

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, Langenkaemper, 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.langenkaemper@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, 33594 Bielefeld, DE, kniehaus@cebitec.uni-bielefeld.de, www.cebitec.uni-bielefeld.de/cebitec/igs/igs.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 Produkte 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 ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N} = +10\% \pm 4$) [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

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 des Kulturverfahrens 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

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.