

Universität Kassel
Fachbereich Ökologische Agrarwissenschaften

Habilitationsschrift
für das Fach „Ökologische Lebensmittelqualität“

**Entwicklung, *in-house* Validierung und Anwendung des
ganzheitlichen Verfahrens Biokristallisation für die
Unterscheidung von Weizen-, Möhren- und Apfelproben
aus unterschiedlichem Anbau und
Verarbeitungsschritten**

Vorgelegt von Dr. Bernhard Johannes Kahl

Witzenhausen, im März 2006

Inhaltsverzeichnis

	Vorwort	4
1	Einleitung	8
1.1	Ökologischer Landbau	8
1.2	Der wachsende Markt ökologischer Produkte	11
2	Ökologische Lebensmittelqualität	12
3	Validierung von Labormethoden	17
4	Ganzheitliche Verfahren und Methoden	25
4.1	Definition des Begriffes „ganzheitlich“	25
4.2	Darstellung der Verfahren	28
4.3	Die Biokristallisation als ganzheitliches Verfahren	32
5	Hypothesen	41
6	Beschreibung des Verfahrens	43
6.1	Überblick	43
6.2	Der Laborprozess	45
6.3	Kristallisation	47
6.4	Auswertung	50
6.4.1	Überblick	50
6.4.2	Visuelle Bildauswertung	52
6.4.3	Texturanalyse	57
6.4.4	Statistische Auswertung der Ergebnisse der Texturanalyse	61
7	Validierung der Biokristallisation	64
7.1	Definitionen und Begriffe	64
7.2	Validierungsprozess für die Biokristallisation	67
7.3	Standardisierung und Charakterisierung des Verfahrens	68
7.3.1	Einflussgröße Mischungsverhältnis	68
7.3.2	Untersuchungen zum Einsatz eines Kammerstandards	73
7.3.3	Einflussfaktoren Feuchte, Verdampfung und Kristallisation	78
7.3.4	Reproduzierbarkeit von in der Literatur beschriebenen Ergebnissen	90
7.3.5	Vergleiche zwischen verschiedenen Laboratorien	99
8	Systematische Beurteilung der Einflussfaktoren	114
8.1	Überblick	114
8.2	Einflussgrößen bei der Biokristallisation von Weizenproben	115

8.2.1	Faktoren während der Probenaufbereitung	115
8.2.2	Faktor Mischungsverhältnis	130
8.2.3	Faktor Scannen	141
8.2.4	Faktor Lagerung der Platten	142
8.3	Einflussgrößen bei der Biokristallisation von Möhrenproben	143
8.3.1	Faktoren während der Probenaufbereitung	143
8.3.2	Faktor Mischungsverhältnis	145
8.3.3	Faktor Scannen	155
8.4	Einflussgrößen bei der Biokristallisation von Apfelproben	156
8.4.1	Faktor Mischungsverhältnis	156
8.5	Zusammenfassende Beurteilung der Einflussgrößen auf das Ergebnis der Methode für Weizen-, Möhren- und Apfelproben	164
9	Streuung der Methoden	166
9.1	Überblick	166
9.2	Streuung der Methode für Weizenproben	167
9.3	Streuung der Methode für Möhrenproben	171
9.4	Streuung der Methode für Apfelproben	174
10	Anwendung der Methoden zur Unterscheidung von Proben aus unterschiedlichem Anbau und verschiedenen Verarbeitungsschritten	178
10.1	Anwendung der Methode für verschiedene Fragestellungen mit Weizenproben	178
10.1.1	Unterscheidung verschiedener Weizensorten	178
10.1.2	Unterscheidung von Weizenproben aus verschiedenem Anbau	179
10.1.2.1	Weizenproben aus dem DOK-Versuch	171
10.1.2.2	Unterscheidung von Erzeugerproben aus ökologischem und konventionellem Anbau	195
10.2	Anwendung der Methode für verschiedene Fragestellungen mit Möhrenproben	199
10.2.1	Unterscheidung verschiedener Möhrensorten	199
10.2.1.1	Sortenversuch am FiBL	199
10.2.1.2	Sortenversuch Universität Kassel	205
10.2.2	Unterscheidung von Möhrenproben aus verschiedenem Anbau	208

10.2.3	Unterscheidung von Möhrenproben mit unterschiedlicher Stickstoff-Düngung	213
10.2.4	Einfluss des Wachstumsprozesses von Möhren auf das Ergebnis	214
10.2.5	Unterscheidung von Möhrenproben aus unterschiedlichen Verarbeitungsprozessen	219
10.2.5.1	Einfluss der Erwärmung (Mikrowelle) von entsafteten Möhrenproben auf das Ergebnis	219
10.2.5.2	Einfluss der Gefriertrocknung von Möhrenproben auf das Ergebnis	221
10.2.5.3	Einfluss der unterschiedlichen Safftherstellung (frisch und vergoren) von Möhrenproben auf das Ergebnis	224
10.3	Anwendung der Methode für verschiedene Fragestellungen mit Apfelproben	226
10.3.1	Unterscheidung verschiedener Apfelsorten in Abhängigkeit von der Alterung der Probenlösungen	226
10.3.2	Unterscheidung von Apfelproben aus verschiedenem Anbau	228
10.4	Kristallisation von verschiedenen Probenarten (<i>Aloe vera</i> , Mais, Milch)	232
10.4.1	Unterscheidung von zwei <i>Aloe vera</i> Lösungen mit unterschiedlicher Konzentration	233
10.4.2	Anwendung der Methode bei Maisproben	235
10.4.3	Anwendung der Methode bei Milchproben	240
11	Diskussion der Ergebnisse	242
12	Zusammenfassung	256
13	Literaturverzeichnis	258
14	Anhang	271

Vorwort

1988 wurde mir zum Abitur die Biografie von Ehrenfried Pfeiffer geschenkt, dem Nestor der Forschung zum Verfahren der Biokristallisation. Ich war von diesem Verfahren und der Art und Weise, wie es von Pfeiffer entdeckt und erarbeitet wurde, fasziniert. Während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena erinnerte ich mich an die Biokristallisation und bemühte mich um Kenntnisse des Forschungsstands über dieses Verfahren bzw. Erfahrungen mit ihm. Zuerst nahm ich Kontakt zu Dr. Ursula Balzer-Graf in Wetzikon/Schweiz auf, die u. a. mit Veröffentlichungen über die erfolgreiche Differenzierung von Proben aus unterschiedlichen Anbausystemen hervorgetreten war. Weitere Anregungen verschafften mir dann die Arbeiten von Jens-Otto Andersen von der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Kopenhagen/Dänemark, deren Ergebnisse er auf der IFOAM-Konferenz 1996 vorgestellt hatte. Seine Arbeiten bedeuteten insofern einen erheblichen Fortschritt, als er sein Verfahren im Detail beschrieb und darüber hinaus begonnen hat, es auch zu charakterisieren. Außerdem setzte er eine computergestützte Bildauswertung ein, die die Möglichkeit eröffnete, auch große Mengen an Bildern in kurzer Zeit und personenunabhängig auswerten zu können.

Mein Forschungsziel war es, für eine allgemeine Anerkennung der Biokristallisation und damit für ihre Anwendung auch außerhalb anthroposophischer Kreise die entscheidende Voraussetzung zu schaffen, nämlich dieses Verfahren zu validieren. Im Zusammenhang mit meiner Promotion am Institut für Spektrochemie und angewandte Spektroskopie in Dortmund hatte ich mit Dr. Stavros Kromidas, damals NOVIA GmbH, Saarbrücken, einen Spezialisten für die Validierung von Labormethoden kennen gelernt. Mit ihm beriet ich nun die Möglichkeit, auch ein ganzheitliches Verfahren zu validieren. Über meine Ansätze diskutierte ich ebenfalls mit Forschern auf dem Gebiet des Ökolandbaus. Für die Validierung der Biokristallisation erarbeitete ich zusammen mit Dr. Nicolaas Busscher ein Konzept und einen Forschungsplan. Diese legten wir Frau Prof. Dr. Angelika Ploeger vor, damals FH Fulda. Sie hatte bereits 1988 mit Prof. Dr. Hartmut Vogtmann das Grundlagenwerk zu ganzheitlichen Methoden und ihren Einsatz

in der Bestimmung von Lebensmittelqualität veröffentlicht. Mit dem gemeinsamen Forschungsziel der Entwicklung der Biokristallisation zur Praxisreife, übertrug Frau Prof. Ploeger Ende 2001 Nicolaas Busscher und mir den Aufbau und die Leitung der Arbeitsgruppe 'Ökologische Lebensmittelqualität' an ihrem neu errichteten Fachgebiet für 'Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur' an der Universität Kassel. Am Standort Witzenhausen wurden uns ein den Erfordernissen entsprechend ausgestattetes Chemielabor und zwei baugleiche Kristallisationskammern zur Verfügung gestellt. Als Mitarbeiterin konnten wir die versierte Laborassistentin Gaby Mergardt gewinnen, die im Verlauf dieses Projektes 21.500 Kristallbilder angefertigt hat.

Zeitgleich gründeten wir ein Netzwerk ('Triangle') mit zwei weiteren Laboratorien, die sich ebenfalls die Validierung des Verfahrens zum Ziel gesetzt haben: mit dem Louis-Bolk-Institut in Driebergen/Niederlande (Machteld Huber, Paul Doesburg) und dem Labor der Biodynamischen Forschungsstelle in Galten/Dänemark (Dr. Jens-Otto Andersen, Marianne Paulsen). Durch die Förderung von privaten sowie öffentlichen Geldgebern (u. a. die Software AG Stiftung, Darmstadt und das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft BMVEL bzw. die Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, Bonn) konnte ab 2002 eine Reihe ganzheitlicher und analytischer Verfahren und Methoden für die Unterscheidung von Proben unterschiedlicher Herkunft validiert werden. Dazu gehörten u. a. die Entwicklung und Anwendung von Methoden zur Bestimmung sekundärer Pflanzenstoffe, die im Rahmen von zwei Dissertationen (Andreas Werries 2002-2005 und Marco Roose ab 2005) validiert wurden. Marco Desche untersuchte die Praxistauglichkeit der elektrochemischen Methoden (Diplomarbeit 2004). Wichtige Beiträge im Rahmen dieses Forschungsvorhabens leisten zwei von uns angeregte und betreute Dissertationen: 2003 begann Aneta Zalecka ihre Arbeit über die Steigbildmethode, die im Netzwerk 'Triangle' charakterisiert wurde, und 2004 folgte Aumaporn Meelursarn mit der Arbeit über die Optimierung und Anwendung statistischer Modelle zur Auswertung der Bilder. Bei der statistischen Auswertung wurden wir von Bertram Schäfer und Boris Kulig von der Firma Statcon in Witzenhausen beraten.

Für die Biokristallisation musste zunächst die Dokumentation der Prozeduren erstellt und die Auswertung optimiert werden, bevor die eigentliche Validierung beginnen konnte. Andreas Degert von der Firma Papyrus in Rosengarten passte die entsprechend aufbereiteten Dokumente in die von Nicolaas Busscher entwickelte computergestützte Labordokumentation ein.

Die Standardisierung der visuellen Bildauswertung dokumentierte Sebastian Kretschmer in einer Diplomarbeit (2003), wobei wir auf die Erfahrung unserer Kollegin Monika Röger in der sensorischen Prüfung von Lebensmitteln zurückgreifen konnten. Kristine Kopp wertete in ihrer Diplomarbeit (2005) die veröffentlichten Forschungsergebnisse aus zur Charakterisierung ökologischer Lebensmittel im Hinblick auf die Anforderungen aus Erzeugung, Handel und Verarbeitung.

Diese Habilitationsarbeit war nur möglich, da wir von verschiedenen Instituten definiertes Probenmaterial zur Verfügung gestellt bekamen. Dazu gehörte das Forschungsinstitut für Biologischen Landbau in Frick/Schweiz (Christine Arncken, Dr. Paul Mäder, Dr. Franco Weibel) und das Fachgebiet Ökologischer Land- und Pflanzenbau der Universität Kassel (Prof. Dr. Peter von Fragstein und Niemsdorff, Michael Fleck). Die Proben wurden für uns vom Institut für ökologischen Landbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in Trenthorst (Prof. Dr. G. Rahmann, C. Ludwig) kodiert und transportiert. Von dort wurden auch die Proben direkt vom Erzeuger organisiert.

Seit 2005 gibt es einen Forschungsaustausch mit dem Institut für Referenzmaterialien und -methoden der Europäischen Union in Geel/Belgien (Prof. Dr. Elke Anklam) und der Landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Pisa/Italien (Maria Kokornaczyk), wo auch die Biokristallisation validiert bzw. eingesetzt wird.

Aus dem hier Mitgeteilten geht hervor, wie viel Anregung und Unterstützung ich für das Forschungsvorhaben von verschiedenen Seiten erfahren habe. Allen genannten Personen und Institutionen möchte ich dafür herzlich danken. Für die kritische Durchsicht meiner Arbeit danke ich Prof. Angelika Ploeger, Prof. Heinz Zwanziger/FH Merseburg, Benigna von Krusenstjern/Göttingen,

Machteld Huber, Nicolaas Busscher, Jens-Otto Andersen und Christian Krutzinna/Witzenhausen. Ein weiterer Dank geht auch an die Mitarbeiter und Kollegen des Fachgebietes „Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur“ für die Gespräche und den Erfahrungsaustausch. Besonders danken möchte ich Frau Prof. Ploeger für ihr stetes Interesse und ihre vielseitige Förderung. Einen Extradank verdient Nicolaas Busscher für die langjährige partnerschaftliche Zusammenarbeit.

Bernhard Johannes Kahl

Witzenhausen, im März 2006

1 Einleitung

1.1 Ökologischer Landbau

Weltweit werden mehr als 31 Millionen Hektar der landwirtschaftlichen Nutzfläche ökologisch bewirtschaftet (Willer & Yussefi 2006). Die größte Bio-Fläche befindet sich in Australien mit 12,1 Millionen Hektar, gefolgt von China mit 3,5 Millionen Hektar und Argentinien (2,8 Millionen Hektar). Im weltweiten Vergleich liegt Deutschland auf Platz sieben mit ca. 0,8 Millionen Hektar, beim Anteil der Bio-Fläche an der gesamten landwirtschaftlichen Nutzfläche mit 4,5% an dreizehnter Stelle. Diese Fläche wird von 16.603 Betrieben bewirtschaftet, wobei die Zahl der verbandsgebundenen Betriebe sinkt. Insgesamt hat sich die Zahl der ökologisch wirtschaftenden Betriebe in Deutschland in den Jahren 1997-2004 verdoppelt (Yussefi 2006).

Der ökologische Landbau ist eine ganzheitliche, systemorientierte Form der Landwirtschaft (vgl. IFOAM 2002, Vogtmann 1991). Stickstoffhaltige Mineraldünger, Pestizide, Herbizide, Fungizide und Hormone werden nicht eingesetzt (vgl. IFOAM 2002, Vogtmann 1991). Ebenso werden gentechnisch veränderte Organismen abgelehnt (vgl. IFOAM 2002). Stattdessen werden natürliche Bewirtschaftungstechniken wie Fruchtfolge, Leguminosen, Kompostdüngung und natürlicher Pflanzenschutz angewendet (EU Commission 2005, Vogtmann 1991). Die ganzheitliche, systemorientierte Form der Bewirtschaftung orientiert sich eher an einer Problemvermeidung als einer Problembekämpfung und arbeitet mit und nicht gegen die Natur (EU Commission 2005). Daher ist der konzeptionelle Hintergrund ganzheitlich statt reduktionistisch und fusst u. a. auf folgenden Ansätzen:

- Von Rudolf Steiner (Steiner 1984) wurde 1924 die biologisch-dynamische Agrarkultur begründet, woraus sich der Demeter- Verband entwickelte (Schaumann et al. 2002).
- Aus den Arbeiten von Hans Müller und Hans Peter Rusch wurde der organisch-biologische Landbau begründet, heute z. B. als Verband unter dem BIOLAND-Label bekannt (Neuerburg & Padel 1992).
- In den vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts beobachteten Forscher in Großbritannien u. a. Lady Eve Balfour und Albert Howard (Howard 1947), den Zusammenhang zwischen der Bodenfruchtbarkeit, der

Pflanzengesundheit und der Gesundheit von Mensch und Tier und prägten den Satz: „ein gesunder Boden bringt auch gesunde Pflanzen hervor, von denen sich gesunde Tiere ernähren“ (vgl. Howard 1947).

Erst 1972 wurde ein internationaler Dachverband im ökologischen Landbau gegründet, die *International Federation of Organic Agriculture Movements* (IFOAM), die 1980 zum ersten Mal allgemeinverbindliche Standards für den ökologischen Landbau und die Lebensmittelverarbeitung festlegte. Zur Einordnung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen und Ergebnisse in die allgemeine Problemstellung, soll im Folgenden auszugsweise, orientiert an den Angaben zur Produktqualität, daraus zitiert werden. Die Struktur der IFOAM *Basic Standards* gliedert sich in *General Principles, Recommendations, Basic Standards* und *Derogations* (IFOAM 2002). Im Teil 6, *Processing and Handling*, definiert die IFOAM als

General Principle

Organic processing and handling provides consumers with nutritious, high quality supplies of organic products and organic farmers with a market without compromise to the organic integrity of their products.

Dies wird spezifiziert in Punkt 6.1.2:

All organic products shall be clearly identified as such, and stored and transported in a way that prevents contact with conventional product through the entire process.

Eine eindeutige Identifizierung ökologischer Produkte wird darüber hinaus in Punkt 7 als generelles Prinzip gefordert:

Organic products are clearly and accurately labelled as organic.

Das Besondere ökologischer Produkte soll auch nach der Erzeugung erhalten bleiben, wie in Punkt 6.3 ebenfalls als generelles Prinzip formuliert:

Organic food is processed by biological, mechanical and physical methods in a way that maintains the vital quality of each ingredient and the finished product.

Zusammengefasst kann damit der Qualitätsanspruch der IFOAM formuliert werden als: es werden authentische Produkte mit hoher Qualität erzeugt, deren Verarbeitung die Vitalqualität (*vital quality*) erhalten soll. Es bleibt zu untersuchen, was als „hohe“ Qualität definiert, wie die Authentizität geprüft und die Vitalqualität untersucht werden kann.

In der Europäischen Union ist die Erzeugung, Verarbeitung und der Handel ökologischer Produkte mit der EG-Öko-Verordnung (2092/91 bzw. 1804/99) geregelt. Die Verordnung 2092/91 unterscheidet zwischen ökologischer und nicht-ökologischer Produktion, wobei die ökologische Produktion eigene Standards, Kontrollen, Zertifizierung und Kennzeichnung der Produkte hat. Die Verordnung soll sicherstellen, dass *„consumers can be confident that when buying premium-priced organic food it has been produced using well-defined organic standards“* (EU Commission 2005, S. 7).

Der aktuelle Forschungsstand zum Ökolandbau in der Europäischen Union ist in der Informationsbroschüre der EU „Organic Food and Farming Research in Europe“ zusammengefasst (EU Commission 2005). Der Vorteil ökologischer Produkte als qualitätsvoll (*high-quality food*) und gesund (*potential healthier food*) wird zwar angenommen, die bisherige Forschung dazu aber als unzureichend bezeichnet (*anecdotal evidence*, EU Commission 2005, S. 9). Ein weiteres Problem liegt in der Unterschiedlichkeit der verschiedenen Standards in den einzelnen Mitgliedsländern der EU.

Mit dem Europäischen Aktionsplan für ökologische Landwirtschaft und ökologisch erzeugte Lebensmittel (EU Commission 2004) wurden Maßnahmen zur Förderung des Ökolandbaus vorgestellt. Darin werden als Forschungsbereiche u. a. genannt:

- *The investigation of organic farming techniques through multi-disciplinary and systems approach* (hier wird dem ganzheitlichen Ansatz des Ökolandbaus Rechnung getragen).
- *More studies on the whole production chain, from farm to table, to guarantee food quality* (Authentizität der Premium-Qualität, Vitalqualität).

Aktuelle EU-Projekte widmen sich Fragen zur Lebensmittelsicherheit (ORGANIC HACCP), Marketing (OMIRAD), Verbrauchererwartungen (CONDOR) und Qualität (QLIF) ökologischer Produkte. Auch das EU-Joint Research Center, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)

in Geel/B arbeitet zu einem dieser Themen (Aktion 13 des EU-Aktionsplanes). Mit dem Projekt „Authentication of Organic Foods“ werden Methoden validiert und getestet, die den vermuteten Unterschied zwischen ökologischen und konventionellen Produkten nachweisen sollen (u. a. wird auch die Biokristallisation als ganzheitliches Verfahren eingesetzt).

1.2 Der wachsende Markt ökologischer Produkte

Nachdem der ökologische Landbau lange Zeit in einer Nische gewachsen ist („Ende der Nische“ wurde als Titel der 8. Wissenschaftskonferenz im Ökolandbau, Kassel 2005, verwendet), hat er den Markt erreicht (Hamm et al. 2004, ZMP 2004 und 2005). Mit einem Jahresumsatz von 3,5 Mrd. Euro lag der Marktanteil aller Öko-Produkte am Lebensmittelmarkt in Deutschland in 2004 bei ca. 2,5 %, wobei z.B. der Marktanteil bei Öko-Obst noch höher, bei ungefähr 5 % lag (BMVEL 2005). Produkte aus ökologischer Erzeugung besitzen einen hohen Bekanntheitsgrad (70-80 %) und haben bei etwa 60 % der Verbraucher eine positives Image (CMA 2005). Allerdings kaufen nur 8 % der Bevölkerung regelmässig Öko-Produkte.

Die Grundorientierung und die soziale Lage der Käufer bestimmt weitgehend die Einstellung zum Kauf von Öko-Produkten (CMA 2005). Zur Grundorientierung zählen Aspekte wie Alltagsbewusstsein, Lebensstil und Lebensziele. Dabei lassen sich die Käufer in verschiedene Ernährungstypen einteilen (z.B. *Öko-Moral*, *Gourmet-Genuss*, *Fast Food*, *Technical Health* etc.), deren Zugehörigkeit zu den einzelnen Milieus ermittelt wird. Danach ergeben sich vier Milieus als potentielle Zielgruppen für die Vermarktung von Öko-Produkten: *Etablierte* (statusbewusstes Establishment), *Postmaterielle* (aufgeklärte Post-68er), *Modern Performer* (junge, unkonventionelle Leistungselite) und *Bürgerliche Mitte* (Status-quo-orientierte, konventionelle Mitte). Öko-Lebensmittel als Premium-Produkte sollen diese Bevölkerungsschichten binden. Für diese Gruppen sind Wellness, Gesundheit und Selbstverwirklichung wichtig (als Lebensstil und -ziele). Zu den besonderen Leistungen des Umwelt- und Tierschutzes im ökologischen Landbau müssen daher weitere Leistungsversprechen kommen. Dazu gehören eine hohe Qualität, natürlicher Geschmack, Reinheit und Genuss (d.h. produktbezogene Qualitätsaspekte von Öko-Lebensmitteln).

Durch die stark wachsende Anzahl von Bio-Supermärkten und das immer grösser werdende Angebot im konventionellen Einzelhandel wird eine breite Käuferschicht angesprochen (CMA 2005). Gemäss Auswertung der Rohdaten aus dem GfK-Haushaltspanel 2002 verfügen Frische-Produkte aus ökologischer Erzeugung im Lebensmitteleinzelhandel (LEH) tatsächlich auch über eine Käuferreichweite von ca. 50% (CMA 2005). Deutschland hat z.Zt. mehr als 300 Bio-Supermärkte (www.organic-market.info), wobei allein im letzten Jahr 60 neue Geschäfte eröffnet haben. Die Alnatura GmbH, mit 21 Läden Marktführer, plant drei bis fünf neue Geschäfte pro Jahr. Nachdem die REWE Gruppe eine eigene Bio-Linie geschaffen hat (Füllhorn), sind von dort auch eigene Bio-Supermärkte gegründet worden (Düsseldorf und Köln in 2005), weitere sind geplant (www.organic-market.info). Im August 2005 warb das Unternehmen Lidl mit einer „ökologischen Woche“ und brachte 50 neue Bio-Produkte auf den Markt (www.organic-market.info). Dieses Wachstum im Handel ökologischer Produkte ist auch für den europäischen Markt zu beobachten (Hamm 2004). Die Verbraucher sind bereit, für ökologische Lebensmittel einen höheren Preis zu zahlen, da sie ein „Mehr“ an Qualität gegenüber Lebensmitteln aus konventioneller Erzeugung erwarten. „Das Wachstum des Marktes hängt davon ab, ob die Verbraucher die Qualität ökologischer Erzeugnisse nach wie vor höher bewerten, als solche aus herkömmlicher Erzeugung“ (EU Commission 2004, S. 8).

2 Ökologische Lebensmittelqualität

Der Anspruch des Ökolandbaus, gesunde und authentische Lebensmittel von hoher Qualität zu erzeugen, trifft die Erwartungen der Verbraucher (Torjusen et al. 2004). Für mehr als 50 % der befragten Verbraucher einer Studie in Deutschland (BMVEL 2004) sind daher die Kaufgründe:

- Tierschutz,
- Gesundheit,
- gerechter Preis für hohe Qualität,
- Frische,
- guter Geschmack und
- Vermeidung von synthetischen Pflanzenschutzmitteln (Pestizide).

Nur 15 % der Befragten achten aber auf die Kennzeichnung (Zertifizierungslabel). Die Mehrzahl der Konsumenten glaubt, dass ökologische Lebensmittel sehr wichtig für die Gesundheit ihrer Kinder sind (58 %), aber für 54 % ist der hohe Preis ein Problem, und 19 % vertrauen nicht auf die Zertifizierung. Eine nicht repräsentative Umfrage unter 20 Studenten des Kurses „Ökologische Lebensmittelqualität und -verarbeitung“ an der Universität Kassel im Wintersemester 2005/06 zeigte, dass die Mehrheit der Studenten im Studiengang „Ökologische Agrarwissenschaften“ davon ausgeht, dass zusätzlich zur Zertifizierung der Prozesse im Ökolandbau die Produkte regelmässig auf ihre besondere Qualität untersucht werden (Kahl 2005).

Die Qualität dieser Produkte wird aber über den Prozess der Produktion definiert (EU-Richtlinie 2092/91 und Richtlinien der Anbauverbände). Methoden, mit denen das Ergebnis der Prozessqualität am Produkt verifiziert und demonstriert werden kann, sind wichtig, um die vom Verbraucher erwartete besondere Qualität am Produkt nachweisen zu können. Der Konsument ökologischer Produkte geht von einem höheren Genuss- und Gesundheitswert dieser Produkte aus, dies wird wissenschaftlich aber kontrovers diskutiert (van Mansfeld 2001, Reganold et al. 2001, Clarke 2001, Tauscher et al. 2003, Grindler-Pedersen et al. 2003, Finamore et al. 2004), zumindest erwartet er einen Unterschied zu konventionell erzeugten Produkten, der den höheren Preis rechtfertigt. Daher haben Händler ökologischer Lebensmittel begonnen, die besondere Qualität ihrer Produkte über einen prüfbaren Index dem Kunden transparent darzustellen (vgl. www.natureandmore.com).

Für die Qualitätsbewertung ökologischer Lebensmittel ist die Definition von Lebensmittelqualität entscheidend. Sie muss dem ganzheitlichen, systemorientierten Ansatz des Ökolandbaus entsprechen. Dafür wurden verschiedene Konzepte vorgestellt (James 1993, Woodward & Meier-Ploeger 1999, Soil Association 2001). Produktbezogene Qualität wird vom Verbraucher wahrgenommen als

- direkte, sichtbare Eigenschaften (Farbe, Aussehen),
- einfach wahrnehmbare Eigenschaften (Geruch, Geschmack) und
- Eigenschaften, die nicht einfach und direkt zu bestimmen sind (Haltbarkeit, Nahrungswert) (Meltzer et al. 1992).

Dabei hat sich der Qualitätsbegriff in den letzten Jahrzehnten von einem produktorientierten Ansatz über eine Prozessorientierung zu einem konsumentenorientierten Ansatz entwickelt (Huyskens-Keil & Schreiner 2003). Dies hat sich auch in der Entwicklung des Qualitätsmanagements von der Endkontrolle zum Total-Quality-Management (TQM), einer ganzheitlichen Betrachtungsweise der Prozesse, gezeigt (DGQ 1992). Jeder Akteur in der Lebensmittelkette vom Landwirt bis zum Konsumenten hat dabei seine eigenen Ansprüche an die Qualität. Eine allgemein akzeptierte Qualitätsdefinition ökologischer Lebensmittel anzugeben, ist dabei aber nicht möglich, da jeder Akteur unterschiedliche Ansprüche hat und sich diese Ansprüche u. a. auch mit gesellschaftlichen Entwicklungen und fortschreitenden wissenschaftlichen Erkenntnissen verändern (Woodward & Meier-Ploeger 1998). Meier-Ploeger (2002) definiert daher Lebensmittelqualität als die Summe dieser Ansprüche und identifizierte sechs wichtige Qualitätsaspekte:

- Authentizität (u. a. Kennzeichnung)
- Funktion (u. a. Haltbarkeit)
- Biologie/Physiologie (u. a. Gesundheit)
- Ernährung
- Sinne (Wahrnehmung)
- Ethik (u. a. Umwelt, Soziales)

Dabei kommt es darauf an, aus welcher Sichtweise diese Aspekte definiert werden (Beck 2000, Spiekermann & Schönberger 2001, Soil Association 2001, Meier-Ploeger & Roeger 2004). So orientiert sich z.B. die Betrachtung der ernährungsbezogenen Qualität ökologischer Produkte bisher am Einzelstoff. Richtwerte für eine ausgewogene und gesunde Ernährung werden dabei auf den Einzelstoff bezogen formuliert (u. a. durch die Deutsche Gesellschaft für Ernährung, DGE). Die Orientierung zur Bewertung von Lebensmitteln nach einzelnen Stoffen, die analytisch von der sie umgebenden Matrix (das Produkt) abgetrennt bestimmt werden, zeigt sich auch in der offiziellen Definition von Lebensmittelqualität. Im Sinne der Verordnung 178/2002 der Europäischen Kommission sind Lebensmittel „alle Stoffe oder Erzeugnisse, die dazu bestimmt sind oder von denen nach vernünftigem Ermessen erwartet werden kann, dass

sie in verarbeiteten, teilweise verarbeiteten oder unverarbeiteten Zustand von Menschen aufgenommen werden“ (EU/EG 178/2002).

Die Betrachtung produktbezogener, ökologischer Lebensmittelqualität ist komplex, da neben der Bewertung von Einzelstoffkonzentrationen die Interaktion der Stoffe (vgl. Whitworth 2006) oder die Bestimmung von neu erkannten Eigenschaften des Produktes (Strukturfähigkeit, spektrale Lichtspeicherkapazität, physiologischer Aminosäurenstatus, sensorische Beurteilung, vgl. Strube & Stolz 2004) erforderlich ist. Neuere Untersuchungen zeigen aber, dass ein Stoff verschieden wirkt, je nachdem ob er im Verbund mit dem Lebensmittel oder isoliert aufgenommen wird (vgl. z.B. Whitworth 2006). Die Interaktion verschiedener Stoffe in einem Lebensmittel wird immer mehr zum Gegenstand der Forschung, nachdem Gesundheitsstudien auf der Basis von Applikation von Einzelstoffen keine Effekte zeigten (Palozza et al. 1992, Truscott 2001, Stanner et al. 2003, Milde et al. 2004, Trombino et al. 2004, Bösch-Saadatmandi et al. 2006). Ganzheitliche, zu den reduktionistischen Betrachtungsweisen komplementäre Ansätze zur Bewertung erfordern eine Erweiterung des Qualitätsbegriffes, der über die Definitionen, wie sie z.B. im Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) verwendet werden, hinausgehen (Meier-Ploeger & Vogtmann 1991, Meier-Ploeger 2001, Tauscher et al. 2003). Es fehlt aber ein dem ökologischen Landbau gemäßes, ganzheitliches Qualitätskonzept für die Produktbewertung (Meier-Ploeger & Vogtmann 1991, Meier-Ploeger 1995, Meier-Ploeger 2001, Kahl et al. 2005, Meier-Ploeger & Roeger 2004). Die bisherigen Ansätze (Breda 1973, Pettersson 1970, 1982, Huber et al. 1991, Schulz 2000, Bloksma 2001a, b, Velimirov 2003) haben keinen oder nur einen unzureichenden Eingang in die Praxis gefunden. Mit dem Bericht "Bewertung von Lebensmitteln verschiedener Produktionsverfahren" der vom BMVEL 2001 eingerichteten Senatsarbeitsgruppe (Tauscher et al. 2003) wurde dieses Problem beschrieben und mit entsprechenden Vorschlägen versehen. Die Empfehlungen für weitere Forschungstätigkeit reichen von der Untersuchung sekundärer Pflanzenstoffe über den Einsatz von Futterwahlversuchen bis zur Nutzung mehrerer ganzheitlicher Methoden in einer interdisziplinären Zusammenschau. Vorrangiges Ziel ist die Unterscheidung ökologischer von konventionell erzeugten Produkten (Frage der Authentizität).

Die bisherigen Studien zur Unterscheidung der Anbausysteme konnten keine eindeutigen Antworten liefern (Tauscher et al. 2003, Soil Association 2001). Messungen von Einzelstoffen zeigten widersprüchliche Ergebnisse, lediglich mit sog. ganzheitlichen Methoden wurden konsistente Unterschiede nachgewiesen. Zwar konnte belegt werden, dass ökologische Produkte weniger belastet sind als konventionelle, positive Qualitätsmerkmale, im Sinne z.B. der von der IFOAM versprochenen hohen Qualität (Ernährungs- und Vitalqualität), konnten aber durchgängig nur mit ganzheitlichen Labormethoden und in Fütterungsstudien gezeigt werden. Eine produktorientierte Definition ökologischer Lebensmittel gibt es bisher nicht. Um ökologische Lebensmittel von konventionellen zu unterscheiden, müssen Merkmale bestimmbar sein, die ein Lebensmittel als ökologisch identifizieren. Eine Prüfung von ökologischen Lebensmitteln auf ihre Authentizität setzt solche Merkmale voraus. Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass die Regelungen der Prozesse im Ökolandbau nicht einheitlich sind. Da es unterschiedliche Prozessrichtlinien gibt z.B. zwischen den Vorgaben der EU-Öko-Verordnung und ausgewählter Anbauverbände in Deutschland wird bei einer zwischen Anbausystemen vergleichenden, produktbezogenen Qualitätsbewertung eine Überlappung der Streuung der Merkmale erwartet. Es bleibt zu untersuchen, ob das Prozess-Siegel eine eindeutige Unterscheidung auch am Produkt garantiert. Dabei ist der ökologische Landbau als System zu verstehen. Das Ergebnis (das Produkt mit seiner „Biographie“) wird beeinflusst durch verschiedene Faktoren, wie Boden, Klima, Sorte, Düngung, Beikrautregulierung etc. Die produktbezogene Qualitätserfassung muss das System abbilden, d.h. das Ergebnis des Zusammenspiels aller Faktoren. Und hier liegt das Problem: Das Öko-Siegel bekommt auch der, der auf einem schlechten Boden eine ungeeignete Sorte mit unzureichender Beikrautregulierung anbaut und erntet, solange er sich konform der Anforderungen der EU-Öko-Verordnung verhält. Das Öko-Siegel bekommt auch der, der zwar nach EU-Richtlinien produziert, aber Verarbeitungstechnologien nutzt, die stark in das Produkt eingreifen (z.B. Extruder). Eine Unterscheidung nach Anbausystemen ist daher nur möglich, wenn die Systemgrenzen definiert sind. Erst dann kann es gelingen, die Streuung des Systems einzuschätzen und die Produktqualität durch Prüfungen zu garantieren. Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass sich dazu

ganzheitliche Methoden am besten eignen. Diese Methoden waren aber bisher nicht validiert und daher nicht anerkannt. Die Ergebnisse wurden wissenschaftlich kontrovers diskutiert (Meier-Ploeger & Vogtmann 1991, Woese et al. 1995, Soil Association 2001, Alföldi et al. 2001, Tauscher et al. 2003, Alföldi et al. 2006). Damit solche Methoden für die Bewertung ökologischer Produkte eingesetzt werden können, müssen sie also für die jeweilige Fragestellung validiert werden.

3 Validierung von Labormethoden

Auch wenn der Begriff Validierung in den verschiedenen Normen festgelegt ist, kommt es doch immer wieder zu Missverständnissen, besonders innerhalb von Disziplinen, wie z.B. der landwirtschaftlichen Forschung, wo der Umgang mit Labormethoden nicht zum täglichen Rüstzeug der Forschenden gehört. Daher werden einige im Zusammenhang mit Validierung verwendete Begriffe hier definiert.

Akkreditierung ist die formelle Anerkennung einer Kompetenz. In den Normen DIN EN 45020:1993 und EN 45002:1990 wird der Begriff in Bezug auf Laboratorien definiert als die „formelle Anerkennung der Kompetenz eines Prüflaboratoriums, bestimmte Prüfungen oder Prüfungsarten auszuführen“. Daneben wird Akkreditierung als in Bezug auf die Kompetenzbestätigung von Zertifizierungsstellen definiert, „in dem eine maßgebliche Stelle formell anerkennt, dass eine Stelle oder Person kompetent ist, bestimmte Aufgaben durchzuführen“.

Zertifizierung (von lat. certum facere, sicher machen) ist damit ein „Verfahren, in dem ein (unparteiischer) Dritter schriftlich bestätigt, dass ein Erzeugnis, ein Verfahren oder eine Dienstleistung vorgeschriebene Anforderungen erfüllt“ (DIN EN 45020:1993). Im Zusammenhang mit der Produkthaftung gewinnt die „geprüfte Sicherheit“ an Bedeutung. Die Zertifizierung ökologischer Produkte erfolgt bisher nicht durch die Erfassung bestimmter Produkteigenschaften, sondern durch die Überprüfung der zum Produkt führenden Prozesse.

Validierung, von lat. validus, d.h. gültig oder rechtswirksam meint in diesem Zusammenhang eine Prüfung der Gültigkeit einer wissenschaftlichen Methode bzw. der Gültigkeit eines Ergebnisses, das mit einer wissenschaftlichen Methode erzielt worden ist. Die Validierung von Labormethoden zur Erfassung

von Aspekten der Lebensmittelqualität heißt zu prüfen, ob die Methode für die Beantwortung einer Fragestellung geeignet ist (Kromidas 2000). In der Begriffsnorm DIN EN ISO 8402:1995 heißt es dazu: „Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung von Nachweisen, dass die besonderen Forderungen für einen speziellen, beabsichtigten Gebrauch erfüllt sind“. Ein Nachweis ist eine Information, „deren Richtigkeit bewiesen werden kann, und die auf Tatsachen beruht, welche durch Beobachtung, Messung, Untersuchung oder durch andere Ermittlungsverfahren gewonnen sind“.

Seit März 2000 gibt es die Europäische Norm „Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien“ ISO 17025:2000, die die allgemeine Anforderung an die Kompetenz für die Durchführung von Prüfungen und/oder Kalibrierungen, einschließlich Probenahme festlegt. Sie bezieht sich auf die „Prüfungen und Kalibrierungen, die auf der Grundlage von in normativen Dokumenten festgelegten **Verfahren**, von Verfahren, die nicht in normativen Dokumenten festgelegt sind, und von Verfahren, die in dem Laboratorium entwickelt wurden, durchgeführt werden“. Es geht also im Wesentlichen um die Qualitätssicherung in einem Labor das seine Ergebnisse an Dritte weitergibt. Im Abschnitt 5.4.5 Validierung von Verfahren, wird festgelegt, dass das Laboratorium Verfahren, die nicht in normativen Dokumenten festgelegt sind, und Verfahren, die in dem Laboratorium entwickelt wurden, validieren muss, um zu bestätigen, dass die Verfahren für den beabsichtigten Gebrauch geeignet sind. Zum Umfang der Validierung heißt es: „Die Validierung muss in dem Umfang durchgeführt werden, der zur Erfüllung der Erfordernisse der beabsichtigten Anwendung oder des betreffenden Anwendungsgebietes notwendig ist“ (ISO 17025, S. 29). Der Kunde bestimmt dabei diese Anforderungen und damit den Umfang. Zur Bestimmung der Verfahrensmerkmale werden Instrumente benannt, die entweder allein oder in Kombination verwendet werden sollen. Diese sind:

1. Kalibrierung mit Bezugsnormen oder Referenzmaterialien;
2. Vergleich mit Ergebnissen, die mit anderen Verfahren erzielt wurden;
3. Vergleich zwischen Laboratorien;
4. Systematische Beurteilung der Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen;
5. Beurteilung der Ergebnisunsicherheit auf der Grundlage wissenschaftlichen Verstehens der theoretischen Grundlagen des Verfahrens und praktischer Erfahrung.

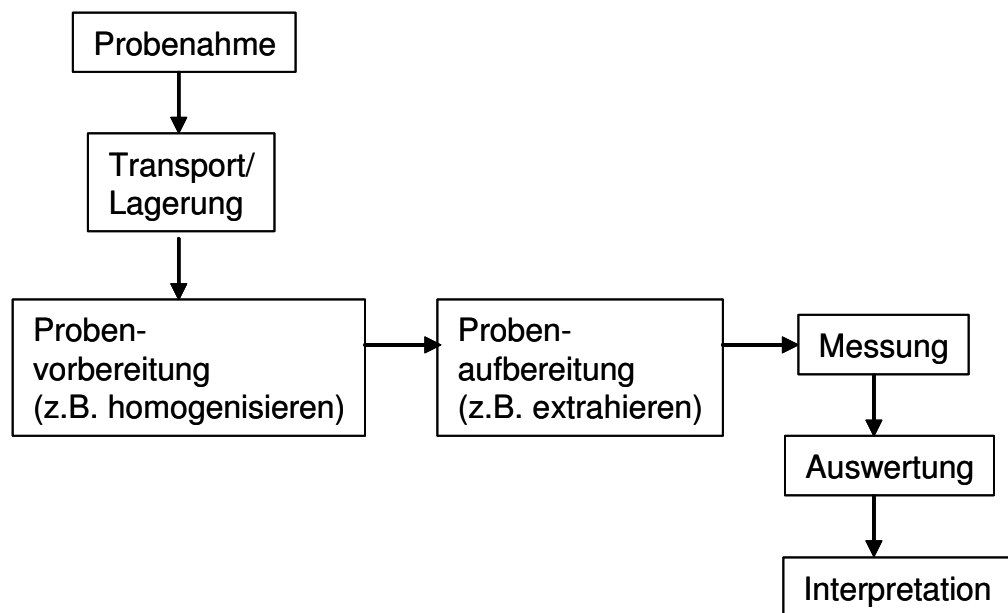


Abbildung 1: Verfahrensschritte, die eine Probe durchläuft.

Eine **Methode** ist ein Teil des Verfahrens, der sich mit einer bestimmten Fragestellung/Probe beschäftigt. Beispielsweise ist die Bestimmung von Carotinoiden ein Verfahren und die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) eine Trennmethode innerhalb dieses Verfahrens.

Bei Labormethoden stehen daher die Erkennung und Vermeidung systematischer Fehler (Prüfung auf Richtigkeit) und die Streuung der Ergebnisse (Ergebnisunsicherheit) im Vordergrund. Für jede neue Probenart (unter Probenart ist hier das landwirtschaftliche un- oder verarbeitete Produkt z.B. Weizen, Möhren, Apfel, Möhrensaft gemeint), und für jede neue Fragestellung müssen geeignete Methoden validiert werden, auch wenn das Verfahren (incl. HPLC) als solches bereits validiert ist. Der Umfang einer Validierung richtet sich nach der Fragestellung. Dabei können drei Arten von Fragestellungen genannt werden:

1. Ein Ja/Nein-Entscheid benötigt ein qualitatives Verfahren, wo es z.B. darum geht, ob ein Probenmerkmal vorhanden ist oder nicht.
2. Ein Vergleich mit Grenzwerten, Limits.
3. Eine Kontrolle von Prozessen (Monitoring).

Methoden, die für die Untersuchung von Lebensmitteln eingesetzt werden, sind von der Codex Alimentarius Commission, Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling in vier Typen eingeteilt worden (ALINORM 01/23 bzw. überarbeitete Fassungen CL 2005/44-MAS):

Typ I sind Methoden, deren Ergebnis per se nur mit dieser Methode ermittelt werden. Diese Methoden legen auch den akzeptierten Referenzwert fest. Typ II Methoden sind Referenzmethoden, Typ III sind Methoden für die Kontrolle, Inspektion und Überprüfung der Regelwerke und Methoden vom Typ IV sind Methoden, die bisher angewandt wurden, für die aber vom Codex Committee noch keine Validierungsprozeduren festgelegt wurden. Methoden vom Typ III (z.B. die ganzheitlichen Verfahren) müssen die Ergebnisse für folgende Verfahrensmerkmale angegeben werden:

- Präzision (im Labor und zwischen Laboren)
- Wiederfindung
- Selektivität
- Anwendungsgebiet (Matrix, Konzentrationsbereich)
- Nachweisgrenze
- Linearität

Und bei Methoden vom Typ I:

- Spezifität
- Richtigkeit
- Präzision (Wiederholbarkeit, Laborpräzision, Reproduzierbarkeit)
- Nachweisgrenze
- Sensitivität.

Damit sind die in der ISO 17025 festgelegten Verfahrensmerkmale erheblich enger gefasst, da unter Verfahren analytische Labormethoden verstanden werden, die entweder chemische Eigenschaften (z.B. Dichte) oder methodenabhängige Merkmale (z.B. Fettgehalt) eines Lebensmittels bestimmen. Dies ist insofern wichtig, da hier die Arbeitsweise einer Methode auf die analytische Bestimmung von Eigenschaften oder Einzelstoffen reduziert wird. Dabei wird zwischen dem zu bestimmenden Analyten (z.B. β -Carotin) und der Matrix (z.B. Möhre) unterschieden. In Annex A des Entwurfes zur Überarbeitung der Norm wird der Validierungsprozess soweit formalisiert, dass die Methode als „black box“ aufgefasst wird, in die Probenmaterial eingeht und

ein Ergebnis herauskommt. Die Funktionsweise der Methode wird nicht berücksichtigt, es geht nur um die Beziehung zwischen dem, was eingeht und dem, was herauskommt. Dabei werden qualitative Methoden, beispielsweise für einen Ja/Nein-Entscheid, in den Richtlinien nicht berücksichtigt.

Die einzelnen Kriterien (Verfahrensmerkmale), die an die Methoden gestellt werden, sind z.B. in der Entscheidung der EU-Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen definiert. Im Folgenden werden diejenigen Verfahrensmerkmale genannt, die für die Validierung der Biokristallisation zur Anwendung kommen können:

*Ein **Kalibrierstandard** ist ein Hilfsmittel für Messungen, das die Menge des interessierenden Stoffs in einer Weise darstellt, die seinen Wert mit einer Referenzbasis in Beziehung setzt.*

Bei einer Methodenvergleichsstudie wird dieselbe Probe mit derselben Methode analysiert, um die Leistungsmerkmale der Methode zu bestimmen. Die Studie umfasst zufällige Messabweichungen und systematische Abweichungen der beteiligten Laboratorien.

*Eine **Laborvergleichsuntersuchung** ist die Organisation, Durchführung und Auswertung von Tests mit derselben Probe durch zwei oder mehr Laboratorien unter Einhaltung vorgegebener Bedingungen zur Bestimmung der analytischen Leistungsfähigkeit. Je nach Zweck lässt sich die Untersuchung als Methodenvergleichsstudie oder als Laboreignungsprüfung klassifizieren (s. Thompson & Wood 1995).*

*Eine **Laborprobe** ist eine zum Einsenden an ein Labor vorbereitete Probe, die untersucht bzw. analysiert werden soll.*

*Ein **Leistungsmerkmal** bezeichnet eine funktionelle Qualität, die einer Analysenmethode zugeschrieben werden kann. Dies kann zum Beispiel die Präzision sein.*

Präzision ist der Grad an Übereinstimmung zwischen unabhängigen Testergebnissen, die unter festgesetzten (vorgegebenen) Bedingungen erzielt werden. Das Präzisionsmaß wird normalerweise als Unpräzision ausgedrückt und als Standardabweichung des Testergebnisses berechnet. Eine geringere Präzision ist durch eine größere Standardabweichung gekennzeichnet.

Die **Wiederholpräzision** ist die Präzision unter Wiederholbedingungen. Wiederholbedingungen sind Bedingungen, unter denen voneinander unabhängige Testergebnisse mit derselben Methode, identischem Testmaterial, in demselben Labor, durch denselben Untersucher und mit derselben Ausrüstung erzielt werden.

Die **Reproduzierbarkeit** (Vergleichspräzision) ist die Präzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen.

Reproduzierbarkeitsbedingungen sind Bedingungen, unter denen Testergebnisse mit derselben Methode, identischem Testmaterial, in verschiedenen Laboratorien, durch verschiedene Untersucher und mit unterschiedlicher Ausrüstung erzielt werden.

Robustheit ist die Anfälligkeit einer Analysenmethode gegenüber Änderungen in den Versuchsbedingungen und kann ausgedrückt werden als eine Liste der Probenmaterialien, Analyte, Lagerungsbedingungen, Umgebungs- und/oder Probenvorbereitungsbedingungen, unter welchen die Methode wie beschrieben oder mit vorgeschriebenen geringfügigen Änderungen angewendet werden kann

Eine **Untersuchungsprobe** ist eine aus der Laborprobe hergestellte Probe, von der Analysenproben genommen werden.

Die **Analysenprobe** ist die Menge an Probenmaterial, die von der Untersuchungsprobe genommen wird, mit der die Analyse oder Beobachtung durchgeführt wird.

Die **laborinterne Reproduzierbarkeit** ist die in ein und demselben Labor unter festgesetzten (vorgegebenen) Bedingungen (betreffend z.B. die Methode, Testmaterialien, Untersucher, Umgebung) über begründete lange Zeiträume erzielte Präzision.

Eine laborinterne Validierungsstudie ist eine analytische Studie in einem Laboratorium unter Verwendung einer Methode zur Analyse derselben oder verschiedener Testmaterialien unter unterschiedlichen Bedingungen und über begründete lange Zeiträume. Dazu unterscheidet die IUPAC (Thompson et al.

2002) zwischen einer „fully validation“, wo nicht nur laborinterne Untersuchungen, sondern auch eine „interlaboratory method performance study“ ausgeführt werden (Minimum der beteiligten Labore 8-10) und einer „single-laboratory method validation“ oder auch **in-house validation** und betont die Notwendigkeit, die Anforderungen des Kunden bei einer in-house Validierung besonders zu berücksichtigen.

Da die Probenahme bei der Biokristallisation in dieser Arbeit nicht validiert wurde, sei hier auf die einschlägigen Normen und Richtlinien verwiesen (ISO 2859 (diverse Jahre), ISO 7002:1986 (E), Kurfürst et al. 2004). Die Probenahme für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurde für alle Proben dokumentiert und teilweise in Standardarbeitsanweisungen festgelegt (u. a. Projekt BÖL 02OE170/F).

Die ISO 17025 fordert für diejenigen Laboratorien, die eine interne Kalibrierung durchführen, ein Abschätzen der **Messunsicherheit** (S. 30). Diese Schätzung kann sowohl qualitativ, als auch quantitativ erfolgen. Dabei wird auf die ISO GUM (1993) bzw. die ISO 5725 verwiesen. Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Validierung der Biokristallisation wird auf die quantitative Betrachtung der Mess- oder **Ergebnisunsicherheit** verzichtet, da es sich um vergleichende Bestimmungen ohne Bezugsnormale bzw. Referenzmaterial handelt und der wahre Wert im Sinne der Prüfung der Richtigkeit nicht definiert ist. Die qualitative Schätzung der Mess- bzw. Ergebnisunsicherheit sollte dann erfolgen, wenn genügend Ergebnisse zur Authentizitätsprüfung ökologischer Produkte mit der Methode vorliegen. Sie wird im Rahmen dieser Arbeit aber anhand der ermittelten Streuung und der systematischen Untersuchung zu den Einflussgrößen begonnen.

Mit welchem Forschungsansatz und mit welcher Methode die Qualität eines Lebensmittels auch immer erfasst werden soll, in jedem Fall muss diese wissenschaftlich reflektiert und beschrieben werden können, muss ein Verfahren, eine Methode lern- und lehrbar sein. Dann kann sie auch validiert werden. Welche Instrumente zur Validierung herangezogen werden oder ob eine statistische Bearbeitung der Ergebnisse nötig ist, richtet sich nach der Fragestellung und wie diese formuliert ist. Dies wird immer von den Personen vorgenommen, die sich mit der Qualität in Beziehung setzen, sei es als Produzent, Verarbeiter, Händler, Konsument, politischer Entscheidungsträger

oder Wissenschaftler. Was von diesen Akteuren gefordert wird, bestimmt die Fragestellung und damit den Validierungsinhalt und -umfang.

4 Ganzheitliche Verfahren und Methoden

Ganzheitliche Verfahren und Methoden müssen im ersten Schritt zeigen, dass sie Produkte verschiedener Behandlungsweisen (Anbausysteme und Verarbeitungsverfahren) unterscheiden können (Frage der Authentizität). Sie müssen ökologische Produkte so charakterisieren, dass die Veränderung im Prozess am Produkt verfolgt werden kann (neue Sorten, Düngung, Verarbeitungsschritte etc.). Darüber hinaus sollen weitere Qualitätsaspekte (z.B. Natürlichkeit, Gesundheit) der Lebensmittel mit den Methoden geprüft werden. Damit lassen sich drei Bereiche (Fragen) für den Einsatz der ganzheitlichen Methoden definieren:

1. Authentizitätskontrolle,
2. Bestimmung weiterer Qualitätsaspekte (z.B. Frische, Gesundheit) einzelner Produkte,
3. Optimierung des Prozesses (Herstellung und Verarbeitung).

Der Anspruch an die Methoden richtet sich daher nach der Frage, die an die Methoden gestellt wird. Für die Authentizitätskontrolle ist es z.B. die Prüfung der Abweichung von einem vorgegebenen Soll-Wert (oder Bereich), für die Bestimmung des Gesundheitswertes sind aufwendige Verkostungs- und Ernährungsstudien nötig, mit deren Aussage das Ergebnis der Methoden korreliert wird (z.B. "Der höhere Wert der ganzheitlichen Methode X weist auf einen höheren Gesundheitswert des Produktes Y hin"). Dann können ganzheitliche Methoden auch für die Bewertung von Prozessen und deren Optimierung eingesetzt werden (z.B. "Welches Verarbeitungsverfahren garantiert möglichst schonende Behandlung?"). Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Untersuchungen und Ergebnisse beziehen sich auf die notwendigen Voraussetzungen für die Beantwortung der ersten Frage und beschränken sich dabei auf die Unterscheidung von Proben aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten.

4.1 Definition des Begriffes „ganzheitlich“

"Leben ist nicht berechenbar. Doch es lohnt sich, Produktionsprozesse von Zellen ganzheitlich verstehen zu wollen ...", heisst es in der Einleitung zu einem

Artikel über die enzymatische Oligosaccharid-Synthese in den "Nachrichten aus der Chemie" (Seibel 2006). Hier wird Ganzheitlichkeit als Summe der Kenntnisse quantifizierbarer Einzeluntersuchungen verstanden (wobei mit Einzeluntersuchungen mittlerweile auch nicht mehr Einzelstoffe, sondern Screening-Tests wie Metabolomics oder Proteomics gemeint sind).

Da sich bisher wissenschaftliche Arbeiten nicht mit der Definition des Begriffes ganzheitlich im Zusammenhang mit einer Labormethode beschäftigt haben, wird auf die z. Zt. allgemein gültigen Beschreibungen in Lexika und Wörterbüchern zurückgegriffen. Im Brockhaus, Dt. Wörterbuch (1984) wird ganzheitlich als die Ganzheit betreffend und auf ihr beruhend, von ihr ausgehend und auf sie bezogen definiert, wobei die Ganzheit das Ganze ist, in seiner Unversehrtheit, Vollständigkeit, Geschlossenheit, kurz: als eine umfassende Einheit, etwas, was nicht in seinen Einzelercheinungen und einzelnen Elementen, sondern in seiner Ganzheit betrachtet wird. Als „ganz“ gilt etwas, wenn es heil, unversehrt, gesamt, ungeteilt, völlig oder vollständig ist. Aus Grimms Wörterbuch (1854/1984) wird deutlich, dass „Ganzheit“ von „Gänze“ kommt, aus dem mittelhochdeutschen „genze“, was Vollständigkeit bedeutet.

Ins Englische wird Ganzheitlichkeit als „holism“ und ganzheitlich als „holistic“ übersetzt. „Holism is the theory that nature tends to synthesize units into organized wholes“ (Oxford dictionary, 1968), und holistic meint "considering a whole thing or being to be more than a collection of parts" oder in der Medizin "treating the whole person rather than just the symptoms".

In Meyers Enzyklopädischem Lexikon (⁹1979) wird Ganzheit als die besondere Struktur komplexer, aus qualitativ gleichen und/oder verschiedenen funktionell voneinander abhängigen bzw. einander zugeordneten Elementen bestehender Systeme beschrieben, die als Einheit wirken und im Unterschied zu lediglich additiven Zusammenordnungen die Beiträge ihrer Einzelemente nicht einfach nur summieren, sondern wegen der Wechselbeziehung der Elemente untereinander eine qualitativ andere Wirkung zeigen. Der Begriff der Ganzheit wird in Philosophie, Biologie, Medizin und Soziologie verschieden interpretiert; zudem existieren unterschiedliche Schulen. Zusammenfassend zeigt sich, dass Strukturen und Funktionen von Teilen lebender Systeme nur durch ihren Bezug auf das Gesamtsystem erklärt werden können.

Daher ist es sinnvoll, die Begriffe „Ganzheit“ und „System“ nebeneinander zu stellen. Im Brockhaus Wörterbuch (1984) wird System als ganzheitlicher Zusammenhang von einander abhängigen Teilen definiert. In Meyers Lexikon (1979) ist es allgemein das einheitlich geordnete Ganze, wobei es als wissenschaftlicher Ordnungsbegriff ein natürliches oder künstliches Gebilde bezeichnet, das ein Ganzes ausmacht, mit bestimmter Ordnung, dessen Teile voneinander abhängig sind oder in Zusammenhang stehen. In der Naturwissenschaft wird System definiert als „Bezeichnung für jede Gesamtheit von (materiellen) Objekten, die sich in einem ganzheitlichen Zusammenhang befinden, wobei ihre Wechselbeziehungen untereinander diejenigen mit der Umwelt im allgemeinen stark überwiegen, so dass sie insgesamt als ein von der Umwelt mehr oder weniger unabhängiges Ganzes (mit einer durch ihre Eigenschaften und Wechselbeziehungen festgelegten Struktur) behandelt werden können“. Es gibt offene und geschlossene Systeme, je nach Wechselwirkung mit der Umgebung.

Nikola Tsikolia setzt sich in seinem Aufsatz „Was ist das Ganze und was ist Teil?“ (Tsikolia 2000) mit dem Problem der biologischen Form auseinander. Er fasst zusammen, daß eine ganzheitliche Sichtweise für die Betrachtung von Lebensvorgängen und Gestaltbildungsprozessen unerlässlich sei. Dabei gebe es zwei Richtungen, die sich darin unterscheiden, ob Lebensvorgänge und Gestaltbildungsprozesse nichtmaterielle Faktoren zur Beschreibung brauchen oder nicht. Organismen im Lebendigen und Selbstorganisation im Anorganischen zeigen Gestaltbildungsprozesse. Beide entstehen durch Gradienten und Veränderungen stationärer Zustände (also entfernt vom Gleichgewicht), wobei das Ganze Eigenschaften zeigt, die sich aus den Eigenschaften seiner Teile nicht bestimmen lassen. Auch die Biokristallisation zeigt Gestaltbildung durch Gradienten und Prozesse entfernt vom Gleichgewicht, nur sind die entstandenen Formen fest, kristallin und einer wiederholbaren Gestalterkennung zugänglich. Dies legt nahe, Ganzheit und Gestalt gegenüberzustellen.

Gestalt kommt vom mittelhochdeutsch „Gestalt“, was Aussehen, Beschaffenheit bedeutet und vom althochdeutschen „gistalt“ (Part. Perf. von stellen, Brockhaus Wörterbuch, 1984) abgeleitet ist. In der technischen Morphologie wird Gestalt definiert als „Bezeichnung für einen Sonderfall der äusseren Erscheinung,

nämlich nicht einfach eine blosse Vielheit von Bestandteilen der äusseren Erscheinung, wie Formen, Farben, Gewichte, Oberflächenbeschaffenheit, (...), sondern Gestalt als eine gesetzmässige Ganzheit solcher Bestandteile. Das Wesentliche einer Gestalt sind nicht ihre Bestandteile, die auch weitgehend andere sein können, sondern das Gesetz ihrer Zueinanderordnung" (Meyers Lexikon, ⁹1979).

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine Sichtweise vertreten, die das übergeordnete Ganze (z.B. die Probe oder das Kristallbild) nicht durch eine Summation der einzelnen Merkmale erklären will und kann. Das bedeutet aber auch, dass nicht nur mit der Probenbehandlung im Labor, sondern auch mit jeder gewählten Auswertungsmethode immer nur ein Teil der Information über die Probe aus dem Bild erfasst werden kann.

Für die untersuchte ganzheitliche Methode der Biokristallisation sei Ganzheitlichkeit definiert als

- bezogen auf den Prozess der Bildentwicklung, als ein durch die äusseren Randbedingungen bestimmter Selbstorganisationsprozess und
- bezogen auf das Bild, eine mehr oder weniger geordnete Gestalt, deren Struktur- und Textureigenschaften ausgewertet werden können.

4.2 Darstellung der Verfahren

Seit Jahrzehnten werden Verfahren eingesetzt, die das Produkt möglichst ganz belassen oder abbilden und damit ganzheitliche (statt auf Einzelstoff bezogene, analytische) Aussagen machen können. Dabei liegt die Innovation zum einen in der Möglichkeit, die Qualität des Prozesses am Produkt zu zeigen, zum anderen in dem Verfahren selbst, da hier statt analytischer Einzelstoffe Organisations- und Ordnungsphänomene für die Charakterisierung von Produkten eingesetzt werden können.

Es geht also darum, die produktbezogene Qualität ökologischer Produkte nicht nur über die Abwesenheit oder Verminderung von Schadstoffen (z.B. Pestizide, Nitrat) zu definieren, sondern die vermutete Besonderheit geprüft herauszustellen.

Zur Bestimmung des Genusswertes werden die Sinne zur Hilfe genommen. Die Wahrnehmung sensorischer Merkmale ist mittlerweile ein Standardverfahren, das ein Produkt durch die subjektive Sinneswahrnehmung (Geschmack,

Aussehen, Textur etc.) so beschreibt, dass bei Festlegung der Randbedingungen objektive, reproduzierbare und statistisch auswertbare Ergebnisse erzielt werden können (vgl. ISO-Normen). Die **Sensorik** ist eine Methode, die kundennahe Ergebnisse liefert, da die erste Wahrnehmung des Produktes im Markt über die Sinne erfolgt (Busch-Stockfisch 2002, Fliedner & Wilhelmi 2003).

Mit einer Vielzahl von analytischen Methoden, die einzelne Stoffe erfassen (z.B. Vitamine, Mineralstoffe), werden auch solche Inhaltsstoffe bestimmt, die eine Aussage sowohl zur Pflanzengesundheit, als auch zu deren ernährungsphysiologischen und/oder gesundheitlichen Bedeutung für den Menschen zu treffen vermögen. Dazu gehört die Substanzklasse der Aminosäuren und Proteine (N-Metabolismus) und die der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe (diverse Stoffklassen und deren Summenparameter sowie das Antioxidative Potenzial). Dazu werden anerkannte analytische Standardmethoden (z.B. Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie-Diodenarraydetektor, HPLC-DAD) eingesetzt. Die Ganzheitlichkeit liegt bei diesen Methoden in der systemischen Interpretation der Einzelergebnisse in Bezug zum Ganzen (Pflanze, Mensch).

Der **physiologische Aminosäurenstatus** (N-Metabolom) erlaubt über die Stoffwechselphysiologie der Pflanze auf das jeweilig angewandte Kulturverfahren zu schließen. Die Bestimmung des physiologischen Aminosäurenstatus erfolgt mittels einer produktspezifischen Methodenkombination verschiedener stickstoff- bzw. aminosäureanalytischer Verfahren, welche auf hohe Präzision optimiert wurden. Das Verfahren ermöglicht die Erfassung stofflicher Veränderungen, die durch Modifikation der Wachstums- und Reifungsprozesse durch verschiedene Kulturbedingungen in den inneren Stoffwechselprozessen der Pflanze bewirkt werden. Als N-Metabolom wird die Gesamtheit der durch den N-Metabolismus der jeweiligen Kulturpflanze gebildeten Stoffwechselprodukte bezeichnet, mit deren Hilfe eine Charakterisierung der entsprechenden Kulturpflanze, bzw. deren Kulturbedingungen, ermöglicht wird. Das Verfahren hat sich bisher bei einigen Produkten zur Differenzierung und Identifizierung als leistungsfähig erwiesen (Stolz et al. 2000).

Die Bestimmung der **sekundären Pflanzenstoffe** (z.B. Spektrum der Polyphenole und Carotinoide und u. a. die Summe der Gelbpigmente), sowie des Antioxidativen Potenzials sind wichtige Größen zur Abschätzung der Pflanzengesundheit (Stress, Abwehrvermögen) und damit einer ganzheitlichen Betrachtung der Pflanze. Gleichzeitig wächst die Kenntnis über ihre Bedeutung für die menschliche Gesundheit, wobei hier die Konzentration und Form (Struktur, Bindung) des Einzelstoffes entscheidend für die Wirkung ist (Asami et al. 2003, Watzl & Leitzmann 1999, Bennett et al. 1994). Die Methoden wurden für die Differenzierung von Lebensmitteln aus ökologischem und konventionellem Anbau angewandt. Die Ergebnisse werden in von uns betreuten Dissertation dokumentiert und in den Abschlussberichten zu den Projekten BÖL 02OE170 und 02OE170/F beschrieben.

Die **Nahe-Infrarot-Spektroskopie** (NIR-Spektroskopie) steht vom Verfahrensprinzip her zwischen diesen analytischen und den die Ordnung und Struktur erfassenden ganzheitlichen Methoden (s. u.). Sie beruht auf dem Prinzip der Infrarot-Spektroskopie in einem bestimmten Frequenzbereich und liefert schnelle Ergebnisse zu einzelnen Inhaltsstoffen, wie Stärke, Rohfaser etc. Die Methode ist für viele Anwendungen mit Einzelstoffen validiert, wird aber bisher ausschließlich analytisch eingesetzt und interpretiert (VDLUFA 2000), ist also bisher nicht als ganzheitliche, ein System abbildende Methode verwendet worden. Ob und in welchem Umfang dies möglich ist, darüber liegen noch keine Untersuchungen vor.

Eine ganzheitliche Qualitätsforschung sollte Untersuchungsmethoden einbeziehen, die eine Probe oder deren Teil (z.B. Extrakt) ganzheitlich abbilden. Damit werden statt Einzelstoffe Eigenschaften eines Lebensmittels bestimmt. Dies kann entweder über die Beziehung zum Licht (z.B. Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie) geschehen oder zur Organisation und Struktur (z.B. Biokristallisation) oder zu Redox-Vorgängen (z.B. Elektrochemie). In allen drei Fällen arbeitet das Verfahren auch ganzheitlich, d.h. es werden keine Einzelstoffen aus der Matrix (dem Lebensmittel) getrennt nachgewiesen.

Die Ergebnisse der **Biokristallisation** sind mehr oder weniger geordnete und produkttypische Kristallmuster auf einer runden Glasplatte, die nach vorgegebenen Kriterien ausgewertet und interpretiert werden. Das Verfahren liefert einen direkten „Abdruck“ des Produktes und bietet durch den

Bildcharakter auch ein interessantes Marketinginstrument. Es wird für Fragen des Anbaus, der Sortenwahl, Lagerung und zur Bewertung von Verarbeitungsschritten eingesetzt. Die Entwicklung und Validierung dieses Verfahrens ist in der vorliegenden Arbeit beschrieben.

Im Unterschied zur Dünnschichtchromatographie, wo die stoffliche Trennung im Vordergrund steht, geht es bei dem **Steigbildverfahren** um eine gestaltliche Differenzierung (vgl. Steffen 1983, Strüh 1987). Das Verfahren wird seit Jahrzehnten für die ganzheitliche Beurteilung von Pflanzen- und Lebensmittelqualität eingesetzt (vgl. Balzer-Graf & Balzer 1987, 1994). Im Rahmen dieser Habilitationsschrift wurden Steigbildmethoden für die Unterscheidung von Proben verschiedener Behandlungsweisen (besonders Anbausysteme) entwickelt und charakterisiert. Die Ergebnisse werden in einer Dissertation dokumentiert (Zalecka 2006).

