): Metabolite profiling of wheat grains (*Triticum aestivum* L.) from organic and conventional agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8301–8306.

Zörb, C., K. Niehaus, A. Barsch, T. Betsche, und G. Langenkämper (2009): Level of compounds and metabolites in wheat ears and grains in organic and conventional agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 9555–9562.

Zörb, C., T. Betsche, und G. Langenkämper (2009): Search for diagnostic proteins to prove authenticity of organic wheat grains (*Triticum aestivum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 57:2932–2937.

8 Anhang

Neue Analysemethoden und ihre Anwendungsmöglichkeiten für die Qualitätssicherung und Kontrolle

Boner, M.¹, Bonte, A.², Hermanowski, R.³, Hofem, S.⁴, Huber, B.⁵, Landau, B.⁶, Langenkämper, G.⁷, Mäder, R.⁸, Mende, G.⁹, Neuendorff J.¹⁰, Niehaus, K.¹¹ und Stolz, P.⁹

Keywords: Traceability, Control System, Quality Assurance, Isotope Ratio Mass Spectrometry, Fluorescence Excitation Spectroscopy, Profiling Techniques

Abstract

Three methods for analytical traceability and verification of product authenticity are evaluated. The objective is to assess whether and how these methods can be used in the quality assurance and control system to verify the organic quality of a product. The methods assessed are the Isotope Ratio Mass Spectrometry, the Fluorescence Excitation Spectroscopy and Profiling Techniques. The last two methods show first promising results for assessing product authenticity. The potential of these methods to become important tools in the quality assurance and control system will be discussed after finalizing the practical tests.

Einleitung und Zielsetzung

Im Rahmen des Projektes „Weiterentwicklung und Nutzungsempfehlungen ausgewählter Methoden zur Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Produkten“ werden Analysemethoden nach vorgängig festgelegten Kriterien bewertet, z. B. nach Anwendungsmöglichkeiten und Aussagesicherheit für Qualitätssicherungssysteme in den Unternehmen, für Kontrollstellen und Behörden im Kontrollsystem. Ein Ziel des Projekts ist die Weiterentwicklung der stabilen Isotopenmassenspektrometrie (IRMS) und der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie (FAS), zwei Methoden, die auf unterschiedliche Weise Rückschlüsse auf die ökologische Qualität der Erzeugnisse zulassen. Diese Methoden sollen auf ein breiteres Spektrum von Produktgruppen bzw. Produkten ausgeweitet werden. Das vorrangige Ziel des Projekts ist die Überprüfung der Praxistauglichkeit von IRMS und FAS in Praxistests anhand von Marktproben (Agrarrohwaren und verarbeitete Produkte).

¹ TÜV Rheinland Agroisolab GmbH, Prof.-Rehm-Str. 6, 52428 Jülich, DE, m.boner@agroisolab.de, www.agroisolab.de

² Max Rubner-Institut, Schützenberg 12, 32756 Detmold, anja.bonte@mri.bund.de, www.mri.bund.de und Universität Bielefeld (siehe 11)

³ FiBL Deutschland e.V., Kasseler Straße 1a, 60486 Frankfurt, DE, robert.hermanowski@fibl.org, www.fibl.org

⁴ TÜV Rheinland Agroisolab GmbH, Prof.-Rehm-Str. 6, 52428 Jülich, DE, office@agroisolab.de, www.agroisolab.de/

⁵ FiBL, Ackerstrasse, 5070 Frick, CH, beate.huber@fibl.org, www.fibl.org

⁶ FiBL, Ackerstrasse, 5070 Frick, CH, bettina.landau@fibl.org, www.fibl.org

⁷ Max Rubner-Institut, Schützenberg 12, 32756 Detmold, georg.langenkemper@mri.bund.de, www.mri.bund.de

⁸ FiBL Deutschland e.V., Kasseler Straße 1a, 60486 Frankfurt, DE, rolf.maeder@fibl.org, www.fibl.org