Die **Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie** (FAS) ermittelt an unzerkleinerten Proben (Originalmatrix) Daten im sichtbaren Bereich des Spektrums, die durch Vergleich mit bekannten Mustern Rückschlüsse auf den Entwicklungsstatus der Pflanze bzw. des Produkts ermöglichen, der bei unterschiedlichen Anbaumethoden verschieden ausgeprägt wird. FAS-Methoden zeigten eine deutliche Tendenz zu erhöhter Reifung der Pflanzen bei Bio-Anbau. Die erhöhte Reifung drückt sich aus z.B. als fruchttypischere Ausprägung von Äpfeln oder samentypischere Ausprägung (erhöhte Samenruhe) von Samenerzeugnissen wie Weizen, Roggen etc. (Strube & Stolz 2004). Mit diesem Verfahren war es möglich, codierte ökologische und konventionelle Proben zu differenzieren und auch zu identifizieren (Strube 1996, Strube & Stolz 1999, 2000).

Bei den **elektrochemischen** Messungen werden drei elektrochemische Merkmale (pH-Wert, Leitfähigkeit/elektrischer Widerstand und Redoxpotenzial) im wässrigen Milieu gemessen, die Einzelergebnisse werden anschließend zu einem Gesamtergebnis kombiniert. Besondere Bedeutung wird dem Redoxpotenzial beigemessen, da es die Reduktionsfähigkeit eines Lebensmittels charakterisieren soll (Hoffmann 1997). Die Methoden wurden für verschiedene Fragestellungen an einer Reihe von Produkten eingesetzt.

Während bisher für den physiologischen Aminosäurestatus die Differenzierungsfähigkeit von Produkten aus unterschiedlichen Anbausystemen

angezweifelt wurde, waren die vier anderen ganzheitlichen Verfahren (Biokristallisation, Steigbildmethode, Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie, Elektrochemische Messungen - als Kombination -) zunächst nicht validiert und damit wissenschaftlich nicht anerkannt und für den Markt nicht nutzbar.

4.3 Die Biokristallisation als ganzheitliches Verfahren

In dieser Habilitationsschrift wird das Verfahren als Biokristallisation bezeichnet, weil es von Andersen (2001) übernommen und für die vorliegenden Untersuchungen optimiert und validiert. Er bezeichnet das Verfahren als „biocrystallization“ und die Bilder als „biocrystallograms“ (Andersen 2001) und bezieht sich dabei auf Engquist, die diesen Begriff zuerst einführte (Engquist 1970a). Andere Autoren beziehen sich auf Pfeiffer, der das Verfahren als „empfindliche Kristallisation“ bezeichnete (1935). Später wird sie „Kupferchloridkristallisation“ (z.B. Morris & Morris 1941, Merten & Lagoni 1958, Balzer-Graf et al. 1998) oder „Kristallisation mit Kupferchlorid“ (z.B. Pettersson 1969) oder auch „cupric crystallization method“ (Mäder et al. 1993) genannt. Balzer-Graf fasst die beiden Verfahren Biokristallisation und Steigbild, zusammen mit der von Pfeiffer entwickelten Rundfilter-Chromatographie (Pfeiffer 1960), als sog. „Bildschaffende Methoden“ zusammen (Mäder et al. 1993, Balzer-Graf & Balzer 1994).

Das Verfahren arbeitet mit wässrigen Extrakten vermahlener Proben oder mit verdünnten Säften. Diese werden zusätzlich gefiltert oder gesiebt. Damit wird ein Teil (Ausschnitt) oder eine Eigenschaft der Probe erfasst. Das Probenmaterial wird dann mit einem anorganischen Salz (Kupferchlorid, CuCl_2) zusammengebracht. Dabei kommt es zur Kristallisation auf einer Glasplatte (dies ist die Bildentstehung). Es scheint, dass CuCl_2 das einzige Salz ist, das diese Kristallmuster entstehen lässt. Sowohl Pfeiffer (1930, 1935) als auch Selawry & Selawry (1957) testeten mehrere hundert Salze, was aber keine Verbesserung brachte. Eine wissenschaftliche Erklärung, warum gerade CuCl_2 sich besonders eignet gibt es bisher nicht, auch wenn verschiedene Interpretationen geliefert wurden (z.B. von Hahn 1962, Beckmann 1959). Die Ergebnisse der Methoden sind Bilder, die nach vorgegebenen Merkmalen bzw. Kriterien sowohl visuell, als auch computergestützt ausgewertet werden können (dies ist die Bilderkennung). Die Bildmerkmale lassen sich spezifisch für das

jeweils zu untersuchende Probenmaterial definieren (Selawry & Selawry 1957, v. Hahn 1962, Balzer-Graf & Balzer 1994, Andersen et al. 2003), wobei sich die Merkmale auch als Textur- und Struktureigenschaften ableiten lassen (vgl. Andersen 2001). Für jedes Probenmaterial lässt sich ein bestimmtes Mischungsverhältnis von Probe und Reagentien ermitteln, bei der sich das Muster von der anderer Proben unterscheidet (Pettersson 1966, Andersen et al. 2003). Die Unterscheidung lässt sich mit der Optimierung der experimentellen Randbedingungen verbessern (Andersen 2001, Ballivet et. al. 1999). Heitler zeigt die Besonderheit des Verfahrens auf: "Die für die ganze Naturwissenschaft grundsätzliche Bedeutung dieser Resultate besteht darin, dass hier erstmals – und vorderhand als einziger Fall – Gestaltbildung auf gewöhnliches anorganisches Material von Seiten des Lebendigen (wenn sich dies verifiziert) vorliegt. – Es scheint mir in der Tat, dass sich hier ein weites und fruchtbares Forschungsgebiet eröffnet. Lässt sich doch hier, wenn die Verfasserin Recht hat, die Gestaltungskraft von organischen Substanzen in aller Ruhe in vitro studieren, während sie sonst nur im lebenden Organismus zu Tage tritt" (Heitler, in: Engquist 1970a, S. 8).

Dabei sind zwei Schritte entscheidend: Zum einen die Entstehung der Bilder als Kristallisation auf einer Glasplatte, zum anderen die Art und Weise, wie die Information aus den Bildern erkannt wird. Der entscheidende Schritt im Laborprozess ist die Kristallisation. In einem Zeitraum von 10-16 h verdampft das Wasser und das Salz kristallisiert. Je nach Mischungsverhältnis von Probe und Salz bilden sich Strukturen mit einer Reichweite von mehreren Zentimetern (die Platte hat einen Durchmesser von 9 cm), die nicht aus der mikroskopischen Kristallstruktur des CuCl_2 erklärt werden können, sondern eine produkttypische Gestalt zeigen (Pfeiffer 1930, Selawry & Selawry 1957, Beckmann 1959, v. Hahn 1962). Balzer-Graf & Balzer (1996) beschreiben diesen Prozess folgendermaßen: „Die Nahrungsmittel werden nicht analytisch zerlegt und in ihrer stofflichen Zusammensetzung erfasst. Vielmehr werden die Nahrungsmittel so gesamthaft in einen experimentellen Ansatz mit Metallsalzen gebracht, dass die Gestalten, Strukturen entstehen können“. Platten, die nur mit CuCl_2 -Lösung ohne Zusatz versetzt wurden, zeigen nach der Verdampfung die typischen CuCl_2 -Nadeln.

Im Rahmen dieser Habilitationsschrift wurde eine Projektarbeit zur Auswertung

ausgewählter Veröffentlichungen zur Biokristallisation durchgeführt (Zalecka 2003). Die Ergebnisse sind im Anhang aufgeführt. Dabei wurde untersucht, welche methodischen Ansätze für die Bildentstehung (Labor und Kristallisation) und Bildauswertung angewandt wurden. Ausgewertet wurden die Arbeiten von Bessenich 1951, Selawry & Selawry 1957, Selawry 1959, Engquist 1961, v. Hahn 1962, Engquist 1963, Pettersson & Engquist 1964, Pettersson 1966, 1969, 1970, Engquist 1975, Schudel et al. 1980, Balzer-Graf & Balzer 1991 und Balzer-Graf et al. 1998. Alle Autoren berichten von der Anfälligkeit des Verfahrens gegenüber Änderungen der experimentellen Randbedingungen, wobei das Mischungsverhältnis und die Kristallisation die bestimmenden Schritte sind. Die Kristallisation geschieht in Klimakammern, die zwar verschieden gebaut, aber in Bezug auf mögliche Erschütterungen und dem Klima (Temperatur, Feuchte) geregelt sein müssen. Die meisten Autoren beschreiben daher auch die Bedingungen während einer Kristallisation in der Darstellung der Ergebnisse. Bei Pettersson & Engquist (1963) dauert die Verdampfung und Kristallisation 15 h bei 30 °C und 60 % relativer Feuchte (rF), bei Selawry (1959) sind es 8-9 h bei 28 °C und 45 % rF.

Die Biokristallisation wurde bislang in einer Reihe von Vergleichsstudien unterschiedlicher Anbaumethoden eingesetzt. Trotz der bisher ausschließlich visuellen Auswertung, konnten mit dem Verfahren durch geschulte Personen Produkte aus ökologischem und konventionellem Anbau differenziert werden (Pettersson 1970, Schudel et al. 1980, Lieblein 1993, Mäder et al. 1993, Balzer-Graf & Balzer 1996, Balzer-Graf et al. 1998, Raupp 1996, Granstedt & Kjellenberg 1997, Weibel et al. 2000, Andersen 2001, Alföldi et al. 2001). Auch für Untersuchungen des Einflusses von Lichtintensität auf das Pflanzenwachstum bei unterschiedlichem Anbau (Klett o. J., Engquist 1963) sowie zur Überprüfung des Lagerverhaltens (Engquist 1961, Engquist 1970b, Selawry 1975), der Differenzierung von samenfesten und Hybridmöhren (Balzer-Graf 2001) und der thermischen Behandlung bei Milch (Merten & Lagoni 1958, Balzer-Graf & Balzer 1991b, Knijpena 2001) konnten mit dem Verfahren Proben unterschieden werden. Knijpena untersuchte den Einfluss von Bestrahlung auf Lebensmittelproben (Knijpena 1994, 1995).

Neben wässrigen Auszügen aus Pflanzen, Milch oder Blut, liefern auch isolierte Probenteile (z.B. Kornfraktionen, Eigelb und Eiweiss, Zucker, Stärke etc.) und

Einzelstoffe Bilder (vgl. Morris & Morris 1939, Selawry & Selawry 1957, Beckmann 1959, Vester 1960, Barth 1997, Andersen 2001). So berichten Morris & Morris (1941) von der Kristallisation extrahierter Stärke, sowie von Polysacchariden, Proteinen und Glykogen. Durch die Mischung verschiedener Einzelstoffe konnten sie die Struktur der Bilder entsprechend beeinflussen. Die Autoren vermuteten eine „aktive Fraktion“ in den Extrakten, die für die Bildentstehung verantwortlich sein könnte. Sie nahmen Änderungen in der Oberflächenspannung der kolloidalen Lösungen als für die Bildentstehung verantwortliche Ursachen an (Morris & Morris 1941). Hollemann (1966) bestätigte diese Vermutung durch Messungen an den Lösungen während des Verdampfungsvorgangs. Pettersson (1969) postulierte, dass die Änderungen der Bewegung von CuCl_2 -Molekülen in der Lösung durch die verschiedenen Zusätze verantwortlich für die Bildentstehung seien, wobei die Steigerung der Menge an Zusatz keine stetige Zunahme des Effektes zeigte. Während Neuhaus (1957) und Barth (1997, 2004) die Bildentstehung aus kristallographischer Sicht (Anlagerung oder Einbau von Fremdmolekülen während des dendritischen Wachstums) erklärten, brachte Nitschmann (1993) die Bildentstehung zum ersten Mal mit Selbstorganisationsprozessen in Verbindung und beschrieb einen möglichen Zusammenhang zwischen Strömungsdynamik und Bildentstehung.

Der Prozess der Bildentstehung ist damit ein komplexer Vorgang, der u. a. durch die Oberflächenspannung und dem Strömungsverhalten bestimmt und als ein Selbstorganisationsprozess beschrieben werden kann. Wie für Selbstorganisationsprozesse typisch, können die Ergebnisse nicht durch die Eigenschaften der Teile allein erklärt werden, sondern zeigen neue, von den Einzelteilen unabhängige Merkmale.

Bereits Selawry & Selawry (1957) und v. Hahn (1962) beschrieben die Art und Weise der Bildauswertung detailliert. Sie definierten eine Reihe morphologischer Merkmale, mit denen sie die Struktur der Bilder von Proben unterschiedlicher Behandlungsweise unterscheiden konnten. Engquist (1970a) teilte das Bild in mehrere Zonen ein und verfolgte die Veränderung der Merkmale innerhalb und zwischen den Zonen. Pettersson (1969) entwickelte anhand von Änderungen des Mischungsverhältnisses von Probe und Salz für die verschiedenen Zonen und Merkmale eine Rangordnung der Bilder, womit er

die Proben mit zu- oder abnehmender Intensität der Merkmale relativ zueinander ordnen konnte. Er teilte die Merkmale in verschiedene Klassen (Dendrite, Textur, Form) ein. Engquist (1963) unterschied die Merkmale in Textur (gemeint ist die Gruppierungsweise der Kristallnadeln) und Tracht (die Art und das Aussehen der Nadeln). Auch Selawry & Selawry (1957) verwendeten den Begriff „Tracht“ in der Bildbeschreibung.

Die hohe Variabilität von Bildern einer Probe wird schon bei Selawry (1961), Engquist (1961) und Nickel (1968) diskutiert. Bei Untersuchungen zum Einfluss von Licht und Schatten auf die Bildstruktur setzte Engquist (1963) daher mindestens 72 Platten pro Variante ein. Schudel et al. (1980), die zum ersten Mal die Streuung der Bilder einer Probe als Methodenkriterium behandeln, kristallisierten 12 Serien zu je 24 Bildern. Sie liessen die Bilder von einer geschulten Person anhand einer Skalierung der morphologischen Merkmale und anschliessender Einsortierung in vorgegebene Klassen auswerten. Die Ergebnisse wurden mit einem X^2 -Test statistisch ausgewertet. Dies hatten zuvor schon Engquist (1961, 1963) und Pettersson & Engquist (1963) dokumentiert. Darüber hinaus setzten Schudel et al. (1980) ein Panel von 14-16 Personen ein, die in mehrfacher Wiederholung die Bilder auswerten mussten.

Auch Balzer-Graf & Balzer (1994, 1996), sowie Balzer-Graf et al. (1998) beschreibt Bildmerkmale, mit denen sie Proben (Weizen, Äpfel) aus unterschiedlichen Anbausystemen unterscheiden. Sie arbeiten dabei mit kodierten Proben, die sie sowohl frisch, als auch nach definierter Alterung der Probenlösung und der Probe (Stresstest) kristallisieren. Die Alterung der Probenlösung und der Probe, als Möglichkeit eine zusätzliche und zeitabhängige Information über die Probe zu erhalten, haben bereits Pettersson und Engquist (1963) beschrieben. Damit kann die Dynamik einer Probe erfasst werden. Diese Vorgehensweise kann u. U. auch die Frische einer Probe bestimmen (zum Zusammenhang zwischen Alterung und Frische einer Probe in Bezug auf die Konsumentenerwartungen vgl. Nuessli 2006). Dieser Ansatz ist auch für die Bewertung der vom Verbraucher von ökologischen Lebensmitteln geforderten Natürlichkeit von Bedeutung (zum Zusammenhang zwischen Frische, Natürlichkeit und gesunder Nahrung, vgl. Buckenhüskes 2006).

Während allerdings Selawry & Selawry (1957), Selawry (1960), v. Hahn (1962), Engquist (1961, 1963, 1970), Pettersson (1967, 1969) und Schudel et al.

(1980), Knijpenga et al. (2005) die Labor- und Kristallisationsbedingungen, sowie die Art und Weise der Auswertung (Merkmalsdefinition, Skalierung, Statistik) beschreiben, fehlen diese Angaben in den Arbeiten von Balzer-Graf weitgehend. Die von ihr erfolgreich gezeigte Unterscheidung von codierten Proben aus verschiedenen Anbausystemen (vgl. Mäder et al. 1993, Balzer-Graf & Balzer (1994, 1996), Balzer Graf et al. (1998)) können aus den veröffentlichten Unterlagen daher nicht ohne weiteres nachvollzogen werden. Bei Untersuchungen zum Einfluss von Standort und Sorte auf die Weizenqualität wird zwar ein Überblick über die Probenaufbereitung gegeben, Mengenangaben und eine Dokumentation der Kammerbedingungen fehlen aber (Balzer Graf & Balzer 1994). Auch die Arbeiten von Knijpenga (1994, 1995) und Geier (2005) liefern qualitative Beschreibungen verschiedener Bilder und Bildtypen, zur Variation nehmen sie keine Stellung.

Eine Angabe über die Streuung des Verfahrens gab es bisher nicht oder wurde nie veröffentlicht. In der Literatur wird lediglich beschrieben, dass einige Autoren mit einer oder mehreren Bildwiederholungen gearbeitet haben und anschließend für die visuelle Bildauswertung Platten verwarfen, deren Bildgestalt nicht zu den übrigen passte (Selawry 1961, Engquist 1970b). In den meisten Veröffentlichungen wird über die Streuung aber nicht berichtet, sondern es werden nur einzelne (vorsortierte?) Bilder ohne weitere Angaben gezeigt (z.B. Balzer-Graf et al. 1998). Dass aber eine Variation der Bilder auftritt, steht außer Frage. Für Balzer-Graf & Balzer (1994, S. 418) werden in den Kristallbildern von Weizenproben von verschiedenen Standorten und Sorten „erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Proben sichtbar“, und bei einigen Proben sind „die Unterschiede in den Kristallbildern innerhalb der Proben dieser Gruppe (...) nicht sehr gross“. Angaben, wie erheblich oder wie gross diese Unterschiede sind, werden nicht gemacht. Knijpenga dokumentiert zwar die Probenaufbereitung, zur Variation findet sich aber nur, dass das Kriterium „Mehrzentrigkeit“ als „innerhalb der Schwankungsbreite der Phänomene liegend betrachtet“ wird (Knijpenga 1994, S. 404). Wie gross diese Schwankungsbreite ist, wird nicht diskutiert.

Zusammenfassend kann die Bildauswertung, wie sie bisher angewandt wurde, in vier verschiedenen Ebenen unterschieden werden:

1. Quantifizierbare, einzelne morphologische und lokale Merkmale (z.B. Nadeldicke)
2. Qualitative, mit den einzelnen morphologischen Merkmalen verbundene Merkmale (z.B. Regelmässigkeit der Verzweigungen)
3. Qualitative, übergeordnete Merkmale, die das ganze Bild beschreiben (z.B. Koordination der einzelnen Nadelzüge, Integration der Verzweigungen)
4. Qualitative, aus einem Training an vielen Bildern definierter Herkunft erfahrenen Eindrücke in Bezug auf pflanzenphysiologische Bedingungen (z.B. Reife, wurzeltypisch)

Aus den in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen zur Charakterisierung und Unterscheidung von Proben unterschiedlicher Herkunft ist es nicht immer möglich zu erfahren, welche der vier Ebenen und wie sie, mit welchen Kriterien angewandt wurden. Waldburger (2005) liefert eine Betrachtung der Bildbeschreibung, bezogen auf diese vier Ebenen.

Bereits Pettersson (1967) hatte für die Kristallisation von Proben mit verschiedenen Behandlungsweisen die Problemstellung für das Verfahren beschrieben. Da sich die vorliegende Arbeit mit methodischen Untersuchungen zur Biokristallisation beschäftigt, soll aus dieser Arbeit zitiert werden (Pettersson 1967, S. 15f):

„Innerhalb der Forschung hat man gewöhnlich folgende Probleme vor sich. Man bekommt von einem Experiment, z. B. Pflanzenversuch, Produkte von verschiedenen Behandlungsweisen zur Untersuchung. Im einfachsten Falle sind es nur zwei, bei komplizierten Experimenten oder Versuchen eine grössere Anzahl. Man muss nun mit Hilfe der bei der Untersuchung erhaltenen Resultate und mit dem, was man ansonsten von den Bedingungen des Experimentes oder Versuchs kennt, folgende Fragen zu beantworten versuchen:

1. Unterscheiden sich die Produkte verschiedener Behandlungen in einer oder mehrfacher Hinsicht?
2. Wie gross ist der Unterschied und ist er gesichert?
3. Wenn der Unterschied als gesichert angesehen werden kann, welche Wirkungen kommen darin zum Ausdruck?

Die erste Frage hat qualitative Aspekte, und um sie beantworten zu können, muss man für das, was man als Unterschied ansieht, Kriterien aufstellen. Die zweite Frage geht weiter und umfasst auch eine quantitative Seite. Um sie beantworten zu können, braucht man eine geeignete Skala, mit deren Hilfe man die einzelnen Resultate vergleichen kann. Diese werden meistens in Zahlensymbolen ausgedrückt, und in diesem Falle sind Mathematik und Statistik wertvolle Hilfsmittel beim Vergleichen von Resultaten. Die dritte Frage ist erkenntnismässiger Art. In dem Experiment, auch wenn es ziemlich vielseitig angelegt ist, hat man aus der Ganzheit etwas herausgenommen, um es „rein“ studieren zu können. Die Resultate, welche man durch die Beantwortung der beiden ersten Fragen bekommen hat, müssen nun bewertet werden, um sie wieder in ihren rechten Zusammenhang stellen zu können.“

Was bisher fehlt, ist eine methodische Grundlagenarbeit zum Verfahren. Dazu gehört die Darstellung der Wiederholbarkeit bezogen auf die einzelnen Prozessschritte, die Untersuchung zur Reproduzierbarkeit und eine systematische Untersuchung möglicher Einflussfaktoren. Während die Reproduzierbarkeit einzelner Methoden offenbar bisher nicht getestet wurde, ist der Einfluss ausgewählter Faktoren auf die morphologischen Merkmale (die durch die jeweiligen Autoren jeweils individuell definiert wurden), zwar qualitativ ansatzweise beschrieben, in den meisten Veröffentlichungen wird aber nur berichtet, dass Experimente dazu durchgeführt wurden, die Ergebnisse aber nicht ausreichend dokumentiert. So nennt Pettersson (1967) als Voraussetzung für eine statistische Auswertung der Ergebnisse, „dass alle äusseren Verhältnisse, die sog. exogenen Faktoren, welche den Kristallisationsprozess beeinflussen, konstant gehalten werden können“ (S. 30), und Heinze (1959) beschreibt Untersuchungen hierzu als Teil der Verfahrensentwicklung: „Wie so oft in der Entwicklung naturwissenschaftlicher Erkenntnisse musste auch hier der Weg durch unmittelbares, intuitives Erfassen gebahnt werden, und konnte die statistische sichernde Methode erst zu ihrem Recht kommen, als man gelernt hatte, die störenden Einflüsse zu erkennen und auszuschalten.“ Ballivet et al. (1999) berichten von der komplexen Interaktion von Probenaufbereitung, Mischungsverhältnis und Bedingungen während der Kristallisation. Auch Knijpena & Waldburger (2004) beschrieben den Einfluss von Kristallisation und Mischungsverhältnis auf das Bild.

Betrachtet man die Geschichte des Verfahrens seit Pfeiffer (1935), so fällt auf, dass die Ergebnisse von Untersuchungen nur mit dem Ansatz der jeweiligen Person erklärt werden können. Die Ergebnisse scheinen daher nicht reproduzierbar zu sein, da grundlegende Arbeit zur Dokumentation und Standardisierung des Verfahrens fehlen. Dies ist bedauerlich, da somit eine Untersuchung von Langzeittrends der Lebensmittelqualität mit diesem Verfahren nicht möglich ist, wie sie z.B. für die troposphärische Ozonbelastung gezeigt werden konnten (Volz & Kley 1988). Diese fehlenden grundlegenden Arbeiten zum Verfahren der Biokristallisation wurden daher auch bei der Bewertung der Ergebnisse zum Anlass genommen, die Aussagefähigkeit anzuzweifeln (vgl. Woese et al. 1995, Raupp 1996, Alföldi et al. 2001, Soil Association 2001, Tauscher et al. 2003, Siderer et al. 2005). Erst Andersen dokumentierte 2001 standardisierte Methoden zur Kristallisation von Einzelstoffen und Lebensmittelproben. Darüber hinaus wurden ab 1995 personenunabhängige Auswertungsmethoden auf Basis gescannter Bilder und einer computergestützten Bildauswertung entwickelt (Le Gia 1995, Le Gia et al. 1996, Andersen et al. 1999, Andersen 2001). Die von Andersen (2001) für die Bildverarbeitung eingesetzte Texturanalyse konnte erfolgreich Bilder von Proben verschiedenen Behandlungsweisen (Düngung, Alterung) unterscheiden. Mit dieser Art der Auswertung konnten auch Bilder von Molekülen mit unterschiedlichem Polymerisationsgrad getrennt werden. Untersuchungen zur Streuung der Bilder einer Probe und eine statistische Auswertung der Ergebnisse wurden ansatzweise durchgeführt (vgl. Andersen 2001), liessen aber, wie auch in den vorherigen Arbeiten von z.B. Pettersson 1969, Engquist (1961, 1963), die unterschiedliche Gewichtung von Wiederholungen der einzelnen Prozessschritte (z.B. Probenaufbereitung, Kristallisation) unberücksichtigt. Damit bezieht sich die dort angegebene Signifikanz der Trennung auf die Kristallisation der Bilder, nicht aber auf die Probe selbst. Dies kann erst mit der Durchführung entsprechender Wiederholungen der einzelnen Schritte oder durch die Anwendung eines entsprechenden Modells in der statistischen Auswertung erfolgen.

5 Hypothesen

Im Rahmen dieser Habilitationsschrift wurden die Biokristallisation für die Unterscheidung von Weizen- und Möhrenproben aus unterschiedlicher Herkunft validiert (in-house). In der vorliegenden Arbeit sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen im Zeitraum von 2002 bis 2005 beschrieben. Die Entwicklung, in-house Validierung und Anwendung der Biokristallisation, wie sie im Folgenden beschrieben ist, beschränkt sich auf die formale Prüfung der Fähigkeit des Verfahrens, in einzelnen Prozessschritten dokumentiert zu werden, auf die systematische Untersuchung zur Bestimmung von Einflussgrößen, auf die Ermittlung der Streuung der Ergebnisse und auf die mathematisch-statistische Prüfung des Unterscheidungsvermögens von Produkten aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten. Dabei wird angenommen, dass das Verfahren den Einfluss eines Zusatzes (der Probe) auf die Kristallisation eines Salzes (CuCl_2) zeigt, der mit einer computergestützten Texturanalyse erfasst werden kann, so dass Unterschiede in den Bildern, bezogen auf die Textureigenschaften, statistisch ausgewertet werden können. Damit sollen die Schwierigkeiten, die bisher diesem Verfahren die Anerkennung in der Wissenschaft versagten (vgl. oben) beseitigt werden. Es wird die methodische Grundlagenarbeit dokumentiert, die den ganzen Prozess einer Probe - von der Probenahme bis zur Auswertung - transparent beschreibt und zeigt, welche Faktoren das Ergebnis beeinflussen und wie präzise die Methode, bezogen auf die Auswertung mit Texturanalyse, angewendet werden kann. Validierung bedeutet zu prüfen, ob eine Methode für eine Fragestellung geeignet ist. Die vorliegende Frage ist die Unterscheidung von Proben aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten, nicht die Bewertung der einzelnen Produktqualitäten, bezogen auf Ernährung oder Gesundheit. Damit werden die Fragen 1 und 2 von Pettersson (1967) beantwortet und mit der Beantwortung der Frage 3 in Bezug auf die Authentizität der Produkte begonnen.

Der vorliegenden Arbeit liegen folgende Hypothesen zugrunde:

1. Die Prozeduren für die Methoden der Biokristallisation lassen sich als Standardarbeitsanweisungen dokumentieren. Die Methoden können damit in anderen Laboratorien angewandt werden (Durchführung einer Laboreignungsprüfung zwischen den verschiedenen Laboratorien).
2. Die Ergebnisse von Experimenten, die in der Literatur entsprechend beschrieben wurden, lassen sich mit dem Verfahren reproduzieren.
3. Für die Auswertung der Kristallbilder kann eine
 - 3.1 computergestützte Texturanalyse mit statistischer Modellbildung charakterisiert werden
 - 3.2 visuelle Bildauswertung durch die Anpassung von Normen aus der sensorischen Prüfung von Lebensmitteln methodisch beschrieben und überprüft werden.
4. Das Verfahren der Biokristallisation kann für die Unterscheidung von Proben (Weizen, Möhre, Apfel) aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten validiert werden.
 - 4.1 Einflussfaktoren können untersucht werden.
 - 4.2 Die Streuung der Methoden kann angegeben werden.
 - 4.3 Das Verfahren der Biokristallisation kann Proben aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten signifikant trennen.

6 Beschreibung des Verfahrens

6.1 Überblick

Voraussetzung jeder Validierung ist eine gute Laborpraxis. Dazu gehörten Standard-Arbeitsanweisungen und die Dokumentation der Prozesse. Ziel eines Validierungsprozesses ist es, Methoden in normativen Dokumenten zu beschreiben. Dafür müssen nicht nur die einzelnen Schritte des Prozesses beschrieben, sondern auch die kritischen Einflussgrößen bekannt sein. Das im Rahmen dieser Habilitationsschrift untersuchte Verfahren der Biokristallisation lässt sich in die folgenden Prozessschritte gliedern:

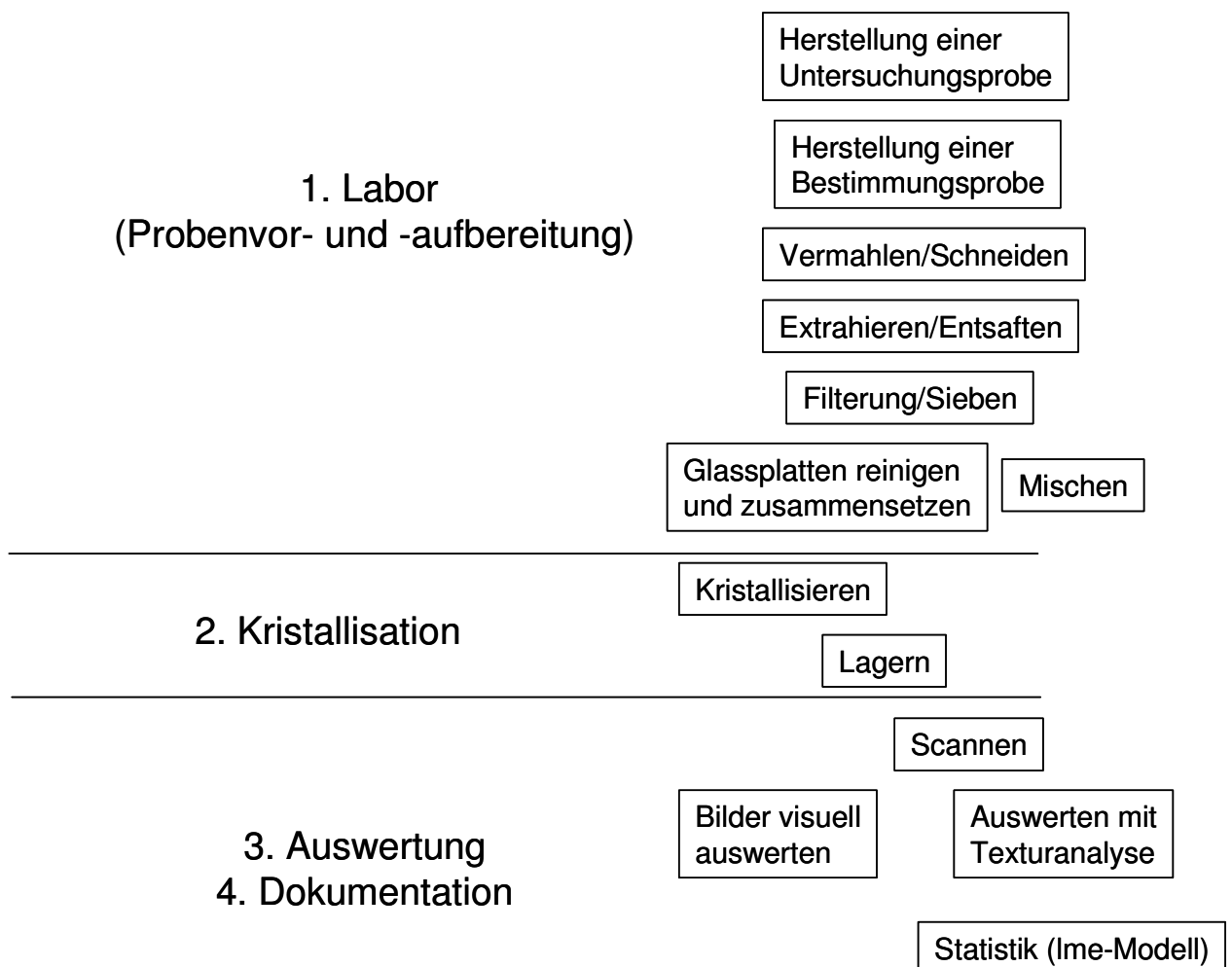


Abbildung 2: Die Prozessschritte des Verfahrens

Die einzelnen Schritte wurden dokumentiert. Die Dokumentation der Probenvor- und -aufbereitung orientierte sich dabei an den für die Labordokumentation

üblichen Formaten internationaler Standardnormen (z. B. ASTM 5245-92 1998). Jeder Schritt bekommt eine eigene Dokumentation mit folgender Gliederung:

1. Ziel (worum geht es)
2. Dokumente (worauf wird sich bezogen, andere Dokumente)
3. Anwendungsbereich (Methode für Frage oder Probenart)
4. Definitionen (Begriffe werden erklärt)
5. Material
6. Reagentien
7. Probleme
8. Regeln (Hinweise und Ratschläge zu kritischen Faktoren)
9. Prozeduren (Standard-Arbeitsanweisung, getestet von mind. drei verschiedenen Laboratorien)
10. Richtlinien Abfallentsorgung
11. Auswertung (Art und Weise)
12. Präzision (Wiederholbarkeit, Reproduzierbarkeit)
13. Bericht (Dokumentation eines Ergebnisses)
14. Änderungen (alle Veränderungen werden vermerkt)

Zur guten Laborpraxis gehört, dass auch die Bestimmung einer Probe dokumentiert wird. Früher wurde dies handschriftlich im Laborbuch getan, heute gibt es dafür zusätzlich computergestützte Softwareprogramme. Ein solches Programm existierte zur Biokristallisation zunächst nicht, wurde aber von Nicolaas Busscher in Dänemark und an der Universität Kassel entwickelt und anschliessend im Rahmen verschiedener Projekte in Zusammenarbeit mit der Firma papyrus in Rosengarten/Hamburg optimiert. Dieses Labordokumentationsprogramm *LabDoc* umfasst die Schritte im Labor, die Kristallisation und das Scannen der Bilder. Es werden die Bonitur, die Mengen an Analysenprobe, Mahlgut bzw. Saft, die Trockenmassen, die Mengen an Probe und CuCl_2 für die Kammerlösung, das Mischungsverhältnis sowie die klimatischen Bedingungen incl. der Regelleistungen der Heizquelle, der Verdampfungszeit und Kristallisationsdauer während eines Kammerdurchganges erfasst bzw. dokumentiert. Damit wird für jeden Kammerdurchgang eine *LabDoc*-Serie angelegt, die nach dem Scannen der Bilder mit der Auswertung im Programm *acia* (Texturanalyse) verbunden wird.

Damit kann jedes Bild einer Probe und jedes Ergebnis lückenlos zur Untersuchungsprobe zurückverfolgt werden. Dies war eine wichtige Voraussetzung, um die 21.500 kristallisierten Platten auswerten zu können. Die einzelnen Prozedurbeschreibungen und die *LabDoc*-Serien sind via Intranet für alle Beteiligten jederzeit verfügbar.

6.2 Der Laborprozess

Im Folgenden wird die Probenaufbereitung der hier untersuchten Probenarten Weizen, Möhre und Apfel als Auszug aus den Standard-Arbeitsanweisungen beschrieben.

Weizenproben

120 g gereinigter Weizenkörner einer Untersuchungsprobe werden in einer Retsch-Mühle (ZM 100, Retsch, 1mm zertifiziertes Ringsieb) gemahlen. 50 g des Mahlgutes werden mit 450 mL ultrafiltriertem Wasser (Milli-Q, Millipore) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur extrahiert (Schüttler, Heidolph Unimax 2010, 180 rpm). Der Extrakt wird 15 min stehen gelassen, damit die groben Partikel absinken und dann zweimal gefiltert (20 µm und 10 µm Whatman 40 und 41, Frisenette, Dänemark). Die Kammerlösung wird hergestellt, indem die gefilterte Lösung mit einer 10 %igen CuCl_2 -Lösung gemischt wird, so dass 90 mg CuCl_2 und 90 mg Probenlösung, bezogen auf das eingewogene Mahlgut pro Platte, in 6 mL Kammerlösung kalkuliert wird (dies wurde in Vorversuchen ermittelt). Der Weizenstandard wird hergestellt, indem 20 kg Weizenschrot (Herkunft: Bio-Premium, Naturland, Meyermühle, Landshut/D) gefriergetrocknet (-80 °C, vier Tage) und in Portionen bei -18 °C im Dunkeln gelagert wird. Für jeden Versuchstag wird der Standard, wie beschrieben, extrahiert und kristallisiert.

Möhrenproben

Die Laborprobe wird nach den Vorgaben der Europäischen Handelsklassennorm bonitiert. 30 Möhren werden gewaschen und $\frac{1}{4}$ an jeder Seite abgeschnitten. Die Möhren werden in einem Green Star GS-3000 (Keimling Naturkost, D) entsaftet. Der Saft wird mit einem 110 µm Nylonsieb gesiebt und 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor er mit

ultrafiltriertem Wasser zur Probenlösung verdünnt und mit einer 10 %igen CuCl_2 -Lösung versetzt wird. Das Volumen pro Platte beträgt 6mL, die Menge an Probe 115 mg, bezogen auf den gesiebten Saft, und 90 mg CuCl_2 , bezogen auf die Einwaage des Salzes (wurde in Vorversuchen ermittelt). Gefriergetrocknete Möhren werden mit der Retschmühle gemahlen, mit ultrafiltriertem Wasser extrahiert (das Mischungsverhältnis wird so gewählt, dass die Probenmenge pro Platte mit frischen Möhren vergleichbar ist) und anschließend gesiebt. Die Menge pro Platte wird auf die Einwaage bezogen.

Apfelproben

Die Laborprobe wird nach der auf diese Probenart modifizierten Handelsklassennorm für Möhren bonitiert. 10-30 Äpfel werden gewaschen, geachtelt in einem Green Star GS-3000 (Keimling Naturkost, D) entsaftet. Der Saft wird mit einem 110 μm Nylonsieb gesiebt und 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor er mit ultrafiltriertem Wasser zur Probenlösung verdünnt und mit einer CuCl_2 -Lösung versetzt wird. Das Volumen pro Platte beträgt 6 mL, die Menge an Probe 180 mg, bezogen auf den gesiebten Saft, und 135 mg CuCl_2 , bezogen auf die Einwaage des Salzes (wurde in Vorversuchen ermittelt).

Maisproben

100 g einer Maisprobe wird mit einer Labormühle (Retsch ZM 100, 1mm Ringsieb) vermahlen. 50 g des Mahlgutes werden mit 450 mL milli-Q Wasser (Millipore) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur extrahiert (Schüttler Heidolph Unimax 2010, 180 rpm). Der Extrakt in ein Zentrifugenröhrchen überführt und in einer Laborzentrifuge (Universal 32 R, Hettich) bei 14.000 rpm und 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert. Die Kammerlösung wird hergestellt, indem die gefilterte Lösung mit einer 10 %igen CuCl_2 -Lösung gemischt wird, so dass 100 mg CuCl_2 und 175 mg Probenlösung bezogen auf das eingewogene Mahlgut pro Platte in 6 mL Kammerlösung kalkuliert wird (dies wurde in Vorversuchen ermittelt).

Einzelstoffe

Für die Polyvinylpyrrolidon (PVP)-Proben wurde die von Andersen (2001) beschriebene Methode verwendet. 400 PVP 40 kDa und 700 kDa (Fluka)

wurden jeweils in 396 mL milli-Q Wasser (Millipore) gelöst, mit einer 10 %igen CuCl_2 -Lösung vermischt und mit einem Mischungsverhältnis von 0,4 mg PVP und 30 mg CuCl_2 pro Platte (d. h. 0,4/30) mit einer Bildwiederholung von 20 Platten pro Polymerisationsgrad in zwei Kammern parallel kristallisiert.

500 mg Glycogen (von der Auster, Fluka) wurden in 500 mL milli-Q Wasser (Millipore) gelöst und in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (0,1/10; 0,25/25; 0,5/50 und 1,0/100) kristallisiert; der Versuch wurde an zwei Versuchstagen wiederholt.

Vorbereitung der Glasplatten

Rundgeschnittene Glasplatten mit einem Durchmesser von 100mm und einer Stärke von 2mm (Float-Glas, Fa. Pfähler/D) werden in einer Laborspülmaschine (Miele Desinfektor) definiert gereinigt (zuerst Neodisher FLA, dann Neodisher Z, zum Abschluss de-ionisiertes Wasser 90 °C). Anschliessend werden die Platten mit 99,5%igem Ethanol (Merck) gespült und bei 30 °C im Trockenschrank für 30 min getrocknet. Zur Fixierung der Lösung auf der Platte während der Verdampfung wird ein 3,5 cm hoher Acyrling (Fa. Broennum Plast/DK) auf dem Rand der Glasplatte befestigt (Andersen, 2001). Dieser Ring soll zusätzlich Turbulenzen während der Kristallisation verhindern (Ballivet et al., 1999; Andersen, 2001).

6.3 Kristallisation

Aufbau und Funktionsweise der hier eingesetzten Kristallisationskammern sind im Abschlussbericht zum Projekt 02OE170 im Bundesprogramm Ökolandbau (Kahl et al. 2003) sowie in Busscher et al. 2003 dokumentiert. Die Kristallisation geschieht in diesen eigens dafür konstruierten Kammern, deren Verdampfungseinheit erschütterungsfrei aufgebaut wird. Sie sind eine Weiterentwicklung der von Andersen et al. (1998) beschriebenen Kammern. Es können 43 Platten pro Durchgang und Kammer untersucht werden. Die Kammer befindet sich in einem Raum (Aussenkammer), dessen Klimaparameter Temperatur und Feuchte konstant gehalten werden. Die Klimakonditionen der Kammer und der Aussenkammer werden an verschiedenen Stellen (s. Abbildung 5) kontinuierlich gemessen und online überwacht. Zusätzlich werden mit Hilfe einer Wetterstation die zum Zeitpunkt

der Untersuchung herrschenden Wetterdaten kontinuierlich aufgezeichnet. In Abbildung 3 ist der Verlauf der relativen Feuchte (rF) auf dem Ring und an der Innen- und Aussenseite der Kammerwand dargestellt. Die relative Feuchte auf dem Ring steigt an, wenn die Platten unter dem Sensor plaziert sind und die Verdampfung beginnt, während die Feuchte in der Aussenkammer konstant gehalten wird. Entsprechend sinkt die Temperatur auf dem Ring, da sich zwischen Wärmequelle und Sensor die Platte befindet (Abbildung 4). Es wird mit Bedingungen einer mittleren Verdampfungszeit von 12-15 h, 26 °C und 53 % rF in der Aussenkammer und 30 °C, 53 % rF über den Platten gearbeitet.

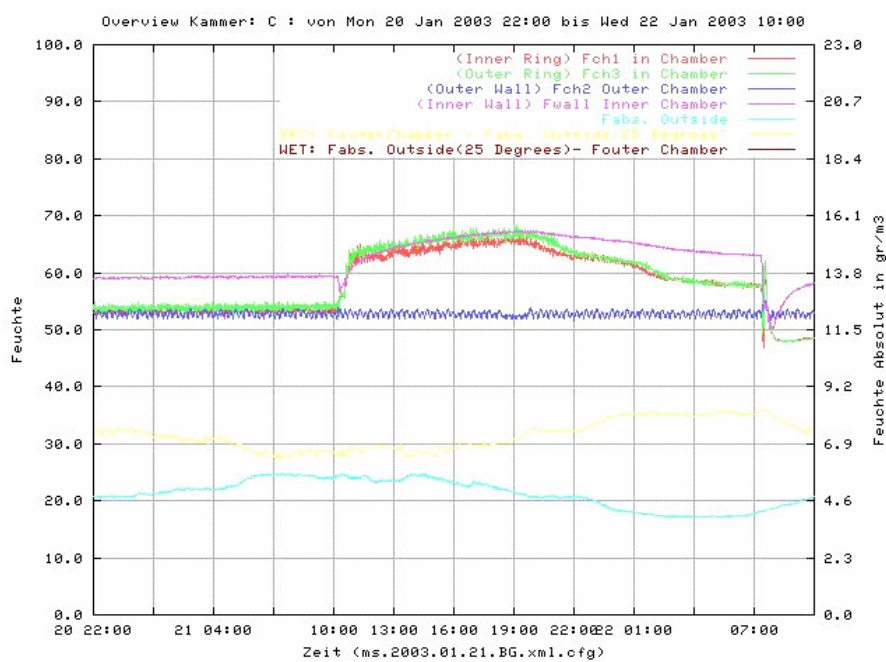


Abbildung 3: Relative Feuchte über je einer Platte pro Ring (grün und rot), an der Innen- (magenta) und Aussenwand (blau) der Holzkammer während eines Kammerdurchganges.

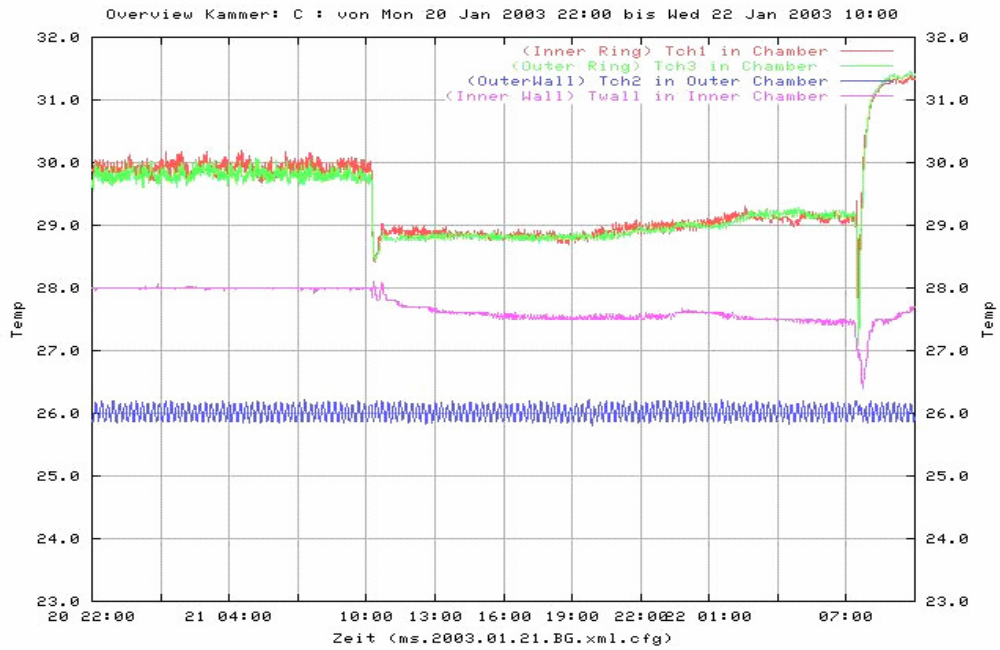


Abbildung 4: Temperatur über je einer Platte pro Ring (grün und rot), an der Innen- (magenta) und Aussenwand (blau) der Holzkammer während eines Kammerdurchganges.

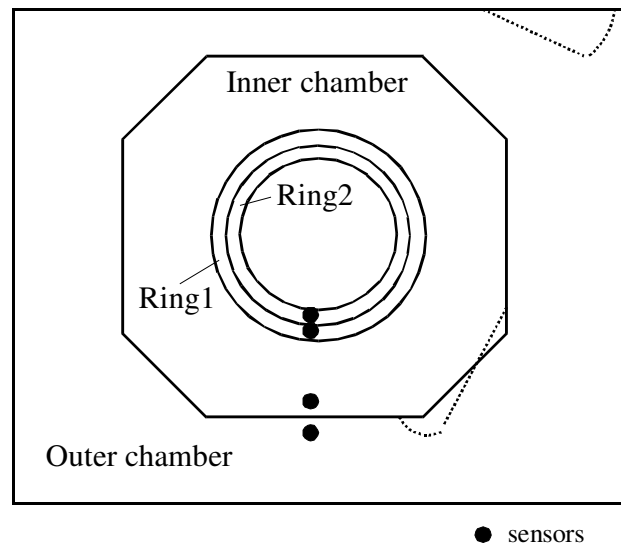


Abbildung 5: Schema der Kristallisationskammer mit den zwei Ringen und vier Sensoren zur Aufzeichnung der Temperatur und Feuchte.

Für die Validierung des Verfahrens wurden zwei baugleiche Kammern in nebeneinander liegenden Kellerräumen der Universität Kassel, Standort Witzenhausen (mit erschütterungsfreien Ringen) zeitgleich aufgebaut. Die Untersuchungen wurden mit zwei Partner-Laboratorien in Holland (Louis Bolk Instituut, Driebergen/NL) und Dänemark (Biodynamic Research Association Denmark, Galten/DK), die über baugleiche Kammern verfügten, gearbeitet.

Die Bilder werden direkt nach dem Kristallisieren aus der Kammer genommen, der Acrylring wird entfernt, und jedes Bild erhält auf dem äusseren Rand unter dem Kristallisationszentrum eine entsprechende Beschriftung (Seriename, Kammer, Probenname, Plattennummer, Mischungsverhältnis). Eine gedachte Verbindungslinie zwischen dieser Beschriftung und dem Kristallisationszentrum ist die Vertikale für die Ausrichtung der Bilder auf dem Scanner. Nach drei Tagen Lagerung in der Aussenkammer werden die Bilder mit einem PowerLook III, UMAX Scanner im Durchlichtverfahren gescannt und anschliessend pro Kammerdurchgang und Tag zusammengefasst und in der Aussenkammer (kontrolliertes Klima) gelagert. Alle 21.500 Platten dieser Untersuchungen sind im Lager an der Universität Kassel aufbewahrt und können so für spätere Auswertungsinstrumente (z.B. Strukturanalyse), aber auch für die Rückverfolgbarkeit zur Verfügung stehen.

6.4 Auswertung

6.4.1 Überblick

Nachdem die Bilder gescannt worden sind, werden diese gescannten Platten als Datei weiterverarbeitet, die gescannten Bilder ausgedruckt oder die Bilder selbst ausgewertet, je nachdem welche Auswertungsmethode angewendet werden soll. Für die visuelle Bildauswertung als Prüfungsmethode hat sich das Photographieren der Bilder als geeigneter gegenüber dem Ausdruck der gescannten Bilder erwiesen. Die Wahl der Methode zur Bildauswertung bestimmt, welche Information aus dem Bild möglich wird und wie die Laborprozesse gesteuert und bewertet werden.

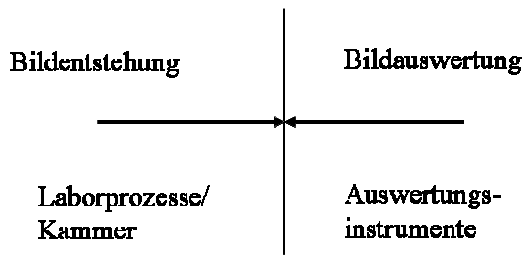


Abbildung 6: Das Kristallbild zwischen Laborprozess und Bildauswertung.

Bei dem Einsatz der Biokristallisation für die Unterscheidung und Klassifizierung von Proben verschiedener Herkunft wird erwartet, dass die Methode sowohl eine Auswertung des einzelnen Bildes, als auch die Zusammenfassung von Bildwiederholungen zu einem Mittelwert gestattet. Jede Methode besitzt eine Streuung, d.h. das Ergebnis unterliegt einer Variation. Dabei gibt es zufällige und systematische Fehler. Die zufälligen Fehler wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dafür muss mit einer mehrfachen Wiederholung der Schritte Probenaufbereitung und Kristallisation gearbeitet werden und, es werden häufig bis zu 36 Bilder pro Untersuchungsprobe kristallisiert. Diese Verschachtelung der Wiederholungen in den einzelnen Schritten, wie sie für die statistische Auswertung in einem Modell berücksichtigt werden muss, ist in Abbildung 7 gezeigt.

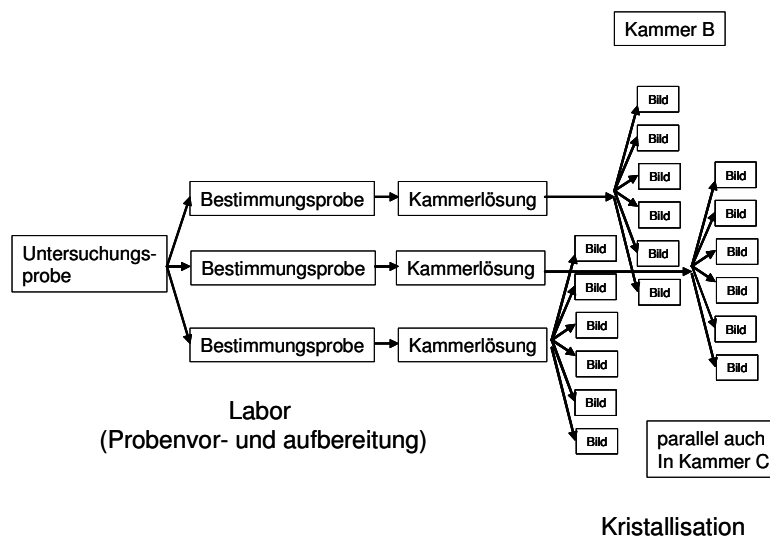


Abbildung 7: Wiederholungen der Prozesse zur Ermittlung der Wiederholpräzision und zur statistischen Auswertung der Ergebnisse bei der Unterscheidung von Proben anhand von Mittelwerten über 18 Bilder einer Untersuchungsprobe.

Die Bilder werden visuell oder computerunterstützt ausgewertet. Die visuelle Auswertung wird als Prüfung durchgeführt. Die computergestützte Bildauswertung kann als Textur- oder als Strukturanalyse angewendet werden. Während die Strukturanalyse mit den visuell erfassbaren morphologischen Kriterien in Beziehung gesetzt werden kann, aber eine hohe Empfindlichkeit gegen kleine Änderungen der Struktur erwartet wird, erfasst die Texturanalyse die Textureigenschaften (Verteilung von Graustufen) der Bilder und ist robust gegen kleine Änderungen in der Bildstruktur (vgl. Andersen et al. 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bilder ausschliesslich mit der Texturanalyse ausgewertet. Eine Strukturanalyse befindet sich z. Zt. in Entwicklung (Engelsmann & Ersboll 2004).

6.4.2 Visuelle Bildauswertung

Im Rahmen der Validierung des Verfahrens wurde untersucht, wie sich die visuelle Bildauswertung durch die Anpassung von Normen aus der sensorischen Prüfung von Lebensmitteln methodisch beschreiben und überprüfen lässt. Ziel war die Unterscheidung von Proben aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten. Dabei wurden nur solche Bildmerkmale verwendet, die sich aus den in Kapitel 4.3 beschriebenen Ebenen 1 und teilweise 2 ableiten lassen (also keine hedonischen Merkmale). Diese Methoden wurden allerdings wegen des hohen Zeitaufwandes nicht für die Validierung des Verfahrens eingesetzt.

Bei der Festlegung der Merkmale wurden die in der Literatur bereits beschriebenen Kriterien (s. Kap. 4.3) verwendet und entsprechend definiert. Dazu konnte auf den Erfahrungen einer qualitativ beschreibenden Bildauswertung am Louis Bolk Institut/NL (Machteld Huber) und von Jens-Otto Andersen (Biodynamic Research Association/DK) aufgebaut werden.

Im Rahmen der Habilitationsschrift wurden vier verschiedene Auswertungsmethoden durch die Anpassung von Normen aus der sensorischen Beurteilung von Lebensmitteln *Einfach beschreibende Prüfung* (DIN 10964), *Triangle-Test* (ISO 4120: 2000), *Rangordnungsprüfung* (DIN 19063) und *Profilprüfung* (DIN 10967: 1999 (1,2) und 2002 (4)) entwickelt und zur Unterscheidung von Proben eingesetzt. Diese Auswertungsmethoden wurden bisher nicht auf das Verfahren angewendet bzw. in der Literatur beschrieben.

Die *Einfach beschreibende Prüfung*, der *Triangle-Test* und die *Rangordnungsprüfung* wurden in Zusammenarbeit mit Aneta Zalecka, die diese Methoden für die Auswertung der Steigbilder einsetzt (Zalecka 2006), und Maria Kokornaczyk von der Universität Pisa/I, Landwirtschaftliche Fakultät, Institut CIRAA E. Avanzi (Betreuung eines Forschungsaufenthaltes an der Universität Kassel) entwickelt. Sie sind im Anhang aufgeführt. Anstelle von Lebensmittelproben werden Bilder dargeboten, ansonsten konnten die Anforderungen dieser Methoden übernommen werden. Der *Triangle-Test* wurde an Bildern von Weizenproben aus einem definierten Feldversuch (Barberi & Mazzoncini 2005) angewandt. Es handelt sich um die zwei Arten *Triticum aestivum* und *Triticum durum*, die jeweils ökologisch und konventionell angebaut wurden (Ernte 2005). Die Bilder wurden in Kristallisationskammern in Italien erzeugt. Von jeder Probe wurden drei Bilder, die entsprechend den Vorgaben der Methode ausgewählt wurden, ausgewertet. Die Auswertung erfolgte mit sechs geschulten Probanden in den Kabinen des Sensorikraumes des Fachgebietes. Entsprechend der Norm, wurden jeweils drei photographierte Bilder zur Unterschiedsprüfung auf das Anbausystem vorgelegt, wobei jeweils zwei Bilder von einer Probe waren. Die Ergebnisse sind für die beiden Arten als Prozent der richtig und falsch erkannten Unterscheidung in Abbildung 8 dargestellt. Die Bilder von Proben aus unterschiedlichen Anbausystemen können für beide Arten signifikant ($p < 0,05$) getrennt werden. Im Unterschied zu Schudel et al. (1980) ist diese Auswertung in Anlehnung an eine bereits in einer anderen Disziplin dokumentierte und anerkannte Methode beschrieben.

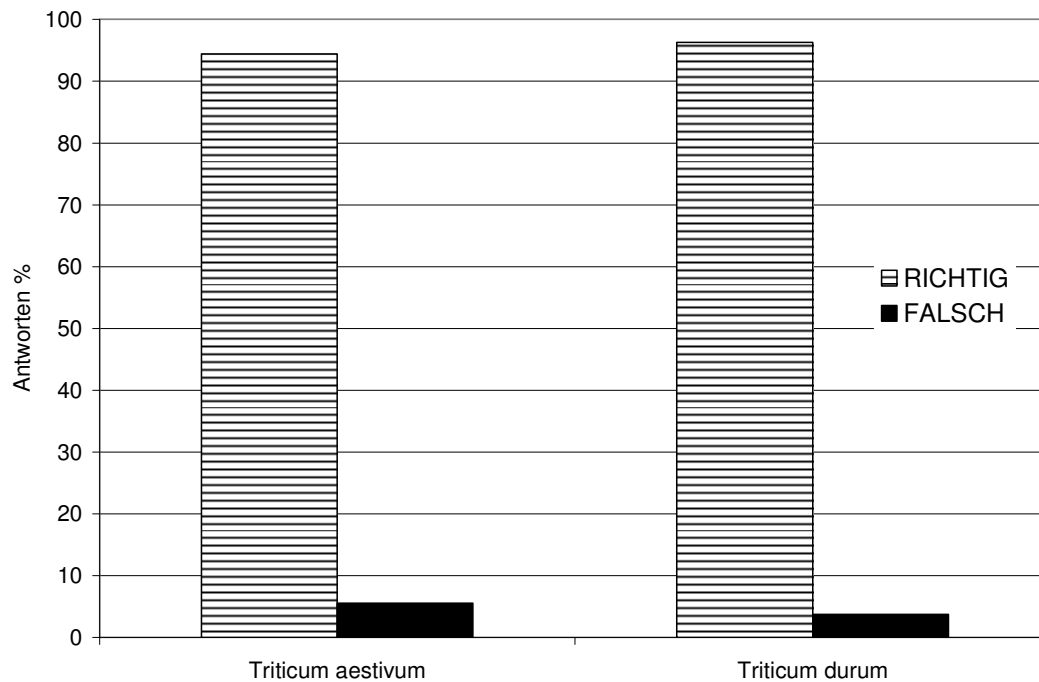


Abbildung 8: Ergebnis (richtig und falsche Antworten in Prozent) des Triangle-Test auf Unterscheidung der Bilder von zwei Arten (*Triticum aestivum* und *Triticum durum*), die ökologisch und konventionell angebaut wurden.

In Zusammenarbeit mit Machteld Huber vom Louis Bolk Institut (die Entwicklung der Kriterien und die Schulung des Panels wurde von Machteld Huber geleitet) wurde die *Profilprüfung* nach den Vorgaben der sensorischen Prüfung an die Bildauswertung adaptiert. Auch hier werden anstelle von Lebensmittelproben Bilder dargeboten, ansonsten konnten die Anforderungen dieser Methoden übernommen werden. Das Panel arbeitete zunächst mit sechs Personen, später mit acht Personen in englischer Sprache. Die Bilder wurden als Photos dargestellt. Zunächst wurden beschreibende Merkmale gesammelt und in die in Kap. 4. 3 beschriebenen, vier genannten Ebenen gruppiert. Für die weitere Schulung wurden 14 Kriterien der Ebenen 1 und 2 ausgewählt, die in gemeinsamen Sitzungen definiert wurden. Eine Skalierung von 1-9 wurde sowohl für Möhren- als auch für Weizenbilder eingeführt und Referenzbilder zu den Schritten 1, 4, 7 und 9 der Skala festgelegt. Die Entwicklung der Methode wurde mit einer im Rahmen dieser Habilitationsschrift angefertigten Diplomarbeit dokumentiert (Kretschmer 2003), diese ist im Anhang zu finden. Die Definition der einzelnen Kriterien sowie die jeweiligen Referenzbilder sind ebenfalls im Anhang aufgeführt. Daher werden die bei der Ergebnisdarstellung

genannten einzelnen Kriterien nicht weiter erläutert. Zu den beiden Normen wurden hinzugenommen: DIN 10952 (1983) und ISO 6658 (1985) sowie später ISO 11035 (1994). Die Methode wurde auf zwei verschiedene Fragestellungen angewandt. Zum einen für die Unterscheidung von frischen und gefriergetrockneten Untersuchungsproben einer Möhrenprobe (Prozess Gefrietrocknung, s. Kapitel 10.2.1.2), zum anderen zur Unterscheidung von zwei Möhrensarten aus einem Versuch an der Universität Kassel (s. Kapitel 10.2.5.2). Beide Versuche wurden mit einem trainierten Panel von acht Personen an je drei ausgewählten Bildern einer Untersuchungsprobe mit einer dreifachen Wiederholung der Auswertung pro Bild durchgeführt - die Auswahl der Bilder wurde nach den bereits bei Andersen (2001) beschriebenen Kriterien vorgenommen (einzentrigte Bilder ohne technische Fehler). Zusätzlich wurden nur Bilder mit vergleichbarer Verdampfungszeit ausgewählt. Für die Untersuchung wurden die Bilder am LBI in Holland farbig fotografiert. Für die Prüfungen wurde mit einem farbigen Ausdruck dieser Bilder gearbeitet (s. Anhang). Damit konnte zum ersten Mal für die visuelle Bildauswertung der Biokristallisation die intra- und interpersonale Variation ermittelt und die Unterscheidung der Bilder statistisch ausgewertet werden. Die Unterscheidung der Bilder frischer von gefriergetrockneter Möhrenproben war zwar signifikant, die intra- und interpersonale Streuung aber noch zu hoch.

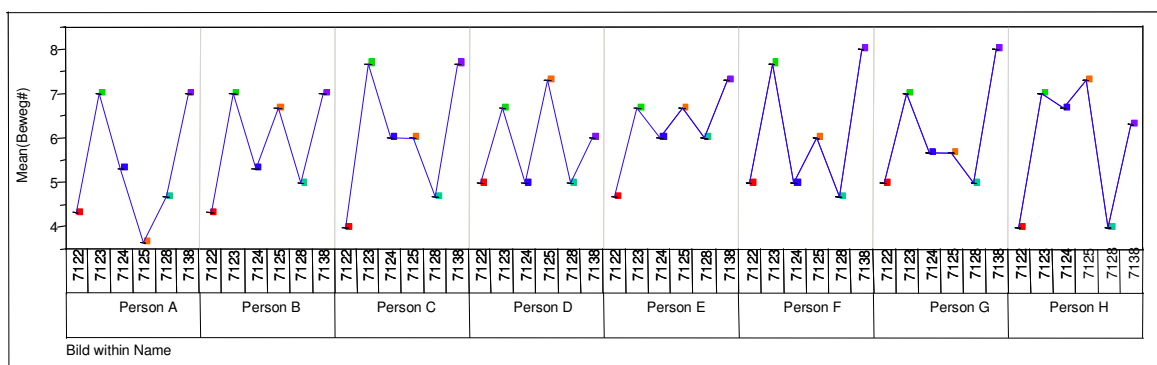


Abbildung 9: Variability-Chart für ein Kriterium der Profilprüfung von Bildern einer Möhrenprobe.

Nach weiterem Training wurden die Bilder der beiden Möhrensarten ausgewertet. Das Ergebnis zeigte eine deutliche Verbesserung der Variation. Die Unterschiede zwischen den Bildern der beiden Möhrensarten sind für alle

Kriterien ausser *Integration* und *Clear stems formed* signifikant (s. Abbildung 10). Die Ergebnisse des Verfassers dieser Arbeit sind zum Vergleich in Abbildung 11 gezeigt (das Signifikanzniveau ist für jedes Kriterium angegeben).

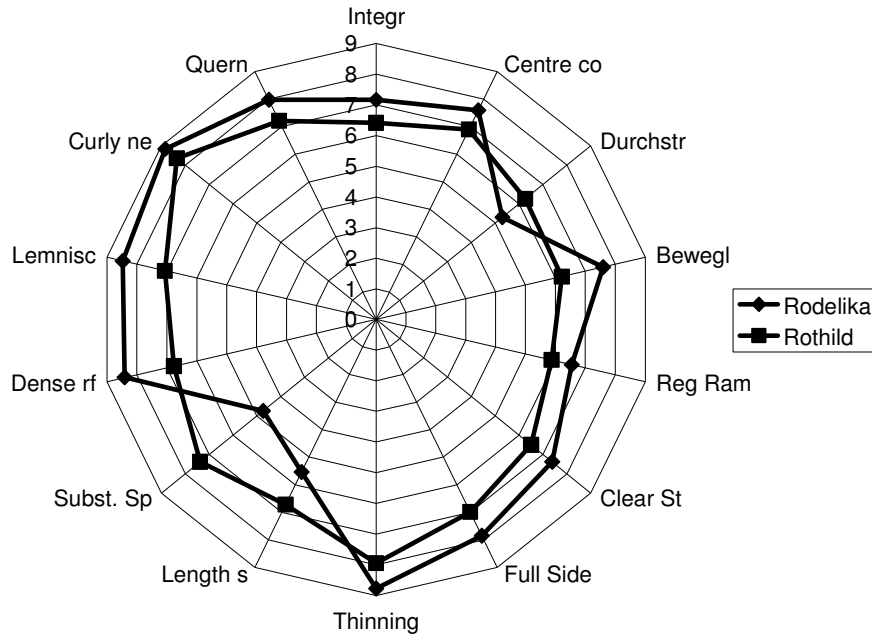


Abbildung 10: Ergebnis der Profilprüfung von Bildern zweier Möhrensorten (Panel, interpersonal).

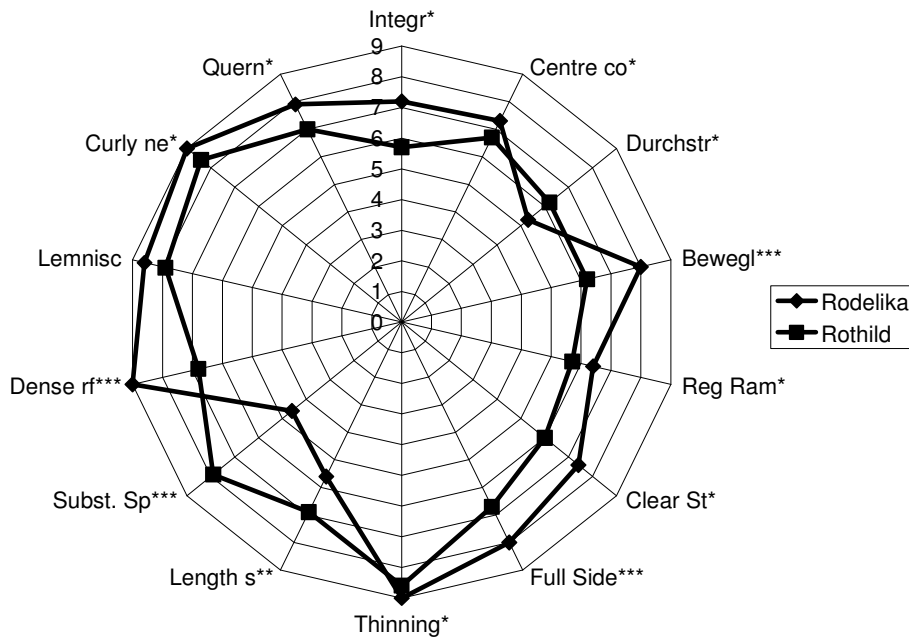


Abbildung 11: Ergebnis der Profilprüfung von Bildern zweier Möhrensorten (Verfasser, intra-personal).

Fazit:

Mit der *Profilprüfung* ist zum ersten Mal eine standardisierte Auswertung von Bildern verschiedener Proben möglich. Für jede neue Probenart und Fragestellung müssen die Kriterien entsprechend überarbeitet und ggf. neue entwickelt werden.

6.4.3 Texturanalyse

Bereits Le Gia et al. (1996) wendeten eine Texturanalyse mit 32 Graustufen und einem definierten Bildausschnitt (Region of Interest, ROI) auf die Kristallbilder an. Carstensen (1992) entwickelte eine Texturanalyse an der Technischen Universität Dänemark, die er zusammen mit Andersen für die Auswertung der Kristallbilder spezifizierte (vgl. Andersen et al. 1999), indem verschiedene Bildausschnitte, Normalisierungsmethoden und Variablen erster und zweiter Ordnung getestet wurden. Damit konnte Andersen (2001) Proben verschiedener Behandlung unterscheiden. Diese Texturanalyse wird für die Auswertung der Bilder in der hier vorliegenden Arbeit eingesetzt.

Das Histogramm ist die normalisierte Graustufenverteilung (0-255 Graustufen) aller Bildpunkte eines ROIs. Die Variablen erster Ordnung beschreiben diese Graustufenverteilung (Histogramm), Variable zweiter Ordnung die Verteilung nächster Nachbarn der Graustufenverteilung. Für jedes Histogramm werden 8 Variable erster Ordnung berechnet (Carstensen 1992), diese werden auf eine Gaußverteilung normiert (Histogramm-matching). Für die vorliegende Arbeit wird deshalb mit den Variablen zweiter Ordnung gearbeitet. Die sog. Graylevel Cooccurrence Matrix (GLCM) ist die Kalkulation der nächsten Nachbarn verschiedener Bildpunkte eines ROIs. Bei der in Abbildung 12 dargestellte GLCM werden auf der x-Achse die Punkte, auf der y-Achse der nächste Nachbarpunkt und auf der z-Achse, die sich ergebende Anzahl gleicher Kombinationen jeweils nächster Nachbarpunkte. Die Anordnung erfolgt auf einer Diagonalen, da helle Punkte eher helle Nachbarn und dunkle Punkte eher dunkle Nachbarn haben. Aus dieser GLCM werden 15 Variable zweiter Ordnung berechnet: Energy, Entropy, Maximum probability, Correlation, Diagonal moment, Kappa, Difference energy, Difference entropy, Inertia, Inverse difference moment, Sum energy, Sum entropy, Sum variance, Cluster shade und Cluster prominence. Die Namen der Variablen (z.B. Energy)

beziehen sich nicht auf physikalische Größen. Die Texturanalyse ist nicht identisch mit der Texturbeurteilung von Lebensmitteln, z.B. über ein Texturmessgerät. Sie bildet auch nicht die Merkmale ab, die in der Literatur zum Verfahren bisher als "Textur" bezeichnet wurden (vgl. z.B. Engquist 1963). Carstensen definiert die zur Auswertung der Bilder genommenen Textur als: "a region in 2D or 3D that can be perceived as being spatially homogeneous in some sense".

Carstensen testete die 15 Variablen der GLCM anhand sog. Brodatz-Texturen (vgl. Carstensen 1992, S. 53). Die Umrechnung der GLCM in 15 Variable ist sinnvoll, da damit die Information und Menge der Daten in 15 verschiedene Aspekte aufgeteilt werden kann.

Die Möglichkeit, verschiedene Auflösungen des Bildes (scales) zu wählen, wird für die vorliegende Arbeit nicht benutzt, da Vorversuche keine Verbesserung bei der Reduzierung der Bildpunkte (höhere scales) zeigten. Alle Ergebnisse sind für Scale 1 berechnet.

Verschiedene Bildausschnitte (Region Of Interest, ROI) zu wählen, macht Sinn, da das Bild eine Struktur und nicht nur eine Textur hat. Dies konnten Andersen et al. 1999 beschreiben. Sie testeten vier verschiedene Bildausschnitte (ROIs): 1. Kreisförmige Bildausschnitte, wobei vom geometrischen Zentrum ausgehend, immer mehr Bildanteile hinzugenommen werden können, 2. Kreisförmige Bildausschnitte, wobei der gewählte Bildausschnitt nicht in die Auswertung eingeht, sondern der Rest, 3. Sektorielle Bildausschnitte und 4. Bildsegmente. Sie konnten zeigen, dass kreisförmige Bildausschnitte (Nr. 1) die beste Information hinsichtlich Gruppierung der Bilder lieferte. Daher wurde für die vorliegende Arbeit auch kreisförmige ROIs gewählt und der Bildausschnitt als ein Verfahrensmerkmal der Methode definiert.

Der Vorgang besteht aus sechs Schritten:

1. Vorbereitung des Bildes für die Analyse (u.a. Scannen)
2. Auswahl der Bildausschnittes (Region Of Interest, ROI)
3. Auswahl weiterer Parameter (z.B. Farbverteilung, Normierung)
4. Kalkulation der 8 Variablen erster Ordnung
5. Kalkulation der 15 Variablen zweiter Ordnung
6. Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse

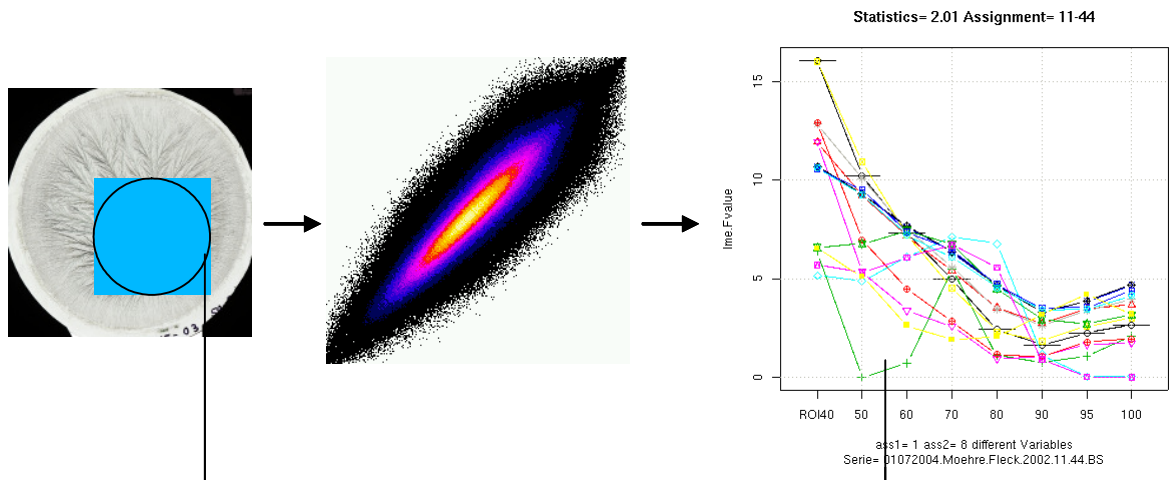


Abbildung 12: Vom gescannten Bild (links mit markiertem ROI von 40 %) über die GLCM (Mitte, für eine Variable) bis zum F-Wert in Abhängigkeit vom ROI für alle 15 Variablen zweiter Ordnung (rechts für zwei Möhrenproben mit unterschiedlicher N-Düngung).

Um zu prüfen, welcher der 15 Variablen sich für die Bildauswertung eignen, wurden für die vorliegende Arbeit zunächst alle Variablen ausgewertet. Da die Fragestellung dieser Arbeit die Unterscheidung von Proben unterschiedlicher Herkunft ist, wurde der F- oder t-Wert und der p-Wert der statistischen Auswertung (s. 6.4.4) in Abhängigkeit vom Bildausschnitt ausgewertet. Dies ist in Abb. 12 für zwei Möhrenproben gezeigt. In die weitere Auswertung gehen dann nur solche Variablen ein, die einen stetigen Verlauf über ROI zeigen (in Abbildung 12 zeigt z.B. die Variable markiert grün mit Kreuz diesen stetigen Verlauf nicht, sondern variiert je nach ROI, sie geht also nicht in die weitere Auswertung ein). Nach der Auswertung der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuche zeigte sich, dass die 15 Variablen in drei Gruppen zusammengefasst werden können, wobei die F- und p-Werte einer Gruppe jeweils einen vergleichbaren Verlauf über ROI zeigen. Die Auswahl der drei Gruppen wurde anhand der Auftragung der F-Werte gegen den Bildausschnitt für die Weizenproben aus dem DOK-Versuch (Ernte 2003, S. Kap. 10. 1.2.1) und für die Möhrenproben aus dem Sortenversuch an der Universität Kassel (Ernte 2004, s. Kap. 10.2.1.2) ausgewählt.

Gruppe 1: *diagonal moment, cluster shade*

Gruppe 2: *inverse different moment, kappa*

Gruppe 3: *sum entropy, sum variance*

Diese sechs Variablen wurden aufgrund der Menge an Daten für die Auswertung der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche weiter, auf eine Variable pro Gruppe reduziert. In Abbildung 13 ist der F-Wert der Trennung (Möhrensorten) gegen den Bildausschnitt (ROI) für diese drei Variablen *diagonal moment*, *kappa* und *sum variance* aufgetragen, dies zeigt auch den unterschiedlichen Verlauf der drei Variablen (Gruppen).

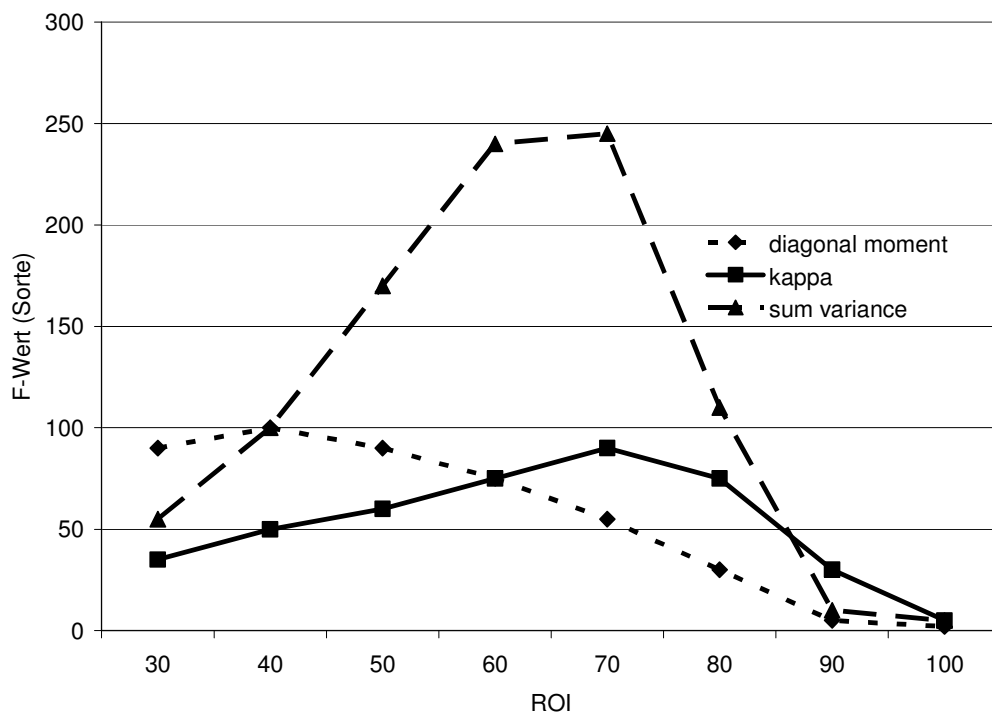


Abbildung 13: F-Wert der Variablen *diagonal moment*, *kappa*, *sum variance* für die Unterscheidung der Möhrenproben *Rodelika* und *Rothild* in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Die Untersuchungen dazu werden z.Zt. im Rahmen der Dissertation von Aumaporn Meelursarn (Titel: *Statistical evaluation of texture analysis data from the biocrystallization method from wheat samples from different wheat trials*) im Fachgebiet Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur weitergeführt. Zusätzlich wurden die Variablen für die in Kapitel 10 beschriebenen Versuche untereinander korreliert. Dabei wurde die anhand der

F-Werte über ROI gefundene Gruppenbildung bestätigt (Projektbericht BÖL 02OE170/F).

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche werden zur besseren Übersichtlichkeit in dieser Arbeit anhand von drei ausgewählten kreisförmigen Bildausschnitten (50, 70, 90 %) vorgestellt, sie wurden aber auch für die Zwischenstufen berechnet.

Die drei ausgewählten Variablen sind in Carstensen (1992) beschrieben und die jeweilige Formel dort angegeben. *Diagonal moment* "basically measures the differences in correlation for high gray levels and for low gray levels" (Carstensen 1992, S. 16). *Kappa* ist bei den hier untersuchten Proben proportional zu *inverse different moment*. Es ist ein Maß für die Breite der GLCM. *Kappa* "is exactly the same as correlation for binary images as shown on page 33 in my thesis. For images with more gray levels kappa is similar to correlation, but with more emphasis on the main diagonal in the GLCM. This means that kappa "likes" unicolored areas much more than almost unicolored (smooth) areas" (Carstensen 2006). Sum variance ist proportional zur Korrelation der GLCM.

6.4.4 Statistische Auswertung der Ergebnisse der Texturanalyse

Wie in Abbildung 7 gezeigt, besteht die Bestimmung einer Untersuchungsprobe aus einer mehrfachen Wiederholung der Schritte Probenaufbereitung und Kristallisation. Zusätzlich werden diese Wiederholungen in zwei Kammern parallel kristallisiert und die Untersuchung an verschiedenen Tagen wiederholt. Damit können die Bilder einer Untersuchungsprobe nicht mit einer einfachen Analysis Of Variance (ANOVA) statistisch ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgt daher über ein Modell, das diese verschachtelten Wiederholungen berücksichtigt.

Es handelt sich um ein sog. "linear mixed effects model" (lme-Modell), das die Kombination von Faktoren (kategoriale Vorhersagevariablen) zulässt, die fest oder auch zufällig sein können. Damit werden hierarchische Strukturen der Daten berücksichtigt, wie sie bei dem für die Biokristallisation gewählten Design vorliegen. Das lme-Modell verarbeitet die Daten aus einer unterschiedlichen Anzahl von Wiederholungen (repeated measurements). Im lme-Modell werden dann die Ergebnisse als Summe der festen und zufälligen Effekte berechnet.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgt dabei mit dem Programmpaket R (Version 2.10, R-Foundation). Die Modelle in R (Pinheiro & Bates 2000, Dalgaard 2002) erlauben in der Funktion lme im Bereich der zufälligen Effekte keine gekreuzten Modelle. Dies impliziert, dass die Daten in R entsprechend sortiert sein müssen, um die Struktur der Verschachtelung korrekt abzubilden. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden Datensätze in SAS (Version 9.1) und R parallel gerechnet und verglichen. Die Parametrisierung der Modelle in SAS kann entweder als gekreuztes oder als geschachteltes Modell gewählt werden. Dabei können sowohl feste als auch zufällige Effekte gekreuzt und geschachtelt werden. Die Ermittlung der Freiheitsgrade geschieht unterschiedlich (vgl. Bates 2005). Grundsätzlich ist die Ermittlung der Freiheitsgrade im lme-Modell an die hierarchische Struktur verschachtelter Modelle gebunden. Das Modell in R rechnet mit kleineren Freiheitsgraden als im vergleichbaren SAS-Modell. Dadurch sind die p-Werte konservativer als im SAS-Modell (Faktor 10). Die Entwicklung des lme-Modells und die Einbindung in die Auswertung der Texturanalyse wurde von Nicolaas Busscher am Fachgebiet Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur in Zusammenarbeit mit der Firma Statcon, Witzenhausen und papyrus, Rosengarten/Hamburg durchgeführt und wird in einer am Fachgebiet betreuten Dissertation (Aumaporn Meelursarn) dokumentiert. Es wird mit folgender Formel gerechnet:

lme(value~quality+day+chamber, random=~1|fsamplepreps)

Das Ergebnis Berechnung für eine Untersuchungsprobe (**quality**) ist der Wert einer Variablen der Texturanalyse (**value**) in Abhängigkeit vom Tag (bei einer Tageswiederholung, **day**) und der Kammer (wenn zwei Kammern parallel eingesetzt werden, **chamber**). Untersuchungsprobe, Tag und Kammer sind feste, keine zufälligen Effekte (**random=~1**). Die Gruppierung der Daten erfolgt nach Bestimmungsprobe (**samplepreps**). Die Mischterme (quality, day, chamber) werden nicht berücksichtigt, da sie nicht signifikant waren.

Jeder Datensatz wird für die Varianzanalyse mit lme-Modell auf folgende Voraussetzungen geprüft:

1. Normalverteilung der Daten mit dem Shapiro-Wilk-Test (Royston 1982a, b, 1995)
2. Homogenität der Varianzen mit dem Bartlett-Test (Bartlett 1937)

Nur die Variablen, die beide Tests bestehen (nicht signifikant), werden für die Auswertung verwendet. Die im Folgenden angegebenen F- und p-Werte beziehen sich auf das Ergebnis der Varianzanalyse mit dem lme-Modell. Diese geben in der vorliegenden Arbeit ausschliesslich eine Aussage zur Unterscheidung der hier untersuchten Proben.

Da die Texturanalyse mehrere Variablen gleichzeitig liefert, liegt es nahe, multivariate Verfahren zur Auswertung der Ergebnisse einzusetzen. Die Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) ist ein Klassifizierungsverfahren mit bekannten Gruppen. Sie ist als besonders robustes und schnelles Verfahren bekannt. Sie wird in dieser Arbeit für die Gruppierung als deskriptive Diskriminanzanalyse benutzt. Für die Klassifizierung wurde für die Proben des DOK-Versuches (s. Kapitel 10) für jedes Jahr ein eigenes Modell mit der bestmöglichen Unterscheidung der Proben unter Reduzierung der Streuung innerhalb einer Probe ermittelt. Das Ergebnis der LDA ist die prozentuale Missklassifikation einzelner Datenpunkte zu der vorgegebenen Klasse. Die hier dargestellten LDAs wurden bei der Firma Statcon/Witzenhausen mit dem Programm JMP (JMP 5.1, SAS) durchgeführt.

7 Validierung der Biokristallisation

7.1 Definitionen und Begriffe

Die in-house Validierung der Biokristallisation wurde anhand der Variablen der Texturanalyse durchgeführt. Die Evaluierung der bei den einzelnen Schritten produzierten Bilder mit der visuellen Bildauswertung erwies sich aufgrund der Menge der Bilder als undurchführbar (Zeit und Kosten). Eine solche Auswertung ist aber prinzipiell für die Validierung der Methode möglich. Im Rahmen der hier vorgelegten Untersuchungen wurden im Zeitraum von 2002 bis 2005 21.500 Kristallbilder in 250 einzelnen Versuchen erzeugt. Die Auswertung der gescannten Bilder führte zu 500 einzelnen Untersuchungsserien, die im eigens entwickelten Labordokumentationsprogramm *LabDoc* dokumentiert wurden (Speicherung der Bilder, Laborbedingungen, Untersucher, Materialien, Chemikalien, Labor-Analyse- und Untersuchungsprobe) und mit der Texturanalyse (Programm *acia*) ausgewertet wurden. Das resultierte in 130 *acia*-Serien mit etwa 400 Einzelauswertungen, die zum einen statistisch ausgewertet wurden (200 Ergebnisblätter), zum anderen zur besseren Übersichtlichkeit für drei Bildausschnitte in 130 *Microsoft-Excel*-Serien mit ca. 800 Darstellungen für diese Arbeit ausgewählt wurden.

Die Texturanalyse liefert Ergebnisse, die die Proben nominal unterscheiden. Für eine nominale Skala ist das Unterscheidungsmerkmal in mindestens zwei diskrete Kategorien (Merkmalsausprägungen) unterteilt. Zwischenstufen gibt es nicht (z.B. zwei Sorten, zwei Proben mit und ohne Stickstoffdüngung oder die Varianten im DOK-Versuch, s. u.). Zusätzlich wurden vergleichend mehr als zwei Proben untersucht. Für einzelne Versuche wurde versucht, die Proben zu gruppieren. Dabei sind die Abstände der Merkmalsausprägungen nicht festgelegt. Dies ist erst auf einer Intervallskalierung möglich, die für die Texturanalyse im Rahmen der Fragestellung bisher nicht erarbeitet wurde. Die Variablen haben dazu keinen Null- oder Bezugspunkt (Verhältnisskala). Dies musste bei der Validierung der Biokristallisation berücksichtigt werden. Die Richtigkeit der Methode (Übereinstimmung mit dem wahren Wert) bzw. die Anwendung des ersten Instrumentes der ISO 17025 kann damit nicht ermittelt bzw. angewendet werden. Die Anwendung des zweiten Instrumentes aus der ISO 17025, der Vergleich mit Ergebnissen, die mit anderen Verfahren erzielt

wurden, wurde im Rahmen der beiden Projekte BÖL 02OE170 und BÖL 02OE170/F durchgeführt und ist in den Abschlussberichten dokumentiert.

Im Folgenden werden zunächst Ergebnisse zum Verfahren und anschließend für einzelne Methoden vorgestellt und diskutiert. Für die Biokristallisation wird anstelle des Begriffs **Messung** der Begriff **Kristallisation** eingeführt. Die Methode wird für eine nominale bzw. ordinale Unterscheidung von Proben validiert und fällt damit aus den von der Codex Alimentarius Commission für chemische Methoden definierten Typenbezeichnungen heraus. Für die Auswertung der vorliegenden Untersuchungen wird angenommen, dass die Methode den Einfluss einer Probe auf das **Kristallisationsbild** zeigt. Ein Kristallisationsbild oder abgekürzt Bild ist dabei der auf der Glasplatte kristallisierte Rückstand einer Mischung aus Probenlösung und CuCl_2 . Der Schritt „Kristallisation“ des Verfahrens wird dabei für die Validierung zunächst als „black-box“ aufgefasst. Ein **Kalibrierstandard** im Sinne der EU-Richtlinie 96/23/EG gibt es nicht. Daher wurde mit einem homogenisierten Material gearbeitet, was als **Standardmaterial** dauerhaft einsetzbar ist und zu den untersuchten Proben vergleichbare Kristallisationsbilder liefert. **Laborvergleichstudien** konnten mit der Methode durchgeführt werden, wobei der Begriff „analytisch“ bei der Beschreibung der Leistungsfähigkeit weggelassen wird. Die Laboreignung wurde anhand des **Unterscheidungsvermögens** der Methode, zwei Proben unterschiedlicher Probenart signifikant zu unterscheiden, überprüft. Dies ist ein für die Biokristallisation definiertes Verfahrensmerkmal, dass mit der für analytische Methoden definierten Selektivität/Spezifität nicht verglichen werden kann. Auch die Präzision der Methode konnte für die ausgewählten Variablen ermittelt werden. Es wurden sowohl die **Wiederholpräzision**, als auch die **Vergleichspräzision** und die laborinterne **Reproduzierbarkeit** (Faktoren Untersucher, Tag, Kammer) ermittelt. Die Berechnung eines Variationskoeffizienten ist aufgrund des fehlenden Nullpunktes nicht möglich. Die **Robustheit** der Methode wurde mit dem vierten Instrument der ISO 17025 (oder der zweiten Charakterisierungsmethode nach Kromidas 2000) untersucht. Dabei wird nur von Methode, nicht von Analysenmethode gesprochen und **Analyte** durch Probe bzw. **Probenlösung** oder **Kammerlösung** ersetzt.

Die Analysenprobe ist hier eine **Bestimmungsprobe** (die wässrige Lösung der

Probe - Saft bei Möhren und Äpfeln, Extrakt bei Weizen- oder Maisproben -), Kammerlösung ist die Mischung aus Probenlösung und CuCl_2 , die zur Kristallisation auf die Platten in der Kammer pipettiert wird. Die Ersetzung gilt auch für alle anderen oben aufgelisteten Definitionen der Verfahrensmerkmale. Im Verlauf der Charakterisierung stellte sich heraus, dass zusätzlich zu den Verfahrensmerkmalen analytischer Methoden zwei als Einflussgrößen untersuchte Faktoren als für die Biokristallisation spezifische Verfahrensmerkmale definiert werden können. Dies sind das **Mischungsverhältnis** von Probenlösung und CuCl_2 und der **Bildausschnitt** der eingescannten Bilder für die Auswertung mit der Texturanalyse. Wenn im folgenden von der **Matrix** unterschiedlicher Mischungsverhältnisse gesprochen wird, so ist nicht die Probenmatrix, sondern die Anordnung unterschiedlicher Mengen an Probe pro Platte bei gleicher CuCl_2 -Menge (als **Probenvektor** bezeichnet) und unterschiedlichen Mengen an CuCl_2 pro Platte bei gleicher Menge an Probe (**CuCl_2 -Vektor**) gemeint. Die Menge an CuCl_2 pro Platte ist auf die eingewogene Menge an CuCl_2 bezogen, die Menge an Probe bei Möhren- und Apfelproben auf die Menge an für die Kammerlösung eingewogene Menge Saft, bei Weizen auf die Menge an für die Extraktion eingewogener Menge Mahlgutes. Die hier beschriebene Validierung der Biokristallisation ist kein abgeschlossener Vorgang. Die Ergebnisse werden zeigen, dass die Methoden weiter entwickelt und optimiert werden müssen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die hier vorgestellten Ergebnisse mit der Texturanalyse der Bilder gewonnen wurden. Es ist zu vermuten, dass mit dieser Art der Auswertung das Potential der Methode nur zum Teil ausgeschöpft, die Information aus den Bildern nur bezogen auf die Textur erhalten wird. Wie anhand der Prüfung visueller Bildauswertungsmethoden gezeigt wurde, bieten die Bilder über die Textur hinausgehende Informationen über die Bildstruktur. Die visuelle Bildauswertung, wie sie hier diskutiert wurde, greift dabei vorwiegend auf morphologische Kriterien zurück, die von einer computergestützten Bildauswertung (Strukturanalyse) auch erfasst werden müssten. Die Gestaltinformation der Bilder wird aber wahrscheinlich auch damit nicht erfasst. Dafür sind geeignete Methoden notwendig, die wissenschaftlich dokumentiert und für die jeweilige Fragestellung validiert werden müssen. Während für die Strukturanalyse die hier beschriebenen

Validierungsprozeduren angewendet werden können, müssen für die Gestalterkennung, so sie mit dem menschlichen Auge erfolgen soll, entsprechende Vorgaben wahrscheinlich erst entwickelt werden.

7.2 Validierungsprozess für die Biokristallisation

Für die Validierung der Biokristallisation wurde ein Validierungsplan erstellt. Ein solcher Plan ist z.B. von der AOAC beschrieben worden (www.AOAC.org). Für die Validierung einer analytischen Methode, die bereits entwickelt ist, veranschlagt die Organisation zwölf Monate und acht bis zehn verschiedene, unabhängige Laboratorien. Die Prozedur wird in neun Schritten beschrieben. Da zu Beginn dieser Arbeit aber weder die Prozeduren zur Biokristallisation in Standard-Arbeitsanweisungen niedergelegt waren noch Einflussfaktoren untersucht oder die Streuung der Methode ermittelt worden waren, mussten zusätzlich zur Validierung einzelne Schritte erst entwickelt werden.

Jeder Validierungsprozess beginnt mit der Dokumentation der einzelnen Prozessschritte von der Probennahme bis zur Auswertung. Ohne diese ist eine Validierung nicht möglich. Die Dokumentation der Methode wurde mit einer Harmonisierung der Prozesse zwischen drei Laboratorien, die an der Entwicklung und Validierung teilnahmen, verbunden. Auch wenn die Vergleichspräzision der Methode und eine Laboreignungsprüfung durchgeführt wurden, wird sich im Folgenden auf eine **in-house Validierung der Methode** bezogen. Dafür wurde die von Kromidas (2000) beschriebene Charakterisierungsmethode zur systematischen Beurteilung der Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen können, angewendet. Diese begann mit der Auflistung sämtlicher möglicher Einflussfaktoren in den einzelnen Prozessschritten. Es wurden diejenigen Faktoren ausgewählt, die aus den bisher in den beiden Partnerlaboren gemachten Erfahrungen den größten Einfluss versprachen. Nach der systematischen Untersuchung der Einflussfaktoren wurde die Streuung der Methode für ausgewählte Probenarten ermittelt und anschließend das Unterscheidungsvermögen der so dokumentierten und charakterisierten Methode für verschiedene Fragestellungen getestet.

7.3 Standardisierung und Charakterisierung des Verfahrens

7.3.1 Einflussgröße Mischungsverhältnis

Wie in Kap. 4.3 gezeigt, ist das Mischungsverhältnis eine wichtige Einflussgröße der Biokristallisation (es wird dann zum Verfahrensmerkmal). Während bei diversen analytischen Methoden ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Messgröße und Signal durch Kalibrierung der Methode gefunden werden soll, wird bei der Biokristallisation nach dem „optimalen“ Mischungsverhältnis von Probe und CuCl_2 gesucht. Für jede Probenart und ggf. Fragestellung wird ein auf die jeweilige Methode angepasstes Mischungsverhältnis ermittelt. Wie in der Literatur beschrieben, werden dabei sog. Konzentrationsserien angelegt, wobei die Menge an Probe und Konzentration an CuCl_2 pro Platte variiert wird (u. a. bei Andersen et al. 2003). Selawry & Selawry (1957), Selawry (1961) und Engquist (1970) beschränken sich allerdings auf einen sog. Probenvektor, indem nur die Probenmenge variiert, die CuCl_2 -Menge aber mit 200 mg pro Platte konstant gehalten wird. Als „optimal“ wird von den Autoren dasjenige Mischungsverhältnis bezeichnet, bei dem die resultierenden Bilder ein Optimum an festgelegten morphologischen (strukturellen) Bildelementen zeigen, die eine bestmögliche visuelle Unterscheidung zweier verschiedener Proben erlaubt. Andersen et al. (2003) entwickelten das Konzept der Matrix verschiedener Mischungsverhältnisse, um den optimalen Bereich zu finden. Der Begriff „Konzentrationsmatrix“ wird nicht mehr verwendet, da „Konzentration“ in der analytischen Chemie anders definiert ist und daher irreführend für die tatsächliche Prozedur ist. Bei der Biokristallisation werden zwei Lösungen gemischt und das Mischungsverhältnis dieser beiden Lösungen verändert; daher anstelle von Konzentration der Begriff „Mischungsverhältnis“.

Graphisch kann eine Matrix verschiedener Mischungsverhältnisse so dargestellt werden, dass auf der x-Achse die zunehmende Probenmenge und auf der y-Achse die zunehmende Menge an CuCl_2 aufgetragen wird (bzw. die Bilder geordnet werden). Üblicherweise wird eine Matrix mit vier bis fünf verschiedenen Mischungsverhältnissen von Probe und CuCl_2 bestimmt, was in 16-25 verschiedenen Kombinationen resultiert. Anstelle von Mengenangaben werden meistens nur Abkürzungen verwendet und dabei zuerst die Stoffmenge und dann die Menge an CuCl_2 in mg pro Platte angegeben. Das für Weizen

verwendete Mischungsverhältnis ist z.B. 70 mg Probe und 90 mg CuCl₂ oder abgekürzt 70/90, für Möhren 115 mg Möhrensaft und 90 mg CuCl₂ pro Platte oder abgekürzt 115/90. Im Folgenden wird das Mischungsverhältnis immer in dieser Abkürzung angegeben. Wie in Kap. 10.2.1.2 gezeigt wird, können Bilder trotz gleicher Menge an Probe unterschiedlich sein, wenn die Proben verschieden behandelt wurden (Anbau, Verarbeitung).

Andere Autoren beziehen die Mengenangabe der Probe pro Platte auf die Trockenmasse der Probe, indem diese in einem Vorversuch ermittelt wird oder stellen das optimale Mischungsverhältnis sogar auf die ermittelte Trockenmasse ein (Knijpena 1994). Wir haben darauf verzichtet, weil Untersuchungen (s. Kapitel 10.2.1.2 und 10.2.5.2), die wir an gefriergetrocknetem Material und an auf die gleiche Trockenmasse eingestellten Proben durchgeführt haben, zeigten, dass die Trockenmasse nicht allein und eindeutig das Ergebnis bestimmt, obwohl sie für manche Proben (z.B. mit hohem Wassergehalt wie Möhren) mit dem Ergebnis korrelieren kann. Auf den folgenden Seiten sind die Bilder verschiedener Mischungsverhältnisse für eine Möhrenprobe innerhalb einer Matrix von 20/20 bis 150/100 dargestellt (s. Abb. 14a und 14b). Die Bilder entsprechen folgender Matrix:

CuCl₂				
100	X	X	X	X
75	X	X	X	X
50	X	X	X	X
20	X	X	X	X
Probe	20	50	100	150

Tabelle 1: Beispiel, welche Mischungsverhältnisse für eine Matrix verschiedener Mischungsverhältnisse von Möhrensaft und CuCl₂ ausgewählt wurden.

Auch für Weizenproben wurde eine solche Matrix ermittelt. Die Ergebnisse sind ausführlich in Andersen et al. (2003) beschrieben. Für Untersuchungen, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben sind, wurde das optimale Mischungsverhältnis auch mittels ausgewählter morphologischer Kriterien bestimmt, da die Bilder zusätzlich zur Texturanalyse auch immer visuell

ausgewertet wurden. Für die Auswertung mittels Texturanalyse wird daher von diesem optimalen Mischungsverhältnis ausgegangen und das Ergebnis mit den benachbarten Mischungsverhältnissen verglichen. Diese Untersuchungen zum Einfluss des Mischungsverhältnisses auf die Variablen der Texturanalyse werden in den Kapiteln zu den unterschiedlichen Probenarten beschrieben. Bereits in der Literatur (vgl. Andersen 2001) wird darauf verwiesen, dass nur solche Ergebnisse verglichen werden können, die an einer Probenart mit gleichem Mischungsverhältnis durchgeführt wurden. Dies haben alle unsere Untersuchungen bestätigt. Der Einfluss des Mischungsverhältnisses war für die meisten Fragestellungen wesentlich größer als der Unterschied zwischen zwei Proben verschiedener Behandlung, wenn die Bilder visuell ausgewertet wurden. Dies lässt sich aber auch für die Variablen der Texturanalyse zeigen (s. u.). Wir haben uns in den hier beschriebenen Untersuchungen zur Validierung der Methode auf ein Mischungsverhältnis pro Probenart beschränkt und nur zur Absicherung der Methode Mischungsverhältnisse benachbarter Punkte in der Matrix untersucht. Wie in Kap. 4. 3 gezeigt, wurde in manchen, in der Literatur beschriebenen Versuchen für jede Untersuchung ein Probenvektor oder ein CuCl_2 -Vektor von mindestens drei verschiedenen Mengen pro Platte parallel untersucht. Nach Meinung der Autoren zeigt sich der Unterschied zwischen zwei Proben häufig erst im Vergleich der Vektoren anstelle eines einzelnen Mischungsverhältnisses. Wir haben diese Aussagen an einigen unserer Proben mit der Texturanalyse untersucht und konnten das bestätigen. Für eine Methodvalidierung müssen die Aussagen (Ergebnisse) statistisch abgesichert werden. Aufgrund der hohen Streuung der Methode ist eine Wiederholung sowohl der Probenvorbereitung (Lösung), als auch der kristallisierten Bilder unerlässlich. Bei einer Limitierung von 43 Plätzen pro Kammer und vier Kammern pro Woche hätten wir aber für die Untersuchung mit einem Proben- oder CuCl_2 -Vektor (d.h. mehreren Mischungsverhältnissen parallel) nicht genügend Bildwiederholungen für eine statistische Aussage durchführen können.

Fazit:

Das Mischungsverhältnis von Probe und CuCl_2 muss als für jede Probenart bzw. Fragestellung untersucht werden.

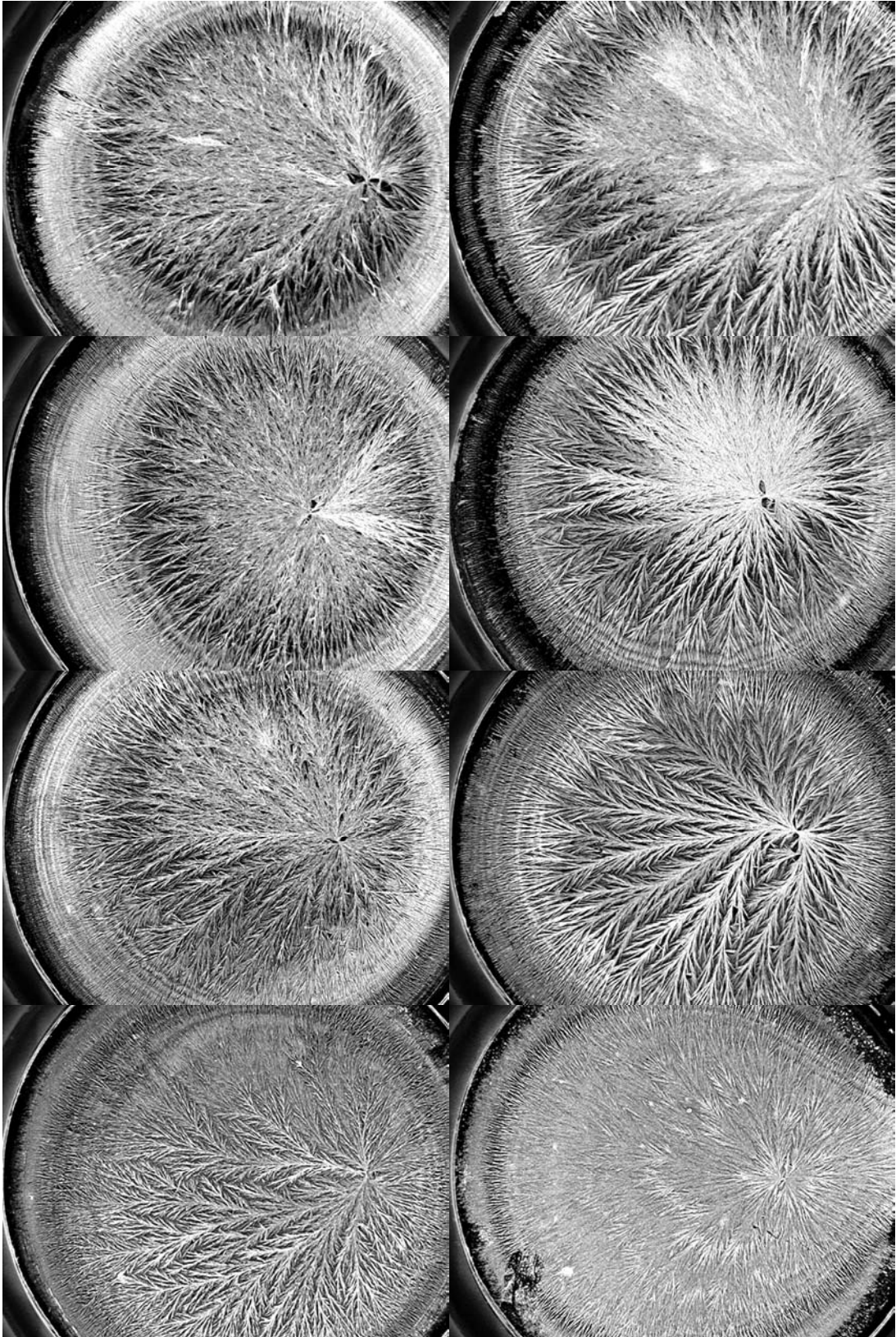


Abbildung 14a: Bilder von einer Möhrenprobe mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Probe und CuCl_2 pro Platte (s. Tabelle 1, Spalte 20, 50).

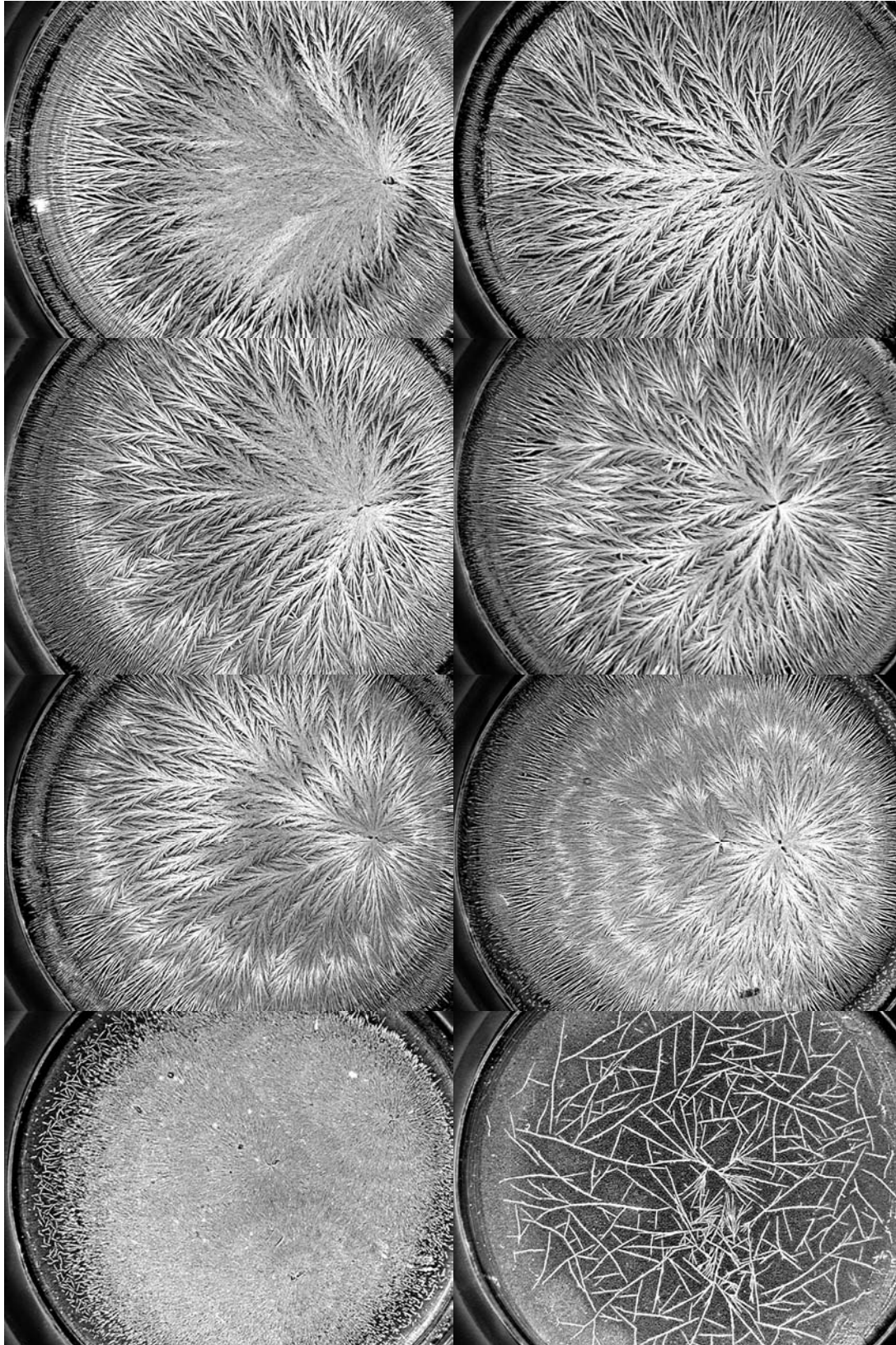


Abbildung 14b: Bilder von einer Möhrensprobe mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Probe und CuCl_2 pro Platte (s. Tab. 1 Spalte 100, 150).

7.3.2 Untersuchungen zum Einsatz eines Kammerstandards

Für die Validierung des Verfahrens müssen alle Schritte des Laborprozesses incl. Kristallisation und Scannen standardisiert werden, damit ein Versuch, der mit diesen standardisierten Schritten durchgeführt wird, reproduziert werden kann. Da es einen absoluten Standard bzw. ein Standard-Referenzmaterial für die Methode bisher nicht gab, musste ein Standard entwickelt werden, der es erlaubt, die Ergebnisse der Methode

1. in verschiedenen Kammern,
2. an verschiedenen Tagen,
3. von verschiedenen Personen und
4. an verschiedenen Orten

zu vergleichen. Darüber hinaus sollte der Standard in der Lage sein, den Erfolg eines Transfers des Systems zu einem anderen Labor mit einer Laboreignungsprüfung abschließend zu beurteilen.

Ein weiteres Ziel zur Entwicklung des Standards war es, langfristig eine Prozess-Kontrollkarte für die Methode einzuführen.

Die Methode erlaubt es nicht, der Probenlösung einen internen Standard beizugeben; daher musste der Standard im Laborprozess eingeführt werden. Es gab dafür zwei Möglichkeiten: Erstens einen synthetischen Stoff (z.B. Polyvinylpyrrolidon/PVP) als Standardkammerlösung zu verwenden oder haltbare Proben immer wieder zu verwenden, die dann aber einen Teil der Laborprozesse (z.B. Extraktion) parallel zur Probe durchlaufen und daher keine reinen Kammerstandards mehr sind. In Vorversuchen wurden verschiedene chemische Substanzen (Glykogen, Lysozym und PVP) zur Eignung als Kammerstandard getestet. Von allen drei Substanzen konnten einzentrigte Bilder mit zum Rand der Platte reichenden Kristallnadeln erzeugt werden. Dies war bereits in früheren Untersuchungen gezeigt worden (s. Kap. 4.3). Dabei erwies sich PVP als von den verschiedenen Substanzen am besten geeignet, da die PVP-Bilder ein mit Weizen- und Möhrenproben noch eher vergleichbares Muster zeigten, auch wenn die Unterschiede zwischen den Bildern bereits auf den ersten Blick deutlich sind: Abbildung 15 zeigt ein Möhren, und ein PVP-Bild im Vergleich.

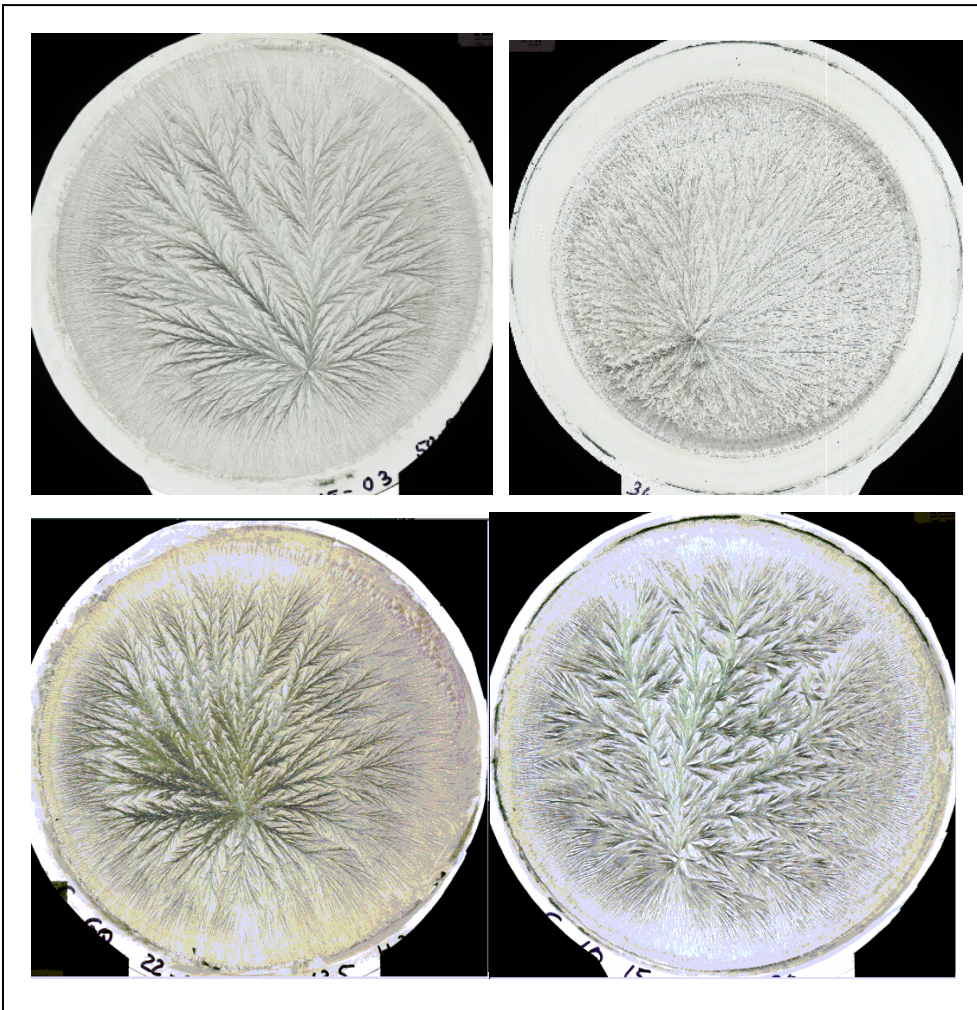


Abbildung 15: Ein Möhren- (oben links), ein PVP- (oben rechts), ein Apfel- (unten links) und ein Weizenkristallisationsbild (unten rechts).

PVP-Bilder hatten aber eine kürzere Verdampfungszeit als frische Möhren- und Weizenproben. Deshalb wurde zusätzlich je eine gefriergetrocknete Möhren- und Weizenprobe getestet. Die Tests wurden so ausgeführt, dass neben einer Matrix verschiedener Mischungsverhältnisse (s. u.) die Verdampfungszeiten und die Kristallisationsdauer der Bilder mit denen von frischen Proben verglichen wurden. Als Ergebnis wurde gefriergetrocknetes Weizenschrot als Methodenstandard gewählt, weil dieses Material:

1. stabil über einen längeren Zeitraum (Monate) ist,
2. eine mit frischen Weizen- und Möhrenproben vergleichbare Verdampfungszeit und Kristallisationsdauer hat,
3. ein mit frischen Weizenproben vergleichbares Muster (Textur, Struktur) hat und
4. eine mit frischen Proben vergleichbare Streuung zeigt.

Gefriergetrocknete Möhrenproben wiesen ein Muster auf, das den Behandlungsprozess zeigte und damit nicht mehr vergleichbar war (s. dazu auch Kapitel 10.2.5.2).

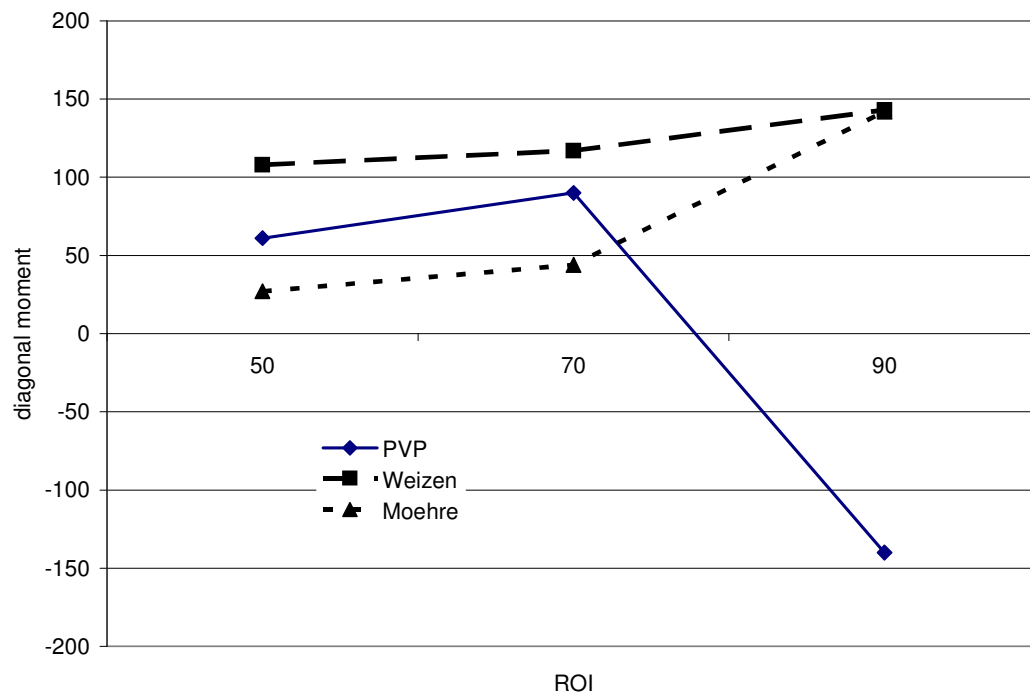


Abbildung 16: ROI-Verlauf von *diagonal moment* für eine gefriergetrocknete Weizen- und Möhrenprobe und PVP (jeweils mehr als 20 Bilder pro Probenart in zwei Kammern parallel).

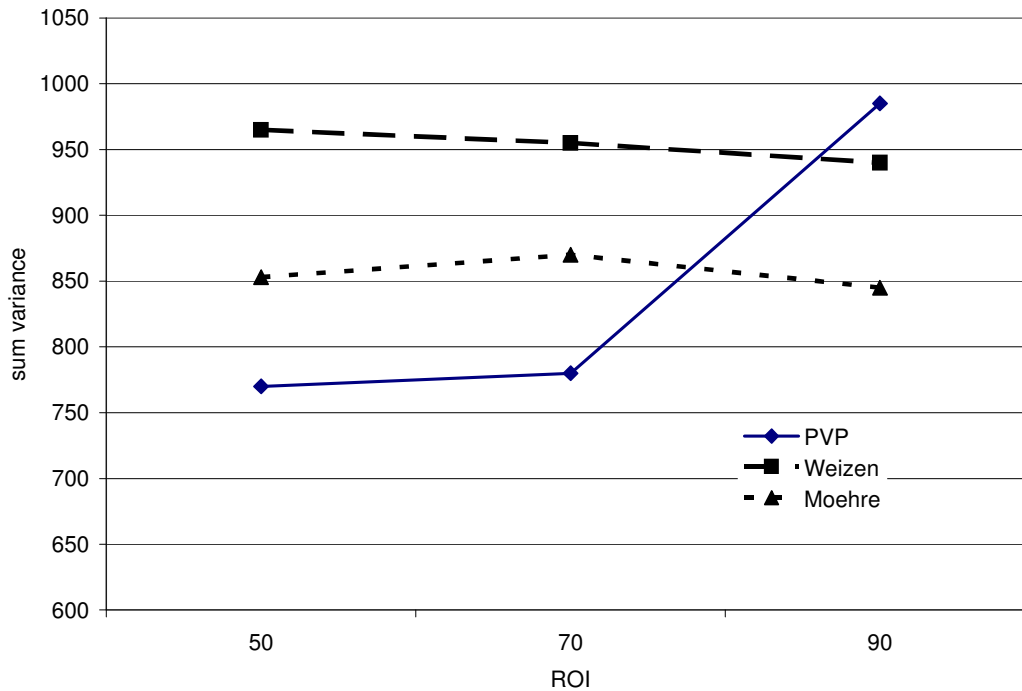


Abbildung 17: ROI-Verlauf von *sum variance* für eine gefriergetrocknete Weizen- und Möhrenprobe und PVP (jeweils mehr als 20 Bilder pro Probenart in zwei Kammern parallel).

Mit allen drei Variablen lassen sich die drei Proben unterscheiden, wobei der Unterschied vom gewählten ROI abhängig ist. Gerade diese ROI-Abhängigkeit zeigt die unterschiedliche Aussage der verschiedenen Variablen: *Diagonal moment* zeigt für alle drei Proben eine Abhängigkeit vom ROI. Diese Abhängigkeit ist für Weizen am schwächsten, für PVP-Bilder am stärksten und nimmt zum Rand zu. Bei ROI 90 können Möhren- nicht mehr von Weizenbildern unterschieden werden. Auch für *kappa* zeigen PVP-Bilder diese ROI Abhängigkeit, wohingegen Möhren- und Weizenbilder über die verschiedenen ROIs stabil sind. PVP- und Möhrenbilder lassen sich für ROIs kleiner als 70 % nicht unterscheiden. Diese Unterscheidung ist, bei vergleichbarem ROI-Verlauf, aber für *sum variance* gegeben. Die Abbildungen 16 und 17 machen deutlich, dass sich PVP als Standard aufgrund seiner im Vergleich zu Weizen- und Möhrenproben unterschiedlichen ROI Abhängigkeit nicht eignet. Es wurde daher im Folgenden (seit 2003) ausschliesslich der Weizenstandard verwendet (auch bei allen anderen Proben), da nur durch wiederholte Kristallisation genügend Daten für eine mögliche Kontrollkarte erhalten werden. Der Weizenstandard wurde aus einer Probe von 25 kg geschrotet und

gefriergetrocknet. Die gefriergetrocknete Probe wurde von Hand homogenisiert und in Päckchen (1 L Gefrierbeutel) von 300 g abgepackt und bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für jeden Kammerdurchgang wird ein Beutel einen Tag vorher im Labor auf Raumtemperatur gebracht und das Schrot, gemäß der Prozedur für Weizenproben, behandelt. Jede Kammerfüllung enthält sechs bis acht Platten dieser Standardlösung. Wenn die Kammern längere Zeit nicht genutzt werden (z. B. Urlaubszeit drei Wochen), wird zuerst eine Kammer ausschließlich mit Standard gefahren. Bei einem Wechsel zu neuem Standardmaterial wird eine Kammer mit je 50 % altem und neuem Standard befüllt. Das Ergebnis der Standardmessungen ist für eine Kammer (C) über einen Zeitraum von zwei Jahren in Abbildung 18 dargestellt (Variable *diagonal moment*). Auf der y-Achse ist die Variable bei einem ROI von 90, auf der x-Achse die Nummer des Kammerdurchgangs. Die Fehlerbalken sind die Standardabweichungen der sieben Bilder einer Kammer. Zusätzlich sind der Mittelwert (durchgezogene Linie) und die einfache Standardabweichung für alle Kammern (gestrichelte Linie) eingezeichnet. Man kann sowohl Trends über 20-40 Kammerdurchgänge, als auch einzelne Ausreißer identifizieren.

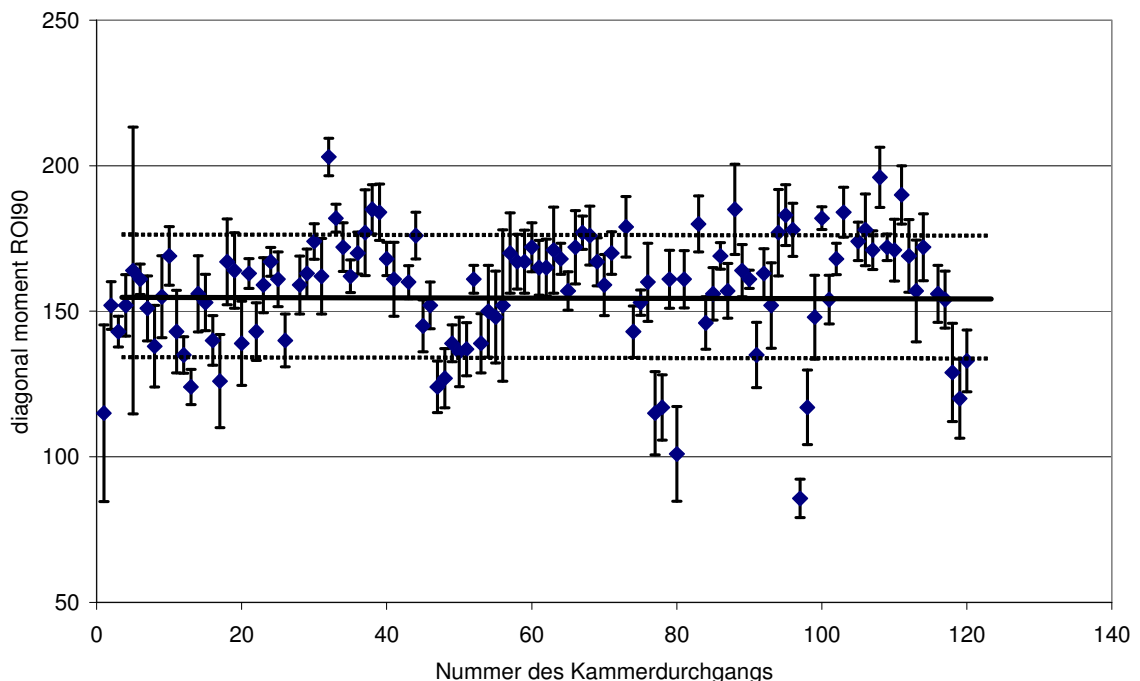


Abbildung 18: Variable *diagonal moment* bei ROI 90 für Standardbilder gegen aufeinander folgende Kammerdurchgänge (Zeit) für Kammer C

Wird *diagonal moment* gegen die beiden anderen ausgewählten Variablen aufgetragen, so ergibt sich das Bestimmtheitsmaß für *diagonal moment* gegen *kappa* zu $r^2 = 0,07$; *diagonal moment* gegen *sum variance*: $r^2 = 0,1$ und *kappa* gegen *sum variance*: $r^2 = 0,77$. Damit können sowohl *diagonal moment* als auch *kappa* oder *sum variance* für eine Kontrollkarte verwendet werden, da beide Gruppen verschiedene Aspekte der Bilder zeigen.

Fazit:

1. Beim Testen verschiedener Proben als Standardmaterial konnten PVP-, Weizen- und Möhrenproben von allen drei Variablen unterschieden werden, wobei das Unterscheidungsvermögen abhängig vom ROI ist.
2. Der Bildausschnitt oder Region Of Interest (ROI) ist damit eine Verfahrenskenngröße, die es bei der Validierung zu untersuchen gilt.
3. Es wurde ein Standard für die Methode entwickelt und über einen Zeitraum von zwei Jahren für die Vergleichbarkeit verschiedener Kammerdurchgänge eingesetzt.
4. Für das Standardmaterial ist die Variable *diagonal moment* unabhängig von *kappa* und *sum variance*. Letztere beiden Variablen bilden eine Gruppe.

7.3.3 Einflussfaktoren Feuchte, Verdampfung und Kristallisation

Bereits Pfeiffer berichtete, dass die Klimabedingungen während der Verdampfung und Kristallisation gemessen und kontrolliert werden müssen, da sie die Bilder beeinflussen (Pfeiffer 1935). Durch eine Kontrolle der Kammerfeuchte verschwanden die „Sommer“- und „Winterbilder“: Während die Außenfeuchte im Sommer hoch ist, ist sie im Winter niedrig; ohne Kontrolle hatten die klimatischen Bedingungen draußen die Bildentstehung in der Kammer saisonal abhängig beeinflusst. Die meisten Autoren beziehen sich seitdem auf diese Untersuchungen. Erst Ballivet et al. (1999) und dann Andersen (2001) führten methodische Untersuchung zum Einfluss der Feuchte auf die Bilder durch. Sie zeigten, dass die Feuchte die wichtigste Einflussgröße auf die Bildentstehung ist. Daher wird in den hier beschriebenen Kammern die Feuchte an mehreren Stellen kontinuierlich gemessen und in der Aussenkammer kontrolliert (auf $\pm 0,5$ % rF). Für die Charakterisierung der

Kammern wurden zunächst sechs Sensoren an verschiedenen Plätzen in der Kammer verteilt. Anschließend wurde je ein Sensor fest über je einen Ring montiert (1+2), ein Sensor an der Innenwand (3) und ein Sensor an der Aussenwand (4) der Kristallisationskammer (s. Abbildung 4). Wenn im Folgenden von Daten zur Aussenkammer gesprochen werden, so beziehen sie sich auf Messungen mit dem Sensor Nr. 4, die Daten zum Ring beziehen sich auf einen der beiden Sensoren über den Ringen, wobei dafür nur die Ergebnisse eines Sensors verwendet wurden, da beide Ringe gleiche Bedingungen haben.

Nach Inbetriebnahme der Kammern zu Beginn 2002 wurde im Frühjahr d. J. die Regelung der Feuchte in der Aussenkammer optimiert. Abbildung 19 zeigt die Feuchte in der Aussenkammer (blau) vor und Abbildung 20 die Feuchte nach Verbesserung der Kontrolle. Damit arbeiten die verwendeten Kammern unabhängig von Temperatur- und Feuchteschwankungen des Außenklimas.

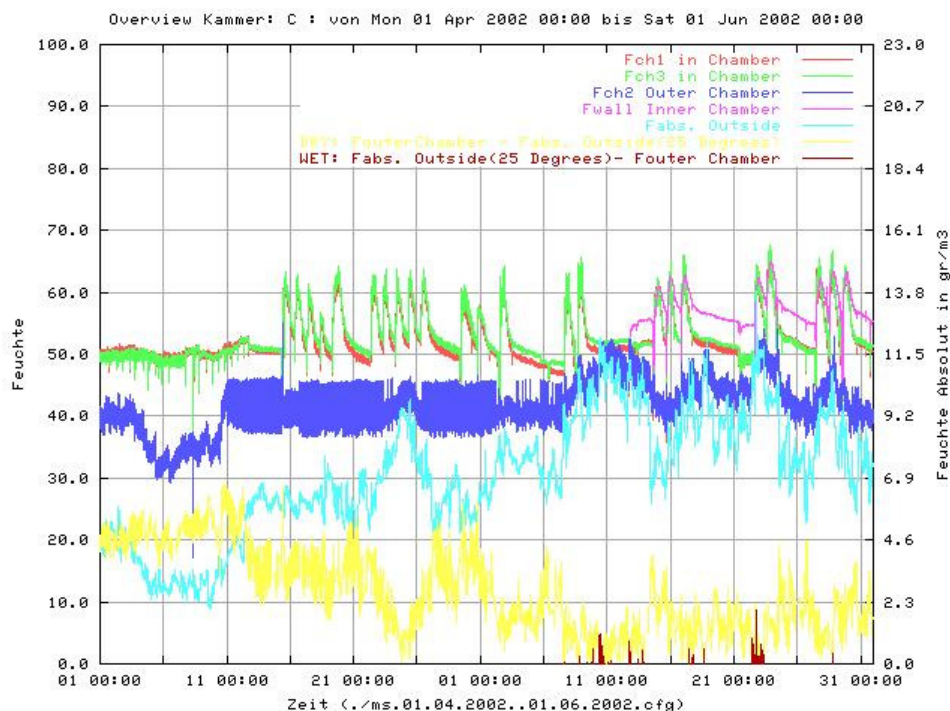


Abbildung 19: Relative Feuchte an den verschiedenen Positionen der Kammer während eines Zeitraumes von zwei Monaten vor der Optimierung der Regelung (rot/grün: Ring, magenta: Innenwand, blau: Aussenkammer, hellblau: Feuchte ausserhalb des Gebäudes bezogen auf 26 °C)

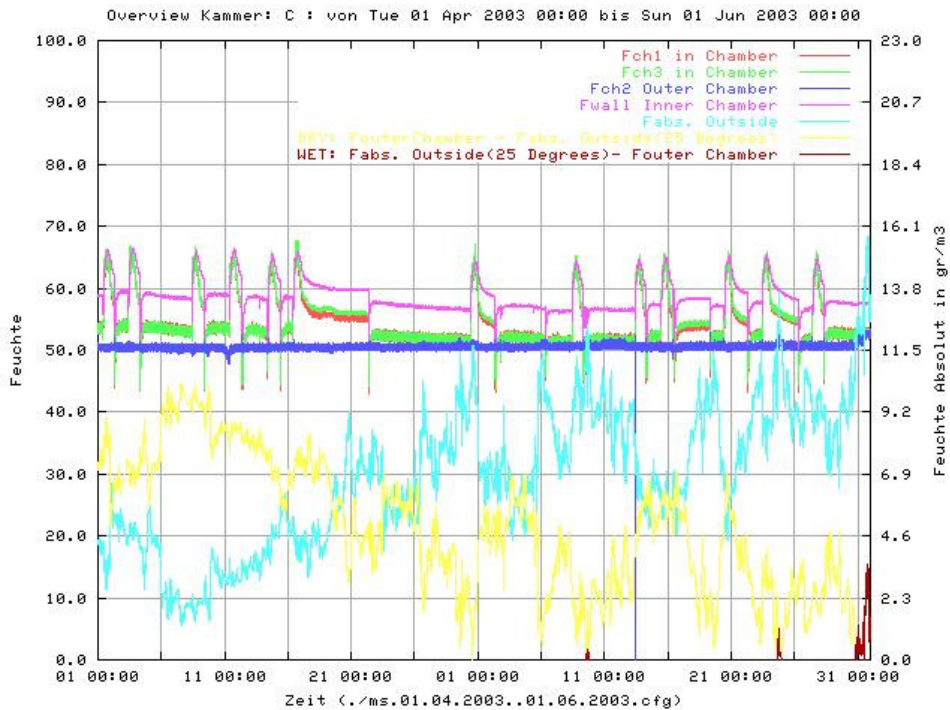


Abbildung 20: Relative Feuchte an den verschiedenen Positionen der Kammer während eines Zeitraumes von zwei Monaten nach der Optimierung der Regelung (rot/grün: Ring, magenta: Innenwand, blau: Aussenkammer, hellblau: Feuchte ausserhalb des Gebäudes bezogen auf 26 °C)

Die verbleibenden zufälligen Schwankungen der Feuchte auf dem Ring wurden für beide Kammern bestimmt, indem die absolute Feuchte auf dem Ring vor und während (als Maximalwert) der Verdampfung gegen die Nummern der aufeinander folgenden Kammerdurchgänge aufgetragen wurde. Dies ist in der Abbildung 21 für einen Zeitraum von zwei Jahren für Kammer C gezeigt, wobei die Nummern der Kammerdurchgänge denen in Abbildung 18 entsprechen.