⁹ KWALIS Qualitätsforschung Fulda GmbH, Fuldaer Str. 21, 36160 Dipperz, DE, office@kwalis.de, www.kwalis.de

¹⁰ Gesellschaft für Ressourcenschutz mbH, Prinzenstraße 4, 37073 Göttingen, DE, jochen.neuendorff@gfrs.de, www.gfrs.de

¹¹ Universität Bielefeld, Fakultät für Biologie, Abteilung für Proteom- und Metabolomforschung, 33504 Bielefeld, DE, kniehaus@cebitec.uni-bielefeld.de, www.cebitec.uni-bielefeld.de/cebitec/igs/igs.html

358

Dieser Beitrag ist in Band 1 des Tagungsbandes der 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau erschienen. Leithold, G.; Becker, K.; Brock, C.; Fischinger, S.; Spiegel, A.-K.; Spory, K.; Wilbois, K.-P. und Williges, U. (Hrsg.) (2011): Es geht ums Ganze: Forschen im Dialog von Wissenschaft und Praxis Beiträge zur 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Justus-Liebig-Universität Gießen, 15.-18. März 2011 Band 1: Boden, Pflanze, Umwelt, Lebensmittel und Produktqualität Band 2: Tierproduktion, Sozioökonomie Verlag Dr. Köster, Berlin. Der Tagungsband kann über den Verlag Dr. Köster bezogen werden. Archiviert unter: http://orgprints.org/view/projects/int_conf_2011_wita.html

Außerdem wurde im Rahmen des Projekts eine dritte Methode weiterentwickelt, die Profiling-Methode (Protein- und Metabolitmuster), die derzeit noch keine Praxisrelevanz hat.

Projektdurchführung

Das Projekt ist in vier Teilabschnitten gegliedert. Im ersten Abschnitt (Vorevaluierung) wurden in Zusammenarbeit mit verschiedenen Ökozertifizierern und Produzenten zehn verschiedene und für den Markt relevante Ökoprodukte festgelegt. Darauf aufbauend wurden Referenzdatensätze dieser konventionellen und ökologischen Produkte entwickelt und auf die Unterscheidungsmöglichkeit zwischen konventionellen und ökologischen Produkten bewertet. Der zweite Abschnitt des Projekts fokussiert auf vier Produkte, die derzeit die höchsten analytischen Trennmöglichkeiten aufweisen: Getreide, Möhren, Tomaten und Eier. Ihre Datensätze wurden durch eine zweite Probenziehung ergänzt, so dass im derzeitigen Verlauf des dritten Projektteils (Blindproben tests) relevante Bewertungskriterien zur Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Produkten vorliegen. Der Blindproben test wird im Jahr 2011 abgeschlossen. Im vierten Projektabschnitt werden der Einsatz und die Handlungsempfehlung der verschiedenen analytischen Methoden sowie ihre mögliche Einbindung in Qualitätssicherungssysteme erarbeitet. Authentische Bio- bzw. konventionell erzeugte Proben wurden nach einem definierten Probenplan durch die am Projekt beteiligten Kontrollstelle bzw. Erzeugergemeinschaft organisiert. Sofern genügend Probenmaterial vorhanden war, wurden bei Weizen und Eiern Material der gleichen Proben mit FAS und IRMS analysiert. Für die Abklärung der Praxistauglichkeit der Analysemethoden werden auch der Aufwand und die Kosten ermittelt, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten.