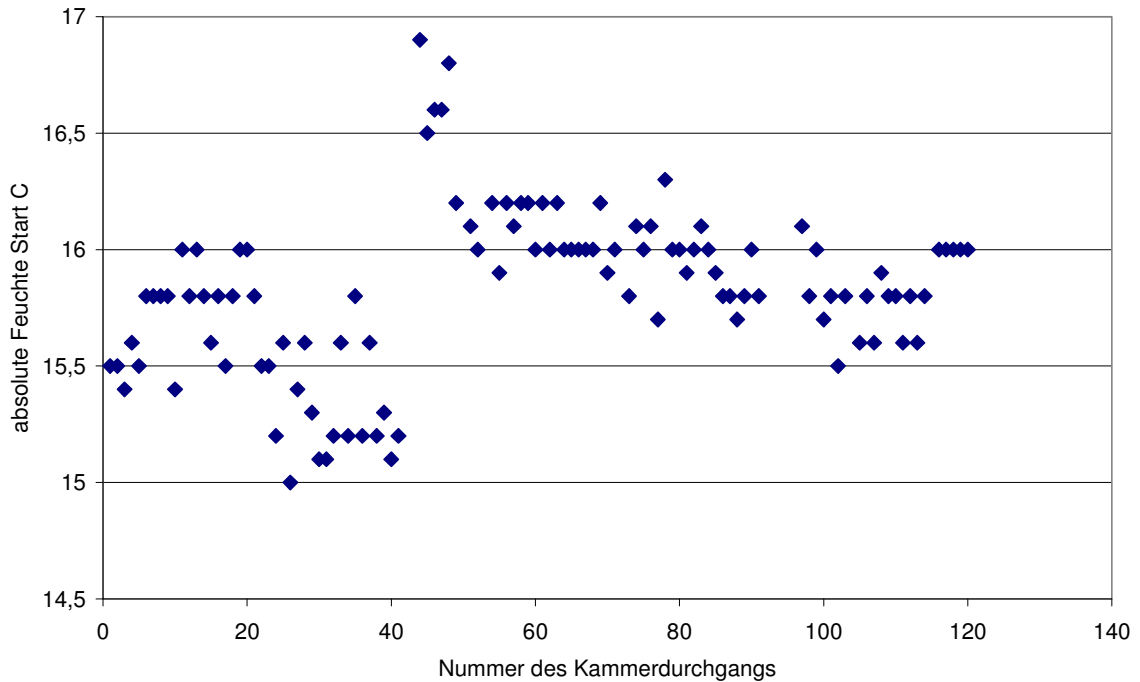


Abbildung 21: Absolute Feuchte in g/m^3 vor einer Kristallisation gegen aufeinander folgende Kammerdurchgänge (Zeit) für Kammer C.

Die zufälligen Schwankungen bewegen sich in einem Bereich von 1 g/m^3 , wobei $0,5 \text{ g/m}^3$ die Ablesegenauigkeit beim Notieren der Zahlen vom Bildschirm ist. Die starken Abweichungen bei Nr. 35-39 sind auf eine Neujustierung der Feuchte in der Aussenkammer zurückzuführen. Die Auftragung der Feuchte zu Beginn einer Kristallisation mit dem jeweiligen Maximalwert während einer Kristallisation ergab einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Feuchtwerten ($r^2 = 0,62$); je höher die Feuchte auf dem Ring beim Start, desto höher ist der Wert für die Maximalfeuchte.

Nach den ersten Laborvergleichsversuchen der drei Institute in Deutschland, Dänemark und Holland zeigte sich, dass die Streuung der Bilder (hier PVP) von einem Standort anhand morphologischer Kriterien der visuellen Bildauswertung größer war als zwischen den verschiedenen Laboratorien. Diese konnten nicht auf die Unterschiede in der Startfeuchte auf dem Ring zurückgeführt werden, sondern mussten von Faktoren beeinflusst werden, die bei gleich eingestellter Startfeuchte eine zusätzliche Streuung der Bilder innerhalb eines Kammerdurchganges verursachen. Daher wurde der Verdampfungs- und Kristallisationsvorgang jeweils eines Kammerdurchganges für jeden der 43

Plätze in einer Kammer verfolgt. Es wurden jeweils für jeden Platz folgende Zeitpunkte notiert:

1. Der Zeitpunkt, wann der erste Kristallisationskeim sichtbar wurde (bezogen auf den Zeitpunkt des Pipettierens der Lösung) und
2. Der Zeitpunkt, an dem 90% der Platte kristallisiert war (bezogen auf den Zeitpunkt des Pipettierens der Lösung).

Diese Daten wurden anschließend in die computergestützte Labordokumentation eingegeben und für jeweils eine Kammer graphisch dargestellt. Damit konnte eine zusätzliche Größe berechnet werden:

3. Der Zeitpunkt, an dem 50% der Platten mit der Kristallisation begonnen hatten.

Dieser berechnete Zeitpunkt ist für den Vergleich verschiedener Kammern und Standorte notwendig (s. u.).

Nachdem die Bestimmung der Zeitpunkte zunächst einige Wochen visuell erfolgte, wurde an der Decke beider Kammern eine Kamera montiert, die automatisch alle 20 min eine Aufnahme beider Ringe speicherte. Anhand dieser Aufnahmen werden seitdem die beiden Zeitpunkte zu 1 und 2 erfasst und zur Berechnung von 3 in die Labordokumentation eingegeben. D.h. es werden für jeden Kammerdurchgang bzw. jede Platte innerhalb eines Kammerdurchganges die Zeitpunkte 1, 2 und 3 erfasst und dokumentiert. Der Zeitpunkt 1 wird von uns als Verdampfungszeit bezeichnet, der Zeitpunkt 2 als Kristallisationsdauer und der Zeitpunkt 3 als mittlere Verdampfungszeit. Die Verdampfungszeit der 43 Platten einer Kammer folgt einer zufälligen, statistischen Verteilung. Wir konnten zeigen (und das wird ebenfalls für jeden Kammerdurchgang mit der computergestützten Labordokumentation automatisch erfasst), dass keiner der 43 Plätze bevorzugt wird, ebenso wenig einer der beiden Ringe. Für den in Abbildung 21 gezeigten Verlauf der Startfeuchte in einem Zeitraum von zwei Jahren wurden die jeweiligen Startfeuchten mit den Daten für die mittlere Verdampfungszeit korreliert. Je höher die Startfeuchte, desto länger dauert es, bis 50 % der Platten mit der Kristallisation begonnen haben ($r^2 = 0,52$). Abbildung 22 zeigt beispielhaft die statistische Verteilung der Verdampfungszeiten für gleiche Proben bei 49 % (oben) und 54 % (unten) rF auf dem Ring. Auf der y2-Achse ist die kumulative Anzahl der bereits mit der Kristallisation begonnen Platten aufgetragen, auf der

x-Achse die Zeit nach dem Pipettieren der Lösung. In dieser Abbildung ist neben der Verteilung der Verdampfungszeiten die Abhängigkeit der Kristallisationsdauer gegen die Zeit nach dem Pipettieren der Lösungen für eine Kammer aufgetragen (Punkte auf der y1 Achse). Hier zeigt sich, dass je später eine Platte mit der Kristallisation beginnt, desto kürzer die Kristallisationsdauer ist. Die visuelle Auswertung vieler Platten von Proben im Projekt BÖL 02OE170/F zeigte, dass es auch Platten geben kann, die diesem Verlauf nicht entsprechen: Trotz längerer Verdampfungszeiten haben sie eine längere Dauer als Platten von benachbarte Plätzen mit gleicher Verdampfungszeit und umgekehrt. Warum es zu diesen Ausreißern kommt, ist bisher unklar.

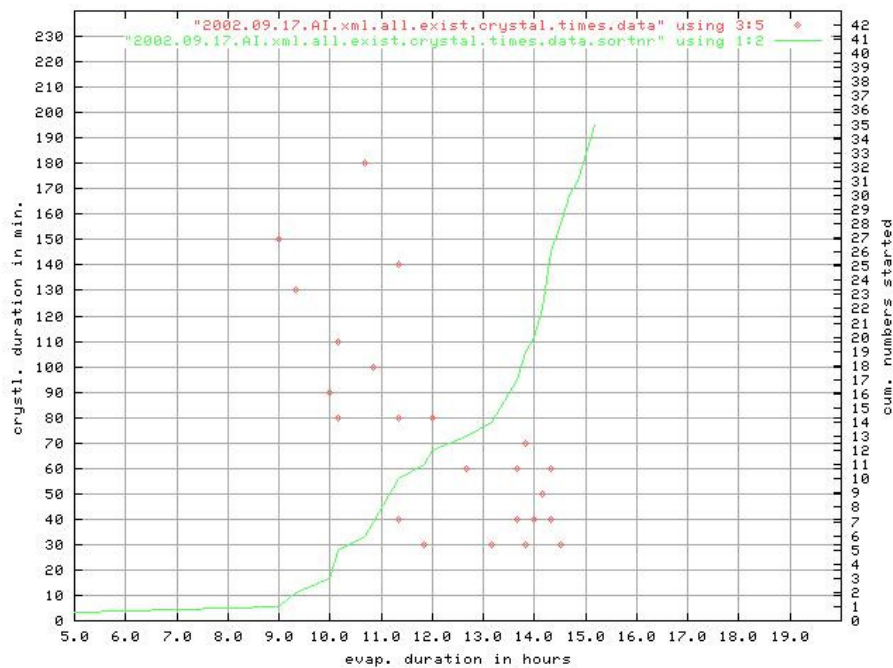
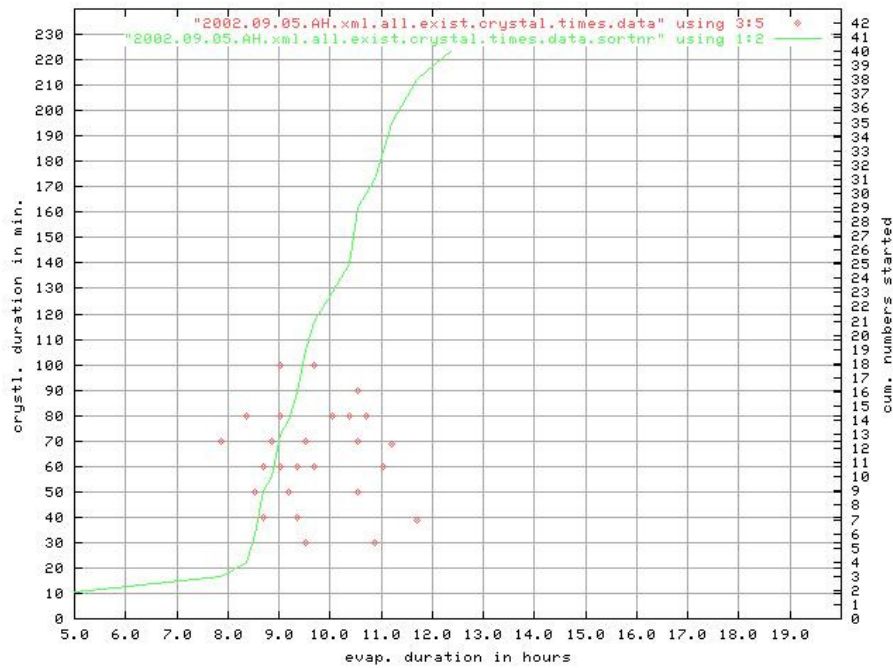


Abbildung 22: Einfluss der Kammerfeuchte auf den Kristallisationsvorgang (y1: Kristallisationsdauer in min, y2: Anzahl der mit der Kristallisation begonnenen Plätze auf beiden Ringen einer Kammer, x: Zeit nach dem Pipettieren in h).

Um den Einfluss der Feuchte auf ein morphologisches Kriterium der visuellen Auswertung (hier Durchmesser der Struktur als „Durchstrahlung“ Kriterium der visuellen Auswertung, s. Anhang) und die Variablen der Texturanalyse zu bestimmen, wurde in einem Versuch eine Kammer an vier verschiedenen Tagen mit einer Mischung von PVP-Lösungen (PVP = AMW 700 kDa, Merck, 1993) und Möhrensäften (ökologische Möhrenproben vom lokalen tegut-Markt) befüllt. Die PVP-Lösungen wurden für vier verschiedene Mischungsverhältnisse angesetzt, wobei sowohl die PVP-Menge also auch die CuCl_2 -Konzentration variiert wurde. Mit jedem Tag wurde die Feuchte auf dem Ring durch Veränderung der Feuchte in der Aussenkammer neu eingestellt. Zwischen den Durchgängen konnte die Kammer durch zwei bis drei Tage auf die neuen Bedingungen adaptieren. Es konnte nicht eindeutig gezeigt werden, ob der Einschwingeffekt (Hysterese) von einer auf die andere Feuchte von der Höhe der zuvor eingestellten Feuchte abhängig ist, dies wird aber durch Beobachtungen vermutet. Da für die Möhrenproben immer wieder neues Material vom Markt genommen werden musste, wurden mit der Texturanalyse nur die PVP-Bilder ausgewertet. Zusätzlich wurden die gescannten Bilder aller Lösungen und Tage am Bildschirm auf den Strukturdurchmesser mit einem Lineal von Hand vermessen.

Abbildung 23 zeigt die Abhängigkeit dieses Strukturdurchmessers von der Verdampfungszeit. Wird die relative Feuchte gegen die mittlere Verdampfungszeit aufgetragen, so ergibt sich $r^2 = 0,97$. Als Ergebnis zeigte sich eine Zunahme des Strukturdurchmessers mit der Zeit (und damit mit der Feuchte). Je länger es dauert, bis der erste Kristallisationskeim entsteht, desto weiter reicht die Struktur des Bildes nach aussen zum Rand der Platte. Dabei ist der Verlauf für PVP- und Möhrenbilder verschieden. PVP- und Möhrenbilder zeigen dabei aber eine verschiedene Abhängigkeit (s. Abbildung 24). In einem Bereich von zwei Stunden um eine mittlere Verdampfungszeit von 13 h verändert sich der Bilddurchmesser sehr stark. Bilder mit einer kürzeren Zeit sind unspezifisch mit einfacher radialer Struktur, Bilder mit längeren Zeiten kristallisieren mit mehreren Zentren und vom Rand; außerdem zeigen diese „späten“ Bilder Substanzdominanz (u.a. „*Substance spirals*“, s. Anhang),

während die frühen Bilder eher als CuCl_2 dominierend bezeichnet werden können (lange, unverzweigte Nadelzüge etc.).

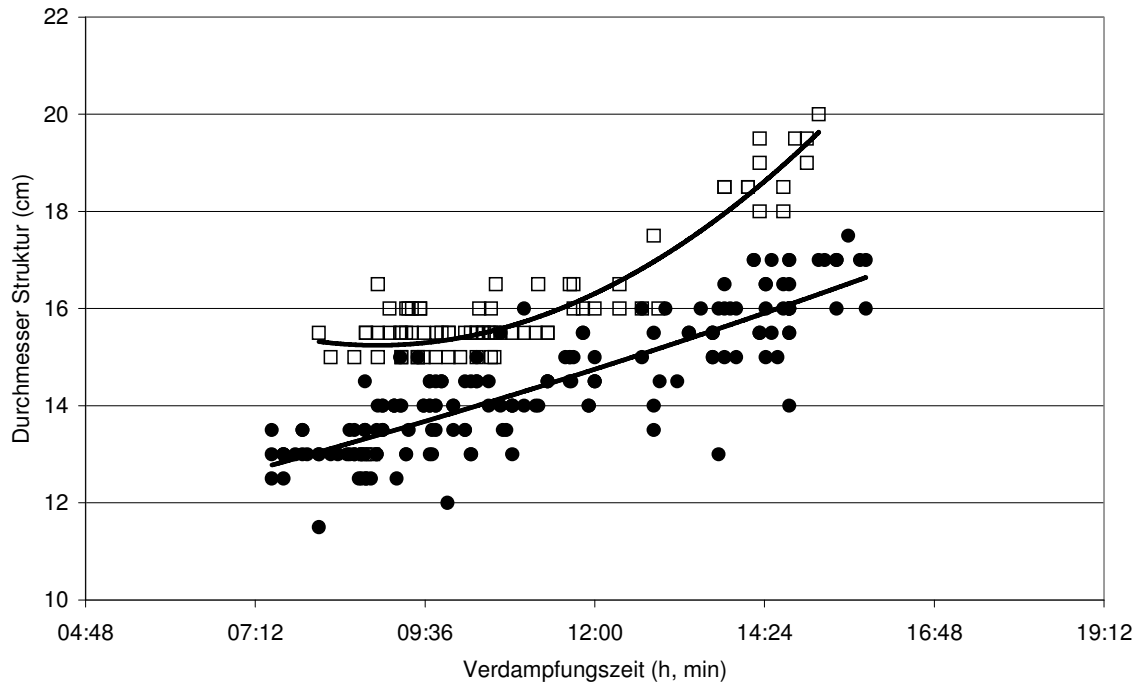


Abbildung 23: Durchmesser Struktur für PVP- (Kreis) und Möhren(Viereck)bilder gegen die Verdampfungszeit.

Die Bilder wurden mit der Texturanalyse ausgewertet. Die Ergebnisse sind für eine Variable in Abbildung 24 dargestellt. *Diagonal moment* nimmt mit zunehmender Feuchte auf dem Ring zu, die Zunahme ist etwa 200 % und hängt vom Mischungsverhältnis ab. Die stärkste Zunahme wird mit dem Mischungsverhältnis 5/40, die geringste Zunahme mit einem Mischungsverhältnis von 4/40 erreicht. Die Zunahme der Variable mit steigender absoluten Feuchte kann auch für ein ROI von 50, nicht mehr aber für ein ROI von 90 beobachtet werden; PVP-Bilder bedecken nur etwa 80 % der Glasplatte. Auch *kappa* und *sum variance* reagieren mit einer Zunahme der Werte mit zunehmender Feuchte auf dem Ring, wobei die Zunahme vom ROI abhängt (ROI 70 mit 30) und dabei ebenso wie bei *diagonal moment* mit zunehmendem ROI schwächer wird. Damit kann gezeigt werden, dass die absolute Feuchte auf dem Ring einen Einfluss auf die Variablen der Texturanalyse bei PVP-Bildern hat.

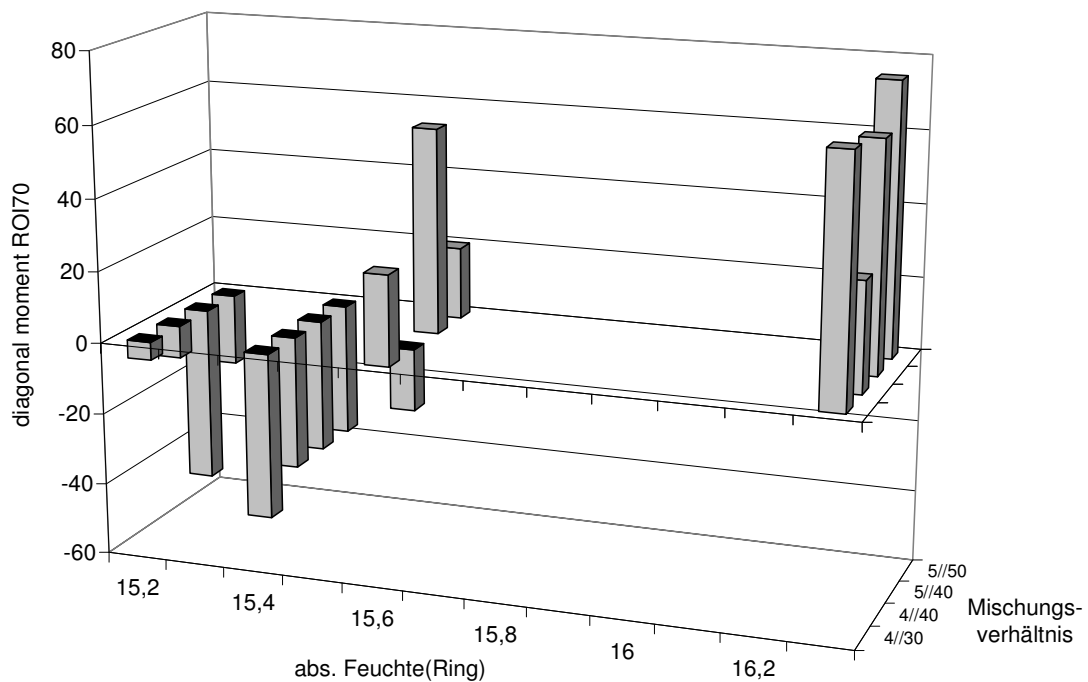


Abbildung 24: Variable *diagonal moment* bei ROI 70 für vier verschiedene Mischungsverhältnisse und vier verschiedene Feuchten auf dem Ring

Um zu prüfen, ob diese Abhängigkeit auch für die Bilder von Pflanzenproben gilt, wurden die in Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse der Texturanalyse nicht gegen den Kammerdurchgang, sondern gegen die Feuchte aufgetragen. Mit zunehmender Feuchte nimmt der Wert für *diagonal moment* ab. Es konnte aber kein Zusammenhang dieser beiden Größen gefunden werden ($r^2 = 0,07$). Dies gilt auch für andere ROI und andere Variablen. Im Gegensatz zu strukturorientierten Kriterien der visuellen Auswertung ist damit die Feuchte bisher kein Kriterium, was sich direkt mit den Ergebnissen der Texturanalyse verbinden lässt. Zusätzlich wurde berechnet, ob sich eine Abhängigkeit der Variable von der Zeit zeigen lässt. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 dargestellt.

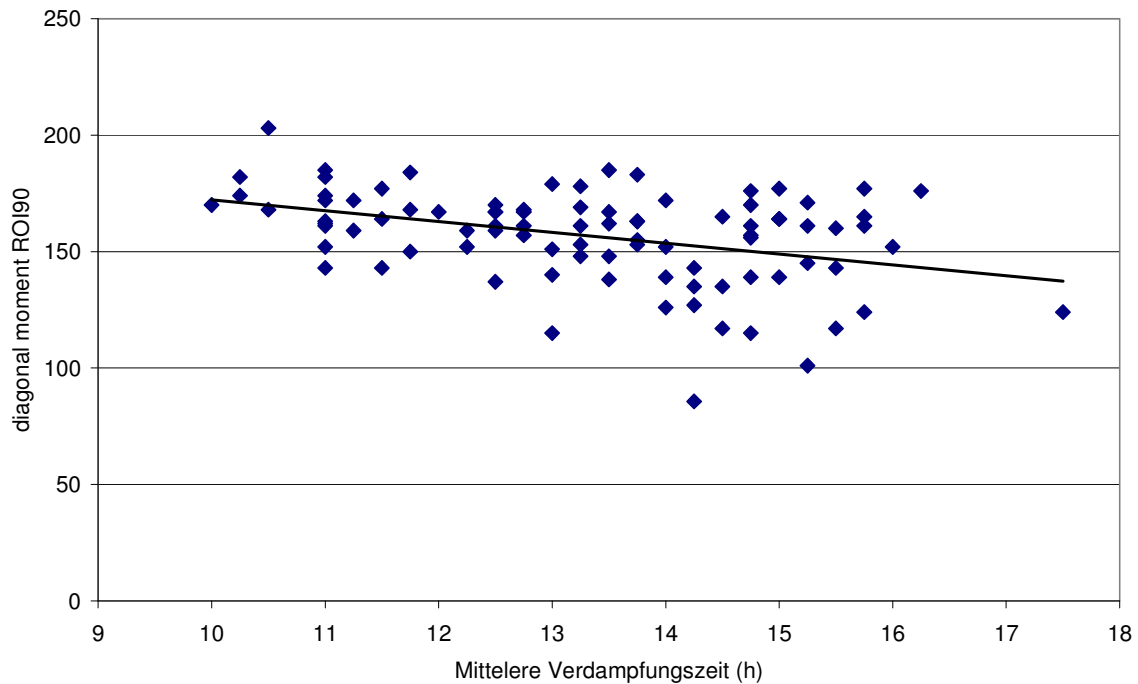


Abbildung 25: Variable *diagonal moment* bei ROI 90 für Standardbilder gegen die mittlere Verdampfungszeit.

Mit zunehmender Verdampfungszeit (und damit zunehmender Feuchte) nimmt der Wert für *diagonal moment* auch hier ab. Der Zusammenhang ist allerdings gering ($r^2 = 0,15$). Die Abhängigkeit der Variablen von der Zeit nimmt mit kleiner werdendem ROI ab. Die Variablen *kappa* und *sum variance* zeigen ein ähnliches Verhalten. Eine Korrelation der Variablen mit der Verdampfungszeit und der Kristallisationsdauer wurde für jedes einzelne Bild der Proben im Projekt 02OE170/F vorgenommen. Die Abhängigkeit der Variablen von der Verdampfungszeit wird mit Zunahme der Korrelation von Verdampfungszeit und Kristallisationsdauer größer. Für die Erzeugerproben Möhre (s. Kapitel 10.2.2) wurde eine hohe positive Korrelation der Variable *diagonal moment* und eine hohe negative Korrelation der Variable *kappa* mit der Verdampfungszeit gefunden. Bei den Erzeugerproben Weizen war die Abhängigkeit für *kappa* invers, *diagonal moment* zeigte dagegen hier keine Abhängigkeit. Für die Erzeugerproben Apfel (s. Kapitel 10.3.2) konnte keine signifikante Korrelation gefunden werden. Die Zeiten konnten daher noch nicht in die statistische Modellbildung bei der Texturanalyse eingerechnet werden.

Fazit:

1. Die Feuchte auf dem Ring innerhalb der Kristallisationskammer kann durch die Regelung der Feuchte in der Aussenkammer kontrolliert werden, so dass klimatisch bedingte Schwankungen keinen Einfluss haben.
2. Durch Regelung der Feuchte in der Aussenkammer kann die Feuchte auf dem Ring vor Beginn der Verdampfung eingestellt werden, wobei die Hysterese zu beachten ist.
3. Es verbleibt eine Reststreuung der Feuchte auf dem Ring über verschiedene Kammerdurchgänge, die durch kontinuierliche Messung der Feuchte an verschiedenen Stellen der Klimakammer dokumentiert wird.
4. Die Feuchte zu Beginn eines Kammerdurchgangs beeinflusst den Maximalwert der Feuchte auf dem Ring während der Verdampfung und Kristallisation. Über die Einstellung der Feuchte in der Aussenkammer kann damit auch der Maximalwert der Feuchte während der Verdampfung beeinflusst werden.
5. Die Variablen der Texturanalyse bilden für den Weizenstandard die durch unterschiedliche Feuchte hervorgerufene Variation der Kammerbedingungen über einen Zeitraum von zwei Jahren nicht ab. Ein direkter Zusammenhang lässt sich somit nicht herstellen. PVP-Proben mit verschiedenen Mischungsverhältnissen zeigen aber eine starke Abhängigkeit der Variablen von der Feuchte auf dem Ring, so dass der Einfluss der Feuchte auf die Variablen der Texturanalyse offenbar von der Probenart abhängt. Die bisher untersuchten Proben Apfel, Möhre und Weizen scheinen aber eher robust gegen Änderungen der Feuchte zu sein.
6. Die visuelle Auswertung anhand morphologischer Kriterien (hier z.B. Strukturdurchmesser) wird stark von der Feuchte beeinflusst. Hierfür ist eine Regelung der Feuchte unerlässlich.
7. Neben dem Einflussfaktor Feuchte kommt es zu zusätzlichen Streuungen der Bilder (sowohl Struktur- als auch Texturauswertung) innerhalb einer Kammer. Während für die Variablen der Texturanalyse keine Einflussgröße für diese Streuung gefunden werden konnte, ist

die Strukturauswertung (visuell) abhängig von der Art und Weise der Verdampfung und Kristallisation. Bilder innerhalb eines Kammerdurchgangs können nur verglichen werden, wenn die Verdampfungszeit und die Kristallisationsdauer bekannt sind.

8. Es gibt einen Zusammenhang zwischen eingestellter Feuchte auf dem Ring vor einem Kammerdurchgang und der mittleren Verdampfungszeit über alle 43 Platten. Je höher die Feuchte, desto länger braucht es bis 50% der Platten mit der Kristallisation beginnen. Je höher die Verdampfungszeit, desto kürzer die Kristallisationsdauer.

7.3.4 Reproduzierbarkeit von in der Literatur beschriebenen Ergebnissen

Mit dem in den vorherigen Kapiteln beschriebenen und charakterisierten Verfahren wurden bereits in der Literatur beschriebene Versuche wiederholt, um zu testen, ob sich die Ergebnisse reproduzieren ließen. Andersen et al. dokumentierten 1998 eine Vorstufe der für die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Kammer (allerdings nur mit einem Ring), die sie mit Untersuchungen an PVP-Proben mit verschiedenem Polymerisationsgrad charakterisierten. Sie konnten zeigen, dass sich die Bilder von PVP-Proben mit verschiedenem Polymerisationsgrad mittels visueller Bildauswertung unterscheiden lassen. Diese Bilder wurden von Andersen et al. (1999) auch mit der computergestützten Texturanalyse ausgewertet. Dabei wurde auch die Abhängigkeit der Variablen vom Bildausschnitt (ROI) berücksichtigt. Für diese Untersuchung wurden u.a. auch die Variablen *kappa* und *sum variance* verwendet. Andersen et al. (1999) konnten zeigen, dass *kappa* mit zunehmendem Polymerisationsgrad steigt. Mit Hilfe einer schrittweisen Diskriminanzanalyse wurde beschrieben, wie sich der Einfluss verschiedener Arten und Größen von Bildausschnitten (Circle, Segment bzw. ROI 50, 70, 90) auf das Ergebnis auswirken. Zirkuläre Bildausschnitte lieferten höhere Klassifikationsraten in einer multivariaten Auswertung der Daten als segmentierte; Variablen sekundärer höhere als primärer Ordnung, und nur Bildauflösungen auf den Skalen (scales) 1 und 2 konnten befriedigende Ergebnisse zeigen.

Die vorliegenden Ergebnisse wurden mit PVP-Proben von zwei verschiedenen Polymerisationsgraden durchgeführt. Es wurde die von Andersen (2001)

beschriebene Methode verwendet, wobei die Klimakammer mittlerweile auf zwei Ringe erweitert wurde.

PVP wurde in ultrafiltriertem Wasser gelöst und mit CuCl_2 -Lösung vermischt (Kammerlösung), anschließend mit einem Mischungsverhältnis von 0,4/30 mit einer Bildwiederholung von 20 Bildern pro Kammer in zwei Kammern parallel kristallisiert. Für die Auswertung mit Texturanalyse wurden beide Kammern zusammengenommen.

Die Ergebnisse der Texturanalyse sind für die Variable *kappa* in Abbildung 26 dargestellt. Die Werte sind relativ mit den Ergebnissen für ROI 80 von Andersen et al. (1999) zu vergleichen: Bilder von PVP-Proben mit einem Polymerisationsgrad von 700 kDa haben höhere *kappa*-Werte als Bilder mit einem niedrigeren Polymerisationsgrad (40 kDa). In den Abbildungen 27 und 28 sind zusätzlich die Ergebnisse der beiden anderen ausgewählten Variablen der Texturanalyse dargestellt.

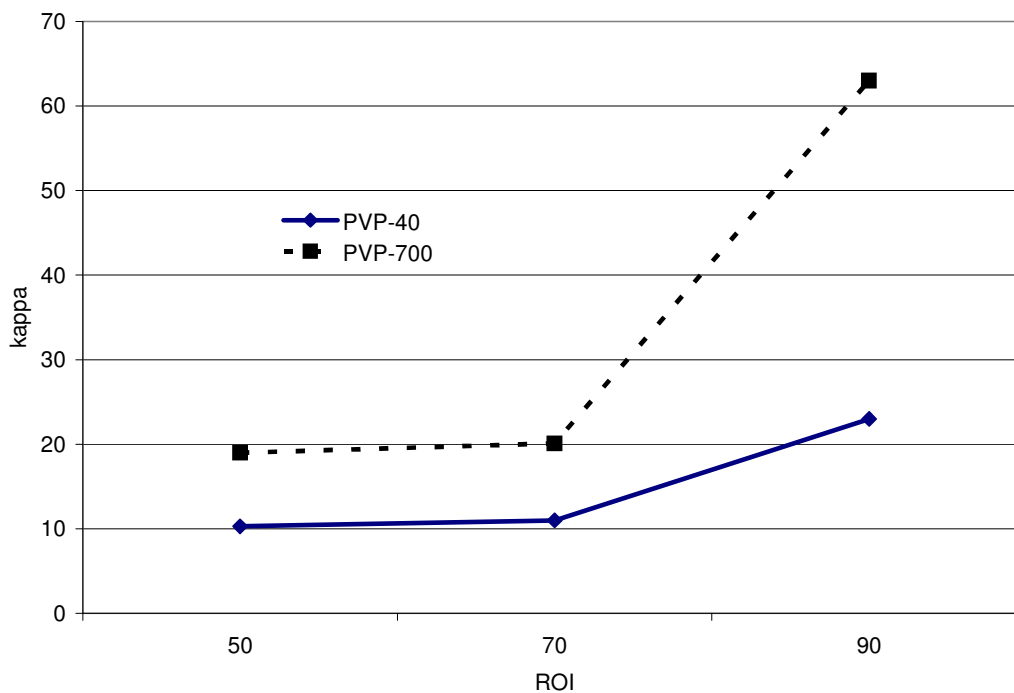


Abbildung 26: Variable *kappa* gegen den Bildausschnitt (ROI) für PVP-Proben mit verschiedenem Polymerisationsgrad.

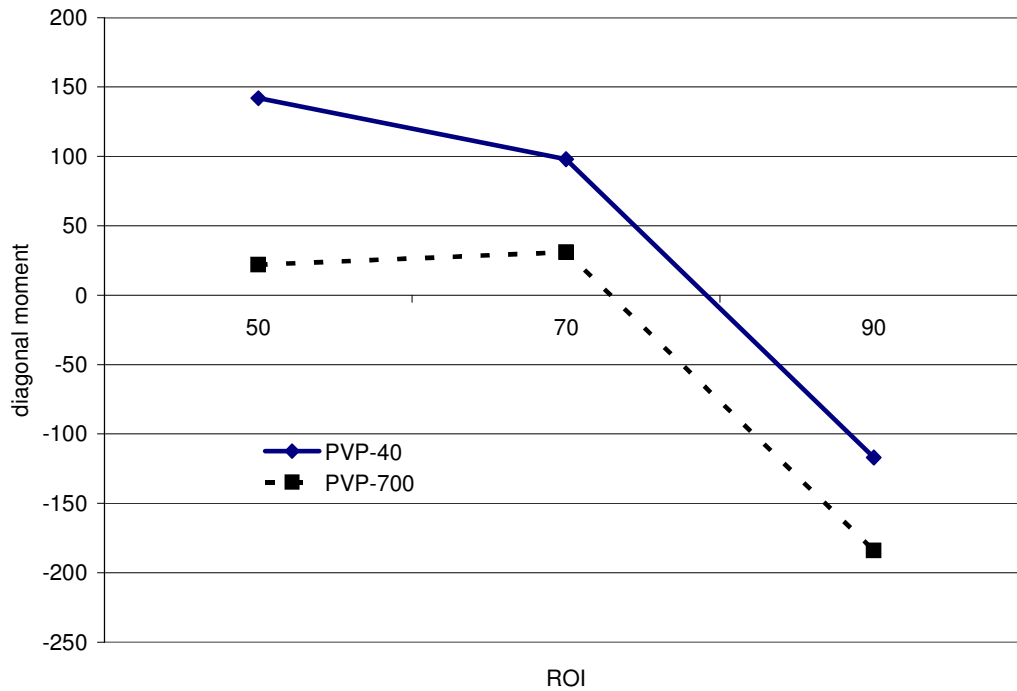


Abbildung 27: Variable *diagonal moment* gegen den Bildausschnitt (ROI) für PVP-Proben mit verschiedenem Polymerisationsgrad.

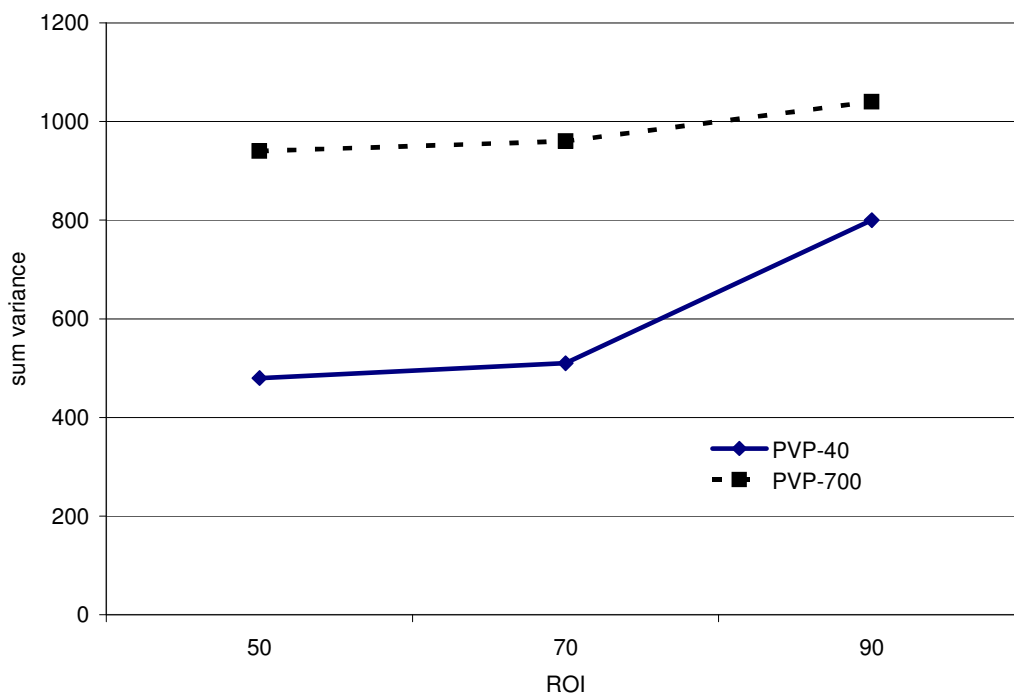


Abbildung 28: Variable *sum variance* gegen den Bildausschnitt (ROI) für PVP-Proben mit verschiedenem Polymerisationsgrad.

Der Unterschied zwischen den beiden Polymerisationsgraden ist bei *diagonal moment* invers zu *kappa* und *sum variance*. Alle drei Variablen unterscheiden

sich durch die Abhängigkeit vom Bildausschnitt, die stärkste Abhängigkeit kann für *diagonal moment* beobachtet werden. Während bei *kappa* PVP (700 kDa) eine stärkere Abhängigkeit vom ROI zeigt, ist dies bei *sum variance* die andere Probe. Die Ergebnisse von Andersen (2001) konnten somit reproduziert werden.

In einem zweiten Versuch wurde untersucht, ob sich auch die Ergebnisse von Andersen et al. (2001) an Möhrenproben reproduzieren lassen. Dazu wurden die Versuche wiederholt, wobei zusätzlich zur frischen Probe nur die Tage drei und sieben der Alterung gemessen wurden. Eine Möhrenprobe wurde entsaftet und direkt kristallisiert (Tag null). Die entsaftete Probe wurde bei 6 °C im Kühlschrank aufbewahrt und nach drei bzw. sieben Tagen erneut unter gleichen Bedingungen kristallisiert. Zusätzlich dazu wurden alle Proben mit einem CuCl_2 -Vektor aus vier verschiedenen CuCl_2 -Mengen pro Platte kristallisiert (sechsfache Wiederholung).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Abbildungen 29-31 für die Variable *kappa* und drei verschiedene Bildausschnitte dargestellt.

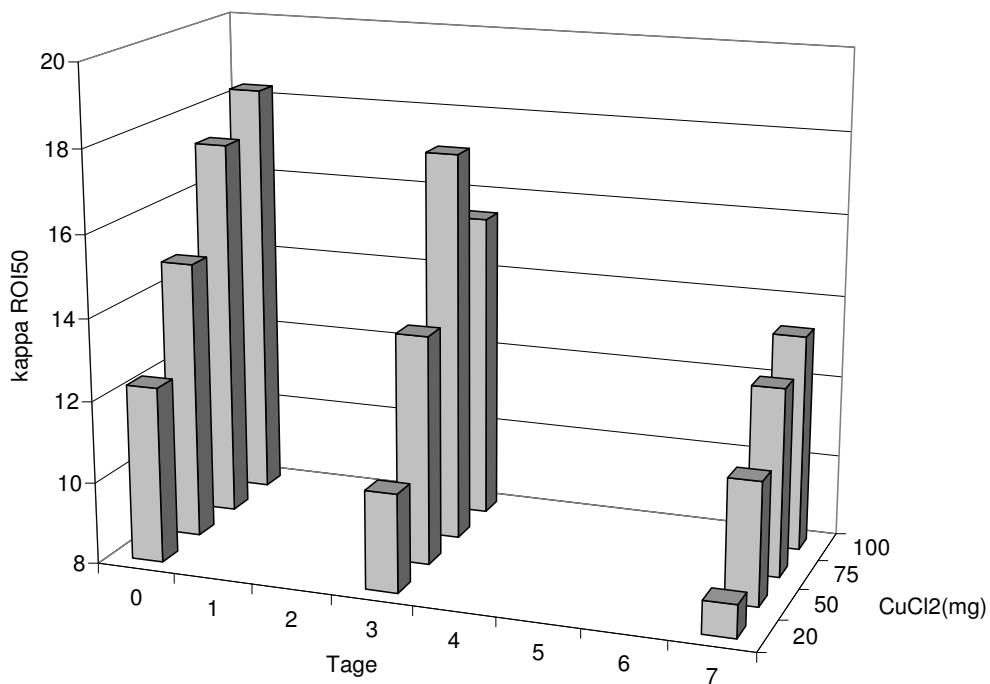


Abbildung 29: Variable *kappa* gegen die Zeit (Tage) und die Menge an CuCl_2 pro Platte für eine Alterungsreihe einer Möhrenprobe bei ROI 50.

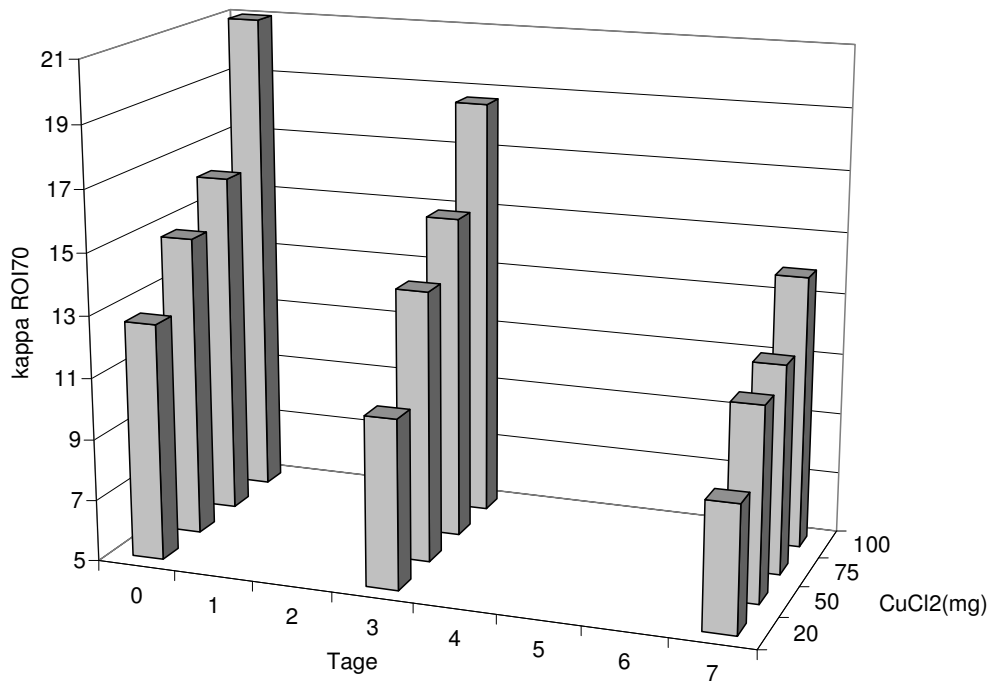


Abbildung 30: Variable κ gegen die Zeit (Tage) und die Menge an CuCl_2 pro Platte für eine Alterungsreihe einer Möhrenprobe bei ROI 70.

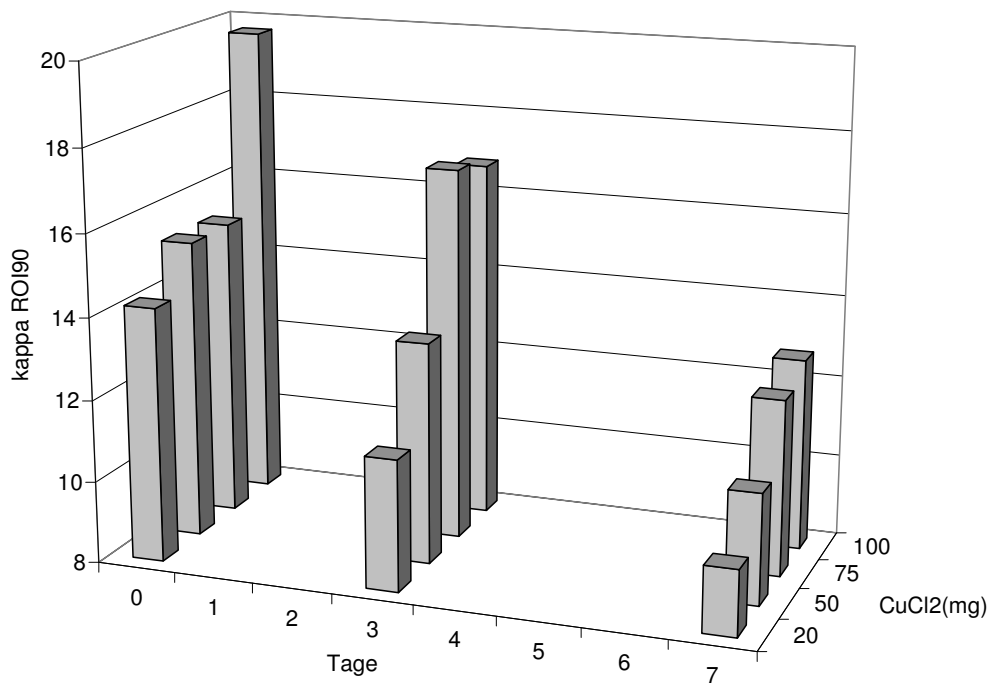


Abbildung 31: Variable κ gegen die Zeit (Tage) und die Menge an CuCl_2 pro Platte für eine Alterungsreihe einer Möhrenprobe bei ROI 90.

Die Ergebnisse von Andersen et al. (2001), dass die Alterung der Probenlösung mit der Methode verfolgt und mit der Texturanalyse ausgewertet werden kann, wurde damit reproduziert. Darüber hinaus lieferte der Versuch wertvolle Hinweise zum Einfluss der Menge an CuCl_2 (Vektor) und des Bildausschnittes auf das Ergebnis. Die Variable *kappa* zeigt für drei CuCl_2 -Mengen und alle ROIs einen Effekt der Alterung, die Werte fallen monoton. Lediglich bei 75 mg CuCl_2 pro Platte zeigt der dritte Tag diesen Effekt nicht. Generell bleibt der Alterungseffekt mit zunehmendem Bildausschnitt konstant. Für alle Alterungsstufen reagiert *kappa* auf zunehmende Mengen an CuCl_2 mit ansteigenden Werten. Der Anstieg flacht mit zunehmendem Bildausschnitt ab bzw. zeigt für frische Proben einen deutlichen Sprung zwischen 75 mg und 100 mg CuCl_2 .

Zusätzlich zu *kappa* wurden die Bilder auch mit den Variablen *diagonal moment* und *sum variance* ausgewertet. Die Variable *sum variance* verhält sich ähnlich wie *kappa*. Auch hier kann der Alterungseffekt mit einem monotonen Absinken der Werte für die verschiedenen Mengen an CuCl_2 und Bildausschnitte gezeigt werden. Auch der Einfluss zunehmender Mengen an CuCl_2 (Vektor) kann mit zunehmenden Werten von *sum variance* mit *kappa* verglichen werden, wobei sich hier der Vektor mit zunehmender Alterung ändert, weil der Alterungseffekt für 20 mg CuCl_2 am stärksten ist. Mit zunehmendem Bildausschnitt wird der Effekt zunehmender CuCl_2 -Menge schwächer und flacht zu 100 mg ab.

Die Variable *diagonal moment* zeigt ein ganz anderes Verhalten. Daher sind die Ergebnisse in den folgenden Abbildungen für verschiedene Mengen an CuCl_2 in Abhängigkeit des Bildausschnittes dargestellt.

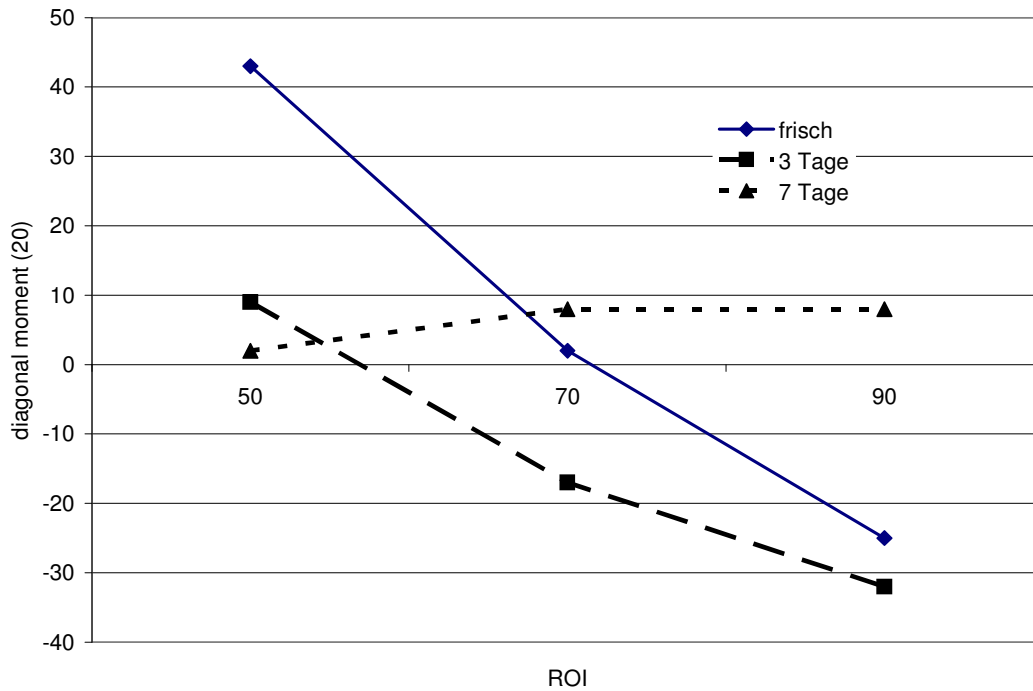


Abbildung 32: Variable *diagonal moment* gegen den ROI für verschiedene Alterungsstufen (0, 3, 7 Tage) und 20 mg CuCl₂ pro Platte.

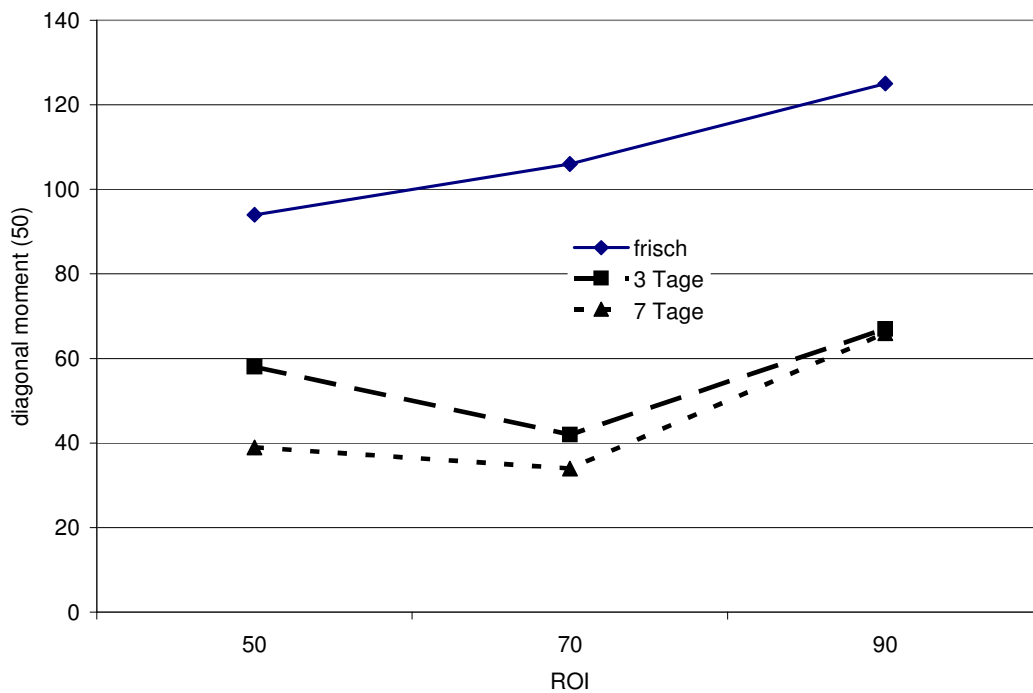


Abbildung 33: Variable *diagonal moment* gegen den ROI für verschiedene Alterungsstufen (0, 3, 7 Tage) und 50 mg CuCl₂ pro Platte.

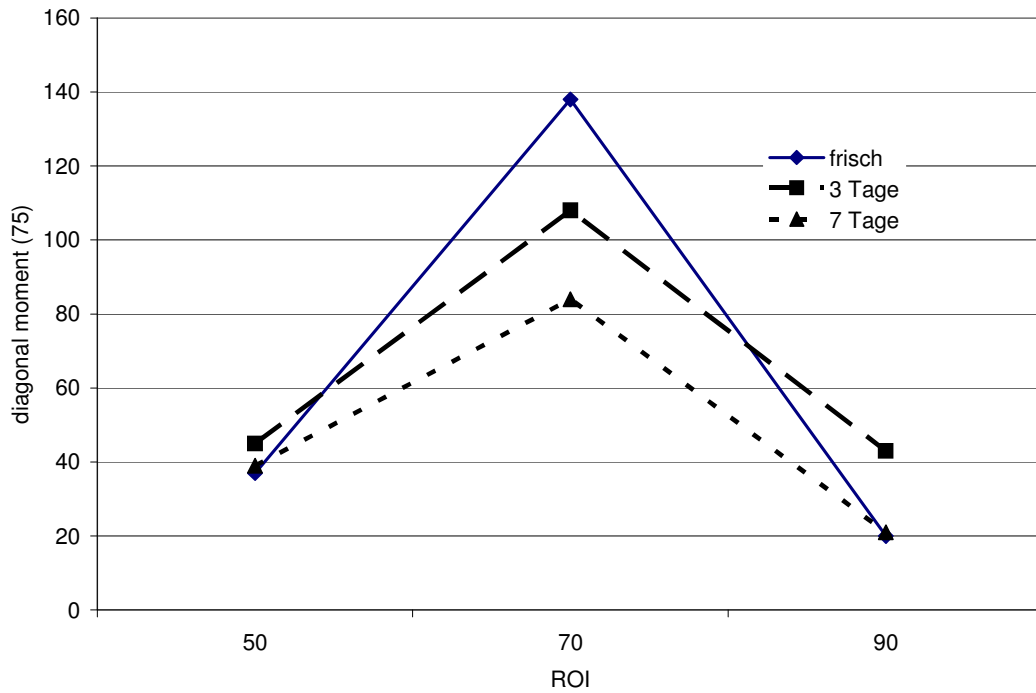


Abbildung 34: Variable *diagonal moment* gegen den ROI für verschiedene Alterungsstufen (0, 3, 7 Tage) und 75 mg CuCl₂ pro Platte.

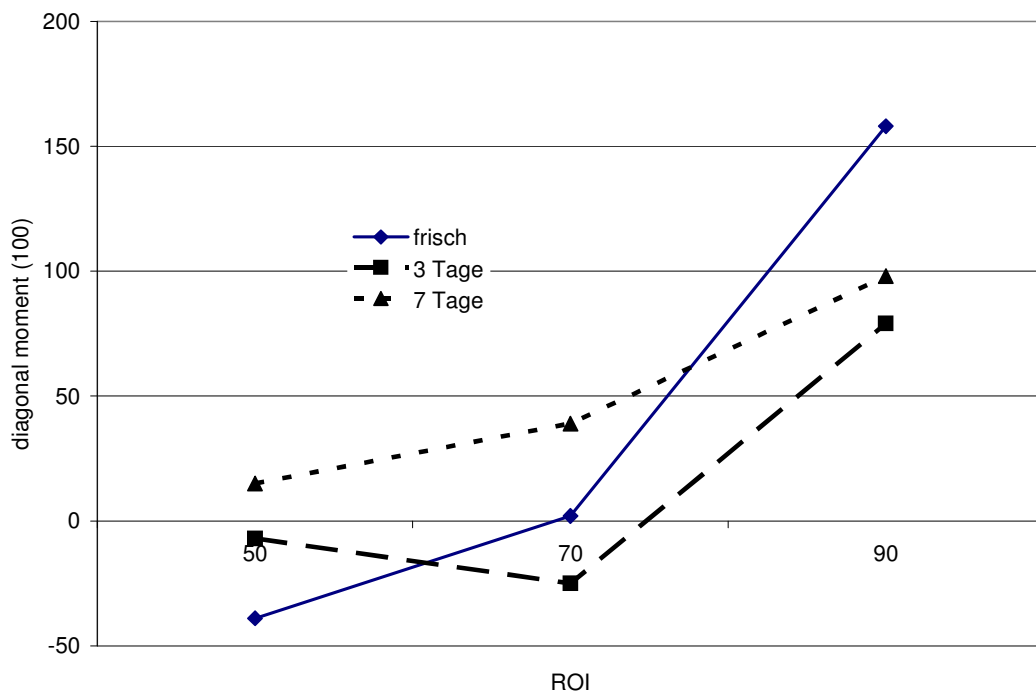


Abbildung 35: Variable *diagonal moment* gegen den ROI für verschiedene Alterungsstufen (0, 3, 7 Tage) und 100 mg CuCl₂ pro Platte.

Für *diagonal moment* ist der Vektor nicht monoton fallend oder steigend, sondern verändert sich stark mit zunehmender Alterung. Der Bildausschnitt hat einen erheblichen Einfluss, sowohl auf den Vektor, als auch auf den Alterungseffekt. Bei 20 mg CuCl_2 ist der Effekt nicht deutlich. Nach drei Tagen sinken die Werte, die ROI-Abhängigkeit bleibt gleich. Nach sieben Tagen ist dieser Effekt verschwunden und die Werte sind über verschiedene ROIs stabil. Für 50 mg gibt es einen deutlichen Alterungseffekt, der bereits nach drei Tagen zu sehen ist (Absinken der Werte mit zunehmender Alterung); der Effekt ist über die Bildausschnitte stabil. Bei 75 mg gibt es nur bei ROI 70 einen Alterungseffekt, kleinere oder größere Bildausschnitte zeigen den Effekt nicht. Auch 100 mg CuCl_2 pro Platte zeigt keinen eindeutigen Alterungseffekt, wobei mit zunehmender Alterung die ROI-Abhängigkeit der Werte schwächer wird.

Um zu untersuchen, ob sich mit dem Verfahren die von Morris & Morris (1941) berichtete Kristallisation von Glykogen reproduzieren lässt, wurden wässrige Lösungen von Glykogen (aus Austern, Merck) untersucht. Da Barth (1997) nachwies, dass die Methode auf unterschiedliche Mengen an Glykogen mit dem von Andersen et al. (2003) für Weizen- und Möhrenproben gefundenen Matrixeffekt reagierte, wurde Glykogen in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (0,1/10; 0,25/25; 0,5/50; 1,0/100) kristallisiert; der Versuch wurde an einem anderen Tag wiederholt. Es wurden damit Bilder gewonnen, deren Muster mit dem bei Morris & Morris (1941) gezeigten vergleichbar ist und die den bei Barth (1997) beschriebenen Matrixeffekt zeigten.

Fazit:

1. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse konnten reproduziert werden. Sowohl Versuche mit einer chemischen Substanz (PVP mit verschiedenem Polymerisationsgrad), als auch mit Möhrenproben (Alterung) zeigten die in der Literatur beschriebenen Effekte.
2. Die drei hier ausgewerteten Variablen reagierten auf zunehmenden Polymerisationsgrad bei PVP und auf die Alterung einer Möhrenprobe.
3. Diese Effekte sind je nach Variabel verschieden stark und abhängig vom gewählten Bildausschnitt.

4. Die Aussage, dass unterschiedliche Mengen an CuCl_2 pro Platte Effekte verschieden stark zeigen, konnte für die Alterung von Möhrenproben für die Variablen der Texturanalyse bestätigt werden, wobei *diagonal moment* stark von der CuCl_2 Menge abhängig ist und im Gegensatz zu *kappa* und *sum variance* keinen monotonen Vektor aufweist.

7.3.5 Vergleiche zwischen verschiedenen Laboratorien

Die bei Kromidas (2000) beschriebene und in der ISO 17025 für die Validierung geforderte Vergleichsmessung zwischen Laboratorien (Laborvergleichsversuche, Ringversuche) wurde mit dem beschriebenen Verfahren mehrfach durchgeführt. Für den Vergleich zwischen verschiedenen Laboratorien wurden die Bilder sowohl visuell anhand morphologischer Kriterien, als auch mit Texturanalyse ausgewertet. Da die visuelle Auswertung, angelehnt an die Normen der Sensorik, einen erheblichen Zeitaufwand beansprucht, wurden die Laborvergleichsversuche für die vorliegende Arbeit ausschließlich mit der computergestützten Texturanalyse ausgewertet. Diese Ergebnisse werden im Folgenden behandelt.

Mit den Variablen der Texturanalyse (und den morphologischen Kriterien der visuellen Bildauswertung) können Bilder verschiedener Proben nominal getrennt werden (einfache Unterscheidung, ohne Richtung und Bezugspunkt). Die Bilder verschiedener Proben können mit Zahlenwerten versehen werden. Durch Wiederholungen lassen sich Mittelwerte und Streuung der einzelnen Proben berechnen und der Unterschied zwischen den Proben kann dann statistisch gesichert werden (unter Angabe der F- und p-Werte).

Die mit der hier vorgelegten Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen auch im Folgenden, dass die Biokristallisation mit computergestützter Texturanalyse oder visueller Profilanalyse Proben nominal unterscheiden und anschließend gruppieren kann. Eine darüber hinaus gehende Unterscheidung verschiedener Proben (z.B. auf einer Intervallskala) ist bisher nicht möglich, da für die Biokristallisation kein Standard-Referenzmaterial existiert. Dieses muss noch entwickelt werden. Hier kann mit dem Institute for Reference Materials and Measurements der Europäischen Union (EU-JRC-IRMM) Prof. Dr. Elke Anklam in Geel/B zusammengearbeitet werden, da dort die Methode z. Zt. im Rahmen einer Dissertation für die Unterscheidung von Proben (nominal) in

Zusammenarbeit mit dem Fachgebiet Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur charakterisiert und validiert wird (Malgorzata Szulc, Titel: *Biocrystallization method: optimization, in-house validation and application for the discrimination of organic and conventional potato, carrot, winter wheat and horsebean*).

Vergleichsmessungen zwischen Laboratorien (Ringversuche) sind in verschiedenen Normen festgelegt (vgl. ISO 17025, ISO 5725, EU-Commission 2002, Draft Guidelines für Codex Alimentarius Commission 2005, Thompson et al. 1995), wobei zwischen der

1. Charakterisierung von Messverfahren,
2. Charakterisierung der Eigenschaften von Stoffen,
3. Überprüfung der technischen Leistungsfähigkeit von Laboratorien

unterschieden wird. Für die vorliegende Arbeit wurde die Biokristallisation als Messverfahren charakterisiert und die technische Leistungsfähigkeit verschiedener Laboratorien überprüft. Mit der Durchführung von Laborvergleichsversuchen wurde die hier beschriebene in-house Validierung bereits in Richtung einer Validierung in vollem Umfang erweitert. Allerdings musste auf eine Auswertung der Ergebnisse gemäß den Normen (z. B. ISO 5725) hinsichtlich der Bestimmung der Reproduzierbarkeit verzichtet werden, da für die Methode noch kein Standard-Referenzmaterial vorliegt und eine Intervallskalierung der Ergebnisse nicht möglich ist. Als Ergebnis der hier durchgeführten Laborvergleichsversuche wurde ermittelt:

1. ein graphischer Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen von einer Probe, die in allen beteiligten Laboratorien unter Wiederholbedingungen behandelt wurde, in Abhängigkeit vom ROI,
2. die Berechnung der Streuung zwischen Laboratorien als Standardabweichung vom Mittelwert,
3. das Unterscheidungsvermögen zwischen zwei verschiedenen Proben für jedes Laboratorium, berechnet mit Ime-Modell in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Es wurden dazu mehrere Laborvergleichsversuche in den Jahren 2003 bis 2005 an Standardmaterialien und verschiedenen Proben durchgeführt. Für die Durchführung und Auswertung dieser Versuche war der Verfasser dieser Arbeit verantwortlich.

Als Standardmaterialien wurden die in den vorherigen Kapiteln bereits beschriebenen gefriergetrockneten Weizen- und Möhrenproben homogenisiert und in gleiche Portionen geteilt. Das Material wurde zusammen mit einer Versuchsbeschreibung an alle teilnehmenden Laboratorien versandt. Jede Probe wurde drei- bis sechsfach vorbereitet und mit sechs Bildern pro Probenaufbereitung kristallisiert. Die Ergebnisse der Texturanalyse wurden der Gruppe an der Universität Kassel übermittelt und dort weiter ausgewertet. Es wurden sowohl eine Probe (dann in sechsfacher Aufbereitung), als auch zwei Proben parallel vermessen. 2005 kamen zwei weitere Laboratorien dazu und nahmen an einer bzw. zwei Vergleichsmessungen teil. Es handelt sich um das Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) in Geel (Belgien) und das Kristallisationslabor in Dornach (Schweiz). Beide Laboratorien arbeiten mit anderen Klimakammern, so dass Unterschiede sowohl auf die Änderung der Probenaufbereitung, als auch auf verschiedene Bedingungen während der Kristallisation zurückzuführen sind. Die Bilder dieser beiden Labore wurden auf dem Postweg nach Witzenhausen gesandt und dort eingescannt und mit der Texturanalyse und anschließender statistischer Behandlung ausgewertet. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Vergleichsversuche an Standardmaterialien dargestellt. Laboreignungsprüfungen an Weizen- und Möhrenproben werden anschliessend behandelt.

Die erste Vergleichsmessung zwischen den Laboratorien in Deutschland, Dänemark und Holland wurde am 18. und 20. November 2003 durchgeführt. Es wurden jeweils gefriergetrocknete Proben von Standardweizen mit einer Wiederholung der Probenvorbereitung und 43 Platten pro Kammer kristallisiert. Es wurde mit einem Mischungsverhältnis von 90/90 gearbeitet. Die Bilder wurden in jedem Labor gescannt, die Texturanalyse und statistische Auswertung wurde in Witzenhausen durchgeführt. Die drei Laboratorien arbeiteten mit verschiedenen mittlere Verdampfungszeiten: LBI: 12,9 h; UniKa: 15 h, BRAD: 10,8 h. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 36-38 für die drei Variablen der Texturanalyse und verschiedene ROI dargestellt. Für die Kammern an der UniKa (dargestellt ist das Ergebnis für Kammer C) zeigt der Vergleich, dass sich die Kammern von den beiden anderen deutlich unterscheiden (*Variable kappa*). Für *diagonal moment* ist der Unterschied zwischen den drei Orten am größten, wenn der Bildausschnitt 90 % beträgt. Die

Auftragung der Werte gegen die mittlere Verdampfungszeit zeigte einen Zusammenhang für alle drei Bildausschnitte (50: $r^2 = 0,6$; 70 und 90: $r^2 = 0,8$), wobei für 50 und 70 eine positive und für 90 % eine negative Abhängigkeit gefunden wurde. Die Abhängigkeit dieser Variable vom Bildausschnitt ist für BRAD und LBI stärker als für die beiden Kammern in Witzenhausen. Bei einem Bildausschnitt von 70 % sind alle vier Kammern vergleichbar. Die größten Unterschiede zwischen den Laboren zeigt die Variable *kappa*. Die Variable *sum variance* zeigt dieses Ergebnis auch, hier ist die ROI-Abhängigkeit für BRAD und LBI (wie bei *diagonal moment*) größer als bei *kappa*. Ob die unterschiedlichen Verdampfungsbedingungen in den vier Kammern oder noch weitere ortsabhängige Faktoren dabei die Ursache für die Verschiedenheit der Ergebnisse sind, kann an dieser Stelle noch nicht eindeutig geklärt werden. Die Abweichung der beiden Kammern an einem Ort mit ähnlicher Verdampfungszeit ist jedenfalls erheblich geringer als zwischen Kammern mit geringerer Verdampfungszeit.

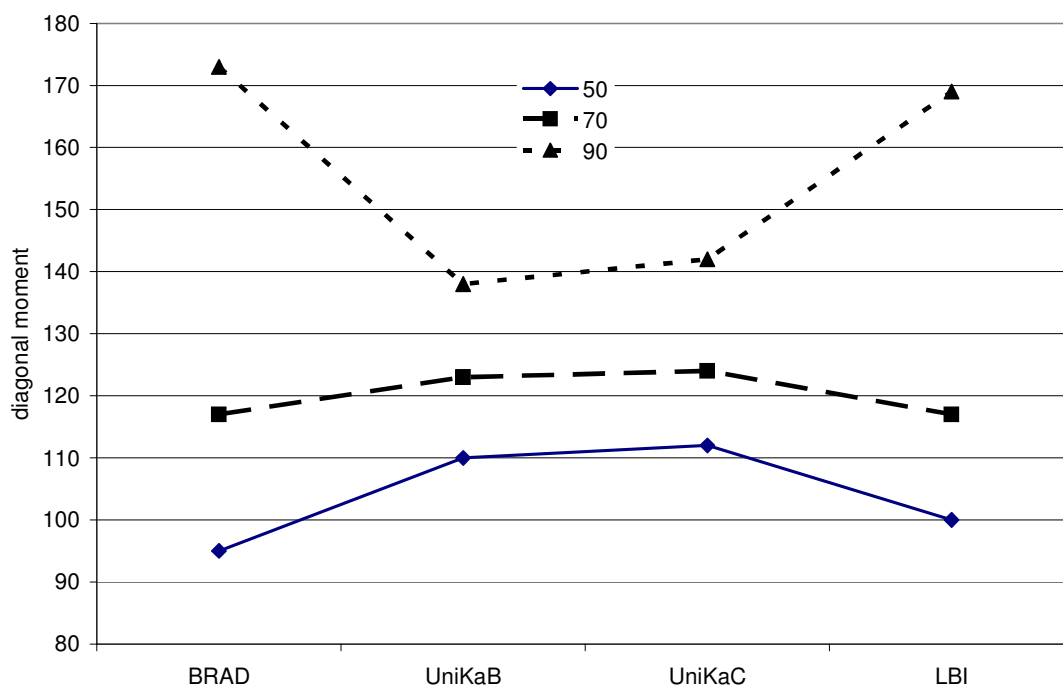


Abbildung 36: Variable *diagonal moment* für Weizenstandard für die vier Kammern und drei ROI.

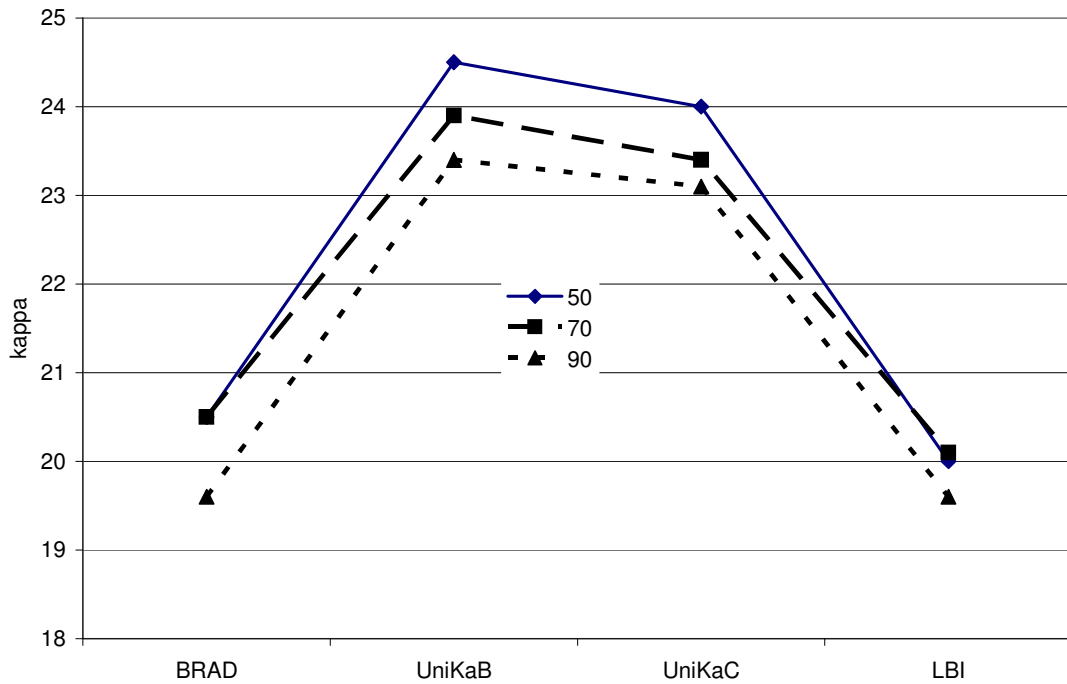


Abbildung 37: Variable *kappa* für Weizenstandard für die vier Kammern und drei ROI.

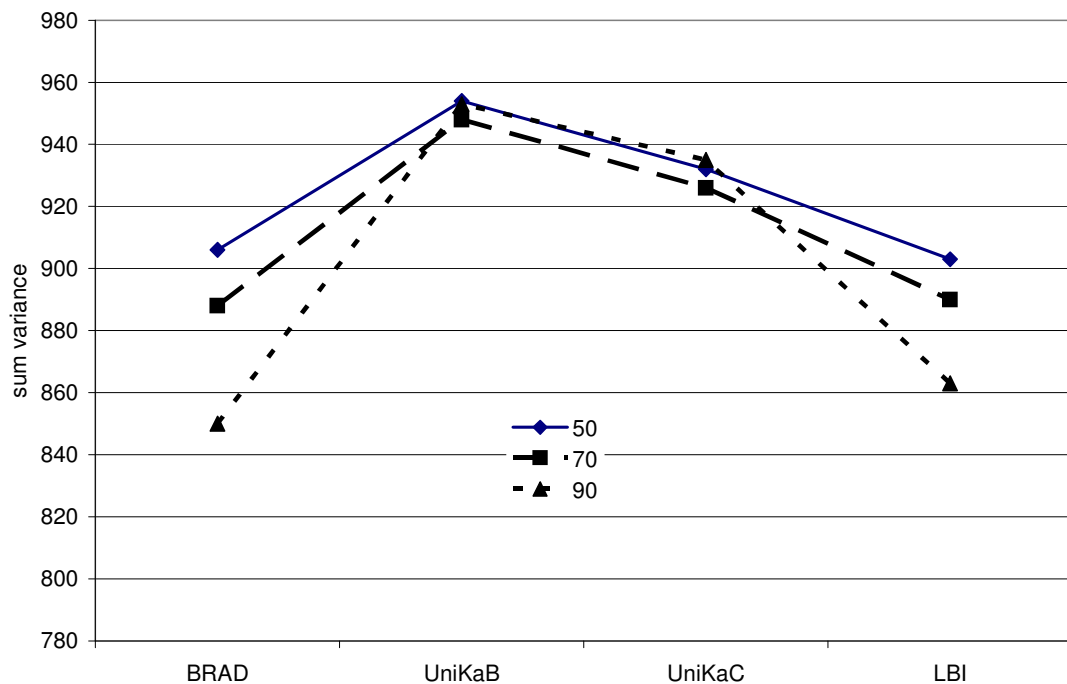


Abbildung 38: Variable *sum variance* für Weizenstandard für die vier Kammern und drei ROI.

2005 wurden zwei Laboreignungsprüfungen durchgeführt. Dabei wurden die zwei anderen Laboratorien mit einbezogen. Alle Laboratorien erhielten

gefriergetrocknete Möhren- und Weizenproben und eine Beschreibung der Prozedur. Es wurde mit dreifacher Probenvorbereitung und sechs Bildern pro Probenvorbereitung gearbeitet. Als Mischungsverhältnis wurde für die Weizenprobe 90/90, für die Möhrenprobe 11,5/90 genommen. In den Abbildungen 39-41 sind die Ergebnisse der ersten Messung für die drei Variable und verschiedenen ROI aufgetragen. Immer drei Balken pro Kammer/Ort gehören zu einer Probe und repräsentieren die drei ausgewählten ROI 50, 70 und 90, beginnend mit der Weizenprobe. Im Vergleich zu den beiden anderen Variablen ist *diagonal moment* für eine Unterscheidung zwischen den beiden Standardproben nicht geeignet. Im Folgenden eine Tabelle der mit dem lme-Modell berechneten F- und p-Werte für die Unterscheidung zwischen den beiden Proben in Abhängigkeit von der Kammer bzw. dem Ort:

F-Wert, Signifikanz	ROI50	ROI70	ROI90
LBI	20,***	40,***	110,***
UniKaB	5,*	2,n.s.	2,n.s.
UniKaC	10,*	50,*	30,*
BRAD	5, n.s.	10,*	1,n.s.
Geel	10,n.s.	1,n.s.	1,n.s.
Dornach	10,n.s.	8,n.s.	1,n.s.

Tabelle 2: F-Wert und Signifikanz für die Unterscheidung zwischen gefriergetrockneten Weizen- und Möhrenproben mit der Variable *diagonal moment* für die Teilnehmer der Laboreignungsprüfung.

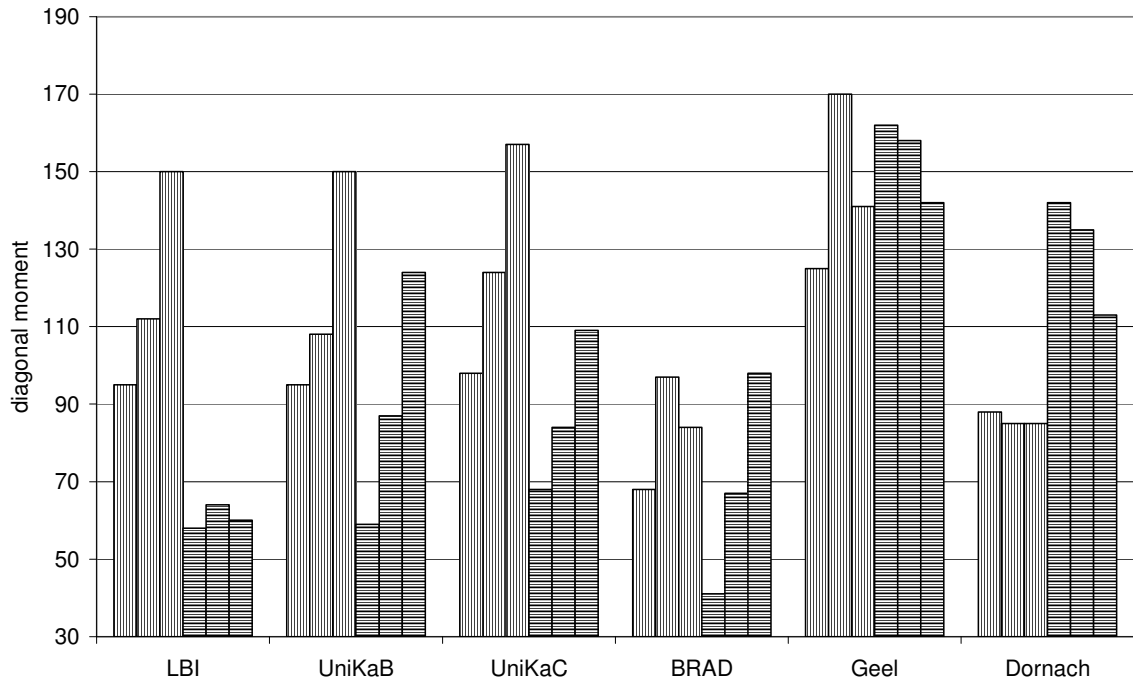


Abbildung 39: Variable *diagonal moment* für den Weizen (hell)- und Möhren(dunkel)standard für die sechs Kammern und drei ROI (drei aufeinanderfolgende Balken).

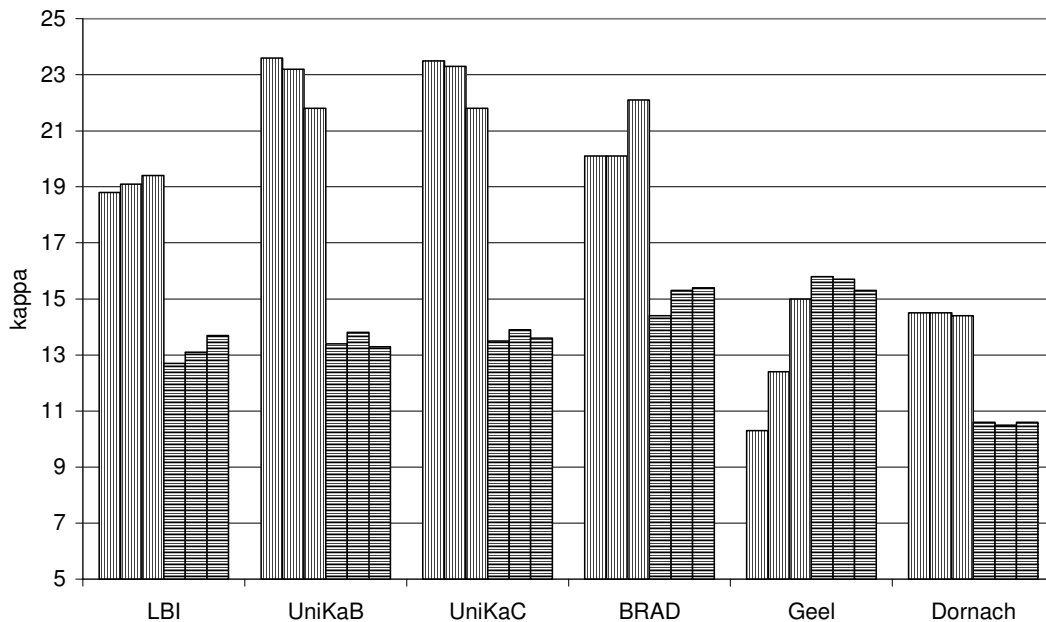


Abbildung 40: Variable *kappa* für den Weizen (hell)- und Möhren(dunkel)standard für die sechs Kammern und drei ROI (drei aufeinanderfolgende Balken).

Für *kappa* können alle Labore außer Geel die Proben unterscheiden, die Weizenproben haben höhere Werte als die Möhrenproben. Geel fällt für das Verhältnis zwischen Möhren- und Weizenproben heraus. Dornach hat deutlich geringere Werte als die drei Labore LBI, UniKa und BRAD, das Verhältnis zwischen den beiden Proben ist aber vergleichbar.

F-Wert, Signifikanz	ROI50	ROI70	ROI90
LBI	380,***	480,***	250,***
UniKaB	380,***	230,***	400,***
UniKaC	1200,***	1300,***	700,***
BRAD	100,***	80,**	260,***
Geel	40,*	20,*	1,n.s.
Dornach	50,*	40,*	140,*

Tabelle 3: F-Wert und Signifikanz für die Unterscheidung zwischen gefriergetrockneten Weizen- und Möhrenproben mit der Variable *kappa* für die Teilnehmer der Laboreignungsprüfung .

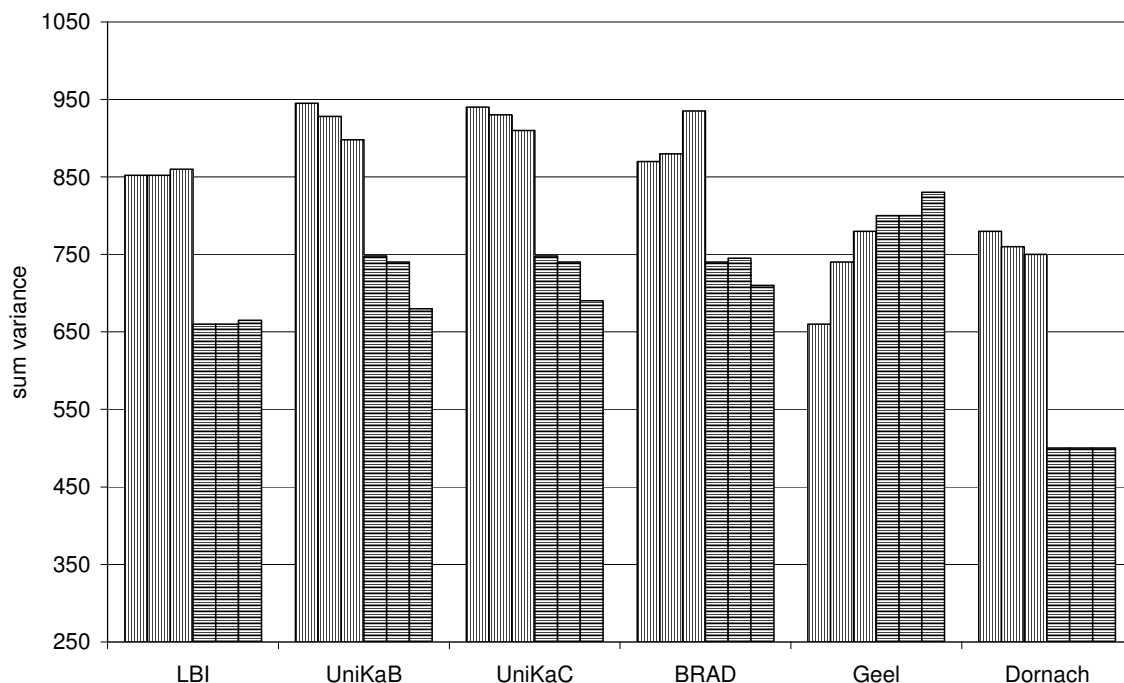


Abbildung 41: Variable *sum variance* für den Weizen (hell)- und Möhren(dunkel)standard für die sechs Kammern und drei ROI (drei aufeinanderfolgende Balken).

Für *sum variance* können alle Labore außer Geel die Proben unterscheiden, die Weizenproben haben höhere Werte als die Möhrenproben. Geel fällt für das Verhältnis zwischen Möhren- und Weizenproben heraus. Damit ist das Ergebnis mit dem für die Variable *kappa* vergleichbar.

F-Wert, Signifikanz	ROI50	ROI70	ROI90
LBI	550, ^{***}	420, ^{***}	250, ^{***}
UniKaB	140, ^{***}	150, ^{***}	200, ^{***}
UniKaC	400, ^{***}	650, ^{***}	190, ^{***}
BRAD	90, ^{**}	220, ^{***}	180, ^{***}
Geel	80, [*]	8,n.s.	5,n.s.
Dornach	70, [*]	80, [*]	120, [*]

Tabelle 4: F-Wert und Signifikanz für die Unterscheidung zwischen gefriergetrockneten Weizen- und Möhrenproben mit der Variable *sum variance* für die Teilnehmer der Laboreignungsprüfung.

Zusätzlich zur Texturanalyse wurden die Bilder auch visuell beurteilt. Dafür wurden alle Bilder einer Kammer nach Verdampfungszeiten sortiert auf ein DIN A0 Poster und nebeneinander an einer Wand aufgehängt. Die Bilder von LBI, BRAD und Witzhausen waren vergleichbar. Ein Vergleich der Verdampfungszeiten zeigte allerdings, dass LBI sehr viel frühe Bilder und BRAD Bilder mit einer starken Streuung der Verdampfungszeiten hatten. Die Bilder von Dornach zeigten starke Überkonzentration an Probenmenge. Offenbar muss für die Kammer in Dornach ein anderes, an die Bedingungen dort adaptiertes Mischungsverhältnis genommen werden. Durch die Probendominanz verlieren die Bilder ihre Strukturelemente. Trotzdem ist die Tendenz einiger Kriterien der visuellen Auswertung („*Fullness with side needles*“, s. Anhang) zur Unterscheidung der beiden Proben mit den anderen Orten vergleichbar. Dies gilt auch, wenn auch deutlich geringer, für die Bilder aus Geel. Für Geel wurde gerade anhand der Poster deutlich, dass hinsichtlich der Probenaufbereitung (Mischungsverhältnis) und der Kammerbedingungen Optimierungsbedarf besteht. Es wurde eine zweite Laboreignungsprüfung der Teilnehmer mit dem Standardmaterial durchgeführt. Das Labor in Geel konnte nicht an der Messung teilnehmen, da dort die Kammerbedingungen noch

untersucht wurden. Das Labor in Dornach hatte mittlerweile das Mischungsverhältnis an die dortigen Bedingungen adaptiert. Da die Messung eine Wiederholung der vorherigen war, wird sie nicht noch einmal beschrieben. Wie bei der ersten Messung ist die Variable *diagonal moment* für eine Unterscheidung der Proben nicht geeignet. Im Gegensatz zur ersten Messung sind auch die Verhältnisse vergleichbar. Die drei Labore LBI, UniKa und BRAD sind vom ROI-Verlauf vergleichbar.

F-Wert, Signifikanz	ROI50	ROI70	ROI90
LBI	15,*	5,n.s.	5,n.s.
UniKaB	15,*	5,n.s.	15,*
UniKaC	40,**	15,*	15,*
BRAD	5,n.s.	1,n.s.	1,n.s.
Dornach	21,*	25,*	5,n.s.

Tabelle 5: F-Wert und Signifikanz für die Unterscheidung zwischen gefriergetrockneten Weizen- und Möhrenproben mit der Variable *diagonal moment* für die Teilnehmer der Laboreignungsprüfung.

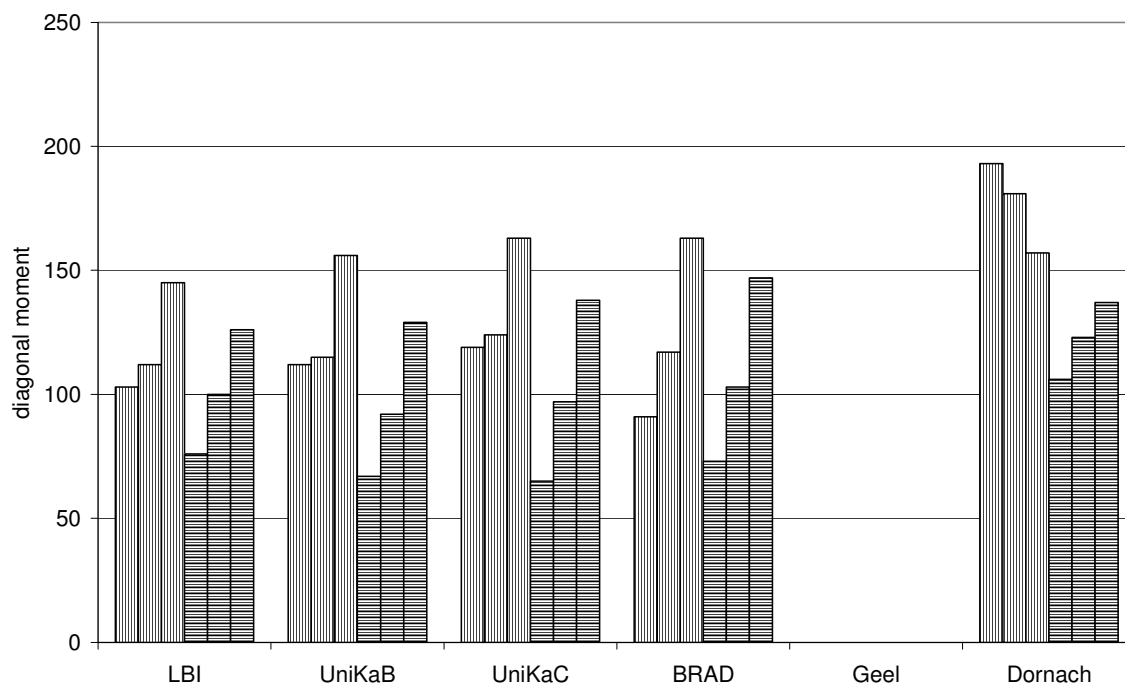


Abbildung 42: Variable *diagonal moment* für den Weizen (hell)- und Möhren(dunkel)standard für die fünf Kammern und drei ROI (drei aufeinander folgende Balken).

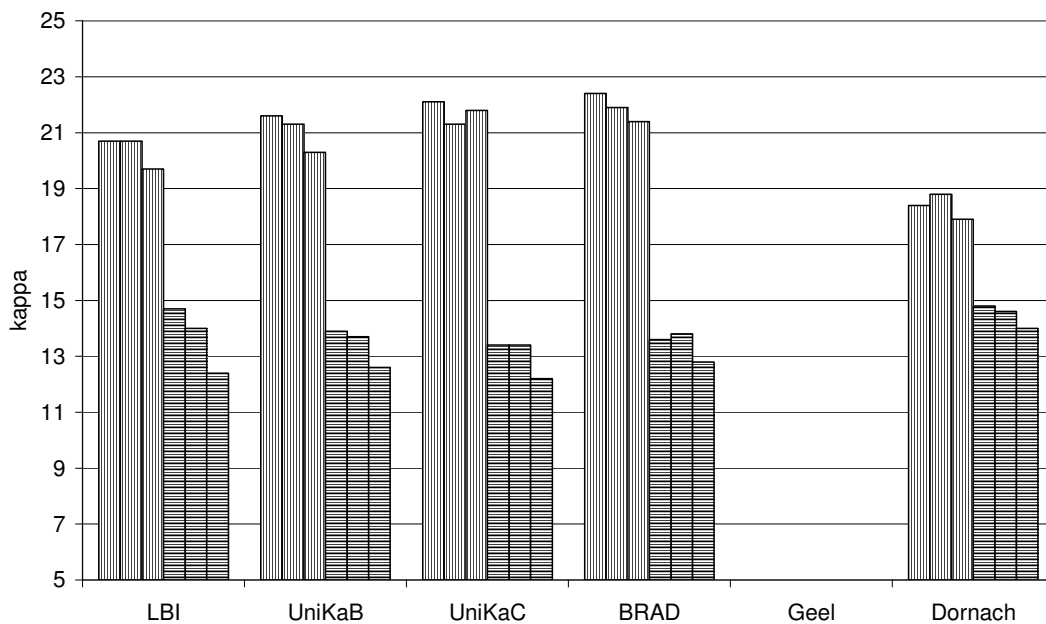


Abbildung 43: Variable *kappa* für den Weizen (hell)- und Möhren(dunkel)standard für die fünf Kammern und drei ROI (drei aufeinander folgende Balken).

Für *kappa* können alle Labore die Proben unterscheiden. Dornach hat eine geringere Differenz zwischen den beiden Proben, das Verhältnis zwischen den beiden Proben ist aber wieder vergleichbar. Die drei anderen Labore sind vergleichbar.

F-Wert, Signifikanz	ROI50	ROI70	ROI90
LBI	190,***	400,***	700,***
UniKaB	420,***	620,***	750,***
UniKaC	550,***	1300,***	1000,***
BRAD	540,***	520,***	300,***
Dornach	18,*	30,*	28,*

Tabelle 6: F-Wert und Signifikanz für die Unterscheidung zwischen gefriergetrockneten Weizen- und Möhrenproben mit der Variable *kappa* für die Teilnehmer der Laboreignungsprüfung.

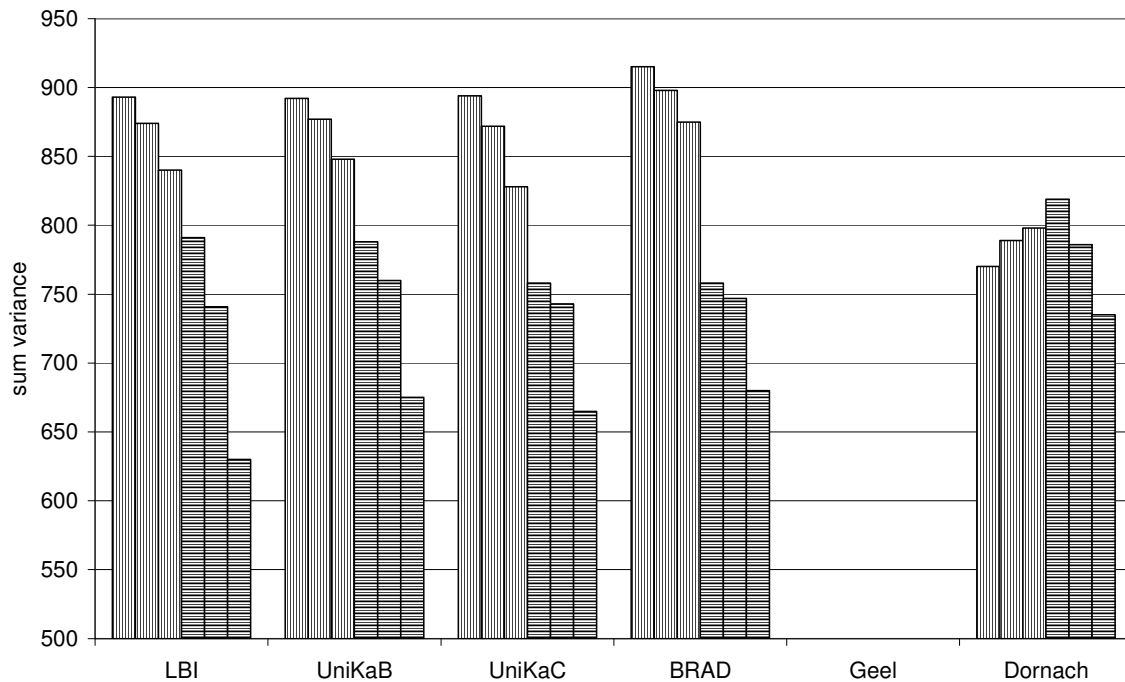


Abbildung 44: Variable *sum variance* für den Weizen (hell)- und Möhren(dunkel)standard für die fünf Kammern und drei ROI (drei aufeinander folgende Balken).

Für *sum variance* können alle Kammern außer der Kammer in Dornach die Proben unterscheiden, Dornach fällt für das Verhältnis zwischen Möhren- und Weizenproben heraus. Die drei anderen Labore sind vergleichbar.

F-Wert, Signifikanz	ROI50	ROI70	ROI90
LBI	80,**	180,***	250,***
UniKaB	100,**	200,***	200,***
UniKaC	350,***	500,***	480,***
BRAD	150,***	120,***	105,***
Dornach	7,n.s.	1n.s.	10n.s.

Tabelle 7: F-Wert und Signifikanz für die Unterscheidung zwischen gefriergetrockneten Weizen- und Möhrenproben mit der Variable *sum variance* für die Teilnehmer der Laborvergleichsmessung.

Die visuelle Bildauswertung am Poster der Bilder wie bei der ersten Untersuchung zeigte eine Abweichung der Bilder von Dornach aufgrund stärkerer Struktur- als Texturmerkmale. Die Nadelzüge der Bilder aus Dornach

sind stärker und differenzierter als die in den Bildern der drei anderen Labore. Die Tendenz in der Unterscheidung der beiden Proben ist aber für alle Labore ähnlich.

Die Bilder der verschiedenen Laboratorien wurden zum Test der Laboreignung im Rahmen der Methodvalidierung ausschließlich mit der Texturanalyse ausgewertet. Vergleicht man die Bilder der beiden Proben je Laboratorium visuell, anhand struktureller Merkmale, so fällt auf, dass die Bilder aus dem Kristallisationslabor in Dornach wesentlich strukturierter sind als die Bilder des Laboratoriums in Geel. Die Unterschiede zwischen den beiden Standardproben sind visuell betrachtet bei den Bildern aus Dornach viel deutlicher als bei den Bildern aus Geel. Bereits Andersen et al. (2003) wiesen auf die Bedeutung der Struktur für die Charakterisierung von Proben hin. Dieser anhand struktureller Merkmale für das menschliche Auge erfassbare Unterschied wird von der Texturanalyse nicht so abgebildet. Die Bilder der beiden Proben lassen sich zwar auch für das Labor in Dornach unterscheiden, zumal nachdem dort das Mischungsverhältnis auf die Kammerbedingungen angepasst wurde, das Unterscheidungsvermögen ist mit der Texturanalyse aber geringer als bei den drei anderen Laboratorien mit baugleichen Kammern und gleichen Prozeduren. Visuell lassen sich die beiden Proben aber ebenso deutlich unterscheiden wie die Ergebnisse der drei anderen Laboratorien mit baugleichen Kammern und gleichen Prozeduren. Die visuelle Unterscheidung anhand struktureller Merkmale kann aber solange nicht mit den Ergebnissen der Texturanalyse verglichen werden, solange nicht quantifiziert wird. Eine statistische Aussage über den Unterschied zwischen Bildern bzw. Proben ist daher visuell erst dann möglich, wenn die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Auswertungsmethoden dafür angewendet werden.

Für einen Vergleich der beiden Standardmessungen mit den beiden Kammern an der Universität Kassel sind in Abbildung 45 die Ergebnisse für die Weizen- und Möhrenproben für κ und beide Messungen nebeneinander aufgetragen. Die beiden Untersuchungen lassen sich sowohl von den Werten als auch von dem Verhältnis der beiden Proben zueinander vergleichen. Bei den Weizenproben sind die Werte der zweiten Messung höher als bei der ersten.

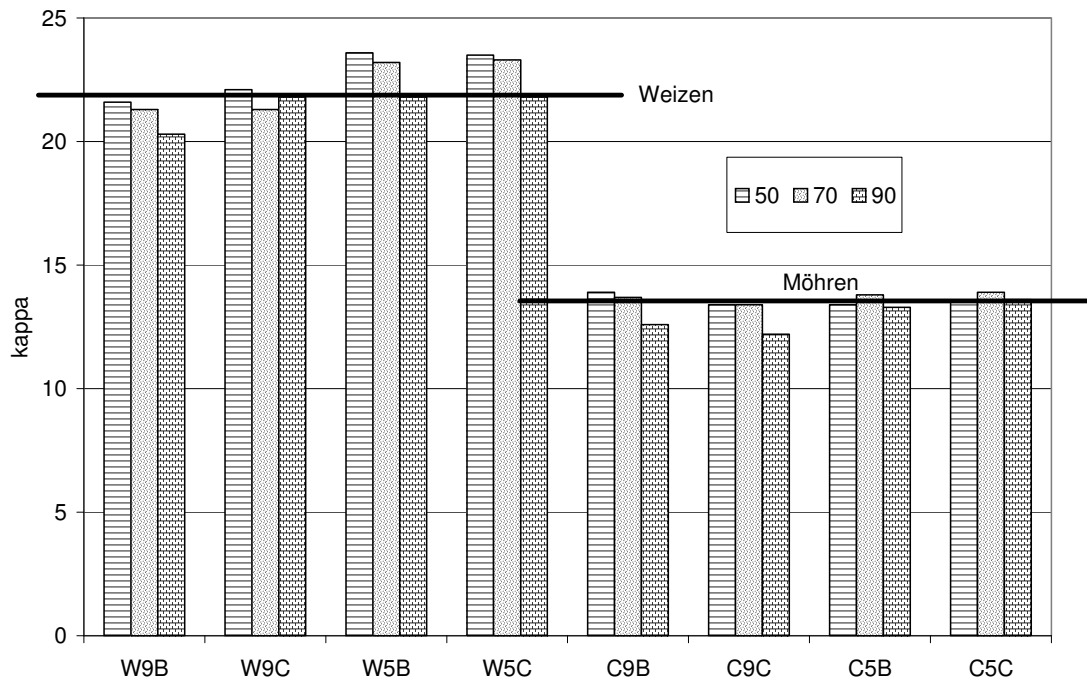


Abbildung 45: Variable κ für den Weizen (links)- und Möhren(rechts)standard für die beiden Kammern (B, C) und drei ROI (drei aufeinander folgende Balken) an zwei Terminen (5, 9) in 2005.

Fazit:

1. Das in Witzenhausen charakterisierte Standardmaterial konnte für Vergleichsmessungen verschiedener Labore und Kammern erfolgreich eingesetzt werden.
2. Es wurden damit - zum ersten Mal für dieses Verfahren überhaupt - mehrere Laborvergleichsversuche mit drei bis fünf Teilnehmern aus Europa durchgeführt.
3. Die Bilder konnten mittels Texturanalyse ausgewertet und die Mittelwerte aus mehrfachen Wiederholungen graphisch dargestellt und verglichen werden.
4. Die erste Vergleichsmessung zwischen drei Laboren zeigte, dass die Bilder der beiden Kammern an der Universität Kassel bei zwei Variablen von den anderen unterschiedlich sind. Die kann evtl. mit Unterschieden im Verdampfungs- und Kristallisationsprozess erklärt werden. In den beiden Laboreignungsprüfungen trat dieser Unterschied zwischen den drei Laboren nicht mehr auf, die drei Labore bzw. vier Kammern waren

vergleichbar für alle Variablen (eine Diskussion der Streuung findet sich für Weizen- und Möhrenproben in Kap. 9).

5. Eine Laboreignungsprüfung der drei Labore zeigte eine Abweichung der zwei Labore mit unterschiedlicher Kammer.
6. Die Ergebnisse von Texturanalyse und visueller Bildauswertung können nicht verglichen werden. Sie liefern unterschiedliche Ergebnisse.
7. Eine Optimierung des vorgegebenen Mischungsverhältnisses an die Bedingungen der Kammer führt nicht unbedingt zu einer Verbesserung der Trennung der beiden Proben (ausgewertet mit der Texturanalyse, Ergebnisse in Dornach).
8. Werden zwei verschiedene Standardmaterialien gleichzeitig gemessen, so können die drei Labore BRAD, LBI und UniKa in insgesamt vier Kammern diese Proben trennen und signifikant unterscheiden; dieses Ergebnis konnte einmal erfolgreich wiederholt werden.

8 Systematische Beurteilung der Einflussfaktoren

8.1 Überblick

Für Weizen-, Möhren- und Apfelproben wurden die relevanten Parameter (Einflussgrößen) systematisch variiert und deren Einfluss auf das Ergebnis quantifiziert. Die in den folgenden Unterkapiteln beschriebenen Untersuchungen wurden für die jeweilige Probenart getrennt durchgeführt, da die Laborprozesse sich grundlegend unterscheiden. Die Faktoren „Kammer“ (inklusive Feuchte) und „Bildausschnitt“ wurden bereits für das Verfahren behandelt und gelten entsprechend (vgl. Kap. 7).

Nachdem die Prozeduren für alle drei Probenarten festgelegt, zwischen den Laboren harmonisiert und abschließend dokumentiert wurden, konnte mit der Prüfung der verschiedenen Faktoren begonnen werden. Dabei wurden zwei Probleme deutlich:

1. Es existierten bis dahin keine detaillierten Prozedurbeschreibungen mit Angaben möglicher Einflussgrößen oder waren nicht veröffentlicht und nicht zugänglich.
2. Es existierte keine Auswertungsmethode, mit der Hunderte von Bildern in kurzer Zeit ausgewertet werden konnten.

Beide Probleme wurden gelöst, die Ergebnisse sind in dieser Arbeit dargestellt. Damit bezieht sich die vorliegende Validierung der Biokristallisation nur auf die Ergebnisse, die mit den hier beschriebenen Methoden durchgeführt wurden.

Bei der Auswahl der zu untersuchenden Einflussgrößen konnte nur bedingt auf veröffentlichtes Material zurückgegriffen werden (vgl. Kap. 4.3). Für die visuelle Bildauswertung waren lediglich einige wenige Faktoren, wie Mischungsverhältnis oder die Kammerfeuchte als wichtige Einflussgrößen bekannt. Diese Untersuchungen wurden allerdings mit anderen Prozeduren durchgeführt als die hier verwendeten. Das größte Problem war, dass die Variation der Bilder aus einer Wiederholmessung nicht angegeben wurde. Damit war zu Beginn der Untersuchungen nicht bekannt, welcher Schritt die größte Streuung verursacht und welcher Faktor den größten Einfluss auf das Ergebnis hat. Es wurden daher diejenigen Faktoren zur Untersuchung ausgewählt, die im Prozess variieren können oder neu in die Prozedur aufgenommen wurden. Wenn im Folgenden von „Ergebnis“ gesprochen wird, so ist entweder das mit der Texturanalyse ausgewertete Bild bzw. der Mittelwert

über mehrere Bilder oder das Unterscheidungsvermögen mittels Texturanalyse zwischen zwei Proben gemeint. Die Herkunft der Proben, mit denen die Faktoren untersucht wurden, wird hier nur kurz charakterisiert. In Kap. 10 wird eine ausführliche Dokumentation gegeben, da dort die Ergebnisse des Unterscheidungsvermögens des Verfahrens an z. T. diesen Proben dargestellt und diskutiert werden.

8.2 Einflussgrößen bei der Biokristallisation von Weizenproben

Die Methode für Weizen kann in folgende Prozessschritte mit den jeweiligen Einflussfaktoren gegliedert werden:

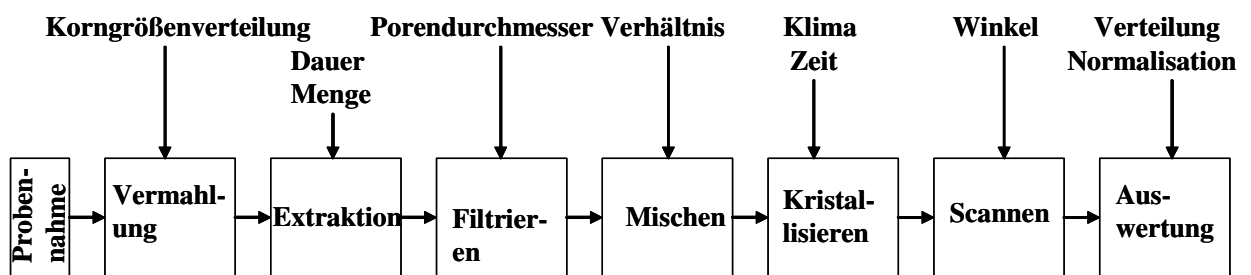


Abbildung 46: Prozessschritte der Methode für Weizenproben inklusive der wichtigsten Einflussfaktoren.

Es wurden folgende Faktoren untersucht:

8.2.1 Faktoren während der Probenaufbereitung

Vermahlung, Faktor Mühlentyp

Für die Extraktion werden die Weizenproben vermahlen. Nach ersten Versuchen mit Weizenschrot an der Universität Kassel im Frühjahr 2002 konnten die Ergebnisse unseres Partners in Dänemark (BRAD), der die Methode für Weizen entwickelt hatte, nicht reproduziert werden, obwohl wir Kammern und Mühle vom selben Hersteller (Mühle: Osttiroler Getreidemühle) bezogen hatten. Eine von BRAD vorgegebene Matrix verschiedener Mischungsverhältnisse lieferte Bilder, die sehr verschieden von den dort erzeugten waren und eine Probendominanz zeigten, wie sie in Dänemark nur bei einem Mischungsverhältnis von hoher Probemenge und geringer CuCl_2 -Konzentration pro Platte erhalten wurden. Um herauszufinden, welcher Faktor

für diese Änderung verantwortlich war, wurde eine Weizenprobe kristallisiert, die in Dänemark geschrotet wurde. Damit konnten die Bilder erzeugt werden, die vergleichbar mit der vorgegebenen Matrix waren. Es stellte sich heraus, dass die Korngrößenverteilung der von den Partnern verwendeten Mühlen, trotz gleichem Typ und Hersteller, verschieden war. Erst bei vergleichbarer Korngrößenverteilung des Mahlgutes konnten vergleichbare Bilder erhalten werden. Daraufhin wurde die Mühle durch eine standardisierte Labormühle (Retsch, Zentrifugalmühle ZM 100) ersetzt. Wie im Folgenden weiter gezeigt werden wird, ist das Ergebnis der Methode von einer Reihe weiterer Einflussgrößen bestimmt, deren Einfluss teilweise durch Änderung des Mischungsverhältnisses kompensiert werden kann. Das optimale Mischungsverhältnis ist also methodenspezifisch. Bilder, die mit einer anderen Methode (z.B. Änderung des Ausmahlungsgrades, der Extraktionsdauer oder der Bedingungen in der Kammer) bei gleichem Mischungsverhältnis erhalten werden, sind nicht vergleichbar.

Vermahlung mit Retsch ZM 100, Faktor Ringsieb

Da der Vermahlungsvorgang einen so großen Einfluss auf die Bilder hat, wurden in einem nächsten Versuch Ringsiebe mit unterschiedlichen Porendurchmessern verglichen. Es wurden zwei Typen von Ringsieben mit 0,5 und 1 mm Porendurchmesser verwendet. Da die Erwärmung des Mahlgutes bei 0,5 mm Porendurchmesser stärker war als bei 1 mm, wurden nur noch Ringsiebe mit 1 mm Porendurchmesser verwendet, um eine Beeinflussung der Probe während des Mahlvorganges zu minimieren.

Fazit:

Die Korngrößenverteilung des Mahlgutes hat einen großen Einfluss auf das Ergebnis der Methode. Sie muss bekannt sein und auf die jeweilige Prozedur (u.a. Mischungsverhältnis) eingestellt werden. Die Mühle ZM 100 von Retsch liefert eine reproduzierbare Korngrößenverteilung.

Extraktion, Faktor Extraktionsmenge

Als Ergebnis einer Reihe von Voruntersuchungen in BRAD wurde mit einer Einwaage von 10 % gearbeitet. Bedingt durch eine Wiederholung von

mindestens sechs Bildern pro Extrakt, muss eine ausreichende Menge (hier 450 mL) Kammerlösung hergestellt werden. Eine Einwaage von 10 % des Mahlgutes in Wasser erlaubte eine Extraktion auf dem Schüttler, wo das gesamte Mahlgut im Wasser verteilt wurde. Eine Erhöhung der Einwaage, bei gleicher Menge Extraktionsmittel, hatte zur Folge, dass sich das Mahlgut nicht mehr vollständig im Wasser verteilte und häufig manuell aufgeschüttelt werden musste. Dies war für einen Routinebetrieb mit der Methode nicht akzeptabel; eine Erhöhung der Menge an Extraktionsmittel bei Erhöhung der Einwaage an Mahlgut konnte aufgrund der Auslegung des Schüttlers nicht vorgenommen werden. Die Steigbildmethode arbeitete zunächst ebenfalls mit dem 10 %igen Extrakt. Es zeigte sich aber, dass für die Unterscheidung zweier Weizensorten (*Titlis* und *Tamaro*) diese Extraktmenge nicht ausreichte, um die auswertbaren morphologischen Bildelemente auszubilden (Zalecka 2006). Für die Steigbildmethode wurde daher eine Einwaage von 20 % vorgeschlagen und Extraktmengen von 10, 15 und 20 % auch für die Biokristallisation untersucht. Dafür wurden die beiden Weizensorten aus dem DOK-Versuch *Titlis* und *Tamaro* mit verschiedenen Extraktmengen kristallisiert. Im ersten Schritt wurde die Einwaage gegen den Rückstand im Extrakt nach dem Filtern (die Trockenmasse der Kammerlösung bei 105 °C, 12 h) aufgetragen. Für beide Weizensorten ergab sich einen positiven Zusammenhang ($r^2 = 0,999$). Je mehr Extraktmenge eingewogen wird, desto höher ist der Rückstand auf der Platte. Für die Untersuchungen wurde die Standardprozedur für Weizen verwendet, es wurde mit einem Mischungsverhältnis von 90/90 und einer 3 fachen Wiederholung gearbeitet. Für *diagonal moment* zeigt sich erst für größere Bildausschnitte (ROI 90) eine Abhängigkeit von der Extraktmenge ($r^2 = 0,9$), für ROIs 50 und 70 gibt es keine Abhängigkeit der Variablen von der Extraktmenge.

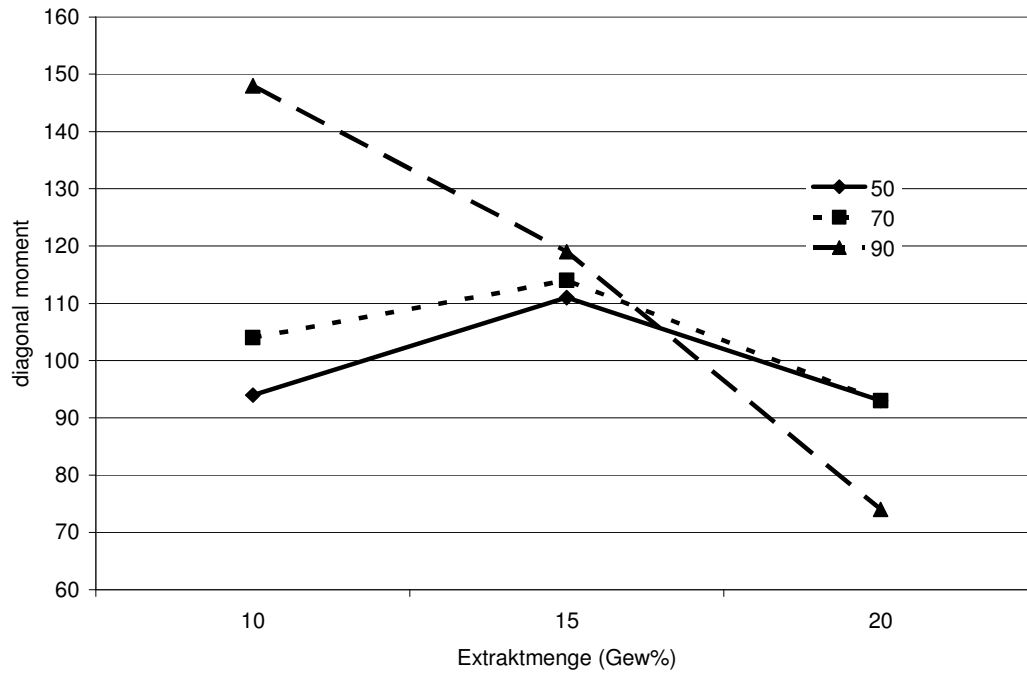


Abbildung 47: Variable *diagonal moment* für die Weizensorte *Tamaro* bei drei verschiedenen Extraktmengen (Einwaage 10, 15, 20 %) und drei ROIs.

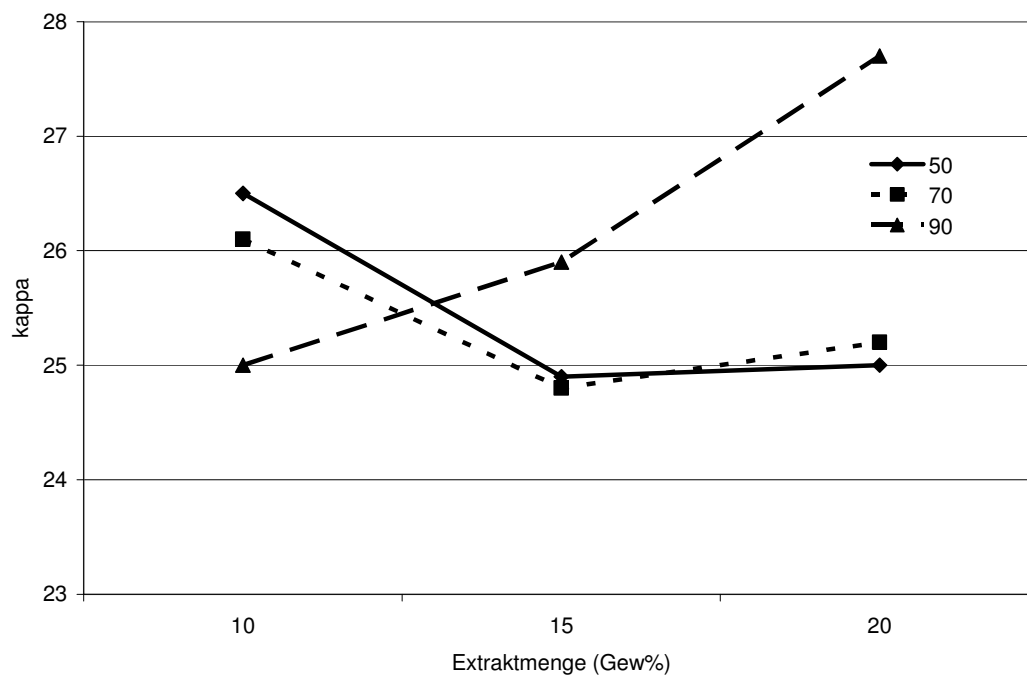


Abbildung 48: Variable *kappa* für die Weizensorte *Tamaro* bei drei verschiedenen Extraktmengen (Einwaage 10, 15, 20%) und drei ROIs.

Für *kappa* zeigt sich ein anderes Ergebnis: Während auch hier ein Zusammenhang der Variable mit der für die Extraktion eingewogenen Menge

für ROI 90 gefunden wird ($r^2 = 0,9$), ist der vorhandene Einfluss für kleinere Bildausschnitte offenbar nicht monoton steigend und unabhängig vom ROI. Das Ergebnis für *sum variance* zeigt keinen Effekt für ROI 50 und 70 (wie *diagonal moment*), aber einen Zusammenhang für ROI 90 ($r^2 = 0,9$). Für die Variablen *diagonal moment* und *sum variance* sind die Unterschiede zwischen den beiden Sorten, unabhängig von der Extraktmenge, vernachlässigbar. Die Variable *kappa* zeigt einen signifikanten Unterschied bei ROI 50 und 70 für alle drei Extraktmengen ($p < 0,05$). Bei ROI 90 ist der Unterschied nur bei einer Extraktmenge von 20 % vorhanden. Gerade dieser Bildausschnitt zeigt gleichzeitig die Abhängigkeit der Variable von der eingewogenen Extraktmenge. In diesem Zusammenhang muss die Abhängigkeit von Extraktmenge und dem Mischungsverhältnis beachtet werden. Der hier dargestellte Einfluss der Extraktmenge auf die Variablen zeigt sich in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis und ROI.

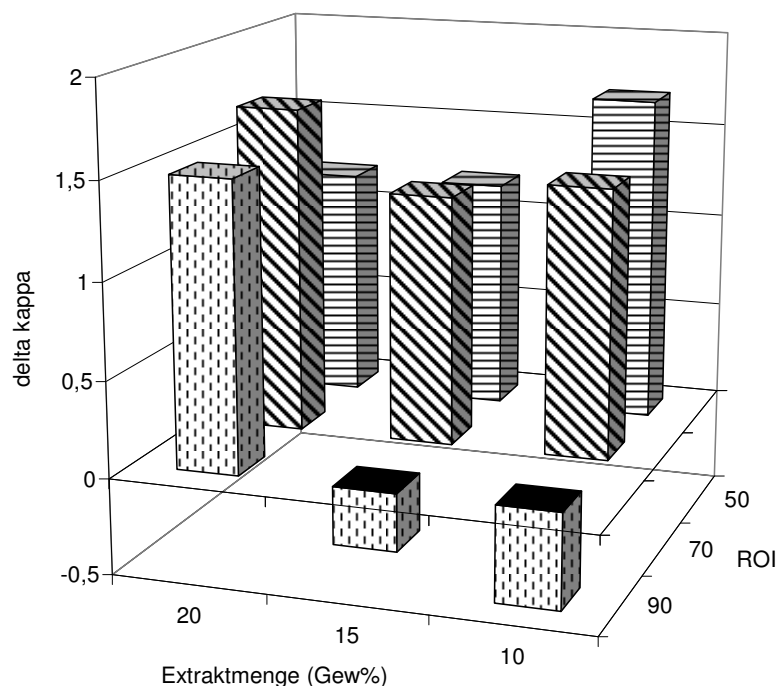


Abbildung 49: Differenz der Variable *kappa* für die Weizensorte *Tamaro/Titlis* bei drei verschiedenen Extraktmengen (Einwaage 10, 15, 20%) und drei ROIs.

Fazit:

1. Die Extraktmenge hat einen Einfluss auf das Ergebnis.
2. Dieser Einfluss hängt sowohl von den Variablen der Texturanalyse als auch von dem Bildausschnitt ab.
3. Unterschiede zwischen zwei Weizensorten sind für ROIs 50 und 70 signifikant und unabhängig von der Extraktmenge.
4. Der Zusammenhang zwischen Extraktmenge und Mischungsverhältnis muss beachtet werden.

Extraktion, Zusammenhang der Extraktionsmenge mit dem Mischungsverhältnis

Um den Zusammenhang zwischen Extraktionsmenge (Einwaage) und Mischungsverhältnis zu untersuchen, wurde die Weizenprobe K2 aus dem DOK-Versuch Ernte 2002 (Sorte *Tamaro*) mit drei verschiedenen Einwaagen des Mahlgutes (10, 15, 20 %) extrahiert und mit drei verschiedenen Mischungsverhältnissen (70/90, 90/90 und 110/90) kristallisiert. Der Versuch wurde wiederholt. Die Ergebnisse sind für die Variable *kappa* in den Abbildungen 50, 51 für die Bildausschnitte 50 und 90 % dargestellt. Für das bereits untersuchte Mischungsverhältnis 90/90 zeigt sich bei ROI 50 und 70 wieder der Einfluss der Extraktionsmenge, die Werte nehmen bei höheren Mengen ab. Offenbar hängt dieser Effekt vom gewählten Mischungsverhältnis ab, denn bei den benachbarten Punkten ist er nicht eindeutig. Interessant ist, dass erst bei einer Einwaage von 20% der Probenvektor eindeutig zu sehen ist. Es gibt einen Zusammenhang zwischen der Variable und der Menge an Probe pro Platte ($r^2 = 0,99$). Bei ROI 90 zeigt sich wieder die Umkehrung der Werte im Vergleich zu den beiden anderen ROIs für eine Einwaage von 20 %. Während eine Erhöhung der Extraktmenge für ROI 50 und 70 in einer Erniedrigung der Werte für *kappa* resultiert, führt die Erhöhung bei ROI 90 zu einer deutlichen Erhöhung. Dies scheint unabhängig vom Mischungsverhältnis zu sein (s. Abbildung 50). Auch für ROI 90 zeigt sich nur bei einer Einwaage von 20% der Probenvektor ($r^2 = 0,98$). Für die Variable *diagonal moment* zeigt sich der Probenvektor erst bei einer Einwaage von 20 % und einem ROI 90 eindeutig. Bei *sum variance* zeigt sich der Probenvektor bei allen drei Einwaagen und

ROIs. Auch hier kommt es zu der bereits bei *kappa* beobachteten Umkehrung zu ROI 90.

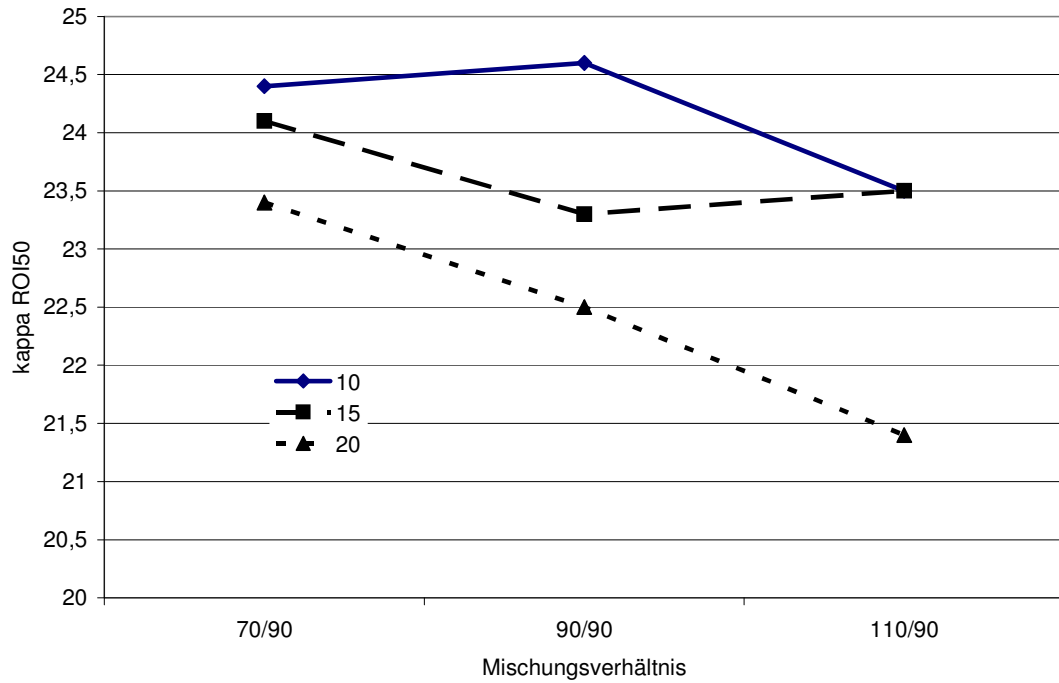


Abbildung 50: Variable *kappa* für die Weizenprobe K2 (DOK-Versuch 2002) bei drei verschiedenen Extraktmengen (Einwaage 10, 15, 20 %) und drei verschiedenen Mischungsverhältnissen und einem ROI 50.

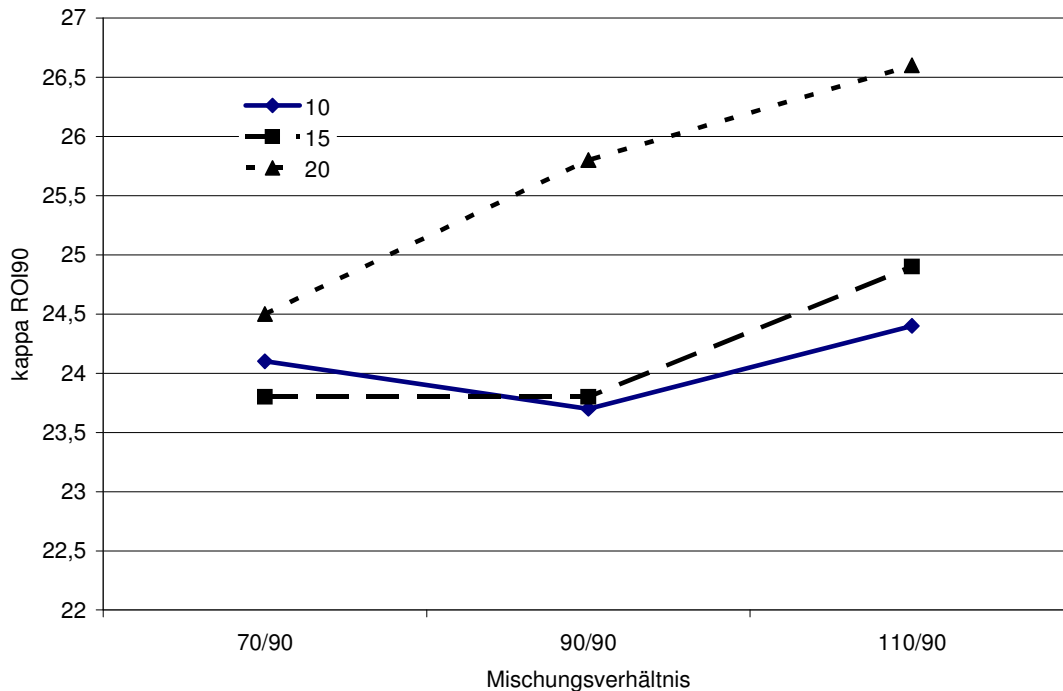


Abbildung 51: Variable κ für die Weizenprobe K2 (DOK-Versuch 2002) bei drei verschiedenen Extraktmengen (Einwaage 10, 15, 20 %) und drei verschiedenen Mischungsverhältnissen und einem ROI 90.

Fazit:

1. Der Einfluss der Extraktmenge auf das Ergebnis ist abhängig vom Mischungsverhältnis.
2. Der Zusammenhang zwischen Extraktmenge und Mischungsverhältnis ist abhängig von der Variable und dem Bildausschnitt.
3. Der Einfluss der Extraktmenge zeigt sich bei dem gewählten „optimalen“ Mischungsverhältnis am deutlichsten, ist aber über alle drei Mischungsverhältnisse stabil.
4. Ein Einfluss zunehmender Probenmenge pro Platte (Probenvektor) ist nur für eine Einwaage von 20% zu beobachten.

Extraktion, Extraktionsdauer

Das Mahlgut wird auf dem Schüttler 30 min extrahiert. Diese Extraktionsdauer brachte die beste Bildstruktur und das beste Trennungvermögen in Voruntersuchungen in BRAD. Um den Einfluss der Extraktionsdauer zu testen, wurde eine Weizenprobe (Herkunft ökologisch, tegut-Markt) einmal vermahlen

und in vierfacher Wiederholung unter gleichen Bedingungen parallel mit drei verschiedenen Zeiten (20, 40, 80 min) extrahiert. Jeder Extrakt wurde gefiltert, mit CuCl_2 -Lösung vermischt und mit einem Mischungsverhältnis von 90/90 bei einer mittleren Verdampfungszeit von 14 h kristallisiert.

Der Prozess der Extraktion ist ein kritischer Schritt in der Prozedur. Bei analytischen Methoden wird die Extraktion benutzt, um Stoffe aus der Matrix zu lösen. Bei der Biokristallisation werden nicht ein einzelner Stoff oder eine Stoffgruppe, sondern alle wasserlöslichen Bestandteile der gemahlene Probe kristallisiert. Daher kann der Erfolg der Extraktion nicht mit den für analytische Methoden üblichen Instrumentarien gemessen werden. Was letztlich vom Extrakt in Lösung geht und was davon die Kristallisation so beeinflusst, dass verschiedene Bilder für verschiedene Probe entstehen, ist bisher nicht untersucht worden und würde bei einer faktoriellen Herangehensweise (Prüfung sämtlicher Bestandteile einzeln und in Kombination) einen nicht vertretbaren Zeitaufwand benötigen. Daher wird der Einfluss der Extraktion auf die Variablen einer einzelnen Probe und auf das Unterscheidungsvermögen von zwei Weizenproben untersucht.

Die Proben D2 und K2 aus dem DOK-Versuch 2002 wurden mit einer Wiederholung parallel bei drei verschiedenen Zeiten (20, 40, 80 min) extrahiert. Während der Extraktion werden, wie für analytische Methoden auch, alle weiteren Faktoren entweder kontrolliert (Rotationsgeschwindigkeit des Schüttlers, Wasserqualität und -temperatur etc.) oder gemessen (pH-Wert, Leitfähigkeit des Extraktes und die Trockenmasse pro Kammerlösung und Probe).

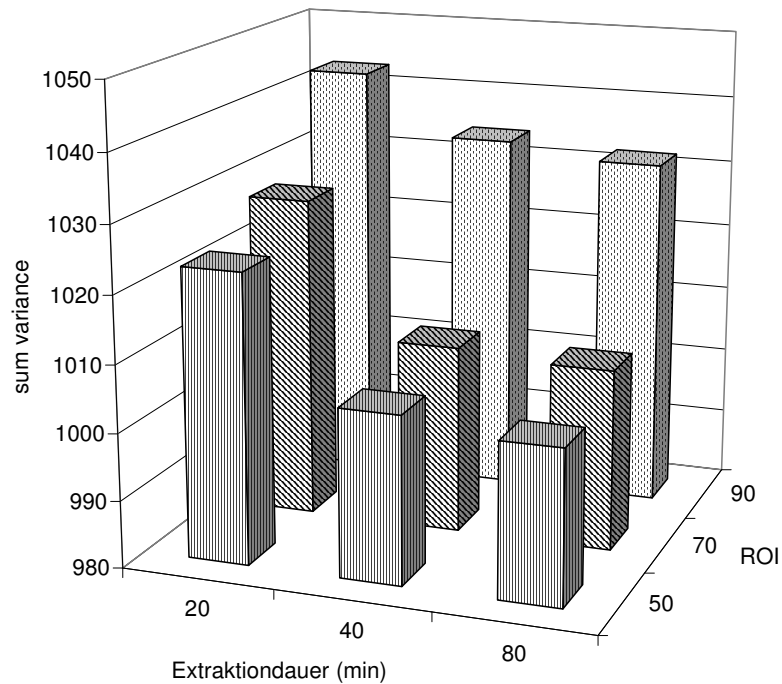


Abbildung 52: Variable *sum variance* für eine Weizenprobe bei drei verschiedenen Extraktzeiten (20, 40, 80min) und drei verschiedenen ROIs.

Für die Variable *sum variance* zeigt sich bei einer Weizenprobe aus dem ökologischen Handel eine Abnahme der Werte mit zunehmender Extraktionsdauer (s. Abbildung 52). Die Abnahme wird mit zunehmender Dauer schwächer, was auf einen Sättigungseffekt schließen lässt. Der Einfluss unterschiedlicher Dauer der Extraktion ist für *sum variance* und *diagonal moment* signifikant ($F = 10$, $p < 0,05$), wobei kein Unterschied zwischen 40 und 80 min besteht. Der Einfluss der Extraktionsdauer zeigt sich konstant über alle Bildausschnitte. Für *kappa* zeigt sich der Effekt vergleichbar, allerdings ist er für ROI 90 nicht eindeutig. Bei *diagonal moment* steigen die Werte mit zunehmender Extraktionsdauer an und zeigen ebenfalls den für *sum variance* und *kappa* beobachteten Sättigungseffekt.

Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem Einfluss steigender Extraktmengen, so reagieren die Variablen *kappa* und *sum variance* ähnlich: Sowohl bei steigender Extraktionsmenge, als auch bei höherer Dauer sinken die Werte signifikant. Dies lässt vermuten, dass beide Effekte, wie für eine Einzelstoffbetrachtung üblich, in dieselbe Richtung gehen. Je mehr Probe eingewogen wird oder je länger extrahiert wird, desto mehr wird dasjenige aus der Probe gelöst, was die

Bilder beeinflusst. Von Verursachung soll an dieser Stelle nicht gesprochen werden, da der Vorgang in der Lösung während der Verdampfung und bei der Kristallisation komplex und noch nicht genügend untersucht worden ist. Für die Variable *diagonal moment* ist dieser Vergleich allerdings nicht zulässig. Sie zeigt ein anderes Verhalten. Während für ROIs 50 und 70 keine eindeutige und monotone Abhängigkeit von der Extraktmenge gefunden werden konnte und diese erst bei ROI 90 auftrat, steigen die Werte bei zunehmender Extraktionsdauer für ROI 50 und 70 und zeigen den bei den beiden anderen Variablen beobachteten Sättigungseffekt.