Isotopenmassenspektrometrie (IRMS)

Die stabilen Isotope der Bioelemente bieten, insbesondere durch die Isotopenverhältnisse des Stickstoffs, Möglichkeiten, Produkte aus der ökologischen Landwirtschaft zu überprüfen. Das schwere (nicht radioaktive) Stickstoff-Isotop ^{15}N kommt in Düngern in unterschiedlichen Anteilen vor. Organische Dünger, insbesondere Mist/Dung, weisen im Vergleich zu Mineraldünger signifikant angereicherte $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Isotopenverhältnisse auf ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = +10\text{‰} \pm 4$) [1]. Mineraldünger hingegen weist Stickstoff-Isotopenverhältnisse auf, die bei annähernd 0 ‰ liegen. Einen ähnlichen Effekt erzielen auch Leguminosen, die im ökologischen Landbau als Vorfrüchte oder Mischkulturen weit verbreitet sind [2]. Pflanzen spiegeln die Stickstoff-Isotopenverhältnisse der verabreichten Düngung wider.[3]. Da der Einsatz von Mineraldünger in der ökologischen Landwirtschaft nicht zulässig ist, können die stabilen Isotope des Stickstoffs Hinweise liefern, welche Dünger zum Einsatz gelangt sind. Die Bewertungsgrundlagen müssen dabei durch den Aufbau von Referenzdatenbanken erarbeitet werden, denn Art der Fruchtfolge bzw. Zeitpunkt, Menge und Art der organischen Düngung können die Isotopenverhältnisse des Stickstoffs beeinflussen und die Unterscheidung erschweren [4]. Daher ist eine Verknüpfung mit Informationen der Düngung zur Interpretation der Isotopenverhältnisse des Stickstoffs sehr hilfreich. Die Signaturen der Isotopenverhältnisse des Stickstoffs können zur Überprüfung sowohl pflanzlicher wie auch tierischer Produkte, z.B. von Eiern, verwendet werden.

Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie (FAS)

Weizen- und Eierproben wurden mit der FAS untersucht. Die FAS ist ein optisches Verfahren, bei dem der zeitliche Verlauf der Lichtemission einer Probe nach definierter Anregung unter speziellen Messbedingungen ermittelt wird. Das Verfahren wurde u. a. für

359

Dieser Beitrag ist in Band 1 des Tagungsbandes der 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau erschienen. Leithold, G.; Becker, K.; Brock, C.; Fischinger, S.; Spiegel, A.-K.; Spory, K.; Wilbois, K.-P. und Williges, U. (Hrsg.) (2011): Es geht ums Ganze: Forschen im Dialog von Wissenschaft und Praxis Beiträge zur 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Justus-Liebig-Universität Gießen, 15.-18. März 2011 Band 1: Boden, Pflanze, Umwelt, Lebensmittel und Produktqualität Band 2: Tierproduktion, Sozioökonomie Verlag Dr. Köster, Berlin. Der Tagungsband kann über den Verlag Dr. Köster bezogen werden. Archiviert unter: http://orgprints.org/view/projects/int_conf_2011_wita.html

Eier beschrieben [5] und für Weizen in Anlehnung an ISO 17025 validiert [6]. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass pflanzliche und tierische Proben nach Anregung durch Licht langfristig fluoreszieren, d.h. Licht niedrigerer Energie (größerer Wellenlänge) als die Anregung emittieren. Durch Variation der Anregungswellenlänge und breitbandige Messung der Emission werden Anregungs-Spektren erhalten, die die Emission einer Probe nach Anregung mit einem Spektralabschnitt zeigen. Die optimale Anregungsdauer, der zeitliche Verlauf der Emission und das Spektrum sind grundsätzlich von der Probenart abhängig. Unter kontrollierten Bedingungen ließen sich die feineren Veränderungen des Spektrums jeder Probenart den Kulturverfahren systematisch zuordnen [7]. Weizenproben aus ökologischen bzw. konventionellen Anbauverfahren (Ernte 2009) konnten in der Messgröße R40ge/bl (prozentuales Verhältnis der langfristigen Emission nach gelber Anregung zur Emission nach blauer Anregung) und weiteren ermittelten Messgrößen nach dem Anbauverfahren getrennt werden. Dotter von Eierproben aus ökologischen bzw. konventionellen Anbauverfahren konnten in der Messgröße R40w (langfristige Emission nach weißer Anregung) signifikant getrennt werden.

Profiling-Techniken

Mit Hilfe von Proteom- und Metabolom-Profiling-Techniken wird in biologischem und konventionellem Weizen nach kombinatorischen Biomarkern gesucht. Anhand dieser Biomarker sollen Weizenproben nach ihrer Produktionsweise unterschieden werden. Winterweizen aus kontrolliertem bio-dynamischen und konventionellem Anbau stammen aus dem DOK-Feldversuch (Forschungsinstitut für Biologischen Landbau (FiBL) und Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon (ART), Schweiz). Zehn verschiedene Weizensorten von einem Anbaujahr und eine Weizensorte über drei Anbaujahre werden untersucht. Eine Quantifizierung primärer wie sekundärer Metabolite erfolgt über GC-MS und LC-MS [8]. Das Weizenproteom wird mit 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-MS analysiert wie zuvor beschrieben [9]. Der Einsatz dieser Methoden erlaubt die Bestimmung einer Vielzahl von sehr unterschiedlichen Inhaltsstoffen. Somit erhöht sich die Chance, eine Kombination von Substanzen zu identifizieren, die zur Unterscheidung von ökologischem und konventionellem Weizen genutzt werden kann. Einige der primären bereits identifizierten Metabolite, z. B. Tryptophan, Alanin und myo-Inositol, weisen Konzentrationsunterschiede auf. Mit dem Softwarepaket MeltDB wurden TAGs (Massenspektren nicht identifizierter Substanzen) gefunden, die in nahezu allen Weizensorten bei identischer Retentionszeit mit sehr ähnlichen Massenspektren auftreten. Einige dieser TAGs zeigen ebenfalls signifikante Konzentrationsunterschiede in ökologischem und konventionellem Weizen. Die Ergebnisse sind vielversprechend hinsichtlich der Identifizierung von kombinatorischen Biomarkern, die ökologischen und konventionellen Weizen aus dem DOK-Versuch unterscheiden können. Weitere Ergebnisse der Arbeiten mit Proteom- und Metabolom-Profiling-Techniken an DOK-Weizen werden vorgestellt.

Diskussion der Einsatzmöglichkeiten in der Praxis

Die ersten Ergebnisse der durchgeführten Blindtests mit FAS und IRMS deuten darauf hin, dass signifikante Bewertungsgrundlagen zur Unterscheidung von ökologischen und konventionellen Produkten aufgestellt werden können. Im Laufe des Projektes wurde die Analytik ebenfalls auf die Überprüfung der produkt- bzw. chargenbezogenen Herkunft eines Ökoproduktes erweitert. Hierzu werden weitere stabile Isotope der Bioelemente wie Wasserstoff, Sauerstoff, Schwefel und Kohlenstoff eingesetzt. Diese Erweiterung bietet eine indirekte Möglichkeit die Authentizität eines Ökoproduktes abzusichern bzw. zu überprüfen: 1) Plausibilität der regionalen Herkunft; 2) Plausibilität der Herkunft von einem bestimmten

360

Dieser Beitrag ist in Band 1 des Tagungsbandes der 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau erschienen. Leithold, G.; Becker, K.; Brock, C.; Fischinger, S.; Spiegel, A.-K.; Spory, K.; Wilbois, K.-P. und Williges, U. (Hrsg.) (2011): Es geht ums Ganze: Forschen im Dialog von Wissenschaft und Praxis
Beiträge zur 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Justus-Liebig-Universität Gießen, 15.-18. März 2011
Band 1: Boden, Pflanze, Umwelt, Lebensmittel und Produktqualität
Band 2: Tierproduktion, Sozioökonomie
Verlag Dr. Köster, Berlin.
Der Tagungsband kann über den Verlag Dr. Köster bezogen werden.
Archiviert unter: http://orgprints.org/view/projects/int_conf_2011_wita.html