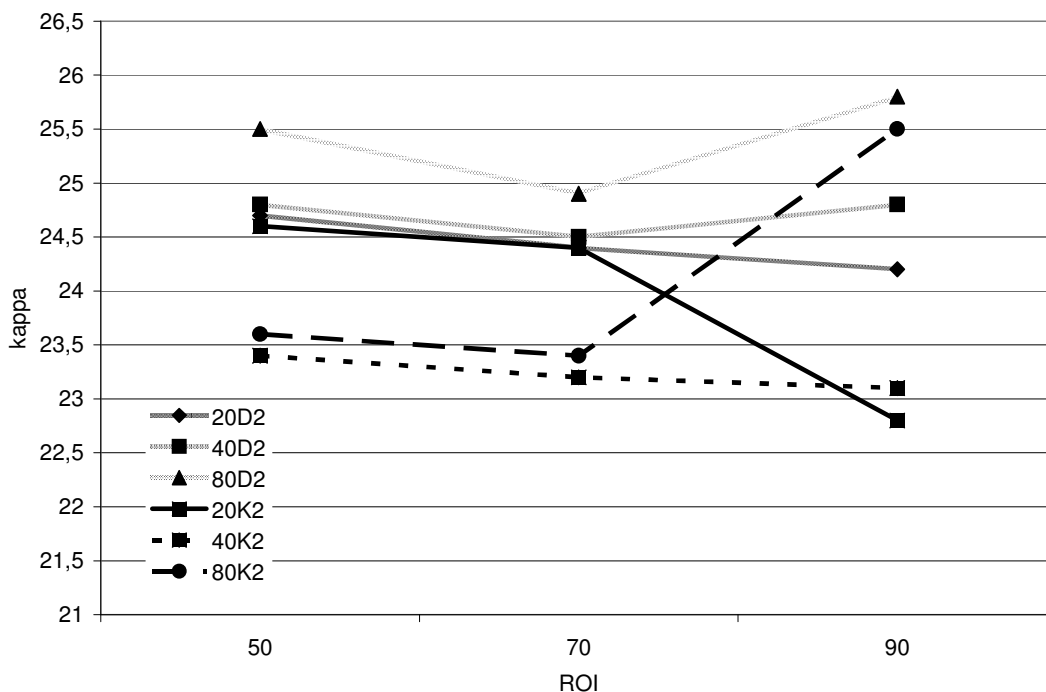


Abbildung 53: Variable *kappa* für zwei Weizenproben aus dem DOK-Versuch 2002 (D2, K2) bei drei verschiedenen Extraktzeiten (20, 40, 80min) über drei verschiedene ROIs.

Werden die beiden Proben aus dem DOK-Versuch parallel extrahiert, so zeigt die konventionelle Variante den bereits beschriebenen Effekt (s. Abbildung 53). Für ROI 50 und 70 sinken die Werte für *kappa*. Bei einem Bildausschnitt kommt es zu der beobachteten Umkehrung (s. Abbildung 53). Die ökologische Variante (D2) zeigt dagegen ein ganz anderes Verhalten. Die Werte für *kappa* steigen mit zunehmender Extraktionsdauer und sind über den Bildausschnitt stabil. Da der Versuch mit dem gleichen Ergebnis wiederholt wurde, kann es sich nicht um ein Artefakt handeln. Bisher gibt es aber keine eindeutige Erklärung dafür.

Als Ursache kann angenommen werden, dass die Matrix einen Einfluss auf das Extraktionsverhalten hat. Dasjenige, was während der Extraktion in die wässrige Phase überführt und die Kristallisation beeinflusst, ist evtl. unterschiedlich mit der Matrix verbunden. Die ökologischen Proben im DOK-Versuch haben im Allgemeinen ein geringeres N-Angebot während des Wachstums, was in niedrigeren Mengen an freien Aminosäuren und höheren Mengen sekundärer Pflanzenstoffe (z.B. Lutein) resultiert (Projekt 02OE170/F, BÖL). Für die Untersuchungen der Weizenproben im DOK-Versuch 2003 wurde der Trockenrückstand der Kammerlösung bestimmt. Dabei zeigte sich, dass nach dem Filtern der Rückstand bei den ökologischen Proben (besonders D2) deutlich geringer war als bei den konventionellen Proben (Projekt 02OE170/F, BÖL). Darüber hinaus ergaben sensorische Tests dieser Proben eine gröbere Struktur des Mahlgutes von ökologischen gegenüber konventionellen Proben des DOK-Versuches. Dies würde die oben genannte These bestätigen, dass die Art und Weise, wie die Probe durch unterschiedliche Wachstumsbedingungen entstanden ist, einen Einfluss auf den Aufbau des Untersuchungsmaterials hat, was einen Unterschied im Extraktionsverhalten zur Folge hat, der von der Biokristallisation sichtbar gemacht werden kann. Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass dem Extraktionsschritt mehr Aufmerksamkeit gewidmet werden muss. In folgenden Versuchen sollten daher verschiedene Extraktionsverfahren getestet werden.

Fazit:

1. Die Extraktionsdauer hat einen Einfluss auf das Ergebnis.
2. Mit zunehmender Dauer steigen die Werte für *diagonal moment* und sinken für *kappa* und *sum variance*, es kommt zu einem Sättigungseffekt.
3. Dieses Verhalten ist abhängig vom Bildausschnitt.
4. Das Extraktionsverhalten ist für die hier untersuchten Proben aus verschiedenen Anbausystemen im DOK-Versuch verschieden.
5. Das optimale Unterscheidungsvermögen für die untersuchten Proben ist bei einer Extraktionsdauer von 40 min.

Filterung, Porendurchmesser

In Voruntersuchungen in BRAD zeigte sich die Notwendigkeit, die Lösung nach dem Extrahieren zu filtern, um Störungen während der Kristallisation durch Reste des festen Rückstandes auf der Platte zu vermeiden. Je geringer der Porendurchmesser ist, desto geringer ist der Durchmesser des Rückstandes im Filtrat. Bei den hier verwendeten sehr kleinen Porendurchmessern von 10 μm , kann es zum Einfluss von Scherkräften kommen. Dieser Einfluss wurde nicht weiter untersucht, sondern es wurde getestet, wie groß der Einfluss von verschiedenen Porendurchmessern auf das Ergebnis ist. Dafür wurden folgende Filter parallel in einer dreifachen Wiederholung getestet:

1. Whatman 41, Porendurchmesser 20 μm und Whatman 40, Porendurchmesser ca. 10 μm , geliefert durch Frisette, DK-8400 Ebeltoft. Die Filter werden nacheinander eingesetzt.
2. Whatman 41, Porendurchmesser 20-25 μm .
3. Nylonsieb, Porendurchmesser 110 μm .

Die Untersuchung wurde mit den Proben D2 und K2 aus dem DOK-Versuch durchgeführt. Der Vergleich zwischen 1 und 3 wurde mit den Proben O2 und M aus der Ernte 2003 wiederholt und bestätigte das Ergebnis.

Der Einfluss von verschiedenen Porendurchmessern auf das Ergebnis ist für die Variable *kappa* in Abbildung 54 dargestellt. Je kleiner der Porendurchmesser, desto höher werden die Werte für *kappa*. Zwischen einem Porendurchmesser von 10 und 20 μm besteht kein Unterschied im Ergebnis, wenn ein Sieb mit einem Porendurchmesser von 110 μm verwendet wird, weicht das Ergebnis ab. Zusätzlich verdoppelt sich die Streuung von dem Filter zum Sieb, und die Streuung bei Verwendung des Siebes nimmt mit dem Bildausschnitt zu. Dieser Effekt kann auch für die Probe D2 beobachtet werden, ist dort aber nicht so stark wie für K2. Auch die Variable *sum variance* zeigt diesen Einfluss, wohingegen *diagonal moment* keinen eindeutigen Effekt zeigt.

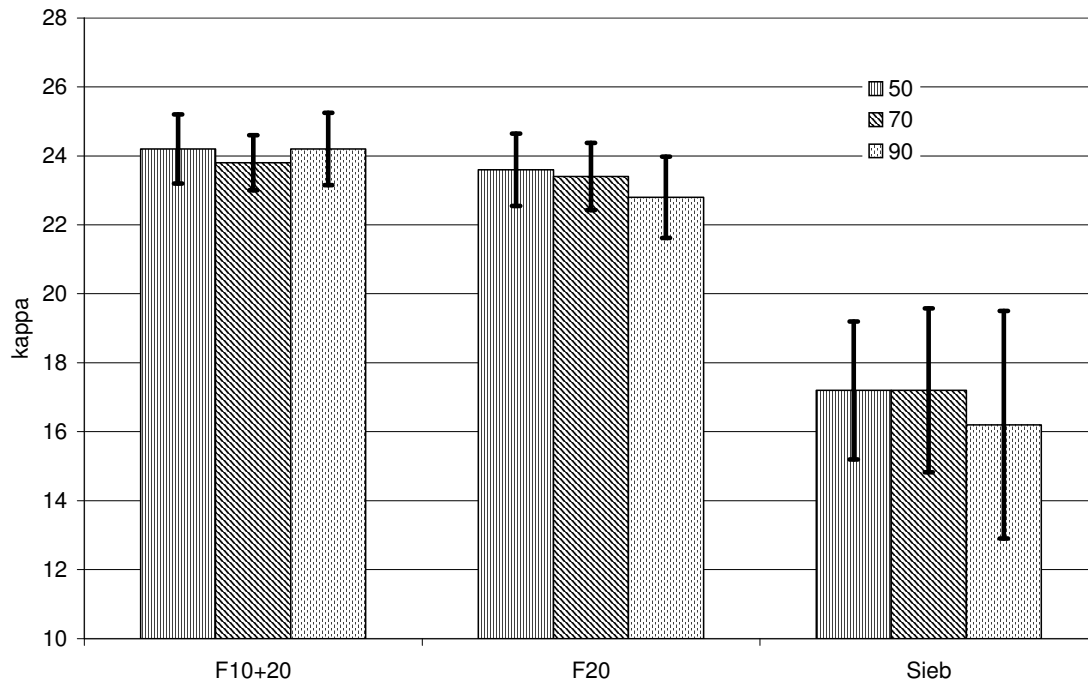


Abbildung 54: Variable *kappa* mit Standardabweichung für eine Weizenprobe aus dem DOK-Versuch 2002 (K2) bei drei verschiedenen Filtern (Porendurchmesser 10, 20 und 110 μm) und drei verschiedenen ROIs.

Der Einfluss des Porendurchmessers auf das Unterscheidungsvermögen zwischen den Proben D2 und K2 ist in Abbildung 55 dargestellt. Auf der z-Achse ist die Differenz der Variablen *kappa* der beiden Proben geteilt durch die Streuung aufgetragen. Trotz zunehmender Streuung ist das Unterscheidungsvermögen bei dem Sieb mit 110 μm Porendurchmesser am besten. Bei den beiden Filtern lassen sich die Proben nicht unterscheiden. Das Unterscheidungsvermögen bei dem Sieb ist für die beiden anderen Variablen allerdings mit dem vom Filter mit 10 μm Porendurchmesser vergleichbar; das Sieb bringt bei diesen Variablen keine Verbesserung. Da die Verbesserung des Unterscheidungsvermögens für *kappa* in einer Wiederholung des Vergleichs von Filter und Sieb mit Proben aus dem DOK-Versuch der Ernte 2003 aufgrund des limitierten Materials nicht wiederholt werden konnte, wurde weiter mit der Kombination der beiden Filter gearbeitet.

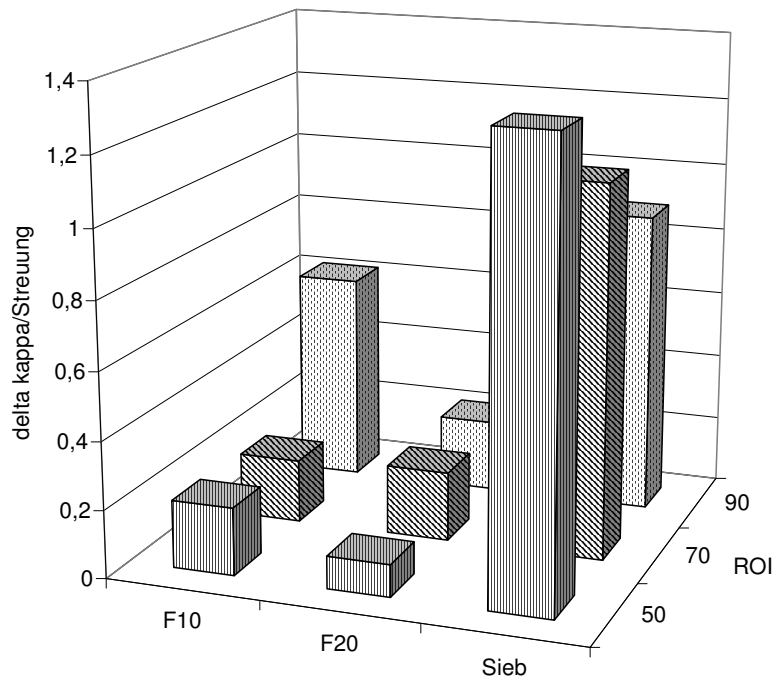


Abbildung 55: Differenz der Variable κ geteilt durch die Streuung für zwei Weizenproben aus dem DOK-Versuch 2002 (D2, K2) bei drei verschiedenen Filtern (Porendurchmesser 10, 20 und 110 μm) und drei verschiedenen ROIs.

Fazit:

1. Der Porendurchmesser des Filters hat einen Einfluss auf das Ergebnis für die untersuchten Variablen κ und sum variance und alle Bildausschnitte.
2. Je kleiner der Porendurchmesser des Filters, desto größer sind die Werte für die Variablen.
3. Filter mit Porendurchmesser von 10 und 20 μm zeigen einen vergleichbaren Einfluss. Da das Unterscheidungsvermögen vergleichbar ist, erscheint der zusätzliche Einsatz eines 10 μm Filters nicht nötig.
4. Der Einsatz eines Siebes bringt keine eindeutige Verbesserung des Trennungsvermögens. Die Streuungen der Werte verdoppeln sich für die untersuchten Variablen im Vergleich zum Filter. Die Streuung nimmt mit dem Bildausschnitt zu.

8.2.2 Faktor Mischungsverhältnis

Der Einfluss des Mischungsverhältnisses auf die Ergebnisse der Biokristallisation wurde bereits im Überblick im Kapitel 7 behandelt. Im Folgenden werden die Ergebnisse von Untersuchungen mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen an Weizenproben dargestellt, wobei als Ergebnis sowohl die einzelne Variable, als auch das Trennungsvermögen behandelt wird. Dabei werden nur Ergebnisse der Texturanalyse diskutiert. Die bereits im vorherigen Kapitel im Zusammenhang mit der Extraktmenge behandelten Ergebnisse zum Einfluss des Mischungsverhältnisses werden an dieser Stelle nicht noch einmal behandelt.

In einem Versuch über mehrere Tage wurden die Weizenproben O2 und M des DOK-Versuches, Ernte 2003 mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen kristallisiert. Dabei wurde sowohl die Menge an Probe als auch an CuCl_2 pro Platte variiert. Der Versuch wurde in einer 4fachen Wiederholung durchgeführt und zum einen der Einfluss unterschiedlicher Mischungsverhältnisse auf die ausgewählten Variablen untersucht, als auch auf das Unterscheidungsvermögen zwischen den beiden Proben. Im Folgenden sind die Ergebnisse für die drei ausgewählten Variablen der Texturanalyse und die drei ausgewählten Bildausschnitte dargestellt. Für den Einfluss auf die einzelnen Variablen einer Probe werden nur die Ergebnisse für die ökologische Probe (O2) gezeigt; die Probe aus konventionellem Anbau unterscheidet sich in ihrem Verhalten unterschiedlichen Mischungsverhältnissen gegenüber nicht. Mit zunehmender Menge an Probe pro Platte (Probenvektor) verändert sich das Kristallisationsverhalten. Während des Verdampfungsprozesses kommt mehr Probe zum Rand der Platte und sorgt dort für eine Probendominanz, die als Substanzspiralen visuell sichtbar werden. Je mehr Probe auf die Platte kommt, desto weniger stark werden die Nadelzüge; die Dichte der Seitennadeln nimmt zu, und Substanzspiralen erscheinen zunächst als konzentrische Ringe um das Zentrum herum, deren Häufigkeit und Dichte mit zunehmender Probenmenge steigen. Dies kann visuell an den Bildern beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führt eine zunehmende Menge an CuCl_2 pro Platte zu einer Konzentration an CuCl_2 um das Zentrum der Kristallisation herum, es treten filzartige Flechtwerke auf (sog. *Dense-radial-formation*, s. Anhang). Eine weitere Erhöhung der CuCl_2 Menge verstärkt diesen Effekt. Wie in Andersen et al.

(2003) bereits beschrieben haben, gibt es ein in der Matrix diagonal verlaufendes Strukturband optimaler Bilder. Im Folgenden gilt es auch zu prüfen, ob diese Phänomene durch die Texturanalyse abgebildet werden.

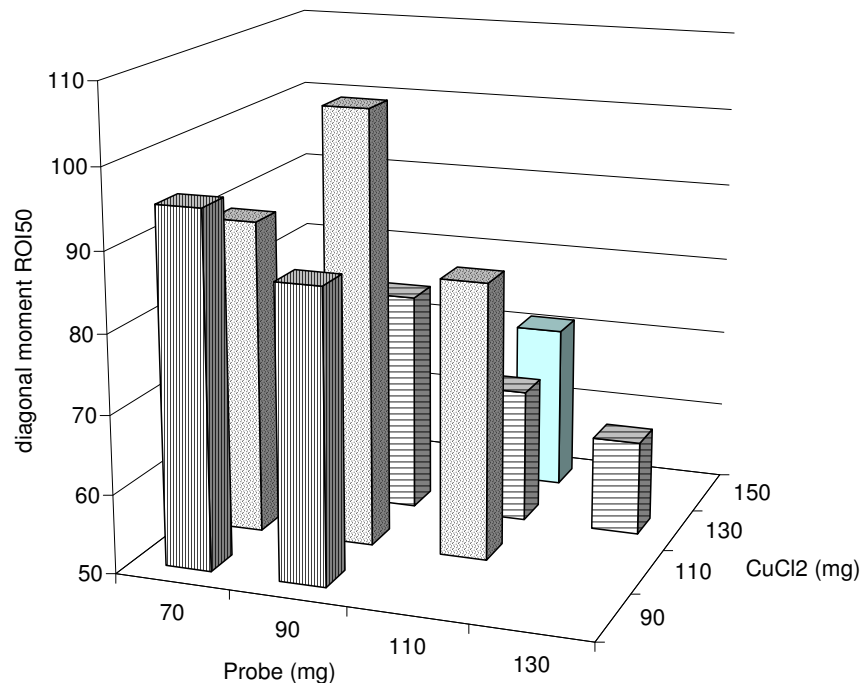


Abbildung 56: Variable *diagonal moment* für die Weizenprobe O2 aus dem DOK-Versuch 2003 bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROI 50.

Die Variable *diagonal moment* reagiert bei ROI 50 auf unterschiedliche Mischungsverhältnisse. Für CuCl₂-Mengen von 90 und 130 mg pro Platte sinkt der Wert mit zunehmender Probenmenge. Dies gilt nicht für eine Menge von 110 mg. Mit zunehmender Menge an CuCl₂ pro Platte sinkt der Wert für *diagonal moment* außer für ein Mischungsverhältnis von 90/110. Der Bildausschnitt 70 % zeigt ein ähnliches Verhalten, wobei für ROI 90 gerade das Mischungsverhältnis 90/110 herausfällt. Im Gegensatz zu einem Bildausschnitt von 50 und 70 % zeigt sich hier ein monotonen Absinken der Werte mit zunehmender Stoffmenge, wie es sonst nur bei den beiden anderen CuCl₂-Mengen zu sehen ist. Im Verlauf zunehmender CuCl₂-Menge sind die Werte für 110 mg wesentlich höher als für die beiden benachbarten Punkte.

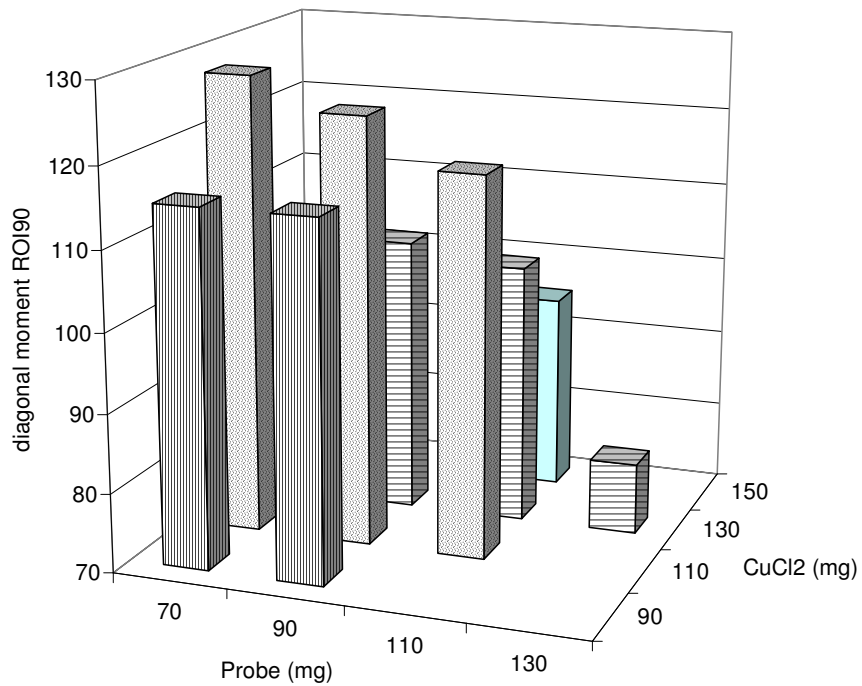


Abbildung 57: Variable *diagonal moment* für die Weizenprobe O2 aus dem DOK-Versuch 2003 bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROI 90.

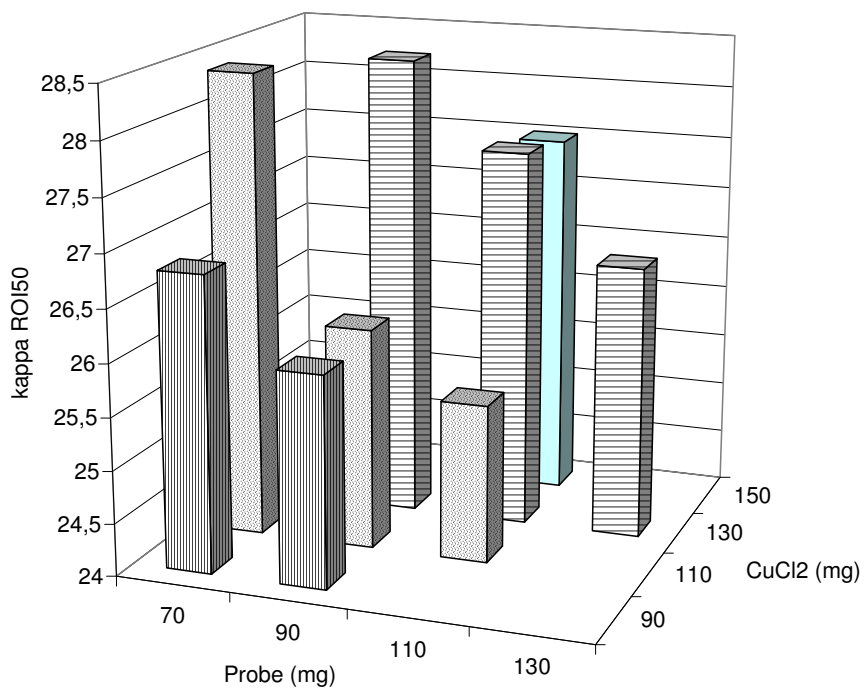


Abbildung 58: Variable *kappa* für die Weizenprobe O2 aus dem DOK-Versuch 2003 bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROI 50.

Für die Variable *kappa* zeigt sich ein anderes Bild. Auch hier sinken zwar die Werte mit zunehmender Probenmenge, steigen aber mit zunehmender CuCl₂-Menge pro Platte an. Die Bildausschnitte 50 und 70 % sind vergleichbar. Das Mischungsverhältnis 90/110 fällt erst bei einem Bildausschnitt von 90 % heraus.

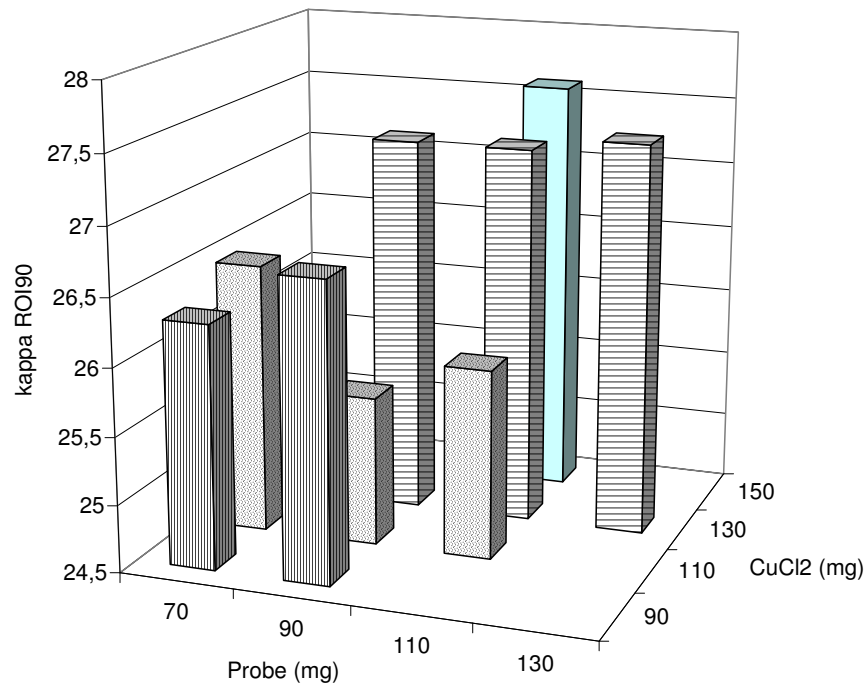


Abbildung 59: Variable *kappa* für die Weizenprobe O2 aus dem DOK-Versuch 2003 bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROI 90.

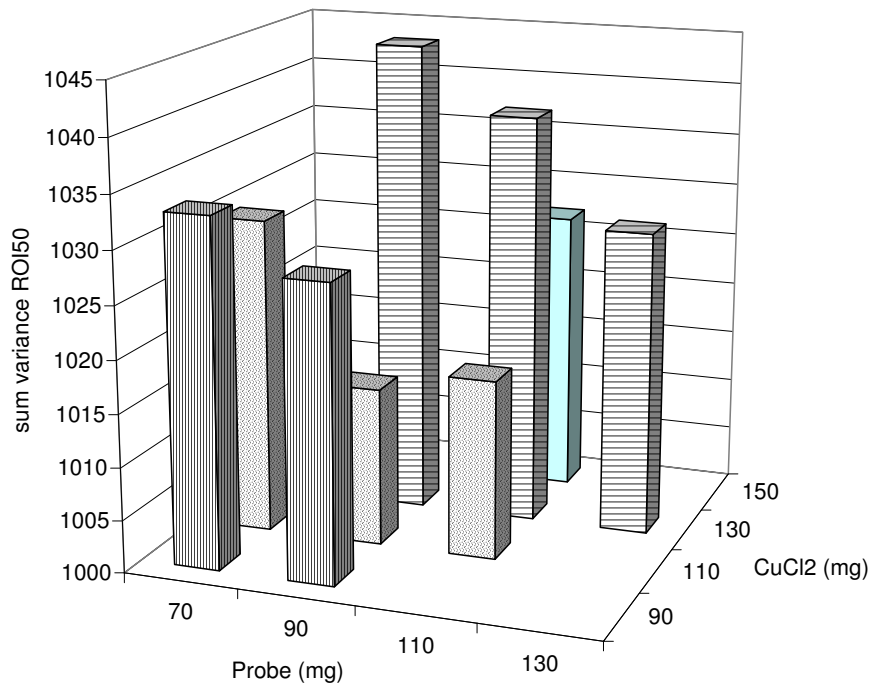


Abbildung 60: Variable *sum variance* für die Weizenprobe O2 aus dem DOK-Versuch 2003 bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROI 50.

Für *sum variance* zeigt sich bei ROI 50 und 70 zwar auch ein Absinken der Werte bei zunehmender Probenmenge, der Einfluss verschiedener CuCl_2 -Mengen pro Platte führt aber nicht zu einem monotonen Verhalten der Variable, sondern zeigt ein Verhalten, wie es bei *kappa* erst bei einem Bildausschnitt von 90 % zu sehen und umgekehrt zu dem Verhalten von *diagonal moment* ist. Die Reaktion der Variable auf die verschiedenen Mischungsverhältnisse ist für *sum variance* über die drei Bildausschnitte stabil, lediglich für eine CuCl_2 -Menge von 130 mg nimmt der Wert mit zunehmender Probenmenge nicht mehr ab, sondern zu.

Damit können die visuell sichtbaren Effekte der Matrix für verschiedene Mischungsverhältnisse, wie sie in Andersen et al. (2003) beschrieben worden sind, für die Texturanalyse nicht bestätigt werden. Ein Probenvektor (monotones Verhalten mit Änderung der Probenmenge) ist für die Variablen *kappa* und *sum variance* zu sehen, wobei der Effekt bei einem Bildausschnitt von 90% verschwindet. Auch *diagonal moment* zeigt diesen Effekt bei 130 mg CuCl_2 , für eine Menge von 110 mg pro Platte gilt dies aber nicht. Damit ist die Antwort der Methode auf Änderungen im Mischungsverhältnis, bezogen auf die

Auswertung mit der Texturanalyse, nicht eindeutig. Ergebnisse, die mit verschiedenen Mischungsverhältnissen erzeugt worden sind, können damit nicht verglichen werden. Es bleibt zu prüfen, wie sich andere Weizenproben (Sorten, Wachstumsbedingungen, Verarbeitung) in der Matrix verhalten und ob andere Stellen in der Matrix (z.B. höhere Mengen an Probe und CuCl_2) die Eindeutigkeit bringen. Um zu zeigen, wie der Effekt unterschiedlicher Mischungsverhältnisse auf das Trennungsvermögen ist, wurde die Differenz der beiden Proben (O2-M) gebildet und für die verschiedenen Mischungsverhältnisse aufgetragen.

Mit allen drei Variablen können die beiden Proben unterschieden werden. Dabei hängt das Unterscheidungsvermögen sowohl von der Probenmenge, als auch von der Menge an CuCl_2 pro Platte ab. Die Variable *diagonal moment* ordnet die beiden Proben umgekehrt zu *kappa* und *sum variance*. Sowohl für eine Probenmenge von 110 mg als auch eine Menge an CuCl_2 von 110 mg ist das Unterscheidungsvermögen für *diagonal moment* am schlechtesten. Für *kappa* und *sum variance* gilt dies nur für den CuCl_2 -Vektor, wobei hier eine Erniedrigung der Probenmenge von 90 auf 70 mg eine starke Verbesserung bei *kappa* bringt. Interessanterweise zeigen die für visuell „optimale“ Bilder ausgewählten Mischungsverhältnisse auch ein gutes Unterscheidungsvermögen. Wird, bei gleicher Probenmenge, die Menge an CuCl_2 pro Platte von 130 auf 150 mg erhöht, lassen sich die beiden Proben nicht mehr unterscheiden. Für dieses Mischungsverhältnis steigt das Unterscheidungsvermögen allerdings bei einem Bildausschnitt von 90 % für alle Variablen. Die Variablen *kappa* und *sum variance* zeigen sonst gegenüber Änderungen im ROI ein stabiles Verhalten. Nur bei *diagonal moment* sinkt das Unterscheidungsvermögen für Probenmengen von 70 mg bei ROI 90.

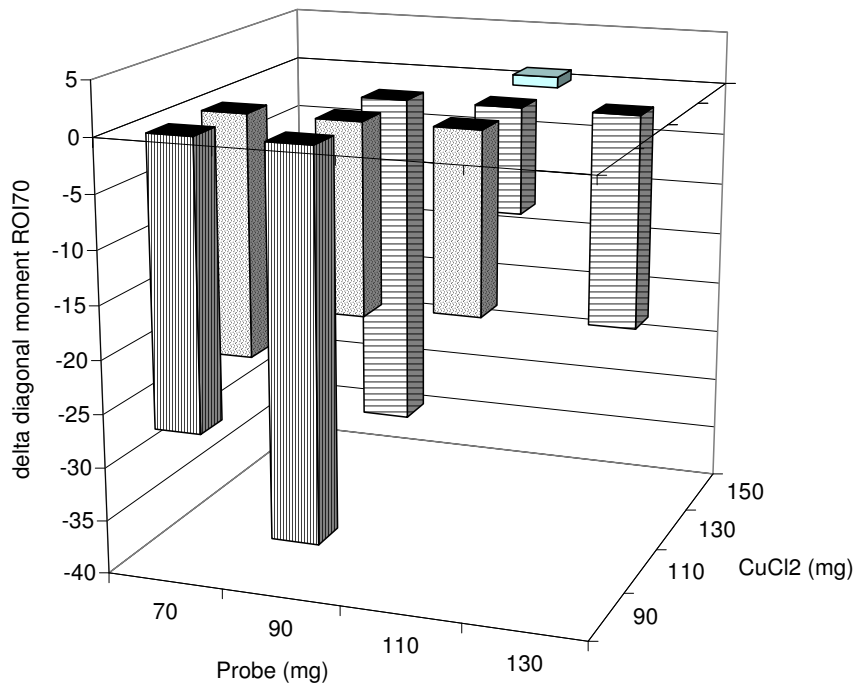


Abbildung 61: Differenz der Variable *diagonal moment* für zwei Weizenproben aus dem DOK-Versuch 2002 (O2, M) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROI 70.

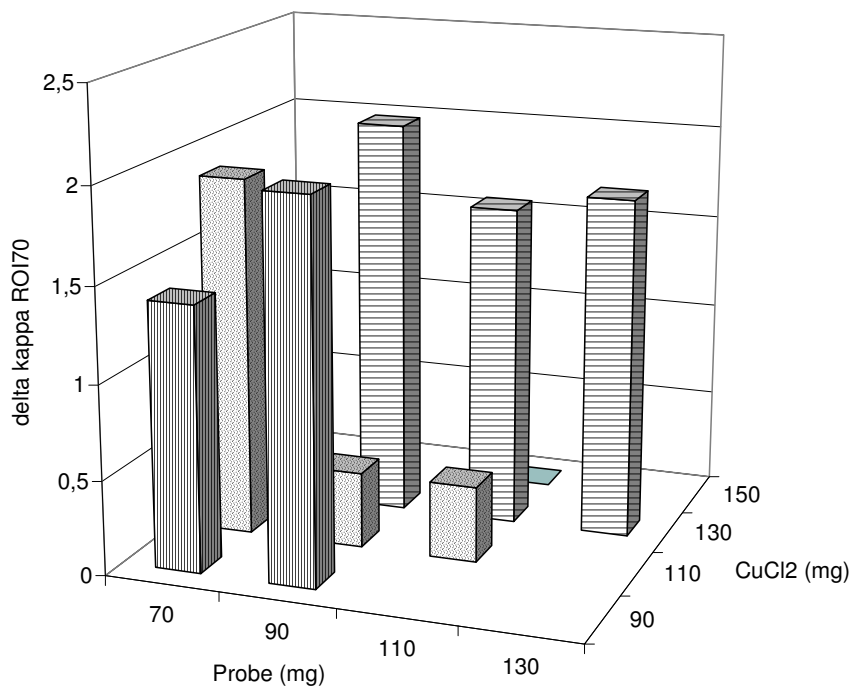


Abbildung 62: Differenz der Variable *kappa* für zwei Weizenproben aus dem DOK-Versuch 2002 (O2, M) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROI 70.

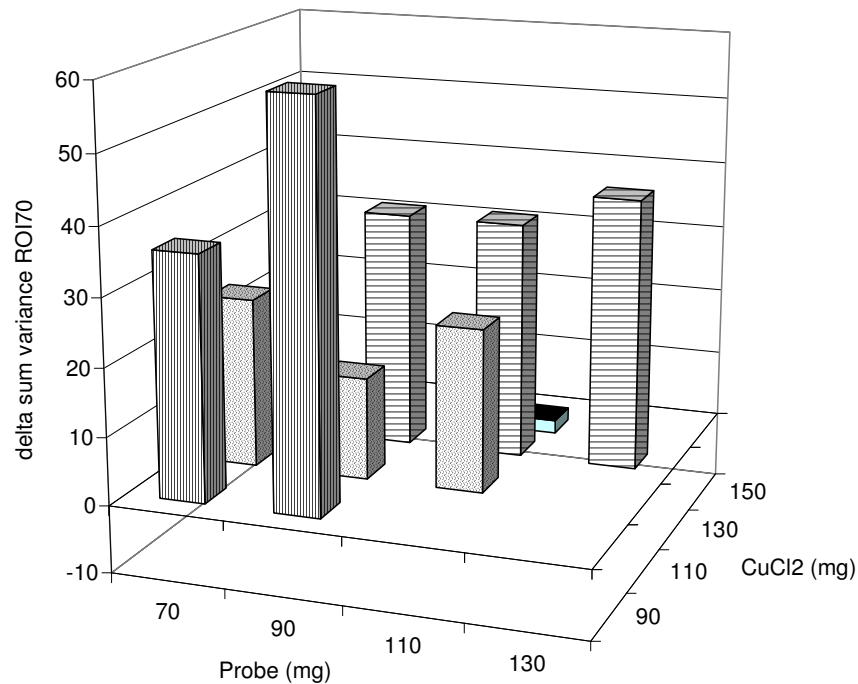


Abbildung 63: Differenz der Variable *sum variance* für zwei Weizenproben aus dem DOK-Versuch 2002 (O2, M) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROI 70.

Die starke Abhängigkeit sowohl der Variablen, als auch des Unterscheidungsvermögens von dem Mischungsverhältnis kann auch für die Kriterien der visuellen Bildauswertung beobachtet werden. In der Literatur ist beschrieben, dass sich die unterschiedlichen Einflüsse auf die Qualität der Probe während des Wachstums (Klima, Boden, Düngung, Sorte), der Behandlung (Lagerung, Transport, Reinigung) und der Verarbeitung (Vermahlung, Backprozess) für die visuelle Bildauswertung in Abhängigkeit von dem Mischungsverhältnis zeigen (vgl. Pettersson 1969). Es erscheint daher sinnvoll, anstatt nur mit einem Mischungsverhältnis, mit drei verschiedenen Mischungsverhältnissen gleichzeitig zu arbeiten. Dann kann auch untersucht werden, ob das hier beschriebene Verhalten dieser beiden Proben generell gilt oder abhängig von den äußeren Einflüssen auf die Probe ist. Im ersten Fall kann man sich auf ein Mischungsverhältnis beschränken, im zweiten Fall kann die Information nur bekommen werden, wenn mehrere Mischungsverhältnisse zum Einsatz kommen. Ob mit einem Proben- oder mit einem CuCl_2 -Vektor gearbeitet werden sollte, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht entschieden werden. Wie bereits gezeigt (s. Kapitel 7), hängt das Verhalten der Variablen auf verschiedene Mischungsverhältnisse sowohl von der Art und

Weise der Probenvorbereitung, als auch den Bedingungen in der Kammer ab. Dies muss bei der Betrachtung zum Einfluss unterschiedlicher Mengen an Probe und CuCl_2 beachtet werden, d.h. eine Übertragung der Ergebnisse auf andere Kammern ist nicht ohne weiteres zulässig.

Die Frage, inwieweit das hier gezeigte Ergebnis auch für die Unterscheidung verschiedener Weizensorten gilt, wurde anhand der beiden Sorten *Titlis* und *Tamaro* untersucht. Beide Sorten wurden mit drei verschiedenen Mischungsverhältnissen (Probenvektor) parallel kristallisiert, der Versuch wurde wiederholt. Das Unterscheidungsvermögen hängt dabei für alle drei ausgewählten Variablen sowohl von der Menge an Probe pro Platte, als auch vom Bildausschnitt ab. Die Variable *diagonal moment* ist für die Unterscheidung der beiden Sorten nicht geeignet, lediglich bei einem Mischungsverhältnis vom 110/90 und einem ROI 90 können die Proben getrennt werden. Für *kappa* zeigt sich, dass die relative Zuordnung der Proben stark sowohl vom Mischungsverhältnis, als auch vom Bildausschnitt abhängt (s. Abbildung 64). Die Ergebnisse für ein Mischungsverhältnis von 70/90 sind umgekehrt zu den beiden anderen. Während mit zunehmendem Bildausschnitt für 70/90 das Unterscheidungsvermögen abnimmt, steigt es für die beiden anderen (90/90 und 110/90). Dies gilt in ähnlicher Weise auch für die Variable *sum variance*. Dieses Verhalten ist auf die unterschiedliche Reaktion der Sorten auf ansteigende Mengen an Probe pro Platte zurückzuführen. Während die Sorte *Titlis* auf den Probenvektor nicht anspricht ($r^2 = 0,06$), sinken die Werte für *kappa* mit zunehmender Menge an Probe für *Tamaro* ($r^2 = 0,9$; s. Abbildung 65). Dieses Ergebnis spricht für die Verwendung mehrerer Mischungsverhältnisse parallel, da sich offenbar durch den Probenvektor eine Antwort der Methode zeigt, die bei nur einem Mischungsverhältnis nicht zu bekommen wäre.

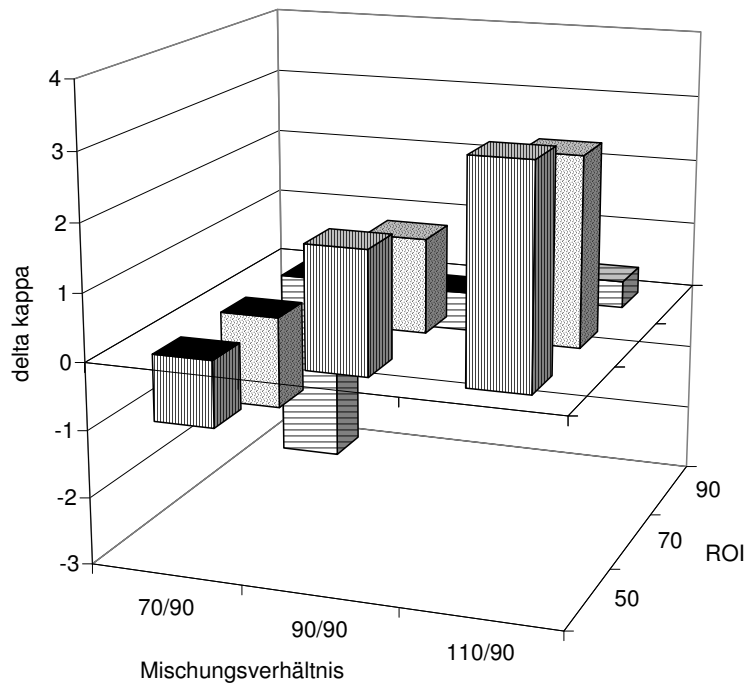


Abbildung 64: Differenz der Variable κ für zwei Weizensorten (*Titlis*, *Tamaro*) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROIs.

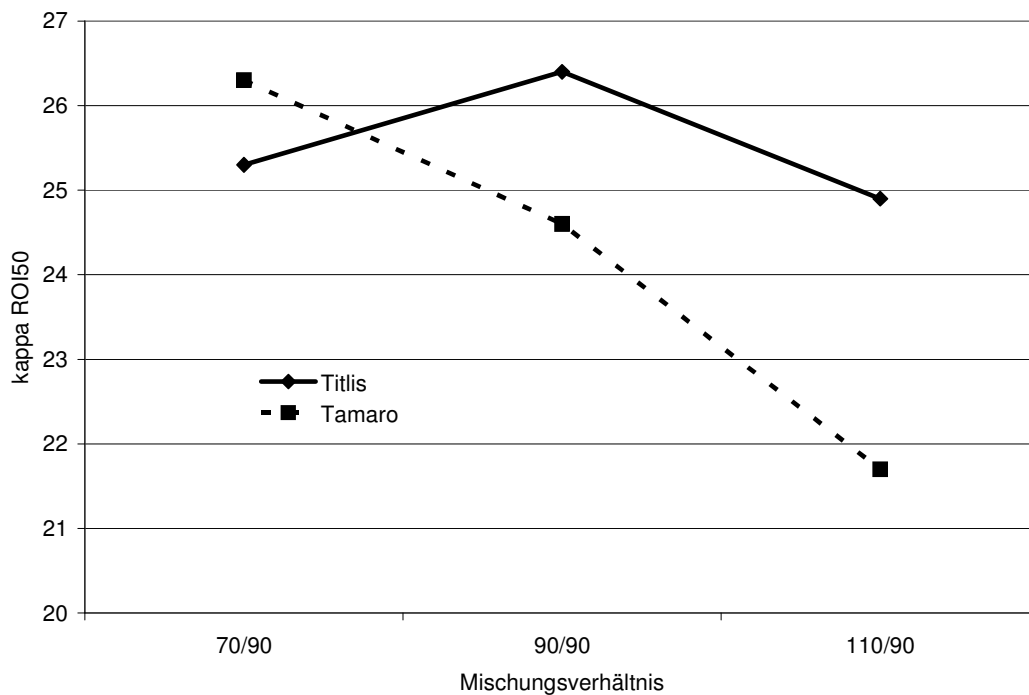


Abbildung 65: Variable κ für zwei Weizensorten (*Titlis*, *Tamaro*) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROI 50.

Wird die Menge an Mahlgut zur Extraktion von 10 auf 15 % erhöht, so ergibt sich ein ähnliches Ergebnis. Das Unterscheidungsvermögen steigt mit zunehmender Probenmenge pro Platte. Bei einer Erweiterung des Bildausschnittes von 70 auf 90 % kommt es zur Umkehrung der relativen Zuordnung der Proben (s. für κ in Abbildung 66). Auch für 15 % Einwaage zeigt *Titlis* keine Reaktion auf steigende Mengen an Probe, während *Tamaro* wieder mit einem Probenvektor (monoton fallende Werte bei steigender Menge) antwortet.

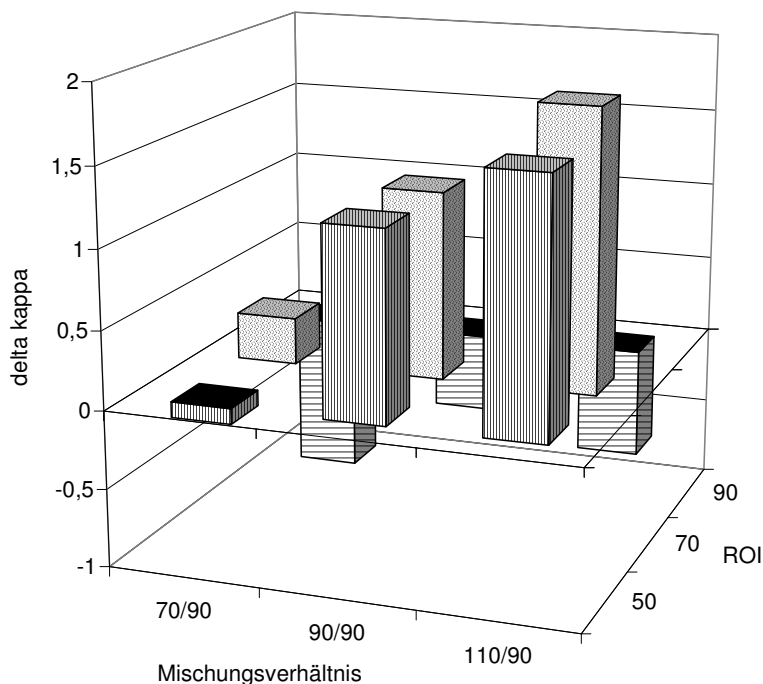


Abbildung 66: Differenz der Variable κ für zwei Weizensorten (*Titlis*, *Tamaro*) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROIs und einer Einwaage zur Extraktion von 15 %.

Fazit:

1. Alle Variablen reagieren stark auf Änderungen des Mischungsverhältnisses.
2. Der Einfluss des Mischungsverhältnisses hängt sowohl von der Probe, als auch vom Bildausschnitt ab.
3. Es gibt einen Einfluss sowohl der Probenmenge bei gleicher CuCl_2 -Menge (Probenvektor), als auch der CuCl_2 -Menge bei gleicher Probenmenge (CuCl_2 -Vektor).

4. Der Einfluss des Mischungsverhältnisses hängt von der Behandlung der Probe ab und ist nicht eindeutig.
5. Das Unterscheidungsvermögen hängt ebenfalls vom Mischungsverhältnis ab und kann durch veränderte Probenmengen und/oder CuCl_2 -Mengen pro Platte verbessert werden.
6. Die parallele Kristallisation einer Probe mit mehreren Mischungsverhältnissen kann die Aussage der Methode verbessern.

8.2.3 Faktor Scannen

Die Platten werden nach dem Kristallisieren und einer Trocknungszeit von eins bis zwei Tagen in der Aussenkammer, die ein geregeltes Klima hat, gescannt. Beim Scannen werden die Platten relativ zum Kristallisationszentrum ausgerichtet. Dabei kann es zu gerätebedingten Schwankungen der Farbsättigung kommen, die mit einem bei jedem Mal mitlaufenden Referenzdia (Kodak IT8) erfasst wird. Die leichte Verschiebung des Kristallisationszentrums von der Mittelachse beim Auflegen auf den Scanner kann ebenfalls zu Schwankungen führen. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurden zwei Platten mit der gleichen Weizenprobe aber verschiedenem Mischungsverhältnis in vier verschiedenen Winkeln relativ zum Kristallisationszentrum (0, 90, 180, 270 °) aufgelegt. Der Versuch wurde viermal wiederholt. Der Einfluss verschiedener Winkelstellungen auf das Ergebnis nimmt mit dem Bildausschnitt zu. Er ist unabhängig vom Mischungsverhältnis vorhanden und für Bildausschnitte kleiner als 70 % vernachlässigbar. Das Ergebnis ist für ein Mischungsverhältnis und die Variable κ beispielhaft in Abbildung 67 dargestellt.

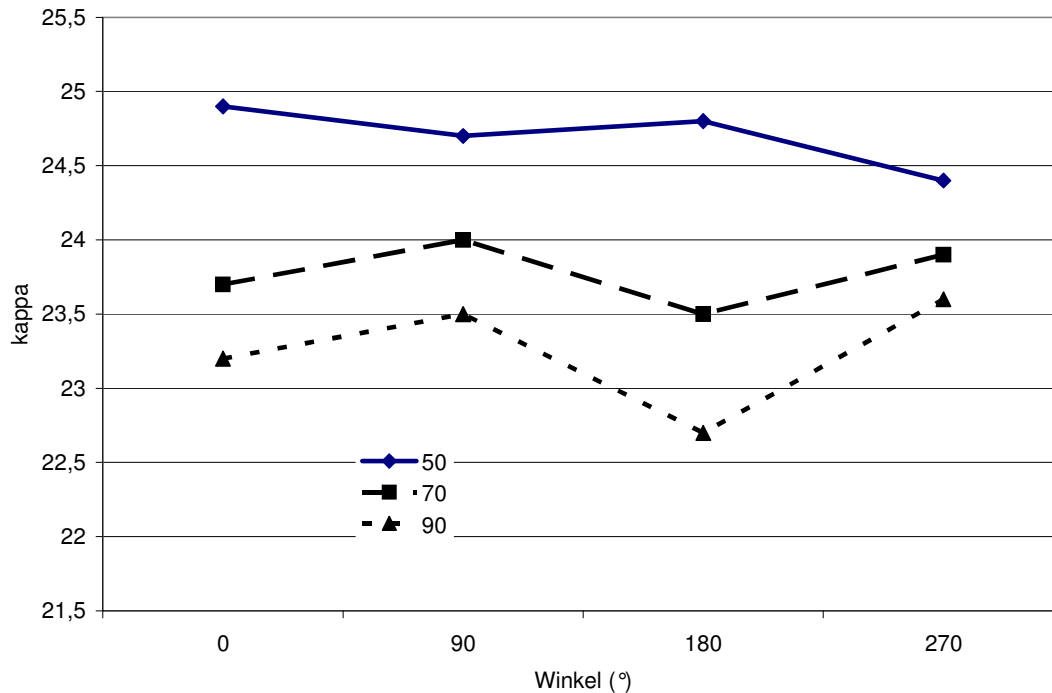


Abbildung 67: Variable κ für eine Platte einer Weizenprobe bei verschiedenen Winkeln relativ zum Kristallisationszentrum während des Scannens und ROIs.

8.2.4 Faktor Lagerung der Platten

Die Platten werden nach dem Scannen pro Kammer (43 Platten) übereinander gestapelt, wobei zwischen die Bilder Filterringe gelegt werden, um eine Beeinflussung der Kristalle zu vermeiden. Anschließend werden die Bilder eines Versuchstages (im Allgemeinen also von zwei Kammern) in einem Karton in der Aussenkammer aufbewahrt. Hier sind Feuchte und Temperatur so geregelt, dass es nicht zu einer Veränderung der Bilder kommen sollte. Um zu sehen, ob eine Lagerung von mehreren Monaten die Ergebnisse beeinflussen, wurden die Bilder von zwei Kammern nach vier Monaten noch einmal gescannt und mit der Texturanalyse ausgewertet. Die Ergebnisse sind für *diagonal moment* in Abbildung 68 dargestellt. Die beiden anderen Variablen verhalten sich umgekehrt zu *diagonal moment*, aber vergleichbar, *sum variance* zeigt keine Abhängigkeit von der Kammer. Auch nach mehreren Monaten sind die Bilder, visuell betrachtet, ohne Veränderung. Die Texturanalyse erkennt eine leichte Zunahme der Werte, die bei kleinen Bildausschnitten größer ist. Bilder, die mehrere Monate gelagert wurden, lassen sich also nicht ohne weiteres mit

aktuellen Bildern vergleichen. Dies begründet auch das Einscannen in konstantem Zeitabstand nach dem Kristallisieren.

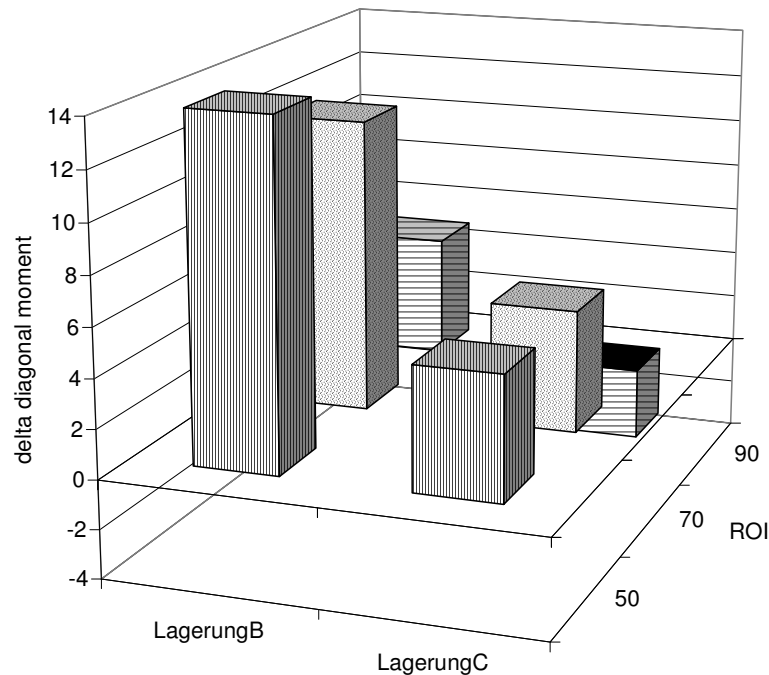


Abbildung 68: Differenz der Variable *diagonal moment* der Lagerung von je 43 Weizenplatten über einen Zeitraum von vier Monaten in Abhängigkeit von der Kammer und dem ROI.

Fazit:

1. Der Winkel relativ zum Kristallisationszentrum beim Scannen beeinflusst das Ergebnis nur unwesentlich, ist aber abhängig vom Bildausschnitt.
2. Platten können mindestens über einen Zeitraum von mehreren Monaten gelagert werden.

8.3 Einflussgrößen bei der Biokristallisation von Möhrenproben

Es wurden folgende Faktoren untersucht:

8.3.1 Faktoren während der Probenaufbereitung

Faktor Entsafter

Zur Bestimmung des Einflusses unterschiedlicher Entsafter wurden folgende Verfahren an einer Möhrenprobe getestet, um zu sehen, welcher Entsafter für

die Probenvorbereitung von Möhren ein für diese Probenart charakteristisches Muster liefert:

1. Entsaften mit einer Handpresse (bisheriges Verfahren)
2. Entsafter Champion, Fa. Keimling, 1.400 Umdrehungen pro Minute (U/min)
3. Entsafter Green star™ 3000, Fa. Keimling, 110U/min

Es zeigte sich, dass alle drei Entsaftungsmethoden visuell vergleichbare Ergebnisse lieferten. Es wurde daher der Entsafter Nr. 3 ausgewählt, da hier zum einen die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Personen als besser gegenüber einer Handpresse eingeschätzt wurde. Um die Proben möglichst schonend zu verarbeiten, wurde die Methode Nr. 3 der Methode Nr. 2 vorgezogen, da bei dem Typ Champion die sehr hohen Umdrehungen sowohl die Temperatur des Probengutes als auch den Sauerstoffeintrag erhöhen.

Faktor Sieb

Die Kristallisation ungesiebter Möhrensäfte brachte Partikel verschiedener Größe auf die Glasplatte des getrockneten Bildes. Daher wurde ein 110 µm Nylonsieb zum Abtrennen größerer Partikel eingesetzt. Dieser Porendurchmesser reichte aus, um Störungen durch Möhrenstücke in der Kammerlösung zu vermeiden. Die Bildstruktur wurde dadurch nicht beeinflusst. Der Einsatz von Filtern mit kleineren Porendurchmessern bis 10 µm brachte in Voruntersuchungen in BRAD keine Verbesserung, sondern beeinflusste die Bildstruktur (morphologische Kriterien der visuellen Bildauswertung) dramatisch.

Vergleich Entsaften und Extrahieren

Für die Validierung wurde auf Methoden zurückgegriffen, die bereits in anderen Laboratorien angewandt worden waren. Während in BRAD die Probe extrahiert wurde (Andersen 2001), wurden die Möhren am LBI entsaftet. Es wurde sich für die Entsaftung entschieden, da mit der Extraktion von Möhrenproben keine Steigbilder mit den typischen Bildelementen erhalten werden konnten. Um zu sehen, welchen Einfluss die beiden Methoden auf die Bilder haben, wurde eine Möhrenprobe parallel extrahiert und entsaftet. Die Prozedur für das Extrahieren ist in Andersen (2001) beschrieben.

Für den Versuch wurden Möhrenproben (Sorte *Rodelika*) aus einem Versuch an der Universität Kassel (M. Fleck, Lehrstuhl Ökologischer Landbau) mit 0 und 150 kg N/ ha aus der Ernte 2002, nach zwei Monate Lagerung, verwendet. Für den Saft wurde mit einem Mischungsverhältnis von 100/100, für den Extrakt von 200/80 gearbeitet (Andersen 2001). Auf einen Vergleich der verschiedenen Mischungsverhältnisse und Methoden wurde verzichtet, da für jede Veränderung der Probenvorbereitung ein Mischungsverhältnis angepasst werden muss. Die Ergebnisse für beide Methoden mit dem pro Methode angepassten Mischungsverhältnis waren sowohl von den Werten für die Variable *diagonal moment*, als auch von dem Unterscheidungsvermögen zwischen den Proben vergleichbar. Für *kappa* und *sum variance* zeigte sich ein Unterschied zwischen den beiden Verfahren, der mit zunehmendem Bildausschnitt größer wurde. Die relative Gruppierung der beiden Proben ist abhängig vom Verfahren. Ergebnisse, die mit den beiden Verfahren und dem daran adaptierten Mischungsverhältnis erzielt werden, können nicht miteinander verglichen werden. Das Unterscheidungsvermögen ist für die Extraktion stabiler über den Bildausschnitt als für den Entsafter.

Fazit:

1. Es wird mit einem standardisierten Entsafter gearbeitet, der die Probe schonend behandelt.
2. Die entsaftete Probe muss gefiltert werden, damit Störungen im Bild vermieden werden. Ein Sieb mit 110 µm Porendurchmesser ist ausreichend und beeinflusst das Ergebnis nicht.
3. Die Frage, ob eine Extraktion der Probe oder eine Entsaftung das Unterscheidungsvermögen der Methode verbessert, konnte nicht geklärt werden. Es wird mit dem Saft der Probe gearbeitet, da damit gleichzeitig auch Steigbilder gemacht werden können, was für die extrahierte Probe nicht möglich war (zu geringe Ausbildung der Bildelemente).

8.3.2 Faktor Mischungsverhältnis

Auch hier werden, wie für Weizenproben, ausschliesslich die Einflüsse unterschiedlicher Mischungsverhältnisse auf die Ergebnisse der Texturanalyse diskutiert.

Der Einfluss unterschiedlicher Mischungsverhältnisse wurde auf die drei ausgewählten Variablen, deren Streuung und auf das Unterscheidungsvermögen der Methode geprüft. Dafür wurden folgende Versuche durchgeführt:

Einfluss des Mischungsverhältnisses auf die Unterscheidung von Möhrenproben verschiedener N-Düngung

Für den Versuch wurden Möhrenproben aus einem Versuch an der Universität Kassel (M. Fleck, Lehrstuhl Ökologischer Landbau) mit 0 und 150 kg N/ ha aus der Ernte 2002 verwendet. Es wurde mit den Mischungsverhältnissen von 50/50, 100/100 und 150/150 (Diagonalvektor in der Matrix) gearbeitet.

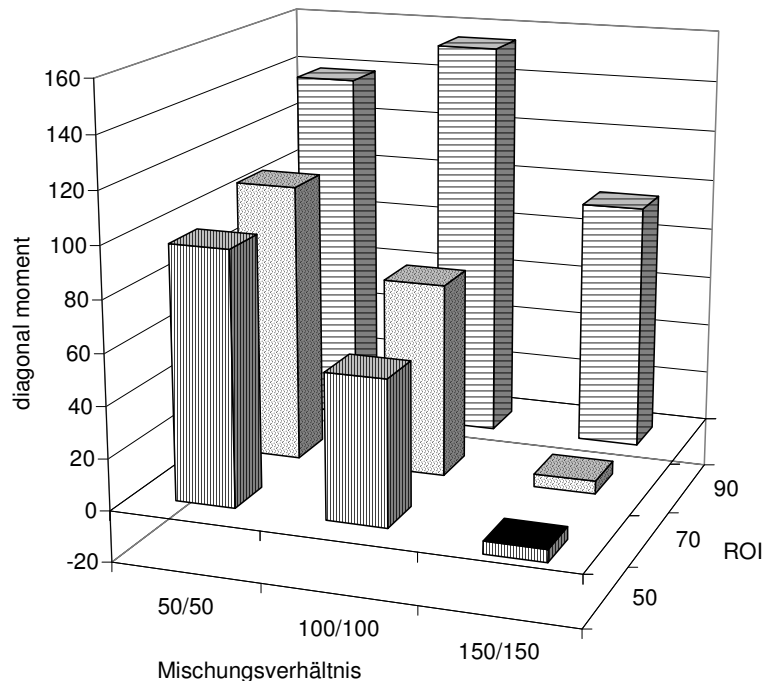


Abbildung 69: Variable *diagonal moment* für die Möhrenprobe ohne zusätzliche N-Düngung bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROIs.

Auch bei Möhrenproben reagiert die Methode stark auf eine Änderung des Mischungsverhältnisses. Bei einem Diagonalvektor in der Matrix, nehmen die Werte für *diagonal moment* mit zunehmender Menge von Probe und CuCl_2 ab. Das Verhalten ist stark abhängig vom Bildausschnitt. Die Abnahme ist umso größer, je geringer der Bildausschnitt ist, für ROI 90 ist der Einfluss schwach.

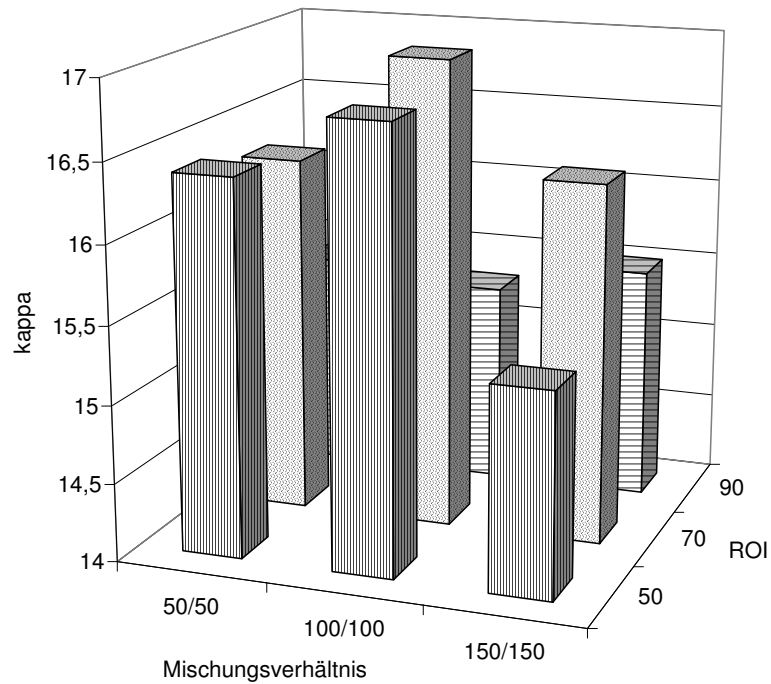


Abbildung 70: Variable κ für die Möhrenprobe ohne zusätzliche N-Düngung bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROIs.

Die Variable κ (*sum variance* verhält sich vergleichbar) zeigt ein anderes Verhalten. Zwar ist auch hier die ROI-Abhängigkeit stark, die Antwort ist aber weder monoton noch im Verlauf eindeutig. Dabei gibt ein Mischungsverhältnis von 100/100 die größten Werte und, alle drei Mischungsverhältnisse haben eine andere Abhängigkeit vom Bildausschnitt. Das Unterscheidungsvermögen hängt ebenfalls stark von dem Mischungsverhältnis ab. Bei *diagonal moment* liefern die Mischungsverhältnisse 50/50 und 150/150 vergleichbare Ergebnisse. Für beide lassen sich die beiden Möhrenproben unterscheiden, das Unterscheidungsvermögen nimmt mit zunehmendem ROI ab. Für 100/100 lassen sich die beiden Proben mit dieser Variable nicht trennen.

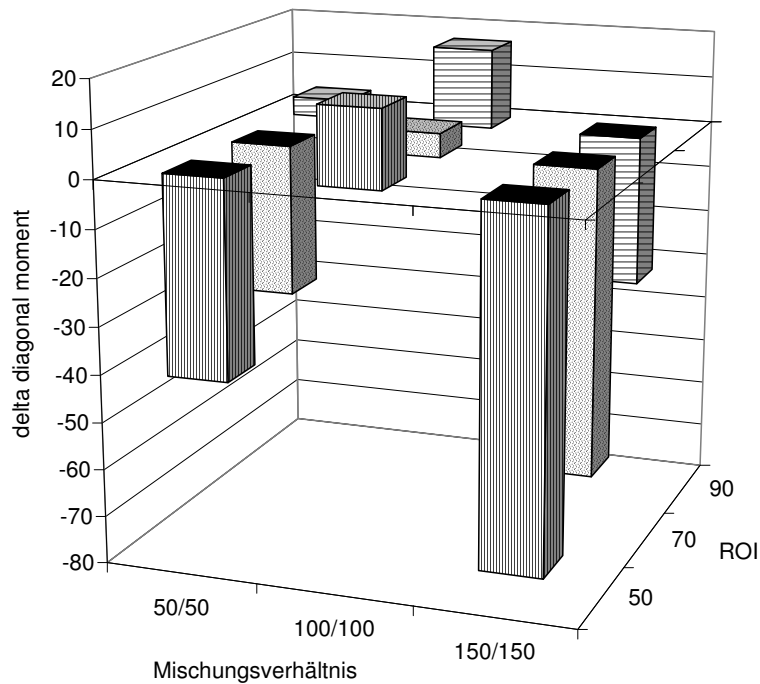


Abbildung 71: Differenz der Variable *diagonal moment* für die beiden Möhrenproben (0, 150 kg N/ha) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROIs.

Für die Variable *kappa* zeigt sich ein anderes Ergebnis. Hier liefern die beiden Mischungsverhältnisse 100/100 und 150/150 vergleichbare Ergebnisse, während die relative Zuordnung der Proben zu 50/50 umgekehrt ist. Mit allen Mischungsverhältnissen können die Proben unterschieden werden, die ROI-Abhängigkeit ist nicht eindeutig. Die Variable *sum variance* liefert vergleichbare Ergebnisse.