Betrieb. Voraussetzungen hierfür sind die Dokumentation und die Mitführung chargenbezogener Informationen vom Beginn der Wertschöpfungskette bis hin zur Probenahme. Damit wären neue Instrumente zur Unterstützung der Prozesskontrolle geschaffen. Neben der Plausibilitätsprüfung anhand dokumentierter Informationen, Daten und Dokumenten wäre die Prüfung der Plausibilität bestimmter Aussagen auf Grundlage einer analytischen Methode möglich. Der Einsatz und die Handlungsempfehlung sowie die mögliche Einbindung von FAS und IRMS in Qualitätssicherungssysteme werden nach dem Abschluss der Praxistauglichkeitstests diskutiert.

Literatur

- G.B Shearer, Commoner B. (1974): The precision of determination of the natural abundance of nitrogen-15 in soils, fertilizers, and shelf chemicals. *Soil Science*. 118: 308
- Neuendorf, J. 1996: Beitrag des Weißklee (*Trifolium repens* L.) zur Ertragsbildung von Grünlandnarben unter besonderer Berücksichtigung von Methoden zur Quantifizierung seiner Stickstoff-Fixierung. Dissertation, Gesamthochschule Kassel
- Yoneyama, Tadakatsu (1990): Variation of natural nitrogen-15 abundance of crops and soils in Japan with special reference to the effect of soil conditions and fertilizer application. *Soil Sci. Plant. Nutr.* 36: 667.
- Bateman et al (2007): Nitrogen Isotope composition of organically and conventionally grown crops", *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 2664-2670.
- Köhler B. (2000): Der Einfluß von Haltung, Fütterung und Beleuchtung auf die Biophotonenemission (delayed luminescence) sowie herkömmliche Qualitätsparameter von Hühnereiern. Doktorarbeit, Universität Kassel (Witzenhausen)
- Strube J. (2003): Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie. in "Abschlussbericht Projektnummer 02OE170 "Ganzheitliche Untersuchungsmethoden zur Erfassung und Prüfung der Qualität ökologischer Lebensmittel: Stand der Entwicklung und Validierung". Bonn, Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) 53168 Bonn S. 61-157. <http://orgprints.org/4815/> (Abruf 25.11.2010)
- Strube J., Stolz P. (2007): Differenzierung und Klassifizierung von Öko-Produkten mittels validierter analytischer und ganzheitlicher Methoden. Abschlussbericht Projekt FKZ: 02OE170/F2 Bundesprogramm Ökologischer Landbau <http://orgprints.org/14072/> (Abruf 25.11.2010)
- Zörb,C., Langenkämper,G., Betsche,T., Niehaus,K., Barsch,A. (2006): Metabolite profiling of wheat grains (*Triticum aestivum* L.) from organic and conventional agriculture. *J.Agric.Food Chem.* 54:8301-8306.
- Zörb,C., Betsche,T., Langenkämper,G. (2009): Search for diagnostic proteins to prove authenticity of organic wheat grains (*Triticum aestivum* L.). *J.Agric.Food Chem.* 57:2932-2937.

Dieser Beitrag ist in Band 1 des Tagungsbandes der 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau erschienen. Leithold, G.; Becker, K.; Brock, C.; Fischinger, S.; Spiegel, A.-K.; Spory, K.; Wilbois, K.-P. und Williges, U. (Hrsg.) (2011): Es geht ums Ganze: Forschen im Dialog von Wissenschaft und Praxis Beiträge zur 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, Justus-Liebig-Universität Gießen, 15.-18. März 2011 Band 1: Boden, Pflanze, Umwelt, Lebensmittel und Produktqualität Band 2: Tierproduktion, Sozioökonomie Verlag Dr. Köster, Berlin. Der Tagungsband kann über den Verlag Dr. Köster bezogen werden. Archiviert unter: http://orgprints.org/view/projects/int_conf_2011_wita.html