In einem zweiten Versuch wurde der Saft beider Proben über sieben Tage bei 6°C gelagert. Danach wurden die gealterten Proben noch einmal kristallisiert. In Abbildung 73 wird das Ergebnis verschiedener Mischungsverhältnisse auf den Effekt der Alterung für beide Proben nebeneinander dargestellt.

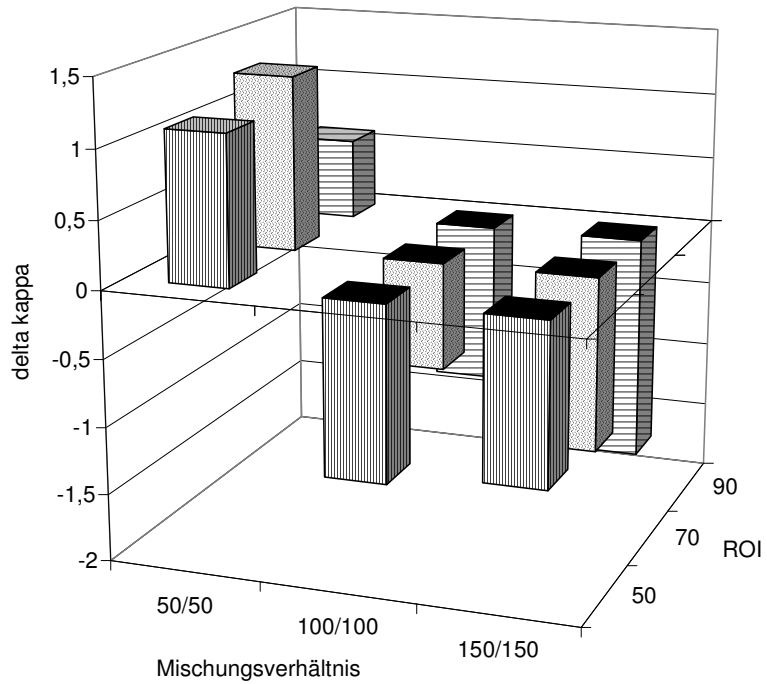


Abbildung 72: Differenz der Variable *kappa* für die beiden Möhrenproben (0, 150 kg N/ha) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROIs.

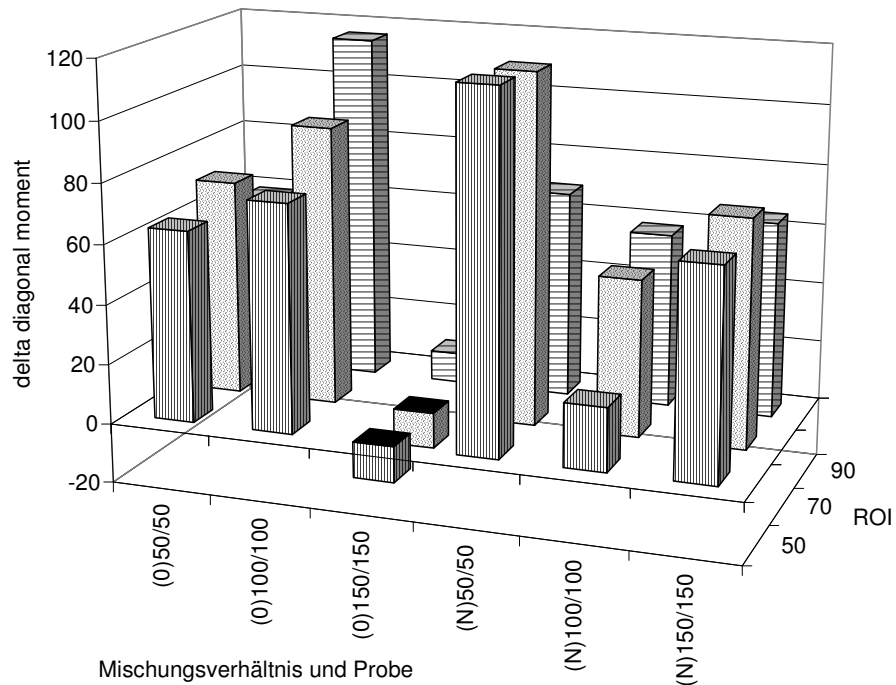


Abbildung 73: Differenz der Variable *diagonal moment* für die Alterung der beiden Möhrenproben (0, 150 kg N/ha) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROIs.

Für *diagonal moment* ist der Alterungseffekt deutlich zu sehen. Er hängt aber nicht nur vom Bildausschnitt und der Probe, sondern stark vom Mischungsverhältnis ab. Der Einfluss des Mischungsverhältnisses auf den Effekt der Alterung hängt dabei ebenfalls vom ROI und der Probe ab. Die beiden anderen Variablen liefern ein Ergebnis, das untereinander, aber nicht mit *diagonal moment* vergleichbar ist. Auch hier zeigt sich die Abhängigkeit des Einflusses in Abhängigkeit vom Bildausschnitt und der Probe.

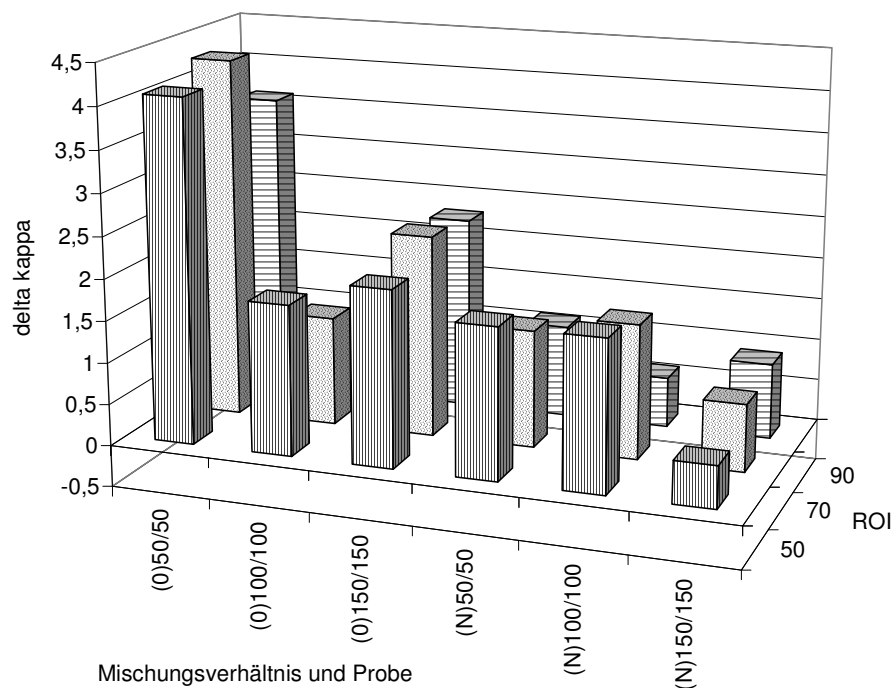


Abbildung 74: Differenz der Variable *kappa* für die Alterung der beiden Möhrenproben (0, 150kg N/ha) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROIs.

Einfluss des Mischungsverhältnisses auf die Unterscheidung von Möhrensorten

Für den Versuch wurden Möhrenproben aus einem Versuch am Forschungsinstitut für Biologischen Landbau (FiBL, Christine Arncken) in Frick/CH 2003 nach dem Lager gemessen im Frühjahr 2004, die beiden samenfesten Sorten *Samson* und *Tiptop* verwendet. Es wurde mit den Mischungsverhältnissen von 90/90, 115/90 und 135/90 (Probenvektor) gearbeitet.

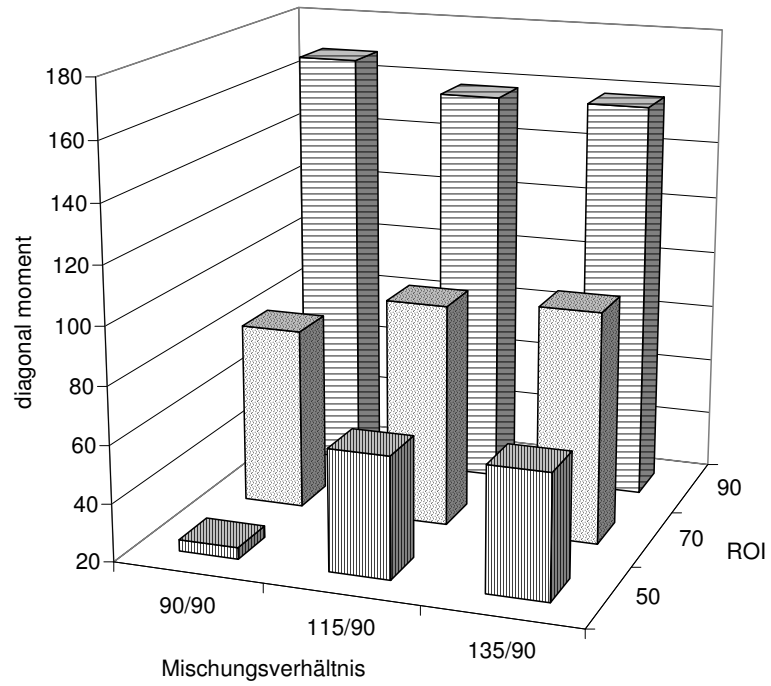


Abbildung 75: Variable *diagonal moment* für die Probe *Samson* bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROIs.

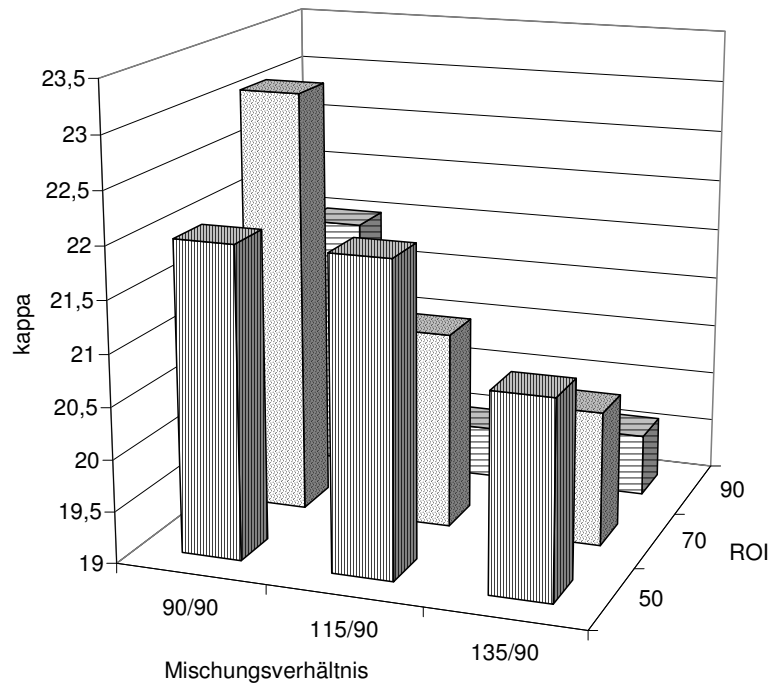


Abbildung 76: Variable *kappa* für die Sorte *Samson* bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROIs.

Bei *diagonal moment* zeigt sich der Einfluss steigender Probenmengen nur bei kleinen Bildausschnitten. Die Abhängigkeit vom Bildausschnitt ist größer als von der Probenmenge. Die Werte für *kappa* sinken mit steigender Probenmenge. Dieser Einfluss nimmt mit dem Bildausschnitt zu. Bei *sum variance* ergibt sich ein Ergebnis, das mit den beiden anderen Variablen nicht zu vergleichen ist. Für ROI 50 und 70 reagiert die Methode entgegengesetzt zu ROI 90, von 90/90 auf 115/90 sinken die Werte ab, bleiben aber zu 135/90 dann konstant.

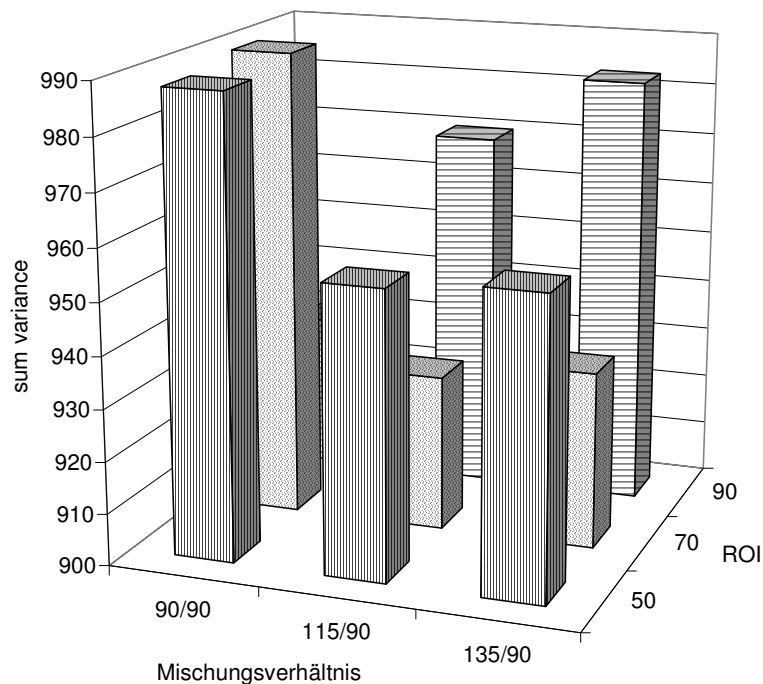


Abbildung 77: Variable *sum variance* für die Sorte *Samson* bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROIs.

Auch das Trennungsvermögen ist entsprechend abhängig von der Variable und dem Bildausschnitt. Die beste Unterscheidung liefert das Mischungsverhältnis 90/90 aber nur für große Bildausschnitte. Für 115/90 ist das Unterscheidungsvermögen unabhängig vom ROI und, bei 135/90 können die Probe für ROI 50 und 70 nicht unterschieden werden.

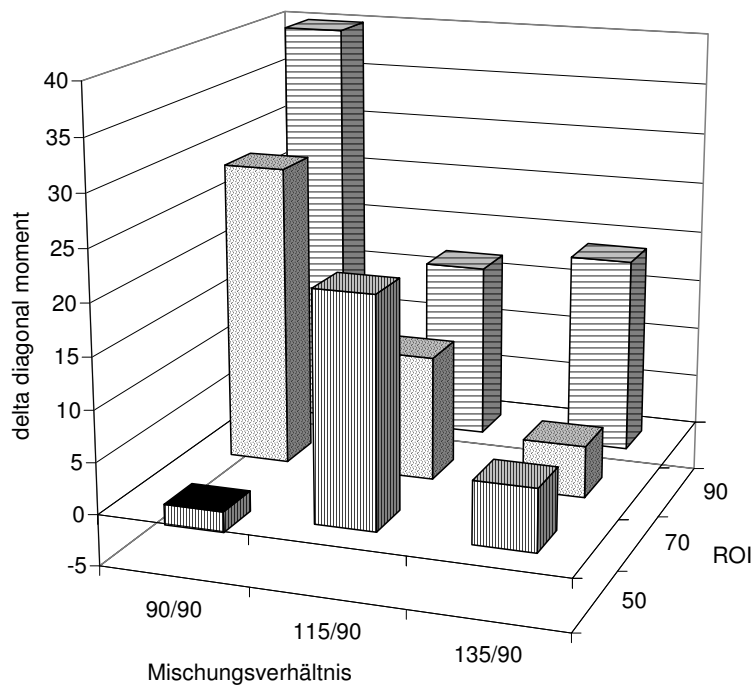


Abbildung 78: Differenz der Variable *diagonal moment* für die beiden Möhrensorten (*Samson, Tiptop*) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROIs.

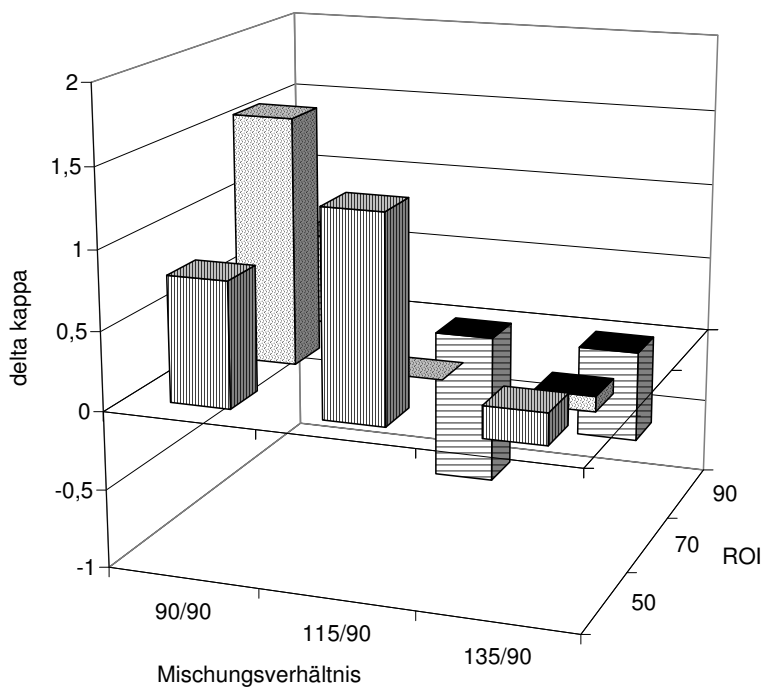


Abbildung 79: Differenz der Variable *kappa* für die beiden Möhrensorten (*Samson und Tiptop*) bei verschiedenen Mischungsverhältnissen und ROIs.

Bei κ zeigt sich, wie auch bei der Trennung der beiden Weizensorten, eine Umkehrung der relativen Zuordnung beim Mischungsverhältnis von 115/90. Dies liegt auch hier an der unterschiedlichen Abhängigkeit der beiden Möhrensorten von dem Bildausschnitt, wie in Abbildung 80 dargestellt.

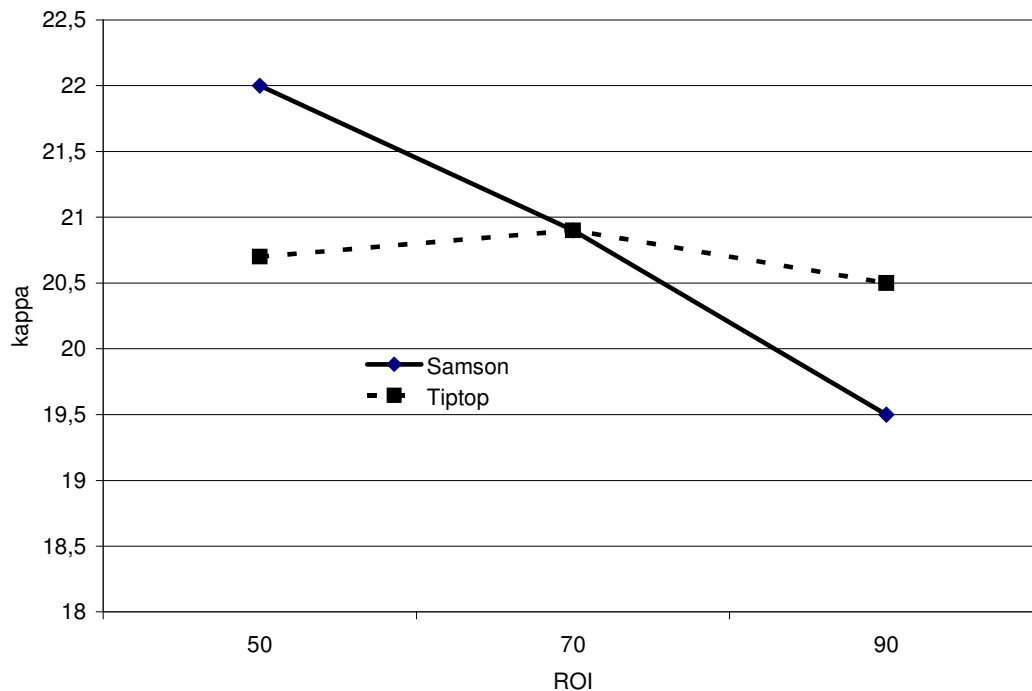


Abbildung 80: Variable κ für die beiden Möhrensorten (*Samson*, *Tiptop*) bei einem Mischungsverhältnis von 115/90 in Abhängigkeit vom Bildausschnitt (ROI).

Fazit:

1. Alle Variablen reagieren stark auf Änderungen des Mischungsverhältnisses. Der Einfluss des Mischungsverhältnisses hängt sowohl von der Probe, als auch vom Bildausschnitt ab.
2. Es gibt einen Einfluss sowohl der Probenmenge bei gleicher CuCl_2 -Menge (Probenvektor), als auch bei gleichzeitiger Änderung der CuCl_2 - und Probenmenge (Diagonalvektor).
3. Verschiedene Proben verhalten sich unterschiedlich auf den Proben- und Diagonalvektor.
4. Die Methode ist auf Änderungen des Mischungsverhältnisses nicht eindeutig.

5. Das Unterscheidungsvermögen hängt ebenfalls vom Mischungsverhältnis ab und kann durch veränderte Probenmengen und/oder CuCl_2 -Mengen pro Platte verbessert werden.
6. Die parallele Kristallisation einer Probe mit mehreren Mischungsverhältnissen kann die Aussage der Methode verbessern.
7. Eine relative Zuordnung von Proben (ordinal Skalierung) hängt vom Mischungsverhältnis ab und ist nur für ein definiertes Mischungsverhältnis gültig.

8.3.3 Faktor Scannen

Auch bei Möhrenproben werden die Platten nach dem Kristallisieren und einer Trocknungszeit von ein bis zwei Tagen in der Aussenkammer bei geregelterm Klima eingescannt. Beim Scannen werden die Platten nach dem Kristallisationszentrum ausgerichtet. Dabei kann es zu gerätebedingten Schwankungen der Farbsättigung kommen, die mit einem bei jedem Scan mitlaufenden Referenzdia (Kodak IT8) erfasst wird. Die leichte Verschiebung des Kristallisationszentrums von der Mittelachse beim Auflegen auf den Scanner kann ebenfalls zu Schwankungen führen. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurden zwei Platten mit der gleichen Möhrenprobe aber verschiedenem Mischungsverhältnis in vier verschiedenen Winkeln relativ zum Kristallisationszentrum (0, 90, 180, 270 °) aufgelegt. Der Versuch wurde viermal wiederholt. Der Einfluss verschiedener Winkelstellungen auf das Ergebnis nimmt mit dem Bildausschnitt zu. Er ist unabhängig vom Mischungsverhältnis vorhanden und vernachlässigbar. Das Ergebnis ist für ein Mischungsverhältnis und die Variable κ beispielhaft in Abbildung 81 dargestellt. Der Einfluss ist mit dem bei Weizenproben vergleichbar.

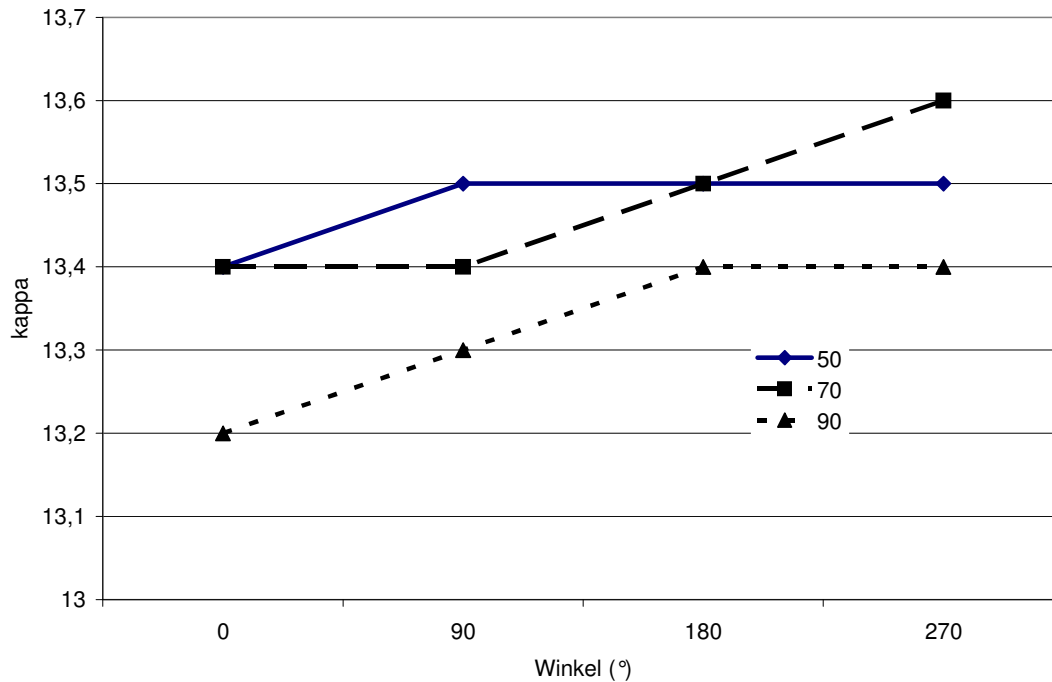


Abbildung 81: Variable κ für eine Platte einer Möhrenprobe bei verschiedenen Winkeln relativ zum Kristallisationszentrum während des Scannens und in Abhängigkeit der ROIs.

8.4 Einflussgrößen bei der Biokristallisation von Apfelproben

Nach den Untersuchungen von Einflussgrößen auf das Ergebnis der Methode bei Weizen- und Möhrenproben wurde die Prozedur für die Kristallisation von Apfelproben auf den Einfluss unterschiedlicher Mischungsverhältnisse geprüft, da sich aus den Versuchen mit Weizen- und Möhrenproben Änderungen des Mischungsverhältnisses als der kritische Einfluss zeigte. Kristallbilder von Apfelproben mit der hier entwickelten Prozedur brauchen länger als andere Proben, um zu trocknen. Sie sind auch empfindlicher gegenüber der Luftfeuchte als die anderen untersuchten Proben. Dies ist ein weiterer kritischer Punkt, der nicht näher untersucht wurde.

8.4.1 Faktor Mischungsverhältnis

Der Einfluss unterschiedlicher Mischungsverhältnisse wurde auf die drei ausgewählten Variablen, deren Streuung und auf das Unterscheidungsvermögen der Methode geprüft. Dafür wurde folgender Versuch durchgeführt:

Einfluss des Mischungsverhältnisses auf die Trennung von Apfelproben aus dem ökologischen Handel

Es wurden je 30 Äpfel von vier verschiedenen Apfelproben aus dem lokalen Supermarkt tegut an einem Tag von einer Person genommen und parallel mit einer Probenvorbereitung verarbeitet und mit fünf verschiedenen Probenmengen (90, 135, 180, 225, 260 mg) bei gleicher Menge an CuCl_2 pro Platte (90 mg) kristallisiert. Der Versuch wurde wiederholt und dabei die Menge an CuCl_2 verändert (135 mg). Folgende vier Apfelproben wurden ausgewählt (alle ökologischer Anbau, aber unterschiedliche Herkunft): *Granny Smith*, *Elstar*, *Cox orange*, *Gala royal*. Es kann nicht zwischen Sorte und Herkunft unterschieden werden (ob Sorte oder Ort einen größeren Einfluss auf die Methode bei Äpfeln hat, wird in einem weiteren Projekt mehrfaktoriell untersucht werden müssen). Auf die Angabe und Diskussion der statistischen Trennung der Proben wird hier verzichtet, da dies im Kapitel 10.3.1 erfolgt. Die Ergebnisse sind für ROI 70 im Folgenden dargestellt.

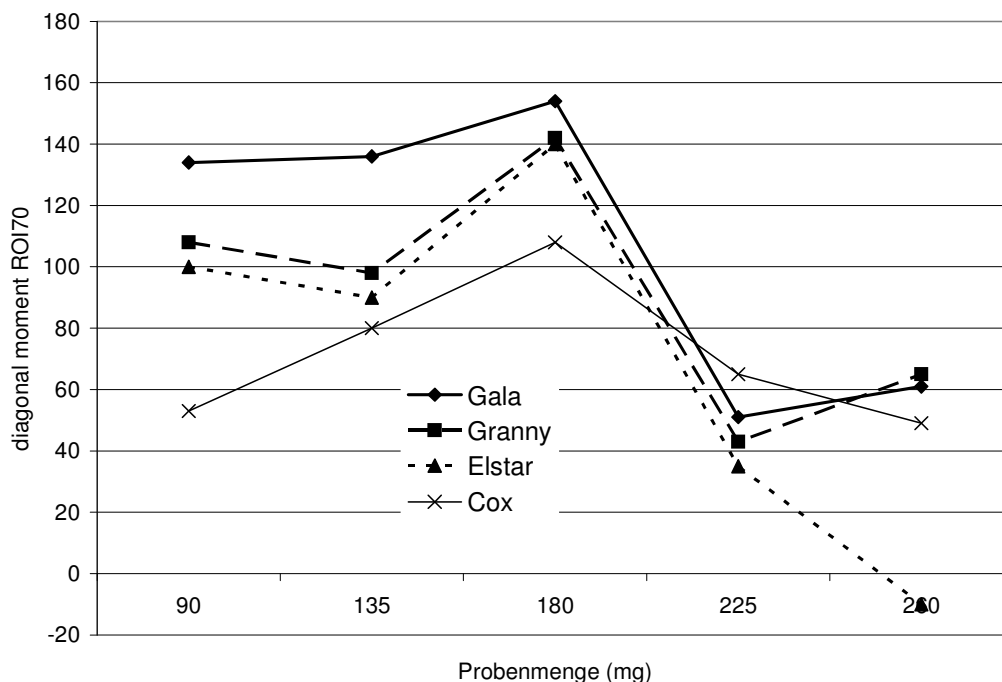


Abbildung 82: Variable *diagonal moment* für vier verschiedene Apfelproben bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (alle 90 mg CuCl_2) und ROI 70.

Die 4 Apfelproben reagieren sehr unterschiedlich auf ansteigende Mengen an Probe pro Platte. Für keine Probe zeigt sich ein monotoner Verlauf bei *diagonal moment*. Während die Proben *Granny Smith* und *Elstar* erst bei einer großen Menge an Probe (260 mg) unterschieden werden können, lassen sie sich für geringere Mengen von den beiden anderen unterscheiden. Die Probe *Cox orange* fällt durch ihre Reaktion auf den Probenvektor heraus und zeigt die geringste Abhängigkeit. Auch die relative Zuordnung der Proben ändert sich mit zunehmender Menge an Probe pro Platte. Für große Mengen an Probe verändert sich die Stellung der Probe *Granny Smith* zu *Elstar*.

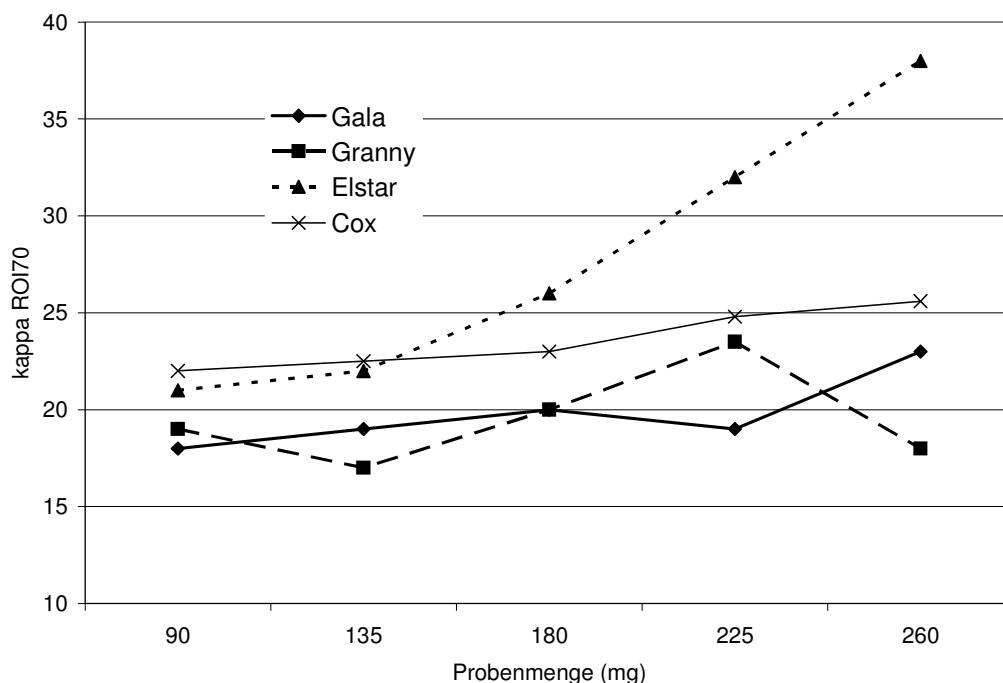


Abbildung 83: Variable κ für vier verschiedene Apfelproben bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (alle 90 mg CuCl_2) und ROI 70.

Mit der Variable κ kann die Probe *Elstar* von allen anderen Proben durch ihre starke Abhängigkeit vom Probenvektor unterschieden werden. Auch die Probe *Elstar* lässt sich für die meisten Mischungsverhältnisse von den anderen Proben abtrennen, von *Cox orange* erst für Probenmengen ab 180 mg. Die beiden Proben *Gala royal* und *Granny Smith* lassen sich nicht (wie für *diagonal moment*) unterscheiden.

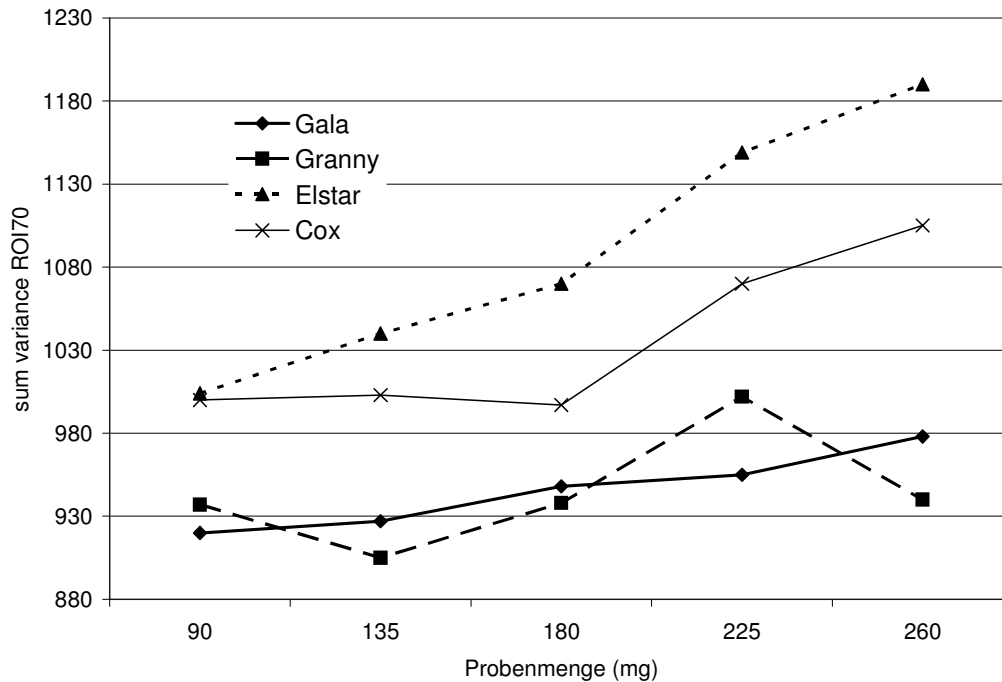


Abbildung 84: Variable *sum variance* für vier verschiedene Apfelproben bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (alle 90 mg CuCl_2) und ROI 70.

Wie bereits bei *kappa* gezeigt, lassen sich die beiden Proben *Elstar* und *Cox orange* von allen Proben über die meisten Mischungsverhältnisse unterscheiden, wobei *Elstar* am stärksten auf zunehmende Mengen an Probe pro Platte reagiert.

Wird die Menge an CuCl_2 von 90 mg auf 135 mg pro Platte erhöht, so werden die Bilder kräftiger und die morphologischen Bildelemente zeigen sich besser. Für die Texturanalyse zeigt sich ebenfalls eine Veränderung. Die relative Zuordnung der Proben bleibt von der Tendenz vergleichbar, ebenso die Unterscheidung für ausgewählte Mengen an Probe pro Platte. Es verändern sich aber sowohl die Werte für die einzelnen Variablen und Mischungsverhältnisse, als auch die Reaktion auf den Probenvektor.

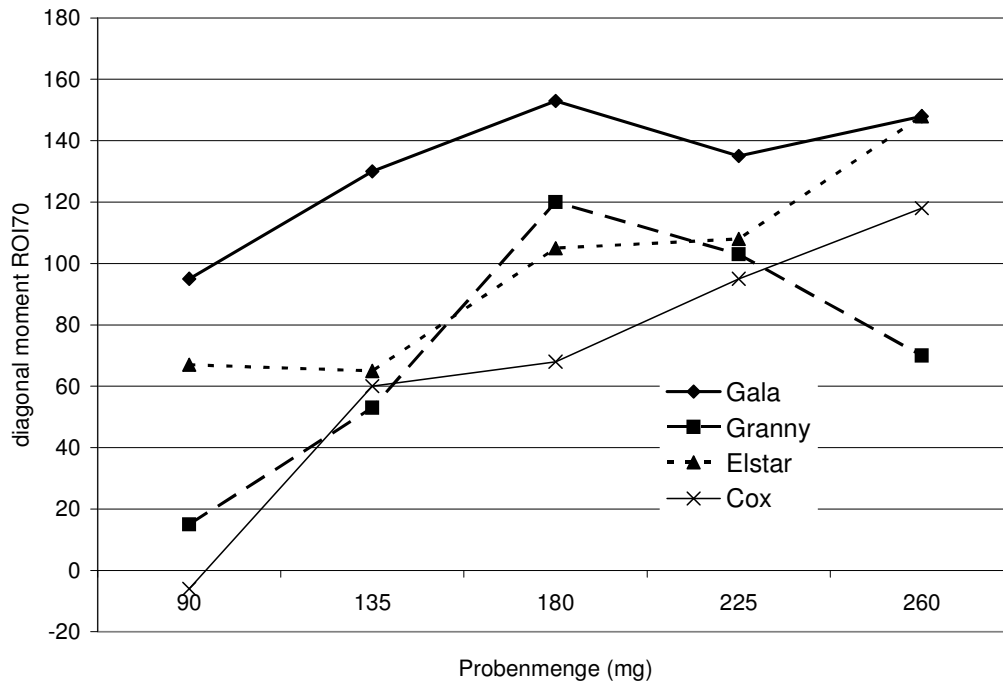


Abbildung 85: Variable *diagonal moment* für vier verschiedene Apfelproben bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (alle 135 mg CuCl₂) und ROI 70.

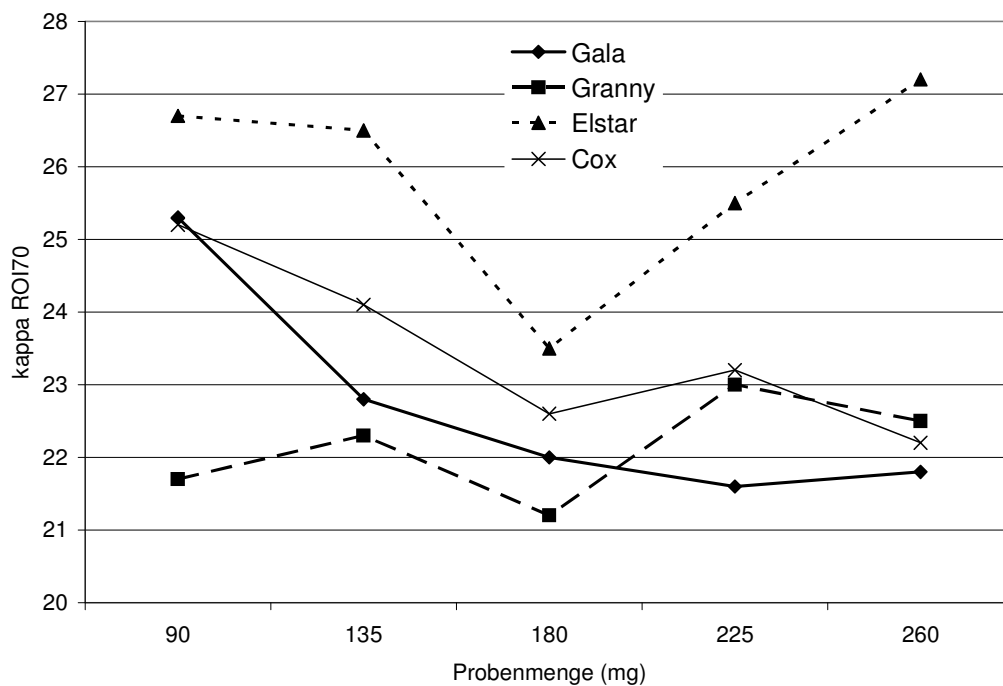


Abbildung 86: Variable *kappa* für vier verschiedene Apfelproben bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (alle 135 mg CuCl₂) und ROI 70.

Alle Proben reagieren jetzt mit steigenden Werten bei größer werdenden Probenmengen pro Platte. Die Probe *Gala royal* lässt sich von den anderen besser unterscheiden.

Für κ ändert besonders die Probe *Elstar* ihr Verhalten. Sie kann zwar immer noch von allen anderen Proben bei allen Mischungsverhältnissen unterschieden werden, zeigt aber nicht mehr den gleichen Verlauf bei steigenden Probenmengen wie bei 90 mg CuCl_2 . Die Unterscheidung von *Gala royal* und *Granny Smith* wird für eine Probenmenge von 90 mg deutlich besser, die relative Zuordnung dieser beiden Proben hängt aber stark vom Mischungsverhältnis ab. Für alle Proben ist die Antwort der Methode auf steigende Probenmengen nicht eindeutig. Die Variable *sum variance* zeigt ein ähnliches Verhalten und wird daher nicht gesondert dargestellt.

Alle Proben zeigen eine zusätzliche Abhängigkeit vom Bildausschnitt (ROI). Bis auf wenige Ausnahmen ist der Einfluss des Bildausschnittes aber unabhängig vom Mischungsverhältnis. Lediglich für *Granny Smith* zeigen *diagonal moment* und κ diese Abhängigkeit, die für *diagonal moment* auch *Elstar* und *Cox orange* haben und in Abbildung 87 dargestellt ist.

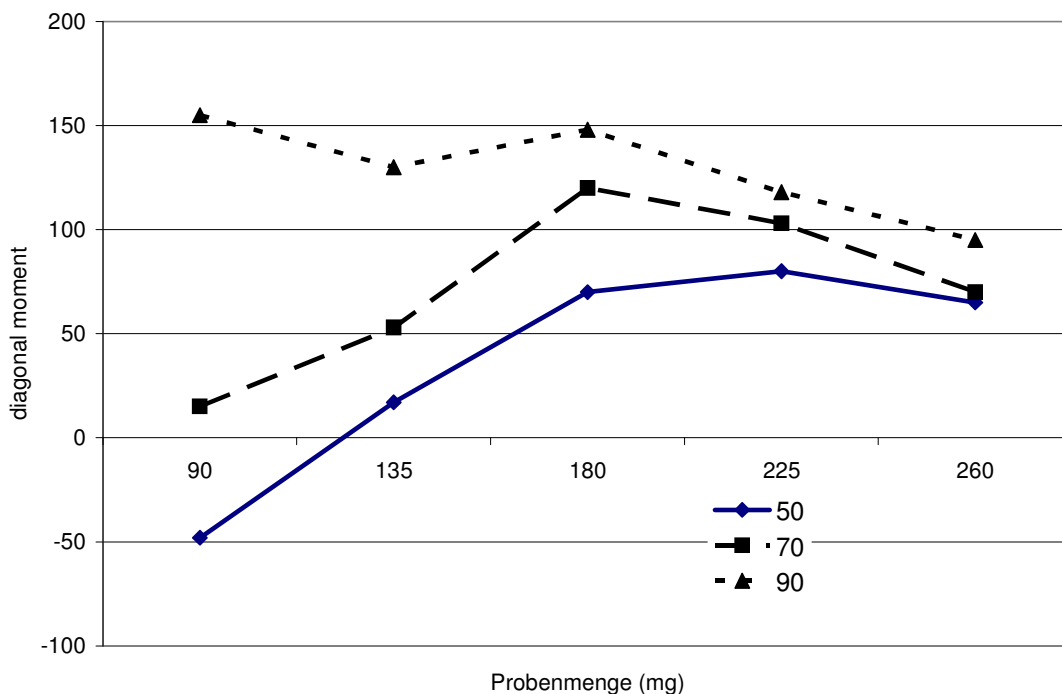


Abbildung 87: Variable *diagonal moment* für die Apfelprobe *Granny Smith* bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (alle 135 mg CuCl_2) und ROIs.

Auch für eine Menge von 90 mg CuCl_2 pro Platte kann die zusätzliche Abhängigkeit der Variable vom Bildausschnitt beobachtet werden, und auch hier kommt es für einige Proben zu einer Abhängigkeit zwischen Mischungsverhältnis und Bildausschnitt. Wie bei 135 mg CuCl_2 , so zeigt der Probe *Cox orange* diese Abhängigkeit auch bei 90 mg (Abbildung 87). Auch für die Variablen *kappa* und *sum variance* kann die Abhängigkeit bei dieser Probe beobachtet werden (für *kappa* s. Abbildung 88). Bei 90 mg CuCl_2 zeigt *Gala royal* bei *kappa* und *sum variance* eine ROI-abhängige Antwort auf zunehmende Mengen an Probe pro Platte (vgl. Abb. 89).

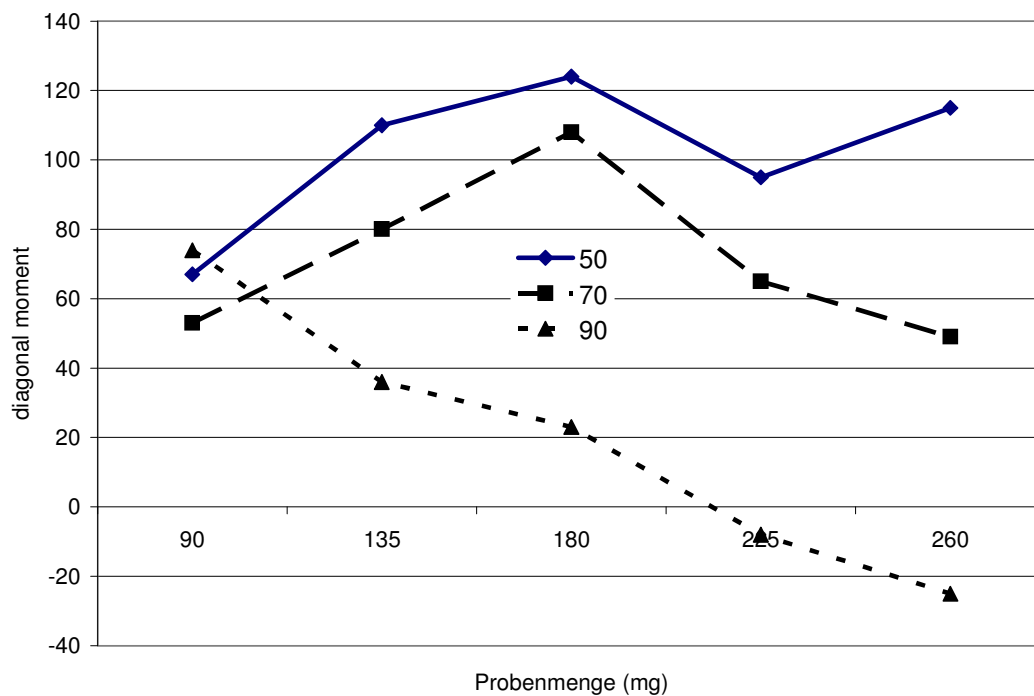


Abbildung 88: Variable *diagonal moment* für die Apfelprobe *Cox orange* bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (alle 90 mg CuCl_2) und ROIs.

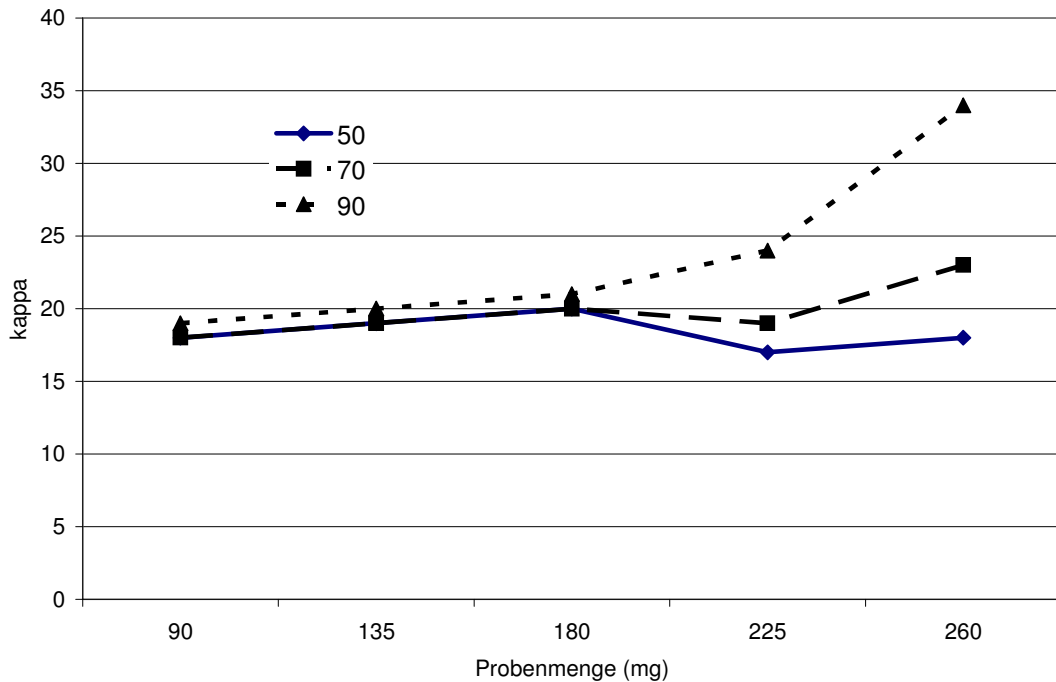


Abbildung 89: Variable κ für die Apfelprobe *Gala royal* bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (alle 90 mg CuCl_2) und ROIs.

Fazit:

1. Alle Variablen reagieren stark auf Änderungen des Mischungsverhältnisses. Der Einfluss des Mischungsverhältnisses hängt sowohl von der Probe, als auch vom Bildausschnitt ab.
2. Es gibt eine Interaktion von Mischungsverhältnis und Bildausschnitt, die aber abhängig von der Probe ist.
3. Es gibt einen Einfluss sowohl der Probenmenge bei gleicher CuCl_2 -Menge (Probenvektor), als auch bei verschiedenen Mengen CuCl_2 und gleich bleibender Probenmenge.
4. Verschiedene Proben verhalten sich unterschiedlich auf den Probenvektor.
5. Die Methode ist auf Änderungen des Mischungsverhältnisses nicht eindeutig.
6. Das Unterscheidungsvermögen hängt ebenfalls vom Mischungsverhältnis ab und kann durch veränderte Probenmengen und/oder CuCl_2 -Mengen pro Platte verbessert werden.

7. Die parallele Kristallisation einer Probe mit mehreren Mischungsverhältnissen kann die Aussage der Methode verbessern.
8. Eine relative Zuordnung von Proben (Ordinale Skalierung) hängt vom Mischungsverhältnis ab und ist nur für ein definiertes Mischungsverhältnis gültig.

8.5 Zusammenfassende Beurteilung der Einflussgrößen auf das Ergebnis der Methode für Weizen-, Möhren- und Apfelproben

Für die zusammenfassende Beurteilung der Einflussgrößen auf das Ergebnis verschiedener landwirtschaftlicher Produkte wird zwischen Verfahren und Methode unterschieden. Das Verfahren beinhaltet alle Schritte von der Probenahme bis zum interpretierten Ergebnis. Die Methode ist für jede Probenart (Weizen, Möhre, Apfel) spezifisch und verschieden. Folgende Faktoren wurden für das Verfahren getestet oder erwiesen sich als **verfahrensspezifische** Einflussgrößen, d.h. sie gelten für alle Methoden als Faktoren:

- Filtern oder Sieben der Probenlösung
- Haltbarkeit der Probenlösung
- Mischungsverhältnis von Probe und CuCl_2
- Feuchte auf dem Ring vor und während der Verdampfung und Kristallisation
- Verdampfungszeit und Kristallisationsdauer
- Scannen der Bilder
- Bildausschnitt

Zum Faktor Haltbarkeit der Probenlösung wurden keine gesonderten Kapitel verfasst. Dieser Faktor wird durch die Untersuchung zur Alterung von Probenlösungen (Langzeiteffekt) und durch die in kurzen Zeitabständen wiederholte Probenaufbereitung abgedeckt und sind daher in den entsprechenden Abschnitten als Alterungseffekt oder Wiederholbarkeit beschrieben.

Zusätzlich gibt es **methodenspezifische** Einflussgrößen:

Für Weizen:

- Vermahlung
- Menge an Probengut für die Extraktion
- Extraktionsdauer

Für Möhre und Apfel:

Entsafter

Aus den bisher dargestellten Versuchen, lassen sich die kritischen Größen des Verfahrens bzw. der Methoden wie folgt benennen:

- Das Mischungsverhältnis. Mit Änderungen des Mischungsverhältnisses können sogar andere Einflussgrößen ausgeschaltet werden.
- Die Kammer mit den klimatischen Bedingungen. Baugleiche Kammern an einem Ort unterscheiden sich nur unwesentlich. Für die visuelle Auswertung ist die Angabe von Verdampfungszeit und Kristallisationsdauer für jedes Bild notwendig.
- Die Probenvorbereitung. Hier ist bei Weizen besonders die Vermahlung (Korngrößenverteilung), bei Möhren und Äpfeln die Entsaftung und für alle Proben die Filterung der Partikel ein kritischer Faktor. Für Weizenproben ist Extraktion (Menge und Dauer) eine weitere Einflussgröße.

9 Streuung der Methoden

9.1 Überblick

Nach der systematischen Untersuchung von Einflussgrößen auf das Ergebnis der Weizen-, Möhren- und Apfelproben wurde die Streuung der Methoden für ausgewählte Schritte im Prozess bestimmt. Wie groß der Anteil der verschiedenen Prozessschritte an der Gesamtstreuung ist, wird selbst von Andersen (2001) nicht behandelt. Für die Validierungsfrage, ob die Methode Proben aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten unterscheidet, ist aber die Angabe der Streuung unerlässlich, da sich eine erfolgreiche Trennung von Proben nur unter Angabe von Mittelwert und Variation angeben lässt. Ausserdem muss für jeden einzelnen Schritt ermittelte Streuung im Falle einer unterschiedlichen Anzahl von Wiederholungen pro Schritt im Modell der statistischen Auswertung entsprechend berücksichtigt werden. Die im Folgenden diskutierte Variation der Methoden wurde für die drei ausgewählten Variablen der Texturanalyse und für drei verschiedene Bildausschnitte durchgeführt. Es wurden die

- Wiederholpräzision,
- Laborinterne Reproduzierbarkeit,
- Laborvergleichs-Untersuchungen (Methoden-Vergleichsstudie)

für die drei Methoden ermittelt.

Für die Bestimmung der Wiederholpräzision wurde eine Probe sechsmal direkt hintereinander aufbereitet und jede Probenaufbereitung (Ergebnis: Kammerlösung) in einer sechsfachen Bildwiederholung in zwei Kammern parallel kristallisiert. Die 72 Platten wurden zusammen gescannt und mit der Texturanalyse ausgewertet. Damit wurde die Variation der

- Probenaufbereitung,
- der Kristallisation,
- der Kammer

bestimmt. Die Versuche wurden für alle Probenarten mehrfach wiederholt. Für Weizen konnte auch über einen längeren Zeitraum auf die Laborprobe zurückgegriffen werden, dadurch konnte hier auch die Standardabweichung der Streuung angegeben und die Streuung über Tage ermittelt werden. Dies ist für Möhren- und Apfelproben nicht möglich, da sich die Probe mit der Zeit

verändert. Auf die Angabe der Standardabweichung der Streuung bei diesen Probenarten wird daher verzichtet.

Für die weiteren Faktoren zur laborinternen Reproduzierbarkeit wurde der Einfluss verschiedener Untersucher und des Scannens der Bilder ermittelt. Für den Einfluss der Untersucher führten die drei trainierten Laborassistenten/innen der drei Partnerlabore (BRAD, LBI, UniKa) die gesamte Prozesskette für Weizen- und Möhren parallel und wiederholt in einem Labor (UniKa) durch. Die Streuung des Scannens der Platten wurde durch mehrfache Wiederholung des Scannens einer Platte ermittelt.

- Scannen
- Untersucher

Wie für die Methodenvergleichsstudie wurden Laborvergleiche zwischen den drei Partnerinstituten (BRAD, LBI, UniKa) durchgeführt. Dabei wurde eine Weizen- oder Möhrenprobe mit drei- oder sechsfachen Wiederholung in jedem Labor aufbereitet und in einer sechsfachen Bildwiederholung pro Kammer kristallisiert. Aus diesen Versuchen wurde für die beiden Probenarten die Streuung zwischen Laboren ermittelt.

Methodenvergleich

Die Ergebnisse zur Bestimmung der Variation der Methoden sind für jede Variable und Probenart separat in den folgenden Abbildungen dargestellt. Jede Streuung wird in Abhängigkeit vom Bildausschnitt angegeben, repräsentiert durch je drei aufeinander folgende Balken (ROI 50, 70, 90). Die Balken sind in Abhängigkeit vom Bildausschnitt markiert.

9.2 Streuung der Methode für Weizenproben

Die in Abbildung 90 dargestellte Variation der Variable *diagonal moment* in Abhängigkeit von den verschiedenen Schritten und dem Bildausschnitt belegt, dass der größte Einfluss auf das Ergebnis durch den Schritt der Kristallisation erfolgt. Dieser Schritt trägt mehr als doppelt soviel zur Gesamtstreuung der Methode bei und ist erstaunlicherweise bei dieser Variablen auch erheblich kritischer als der Vergleich zwischen Laboren. Die Methode arbeitet, wie bereits festgestellt, aber nicht analytisch, d.h. es werden nicht einzelne Stoffe aus der Matrix getrennt analysiert oder Eigenschaften der Extraktionslösung direkt in der Lösung bestimmt, sondern es wird das Verhalten der Probenlösung auf die

Kristallisation von CuCl_2 untersucht. Dieser Schritt ist sehr empfindlich. Die 43 Platten einer Kammerfüllung kristallisieren in zufälliger Reihenfolge in Abhängigkeit von den eingestellten Bedingungen in der Kammer. Die Untersuchungen zeigen, dass Bilder, die sehr kurze Verdampfungszeiten haben, (<10 h) erheblich zur Streuung beitragen. Werden diese Bilder (ca. 5 %) verworfen, kann die Streuung verbessert werden (um ca. 20 %). Das Ergebnis macht deutlich, dass eine Optimierung der Methode hinsichtlich der Faktoren Zeit und Kosten, zunächst in den Schritten „Mischungsverhältnis“ und „Kristallisation“ erfolgen muss, um die Streuung zu verringern (und damit den Probendurchsatz pro Kammer zu erhöhen). In wieweit mit der Verringerung der Streuung auch das Unterscheidungsvermögen abnimmt, muss dabei untersucht werden.

Die meisten der für diese Arbeit kristallisierten Proben können mit der vorliegenden Streuung signifikant unterschieden werden, wenn mit einer sechsfachen Bildwiederholung pro Probenaufbereitung gearbeitet und diese verschachtelte Wiederholung von Probenaufbereitung, Bildwiederholung und Kammer im statistischen Modell berücksichtigt wird. Insofern ist das Ziel, Proben signifikant mit der Methode zu unterscheiden, trotz der bisher hohen Streuung der Methode erreicht. Die Schritte Probenaufbereitung und Scannen und Kammer tragen etwa gleich viel zur Streuung bei. Die Streuung ist für einen Bildausschnitt von 90% etwa 50% größer als für die beiden anderen hier untersuchten ROIs.

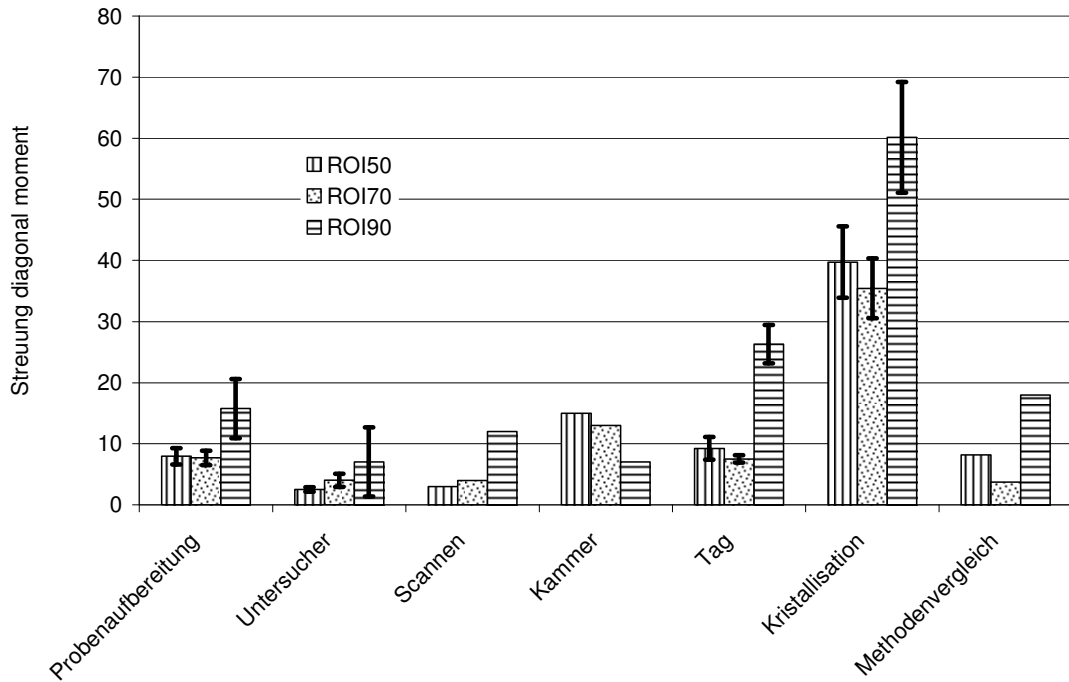


Abbildung 90: Streuung der Variable *diagonal moment* für Weizenproben der verschiedenen Prozessschritte bei unterschiedlichen Bildausschnitten.

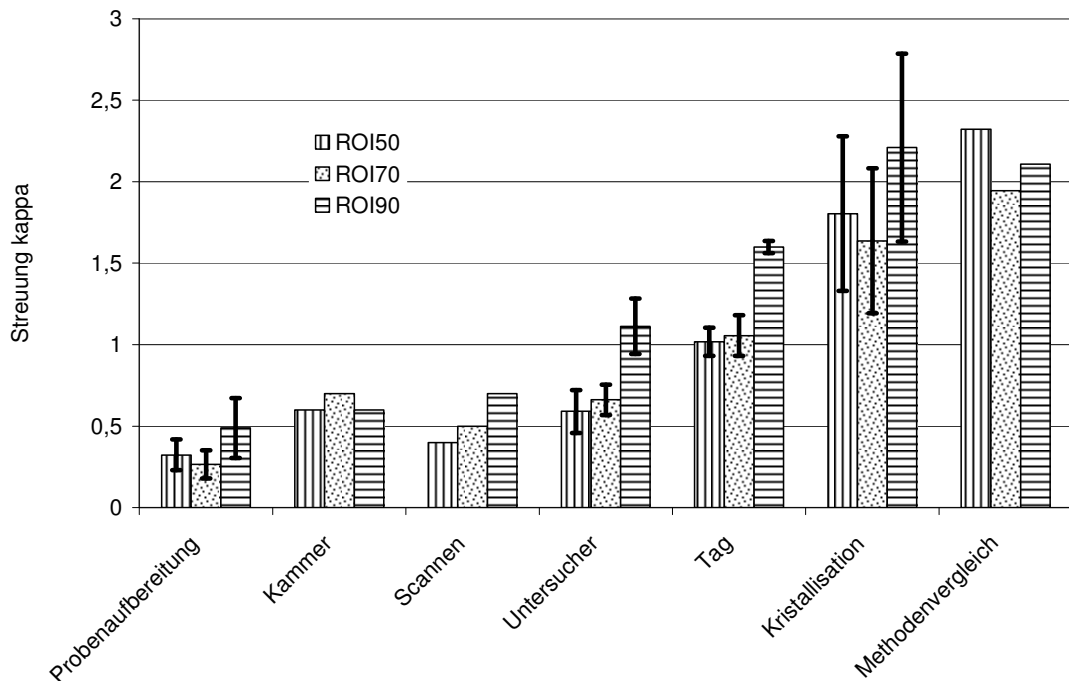


Abbildung 91: Streuung der Variable *kappa* für Weizenproben der verschiedenen Prozessschritte bei unterschiedlichen Bildausschnitten.

Auch für die Variable *kappa* zeigt sich, dass die Kristallisation den größten Einfluss auf die Gesamtstreuung der Methode hat. Allerdings ist die Streuung zwischen Laboren größer und damit unterscheiden sich die beiden Variablen grundsätzlich. Der Faktor Tag (andere Bedingungen, gleicher Untersucher, gleiche Kammer) zeigt für *kappa* einen größeren Einfluss als für *diagonal moment*. Auch für *kappa* zeigt sich eine Zunahme der Streuung mit dem Bildausschnitt.

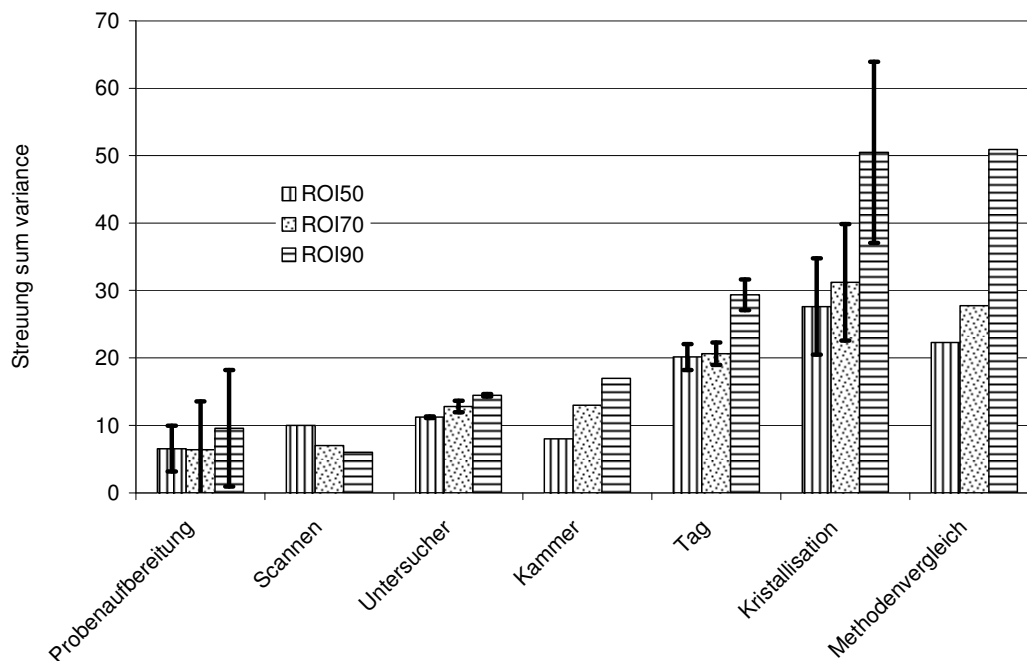


Abbildung 92: Streuung der Variable *sum variance* für Weizenproben der verschiedenen Prozessschritte bei unterschiedlichen Bildausschnitten.

Die Streuung der Variablen *sum variance* ist vom Verhältnis der einzelnen Schritte mit der von *kappa* vergleichbar, wobei das Scannen hier keinen so großen Einfluss hat. Wieder hat der Schritt der Kristallisation den größten Beitrag auf die Gesamtstreuung. Die Streuung nimmt mit zunehmendem Bildausschnitt zu.

Fazit:

1. Die Kristallisation hat den größten Einfluss auf die Streuung der Methode, unabhängig von Variable und Bildausschnitt.
2. Für einen Bildausschnitt von 90 % ist die Streuung größer als für 50 % und 70 %.
3. Die Probenaufbereitung, der Untersucher, die Kammer, das Scannen und der Tag haben einen untereinander vergleichbaren Einfluss auf die Streuung. Für die beiden Variablen *kappa* und *sum variance* hat der Tag einen etwas größeren Einfluss.
4. Die Variation zwischen den drei Laboren liegt im Bereich der Streuung der Kristallisation; für die Variablen *kappa* und *sum variance* sind beide Einflüsse vergleichbar stark, für *diagonal moment* spielt der Ort offenbar eine untergeordnete Rolle.
5. Die Streuung der Methode ist so hoch, dass nur mit einer mehrfachen Wiederholung an Probenaufbereitung und Platten gearbeitet werden sollte.
6. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse müssen die verschiedenen Wiederholungen entsprechend in einem Modell (Ime-Modell) berücksichtigt werden.
7. In einem nächsten Schritt müssen der Einfluss der Verdampfungszeit, der Kristallisationsdauer, der Mehrzentrigkeit und der Lage des Zentrums auf die Streuung untersucht werden.

9.3 Streuung der Methode für Möhrenproben

Auch für Möhrenproben hat die Kristallisation bei der Variablen *diagonal moment* den größten Einfluss auf die Streuung der Methode. Der Einfluss ist sowohl im Vergleich zu Weizenproben, als auch zu den anderen Schritten im Prozess erheblich höher. Der Einfluss der Probenaufbereitung, des Untersuchers und des Scannens ist vergleichbar mit Weizenproben. Bei Möhren ist die Variation zwischen Laboratorien fast fünfmal größer als bei Weizenproben und liegt im Bereich der Kristallisation. Für die meisten Faktoren nimmt die Streuung mit dem Bildausschnitt zu.

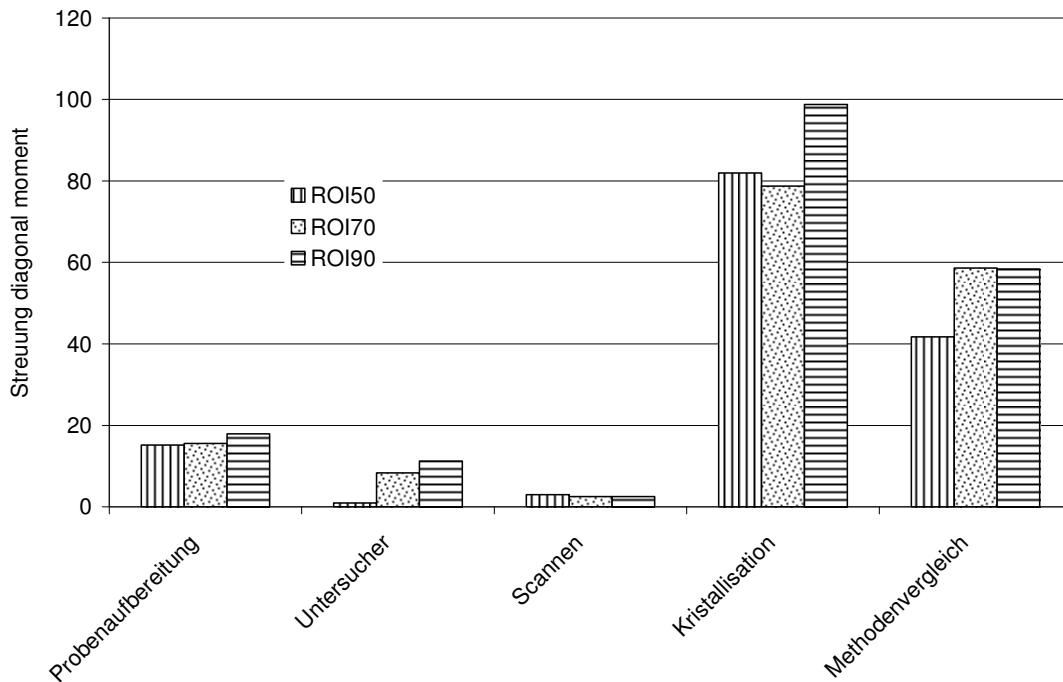


Abbildung 93: Streuung der Variable *diagonal moment* für Möhrenproben der verschiedenen Prozessschritte bei unterschiedlichen Bildausschnitten.

Die Verhältnisse des Beitrages der einzelnen Faktoren zur Streuung für die Variable *kappa* sind im Gegensatz zu Weizenproben mit *diagonal moment* vergleichbar. Auch hier hat die Kristallisation wieder den größten Einfluss. Die Streuung bei diesem Schritt ist größer als bei Weizenproben, wobei die ROI-Abhängigkeit anders ist. Für einen Bildausschnitt von 70 % zeigt *kappa* bei Möhrenproben die geringste Streuung.

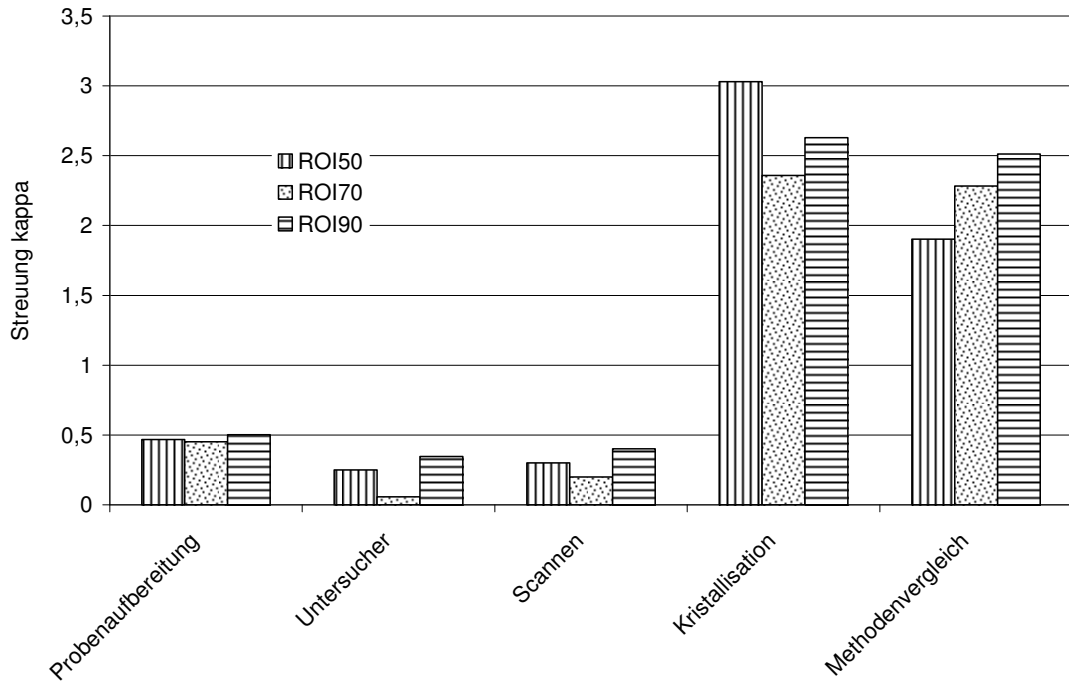


Abbildung 94: Streuung der Variable κ für Möhrenproben der verschiedenen Prozessschritte bei unterschiedlichen Bildausschnitten.

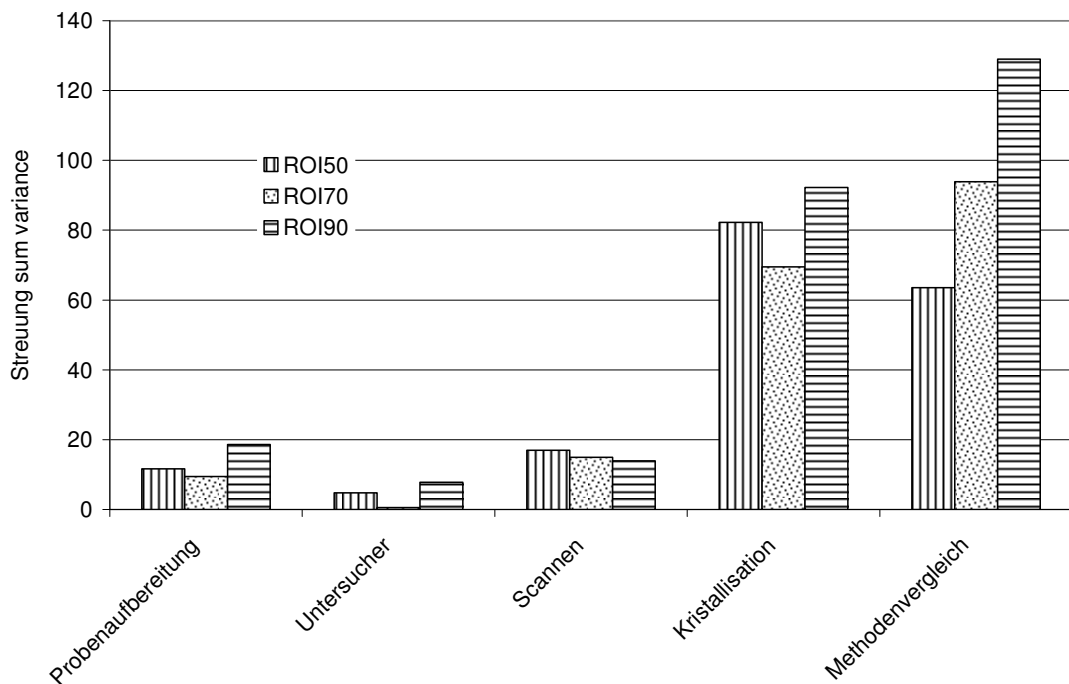


Abbildung 95: Streuung der Variable sum variance für Möhrenproben der verschiedenen Prozessschritte bei unterschiedlichen Bildausschnitten.

Der Einfluss der verschiedenen Faktoren auf die Streuung der Methode bei Möhrenproben und der Variable *sum variance* ist vom Verhältnis dem bei *kappa* vergleichbar. Der Methodenvergleich zeigt, dass diese Variable besonders auf Unterschiede zwischen verschiedenen Orten reagiert. Die Streuung im Schritt Kristallisation ist fast dreimal so groß wie bei Weizenproben. Auch hier kann die Abhängigkeit vom Bildausschnitt beobachtet werden, für ROI 70 ist die Streuung geringer als für die beiden anderen Bildausschnitte.

Fazit:

1. Die Kristallisation hat den größten Einfluss auf die Streuung der Methode, unabhängig von Variable und Bildausschnitt.
2. Die Streuung dieses Schrittes ist bei Möhrenproben erheblich größer als bei Weizenproben.
3. Für einen Bildausschnitt von 70 % ist die Streuung geringer als für 50 % und 90 %.
4. Die Probenaufbereitung, der Untersucher und das Scannen haben einen untereinander vergleichbaren Einfluss auf die Streuung.
5. Die Variation zwischen den drei Laboren liegt im Bereich der Streuung der Kristallisation; beide Einflüsse sind vergleichbar stark.

Dazu gelten die Punkte 5 – 7 im Fazit der Streuung bei Weizenproben.

9.4 Streuung der Methode für Apfelproben

Für Apfelproben wurde die Wiederholpräzision der Methode ermittelt, d.h. der Einfluss der Schritte Probenaufbereitung und Kristallisation wurde durch mehrfache Wiederholung dieser Schritte ermittelt. Hierzu wurde eine Apfelprobe an zwei verschiedenen Tagen verarbeitet, daher lässt sich hier die Standardabweichung der Streuung angeben. Für *diagonal moment* zeigt sich ein vergleichbares Ergebnis bei Apfelproben wie auch schon bei Weizen und Möhren. Der Schritt Kristallisation hat einen erheblich stärkeren Einfluss auf die Streuung als die Probenaufbereitung. Die Streuung ist etwas größer als bei Möhrenproben.

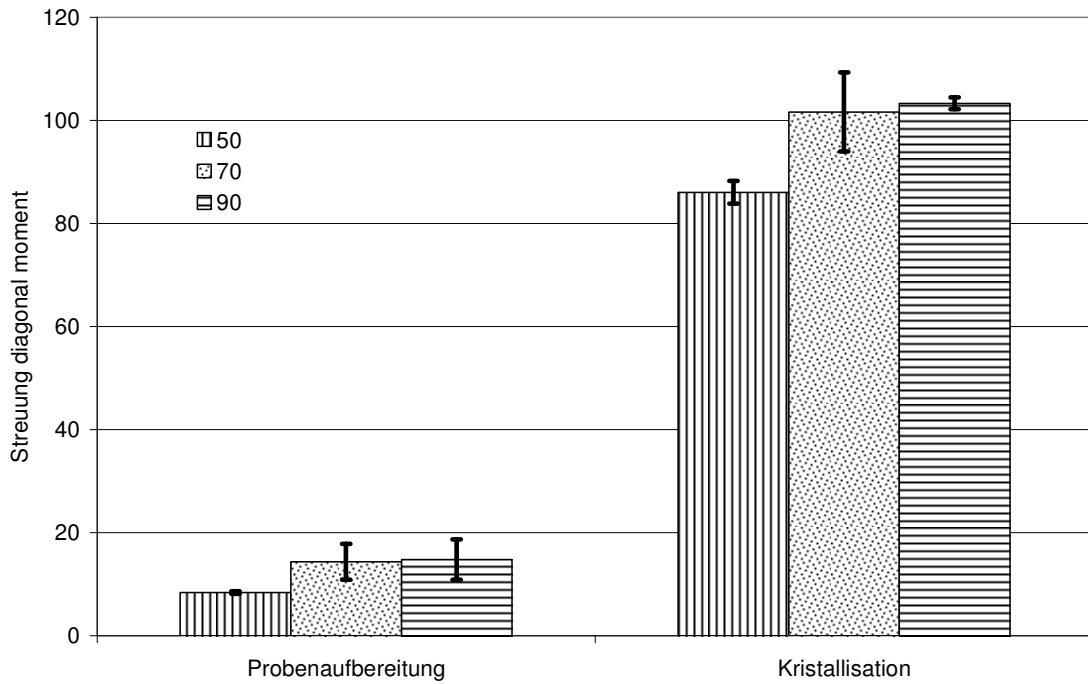


Abbildung 96: Streuung der Variable *diagonal moment* für Apfelproben der verschiedenen Prozessschritte bei unterschiedlichen Bildausschnitten.

Auch für die Variablen *kappa* und *sum variance* zeigt sich ein mit Möhren- und Weizenproben vergleichbares Verhältnis des Einflusses von Kristallisation und Probenaufbereitung. Die Streuung nimmt hier mit zunehmendem Bildausschnitt ab.

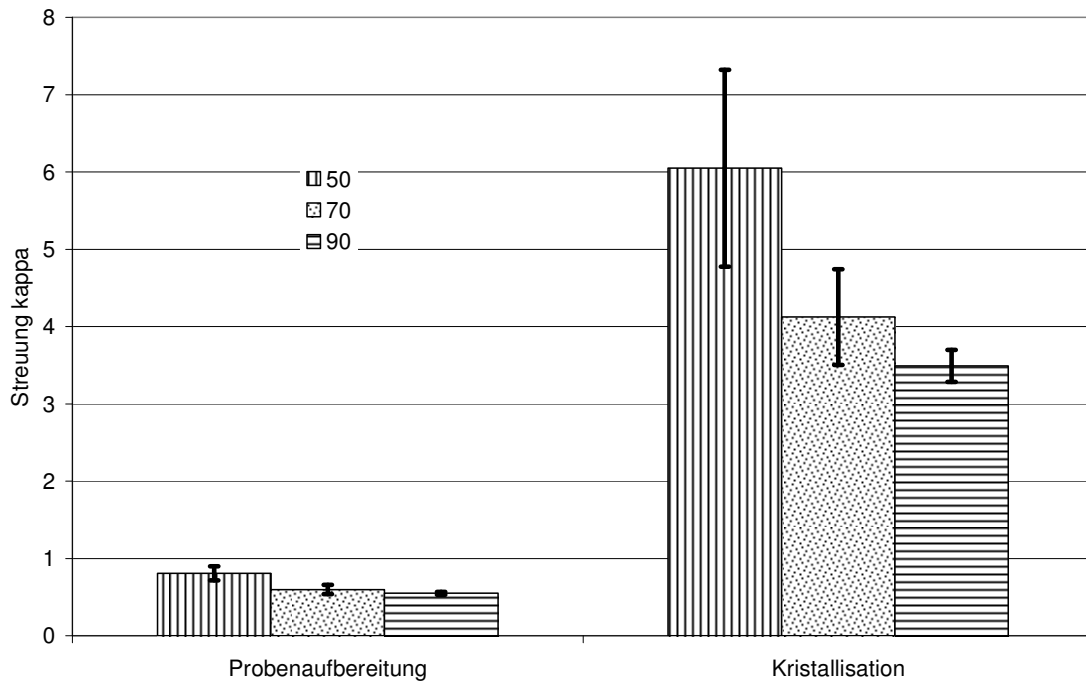


Abbildung 97: Streuung der Variable κ für Apfelproben der verschiedenen Prozessschritte bei unterschiedlichen Bildausschnitten.

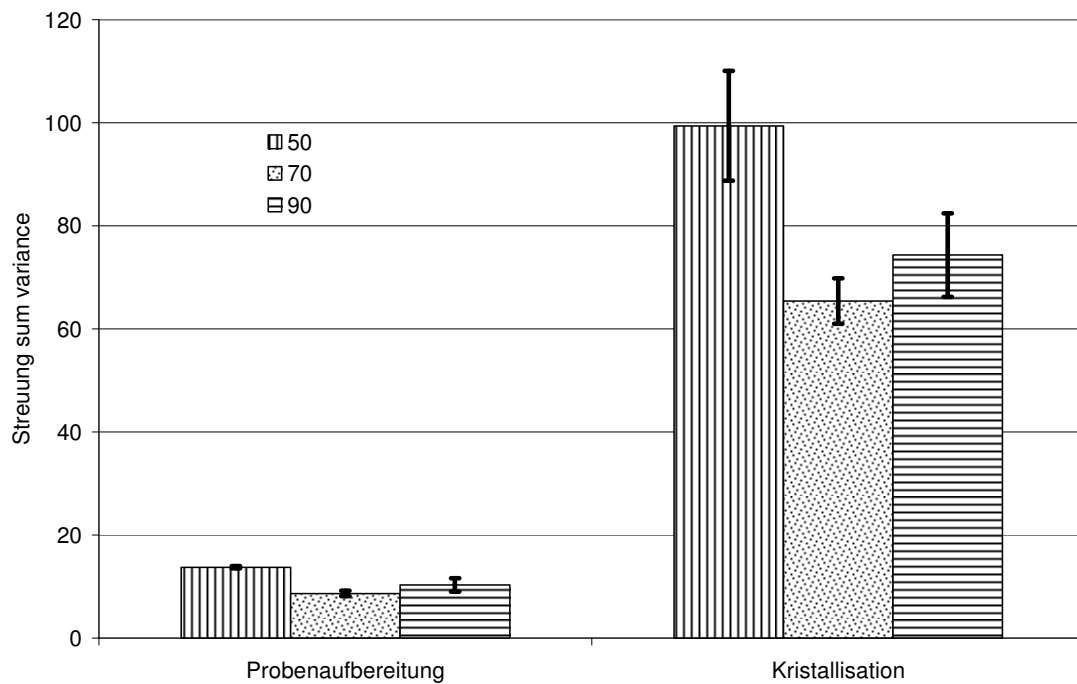


Abbildung 98: Streuung der Variable $sum\ variance$ für Apfelproben der verschiedenen Prozessschritte bei unterschiedlichen Bildausschnitten.

Fazit:

1. Die Kristallisation hat den größten Einfluss auf die Streuung der Methode, unabhängig von Variable und Bildausschnitt.
2. Die Streuung dieses Schrittes ist bei Apfelproben größer als bei Möhrenproben.
3. Die Streuung nimmt mit zunehmendem Bildausschnitt ab.

Dazu gelten die Punkte 5 – 7 im Fazit der Streuung bei Weizenproben.

10 Anwendung der Methoden zur Unterscheidung von Proben aus unterschiedlichem Anbau und verschiedenen Verarbeitungsschritten

Die in den vorherigen Kapiteln charakterisierten und standardisierten Methoden wurden für die Probenarten Weizen, Möhre und Apfel auf verschiedene Fragestellungen angewendet. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt. Dabei werden neben den Ergebnissen der Texturanalyse für drei ausgewählte Variablen und drei Bildausschnitte auch die Ergebnisse der statistischen Auswertung mit dem beschriebenen lme-Modell gezeigt. Das Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, für welche Fragestellungen sich die Biokristallisation eignet. Dabei geht es um die Trennung von Proben aus verschiedenem Anbau und verschiedener Verarbeitungsschritte. Wie gezeigt werden konnte, hängt das Ergebnis der Texturanalyse und damit auch der statistischen Auswertung sowohl vom gewählten Mischungsverhältnis, als auch vom Bildausschnitt ab. Es werden deshalb auch nur Ergebnisse verglichen, die mit gleichem Mischungsverhältnis erzeugt wurden. Der F-Wert als Maß für die statistische Trennung zweier oder mehrerer Proben wird in Abhängigkeit vom Bildausschnitt angegeben. Die Signifikanz der Trennung verschiedener Proben wird mit dem p-Wert bestimmt, der aus dem lme-Modell berechnet wurde. Der Übersicht halber wird der p-Wert nur für einen ausgewählten Bildausschnitt angegeben. Die Herkunft der Proben ist beschrieben. Es wird auf die Darstellung und Diskussion der Charakterisierung eines Teiles der hier untersuchten Proben mit anderen Methoden weitgehend verzichtet und auf die entsprechenden Abschlußbericht der Projekte BÖL 02OE170 und 02OE170/F verwiesen. In der vorliegenden Arbeit werden nur die Angaben gemacht, die für die Beschreibung der Probenherkunft (Anbau, Verarbeitung) unmittelbar von Bedeutung sind.

10.1 Anwendung der Methode für verschiedene Fragestellungen mit Weizenproben

10.1.1 Unterscheidung verschiedener Weizensorten

Zwei Weizensorten *Titlis* und *Tamaro* wurden von der Firma Otto Hauenstein Samen, Bahnhofstrasse 92, CH-8197 Rafz geliefert.

Titlis wurde erzeugt, geerntet und gereinigt von Vitus Schafer, CH-1715 Altersvil in 840 m Höhe auf einem ökologischen Betrieb mit folgender Fruchtfolge: Klee, Klee, Kartoffel, Weizen. Boden: mittlerer Boden, sandig.

Tamaro wurde erzeugt, geerntet und gereinigt von Rudolph Lüthi, CH-3438 Lauperswil. Vorrucht war Klee und Kartoffel. Boden: Humus 5%, Lehm 26% und Schluff 31%.

Die beiden Proben wurden an drei verschiedenen Tagen mit je einer Probenaufbereitung und 6-12facher Bildwiederholungen in zwei Kammern parallel und mit einem Mischungsverhältnis von 90/90 kristallisiert. Der Einfluss der Extraktmenge auf das Ergebnis wurde bereits in Kapitel 8.2.1 diskutiert.

Die beiden Sorten können durch die Variable *kappa* und ROIs von 50 und 70 signifikant getrennt werden ($p < 0,05$). Wird die Extraktmenge bei gleichem Mischungsverhältnis von 10 auf 15% erhöht, so steigen die F-Werte und damit auch die Signifikanz. Für die beiden anderen Mischungsverhältnisse wird die Trennung durch die Erhöhung der Extraktmenge schlechter.

Für das Mischungsverhältnis 70/90 wurden die Proben an zwei verschiedenen Tagen mit einer Bildwiederholung von sechs je Probe und Tag kristallisiert. Das Trennungsvermögen ist hier am Rand der Platte, während es bei 90/90 mit mehr Probe zum Kristallisationszentrum anstieg. Die beiden Proben können aufgrund der geringeren Wiederholung nur noch bei einem Bildausschnitt von 90 % signifikant getrennt werden ($p < 0,05$).

Der Versuch mit einem Mischungsverhältnis von 110/90 wurde parallel zu dem Versuch mit 70/90 durchgeführt. Mit zunehmender Probenmenge steigt das Trennungsvermögen und geht noch weiter zum Kristallisationszentrum. Mit der Variablen *kappa* können die Proben bei ROI 50 und 70 signifikant getrennt werden ($p < 0,05$). Für *diagonal moment* ist bei ROI 90 die Trennung signifikant.

Auch mit der Steigbildmethode konnten die beiden Sorten anhand definierter morphologischer Kriterien statistisch signifikant unterschieden werden (vgl. Dissertation Aneta Zalecka).

10.1.2 Unterscheidung von Weizenproben aus verschiedenem Anbau

10.1.2.1 Weizenproben aus dem DOK-Versuch

Die Proben aus dem DOK-Versuch wurden im Abschlussbericht Projekt 02OE170 dokumentiert. Sie stammen aus dem seit 1977 laufenden DOK-Versuch in Therwil/Schweiz. Dieser Langzeit-Versuchsanbau wurde 1977 vom Forschungsinstitut für Biologischen Landbau in der Schweiz (FiBL) begonnen und wird heute zusammen mit der Eidgenössischen Forschungsanstalt für

Agrarökologie und Landbau (FAL) betreut (Mäder et al. 1993, Mäder et al. 2002). Der DOK-Versuch umfasst insgesamt fünf verschiedene Anbauvarianten mit vierfacher Feldwiederholung. Die Verfahrensunterschiede liegen in der Düngung und im Pflanzenschutz, nicht in der Fruchtfolge und der Bodenbearbeitung. Insgesamt gibt es 96 Parzellen mit einer Größe von jeweils 100 m². Die Anbauvarianten integriert (IP), organisch-biologisch und biologisch-dynamisch werden im DOK-Versuch in zwei Intensitätsstufen der Düngung unterschieden, wobei für diese Untersuchungen nur die praxisüblichen Düngungsvarianten mit 1,4 DGVE/ha für die biologisch-dynamische (Probe wird im Folgenden mit D2 bezeichnet) bzw. der organisch-biologischen (Probe wird im Folgenden mit O2 bezeichnet) sowie 1,0 Norm-Mistdüngung der integrierten Produktion (Probe wird im Folgenden mit K2 bezeichnet) und der Mineraldüngung (Probe wird im Folgenden mit M bezeichnet) und schließlich der ungedüngten Kontrolle (Probe wird im Folgenden mit N bezeichnet) verwendet.

Für die Periode 1999-2005 wurden die Kulturarten Kartoffeln (Sorte *Desiree*), Winterweizen (1999 und 2002: Sorte *Tamaro*; 2003: Sorte *Titlis*) mit Untersaat, Sojabohnen (Sorte *Maple Arrow*), Mais (Sorte *Magister*), Winterweizen ohne Untersaat und zweimal Klee gras (Standardmischung 330) verwendet. Die Proben für die Untersuchungen stammen aus den Weizen-1-Anbaufeldern. Die Proben wurden gedroschen und in der Schweiz sowie kurzzeitig im Institut für ökologischen Landbau in Trenthorst (FAL-OEL) gelagert und von dort kodiert versandt und im Labor in Witzenhausen kristallisiert. Die Dekodierung der Proben erfolgte erst nach Hinterlegung der Ergebnisse in Trenthorst bzw. am FiBL. Alle Proben wurden als bulk-Proben (d.h. eine Mischung der vier Feldwiederholungen) mit einer mehrfachen Probenaufbereitung und Bildwiederholung, an verschiedenen Tagen in zwei Kammern parallel kristallisiert. Es wurden zwei Mischungsverhältnisse angewendet: 70/90 (Proben 2003) und 90/90 (1999, 2002, 2003). Die kristallisierten Platten wurden gescannt und mit der Texturanalyse ausgewertet. Mit den Variablen der Texturanalyse wurde eine Lineare Diskriminanzanalyse (LDA) im Programm JMP durchgeführt. Für die Proben aus 1999 werden diese Ergebnisse für alle Bildausschnitte dargestellt, damit die Abhängigkeit vom gewählten ROI deutlich wird. Für alle anderen Proben (auch Möhrenproben) wird nur das Ergebnis mit

der besten Diskriminierung innerhalb verschiedener Bildausschnitte dargestellt, die anderen Ergebnisse sind im Anhang aufgeführt.

Die fünf Proben aus dem Versuchsjahr 1999 wurden in 2003 an zwei Tagen mit je einer Wiederholung der Probenaufbereitung und einer sechsfachen Bildwiederholung pro Kammer in zwei Kammern parallel kristallisiert. Die Keimfähigkeit der Proben wurde vorab am FiBL (Dr. Paul Mäder) untersucht und sichergestellt, dass die Proben für die Untersuchung noch eingesetzt werden konnten.

Die Unterschiede zwischen den Proben anhand der ausgewählten Variablen der Texturanalyse sind gering und abhängig vom Bildausschnitt. Für *diagonal moment* können alle behandelten Proben von der Kontrolle unterschieden werden, wobei die Kontrolle (Nullvariante) eine andere Abhängigkeit vom Bildausschnitt zeigt als die vier anderen Proben. Bei ROI 90 können die drei mit Mist gedüngten Proben von der mineralisch gedüngten Probe (M) und der Nullvariante getrennt werden.

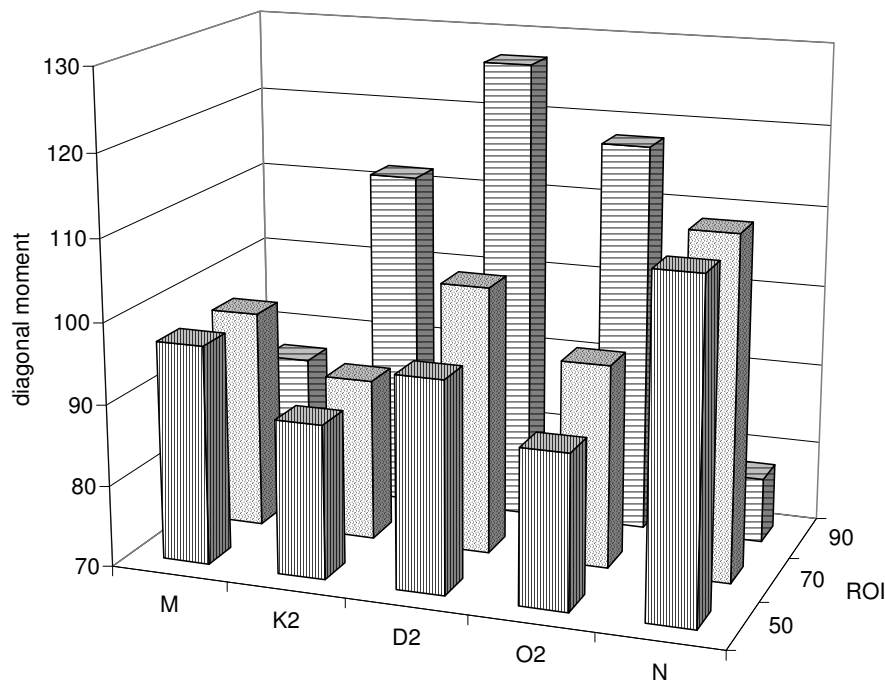


Abbildung 99: Variable *diagonal moment* für die fünf Weizenproben aus dem DOK-Versuch 1999 in Abhängigkeit vom Bildausschnitt und einem Mischungsverhältnis von 90/90.

In Tabelle 8 sind die Prozent Missklassifikation als Ergebnis der LDA aufgeführt.

ROI	Missklassifikation %	Erste 3 Variable einer schrittweisen LDA
40	26,4	<i>entropy, correlation, diagonal moment</i>
50	23,6	<i>diagonal moment, difference energy, invers. diff.moment</i>
60	23,7	<i>entropy, diagonal moment, difference entropy</i>
70	28,6	<i>entropy, diagonal moment, difference energy</i>
80	30,7	<i>correlation, diagonal moment, difference energy</i>
90	32,8	<i>entropy, diagonal moment, difference energy</i>
100	25	<i>entropy, energy, max. probability</i>

Tabelle 8: Missklassifikation (%) und die ersten 3 Variablen der Texturanalyse für die LDA in Abhängigkeit vom Bildausschnitt (ROI) für die DOK-Weizenproben 1999.

Die Abbildungen der LDA lassen sich folgendermassen erklären. Abgebildet sind jeweils die beiden ersten Gleichungen der LDA als x- und y-Achse. Jeder Punkt repräsentiert ein Bild, die Ringe repräsentieren die Proben, wobei jeder Ring mit dem 95 % Signifikanzniveau korrespondiert. Zusätzlich ist die Richtung der einzelnen Variablen markiert.

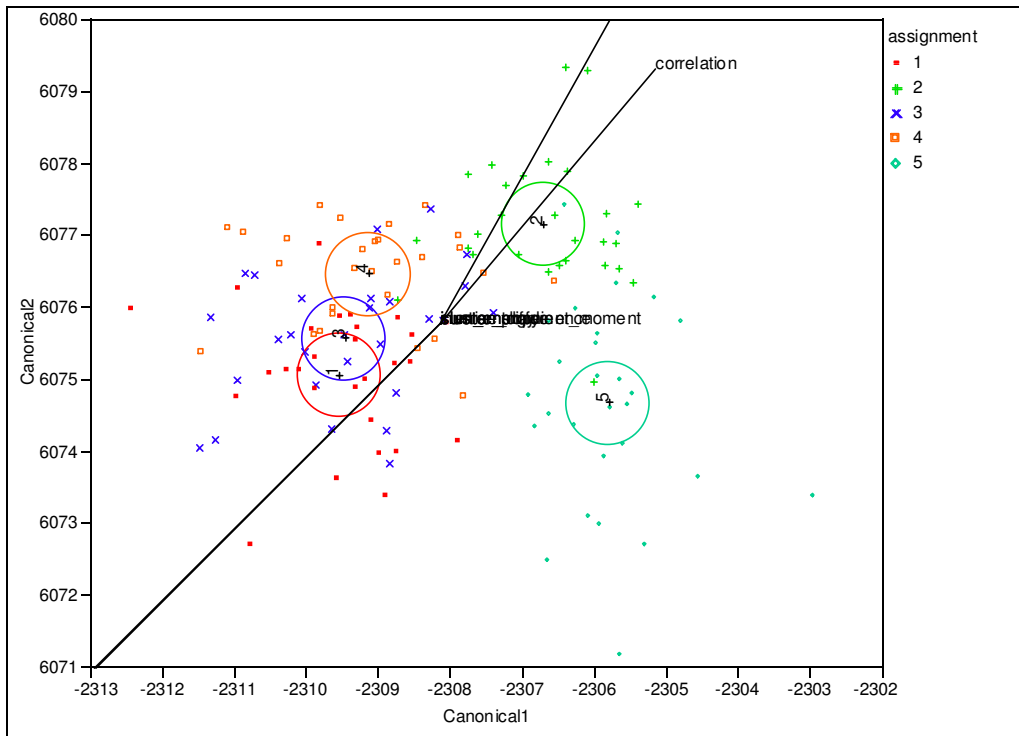


Abbildung 100: Canonical plot (LDA) mit den Variablen der Texturanalyse für die fünf Proben aus dem DOK-Versuch Ernte 1999 und einem Bildausschnitt von 40 % (1: O2; 2: M; 3: D2; 4: K2; 5: N).

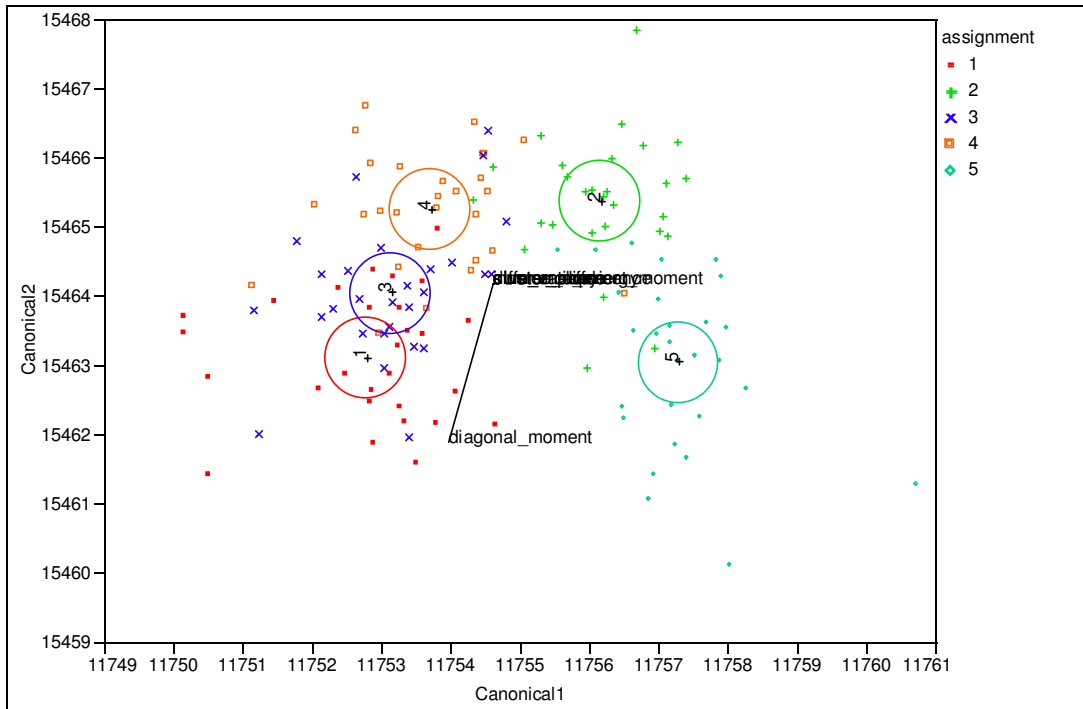


Abbildung 101: Canonical plot (LDA) mit den Variablen der Texturanalyse für die fünf Proben aus dem DOK-Versuch Ernte 1999 und einem Bildausschnitt von 50 % (1: O2; 2: M; 3: D2; 4: K2; 5: N).

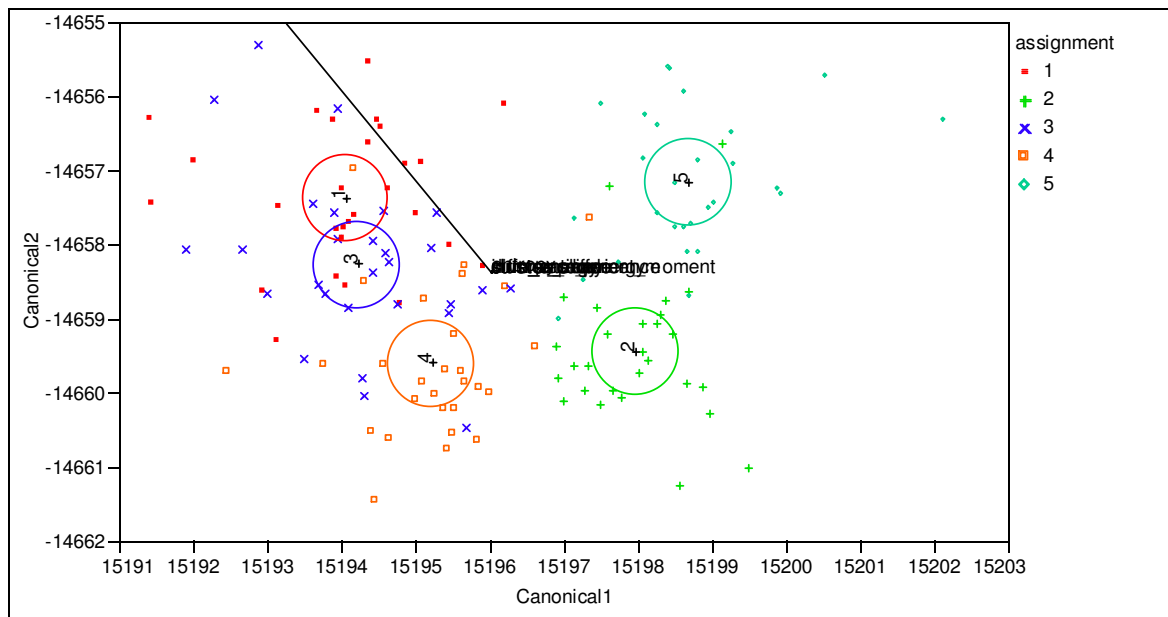


Abbildung 102: Canonical plot (LDA) mit den Variablen der Texturanalyse für die fünf Proben aus dem DOK-Versuch Ernte 1999 und einem Bildausschnitt von 60 % (1: O2; 2: M; 3: D2; 4: K2; 5: N).

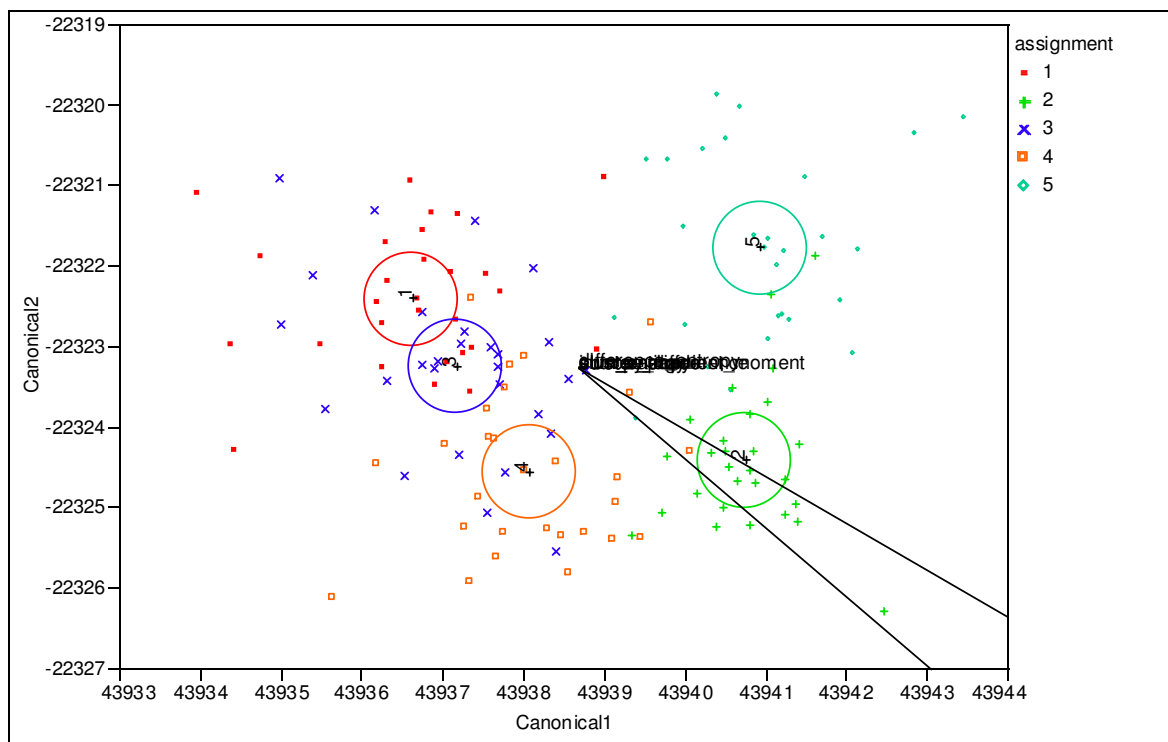


Abbildung 103: Canonical plot (LDA) mit den Variablen der Texturanalyse für die fünf Proben aus dem DOK-Versuch Ernte 1999 und einem Bildausschnitt von 70 % (1: O2; 2: M; 3: D2; 4: K2; 5: N).

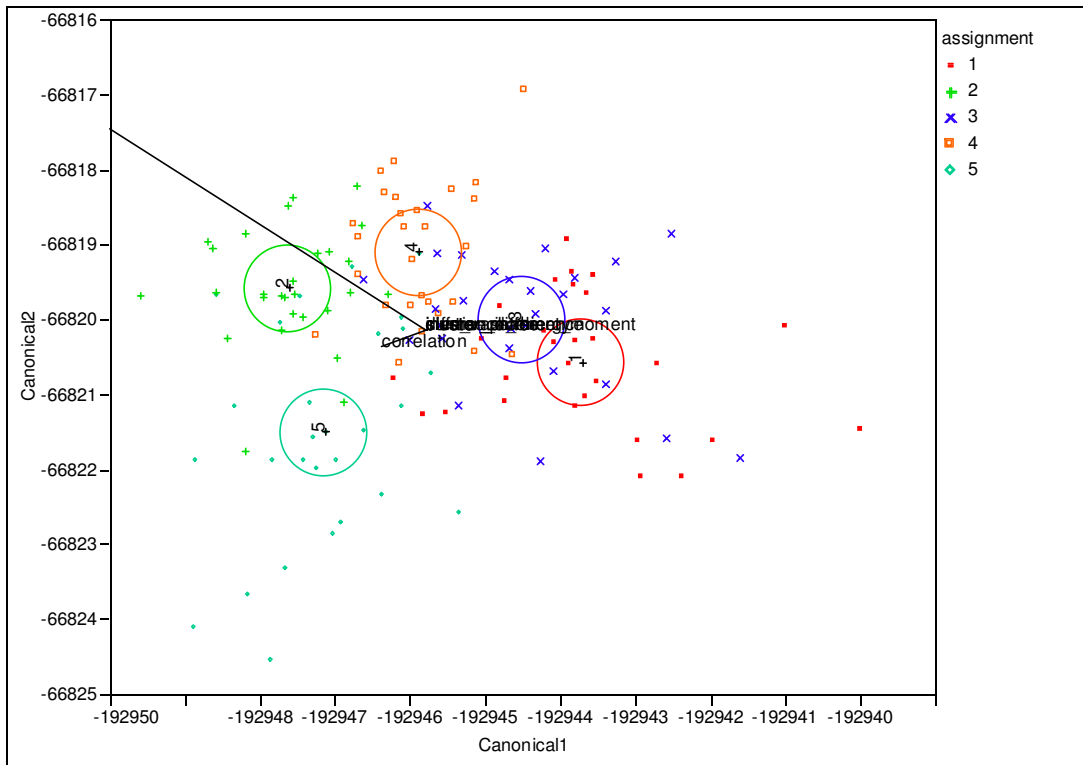


Abbildung 104: Canonical plot (LDA) mit den Variablen der Texturanalyse für die fünf Proben aus dem DOK-Versuch Ernte 1999 und einem Bildausschnitt von 80 % (1: O2; 2: M; 3: D2; 4: K2; 5: N).

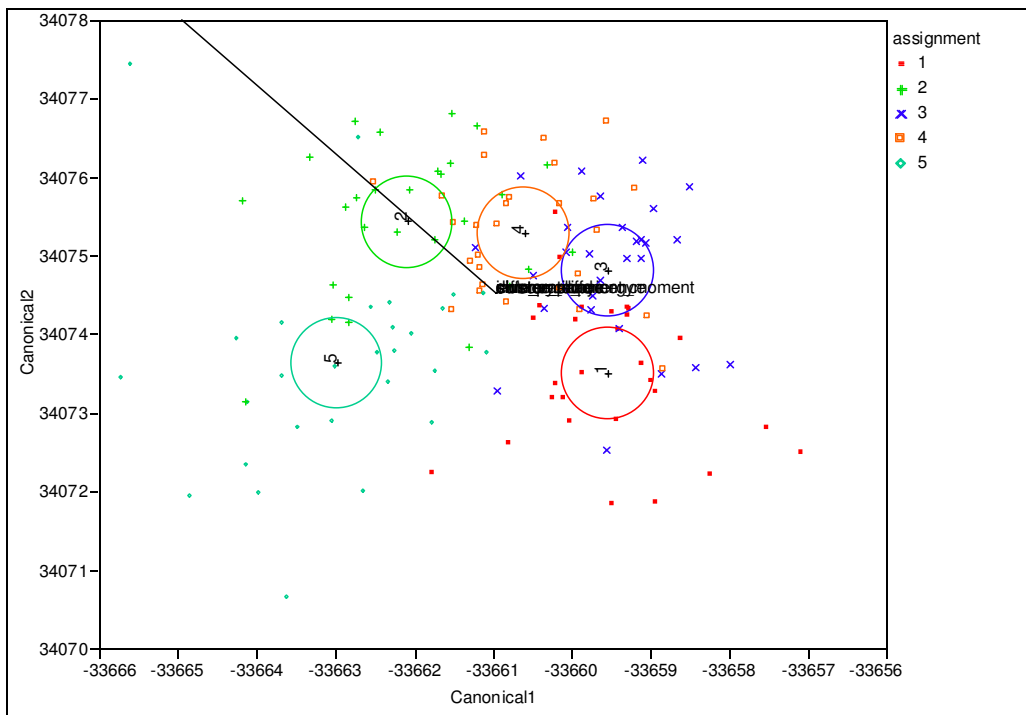


Abbildung 105: Canonical plot (LDA) mit den Variablen der Texturanalyse für die fünf Proben aus dem DOK-Versuch Ernte 1999 und einem Bildausschnitt von 90 % (1: O2; 2: M; 3: D2; 4: K2; 5: N).

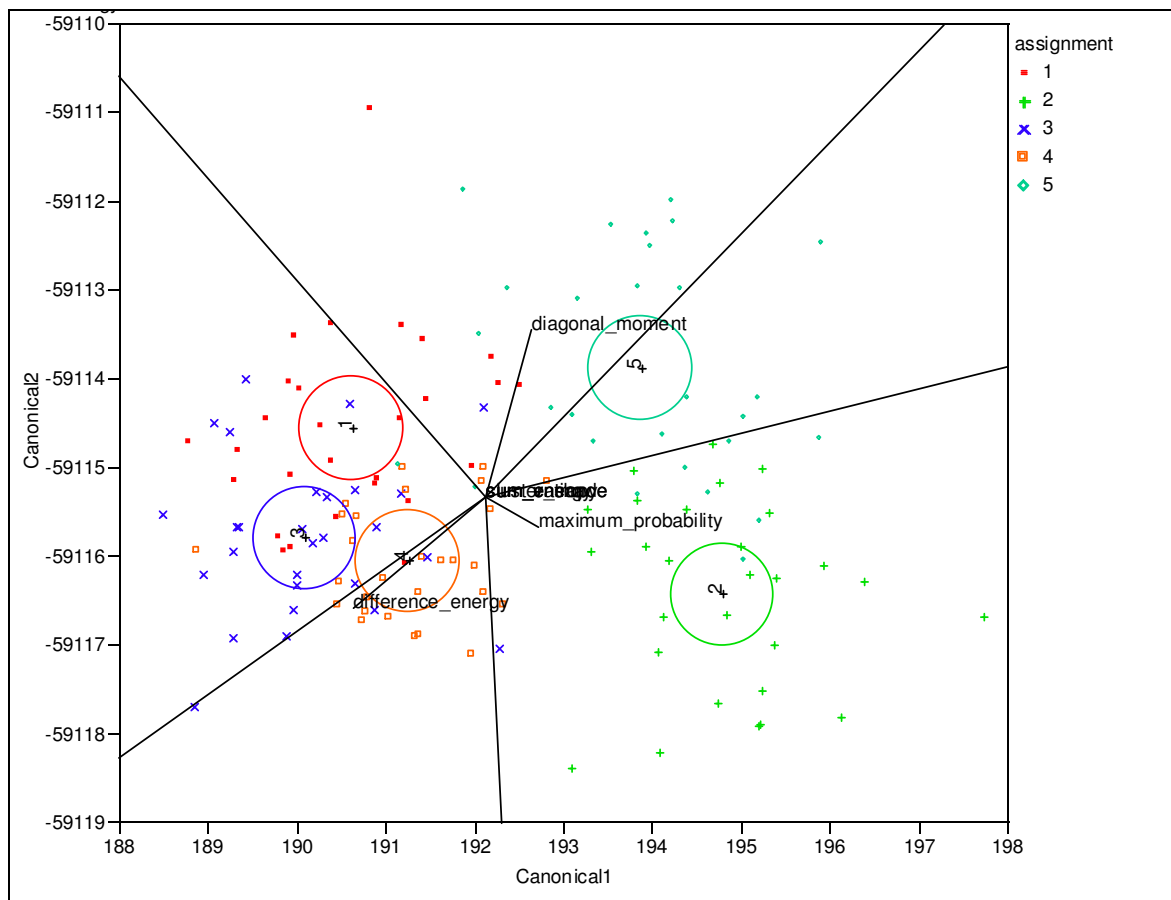


Abbildung 106: Canonical plot (LDA) mit den Variablen der Texturanalyse für die fünf Proben aus dem DOK-Versuch Ernte 1999 und einem Bildausschnitt von 100 % (1: O2; 2: M; 3: D2; 4: K2; 5: N).

Für alle Bildausschnitte können die fünf Weizenproben aus dem DOK-Versuch unterschieden werden, die Missklassifikation liegt zwischen 23 und 33 %, d.h. ca. 75 % der Bilder wurden korrekt zu einer Probe zugeordnet. Vor dem Hintergrund der hohen Streuung der Methode ist das ein sehr gutes Ergebnis und belegt, dass die Auswertung unter gleichzeitiger Berücksichtigung mehrerer Variablen, die Unterscheidung von Proben erheblich verbessert. Für alle Bildausschnitte kann die Nullvariante (N) und die mineralisch gedüngte Weizenprobe (M) von allen anderen abgetrennt werden. Die Trennung zwischen den beiden ökologischen Proben (D2, O2) und der Probe aus integrierter Produktion (K2) ist abhängig vom Bildausschnitt. Die beste Unterscheidung bringen die ROIs von 50 bis 80. Bei diesen ROIs ist die Trennung innerhalb der beiden ökologischen Proben geringer als für einen Bildausschnitt von 90 oder 100 %. Die organisch-biologische Probe (O2) kann

deutlicher als die biologisch-dynamische (D2) von der konventionellen (K2) unterschieden werden.

Die Proben aus der Ernte 2002 wurden im Frühjahr 2003 an drei verschiedenen Tagen mit jeweils einer Probenaufbereitung pro Tag und einer sechsfachen Bildwiederholung pro Probenaufbereitung und Kammer in zwei Kammern parallel kristallisiert. Die Bilder wurden gescannt und mit der Texturanalyse ausgewertet. Das Ergebnis basiert also auf 36 Bildern pro Probe mit einer dreifachen Wiederholung der Probenaufbereitung/Tag. Auch für die Ernte 2002 können die behandelten Proben wieder von der Nullvariante (N) getrennt werden. Für alle Proben ist diese Trennung signifikant ($p < 0,05$). Dabei ist die Trennung abhängig vom Bildausschnitt und der Probe. Für alle Proben ist die beste Trennung bei ROI < 80 . Die F-Werte liegen zwischen 20 und 30. Interessanterweise trennt die Variable *diagonal moment* die Nullvariante von der mineralischen, während für die Unterscheidung der ökologischen Varianten von der Kontrolle die Variable *kappa* und für die Probe K2 die Variable *sum variance* die beste Trennung bringt. Die biologisch-dynamische Probe lässt sich mit der Variable *kappa* für ROI > 90 von der mineralischen signifikant trennen ($F = 120$, $p < 0,05$), die andere ökologische Probe mit der Variable *cluster shade* bei ROI 60 und 70 ($F = 15$, $p < 0,05$). Die Trennung der Proben untereinander ist also abhängig von der Variablen. Die zusätzliche Abhängigkeit der Ergebnisse vom Bildausschnitt ist für die Variable *kappa* in Abbildung 107 gezeigt. Auch wenn mit dieser Variable und in den dort gewählten ROIs die beiden ökologischen Varianten nicht von der Probe K2 unterschieden werden können, wird das verschiedene Verhalten der Proben mit zunehmendem Bildausschnitt deutlich: Die Nullvariante und die mineralisch gedüngte Probe zeigen einen anderen ROI-Verlauf als die mit Mist behandelten.

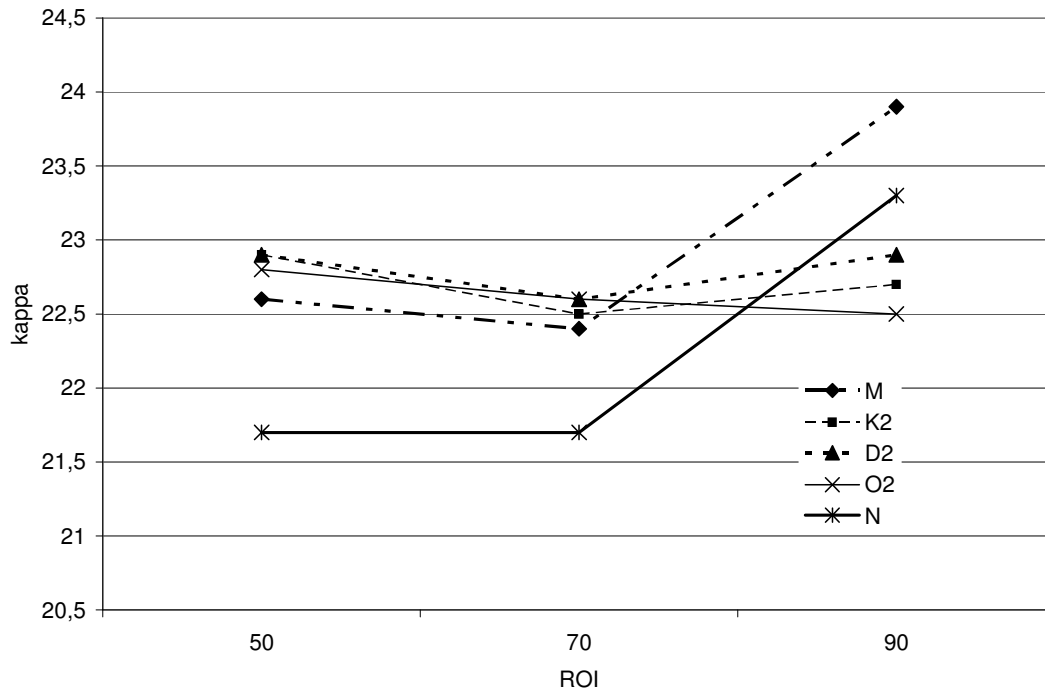


Abbildung 107: Variable κ für die fünf Proben aus dem DOK-Versuch Ernte 2002 in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Der Unterschied zwischen den Anbauvarianten ist gering und kann durch die Streuung der Methode nur mit einer mehrfachen Wiederholung von Probenaufbereitung/Tag und Kristallisation (Bild) statistisch abgesichert werden.

Für die Auswertung der Ergebnisse mit der Linearen Diskriminanzanalyse wurden zwei weitere Versuchstage dazu genommen. Es zeigt sich, dass sich auch für die Ernte 2002 alle behandelten Proben von der Nullvariante unterscheiden lassen. Zusätzlich bilden die beiden ökologischen und die beiden konventionell angebauten Proben jeweils eine Gruppe. Diese Zuordnung der fünf Proben in drei Gruppen ist unabhängig vom Bildausschnitt. Für ROI 90 gibt es die beste Gruppierung; wenn die beiden ökologischen und die beiden konventionellen Proben jeweils der einen Gruppe zusammengefasst werden, ist die Missklassifikation bei 20 %. Eine Verringerung der Probenmenge auf ein Mischungsverhältnis von 70/90 brachte eine deutliche Verschlechterung der Unterscheidung der Proben.

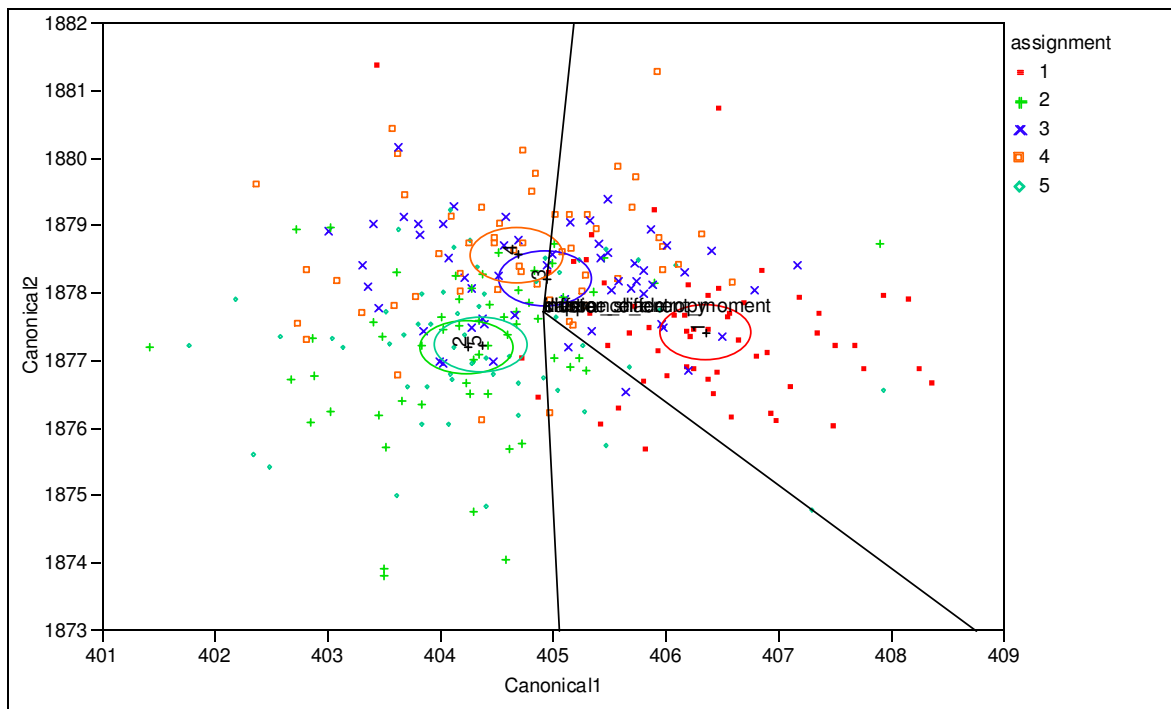


Abbildung 108: Canonical plot (LDA) mit den Variablen der Texturanalyse für die fünf Proben aus dem DOK-Versuch Ernte 2002 und einem Bildausschnitt von 90 % (1: N; 2: M; 3: D2; 4: O2; 5: K2).

Die Proben der Ernte 2003 wurden nach der Ernte im Herbst 2003 an drei verschiedenen Tagen mit je einer Probenaufbereitung in zwei Kammern parallel gemessen (Bildwiederholung von 3-7 je Kammer und Tag) und die Ergebnisse über alle Tage und Kammern zusammengefasst. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Anbauvarianten sind (bezogen auf jeweils eine Variable der Texturanalyse) gering und können daher nur mit einer mehrfachen Wiederholung von Probenaufbereitung/Tag und Kristallisation statistisch erfasst werden. Die Lineare Diskriminanzanalyse erbrachte die beste Trennung der Anbauvarianten bei kleinen Bildausschnitten. Unabhängig vom ROI werden allerdings für die Proben der Ernte 2003 die konventionell angebauten Varianten eher zu der Kontrolle (N) gruppiert.

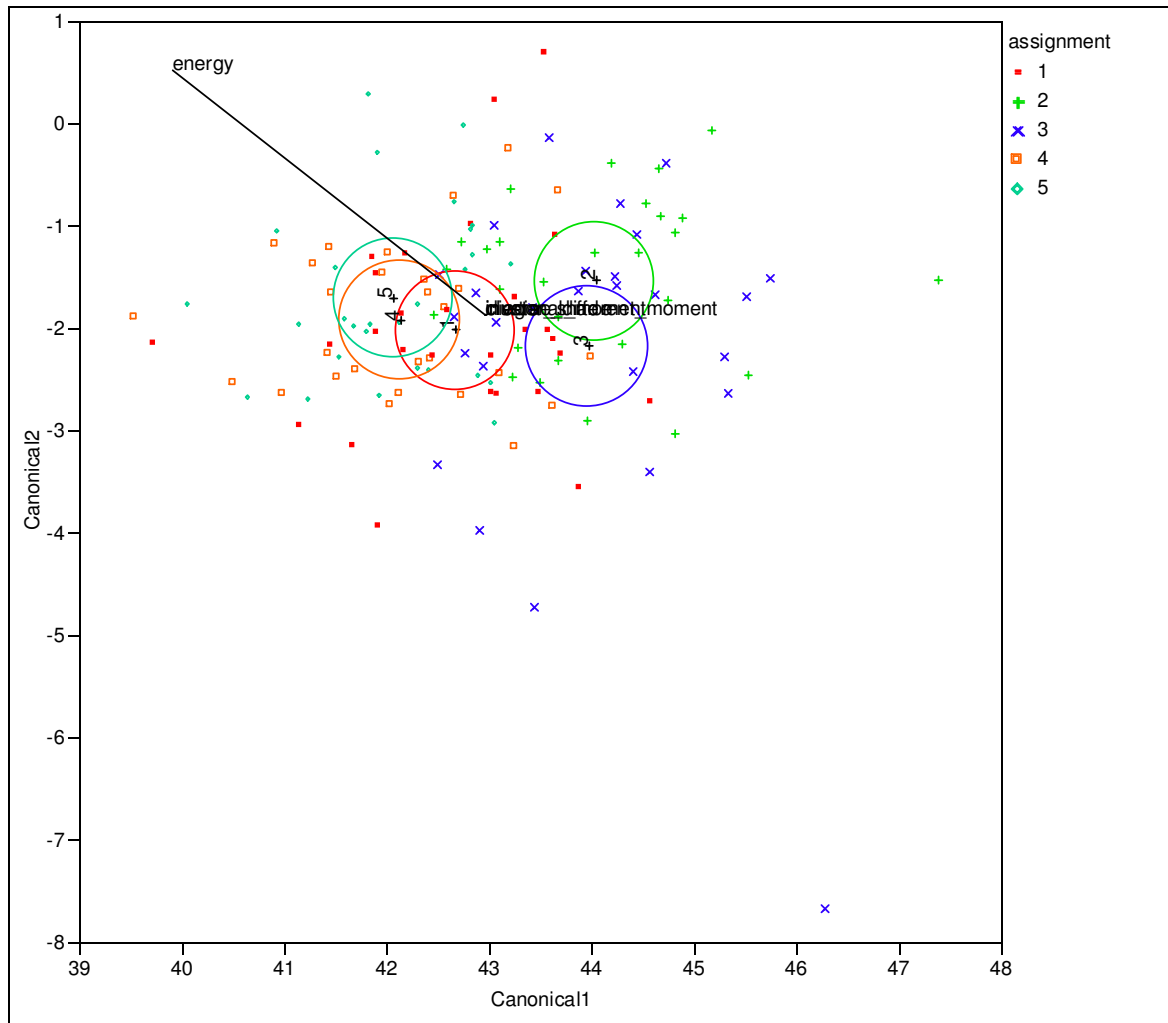


Abbildung 109: Canonical plot (LDA) mit den Variablen der Texturanalyse für die fünf Proben aus dem DOK-Versuch Ernte 2003 und einem Bildausschnitt von 40 % (1: K2; 2: O2; 3: D2; 4: M; 5: N).

In Vorversuchen wurde der Einfluss eines anderen Mischungsverhältnisses auf die Unterscheidung der Proben getestet. Im Gegensatz zu den Proben aus der Ernte 2002 zeigte sich dabei, dass eine Verringerung der Probenmenge pro Platte zu einer deutlichen Verbesserung der Unterscheidung führte, die relative Anordnung der Proben (LDA-Gruppierung) aber unverändert blieb. Für diesen Versuch wurden alle fünf Weizenproben an drei verschiedenen Tagen mit je einer Probenaufbereitung und einer siebenfachen Bildwiederholung pro Kammer in zwei Kammern parallel kristallisiert, was in 42 Bildern pro Probe resultierte. Damit war eine statistisch signifikante Trennung der Proben möglich. Für die Variable *sum variance* ist das Ergebnis in Abbildung 110 dargestellt. Alle Proben zeigen eine Abnahme der Werte mit zunehmendem Bildausschnitt.

Die ökologischen Proben haben geringere Werte als die konventionellen und die Nullvariante.

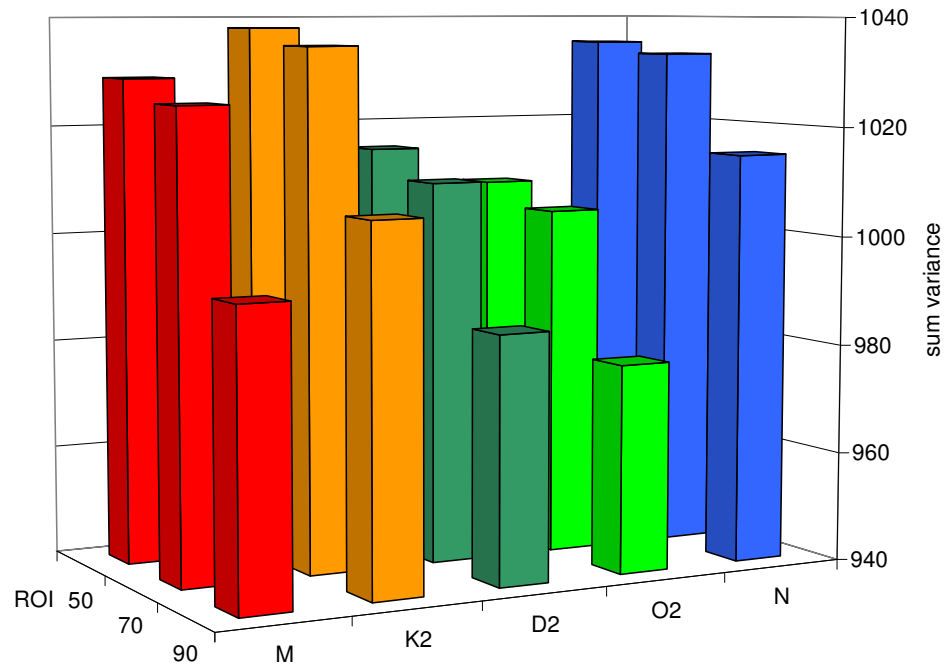


Abbildung 110: Variable *sum variance* für die fünf Proben aus dem DOK-Versuch Ernte 2003 in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Wie bereits in den vorherigen Erntejahren beobachtet, lassen sich die verschiedenen Proben mit unterschiedlichen Variablen voneinander trennen. Die integrierte Probe K2 lässt sich als einzige Probe nicht von der Nullvarianten trennen ($F < 2$). Die beiden ökologischen Proben werden von der Nullvarianten signifikant getrennt ($F = 20$ bzw. 40) für u. a. die Variable *sum variance* und einem ROI > 40 ($p < 0,05$). Die mineralische kann in einem Bildausschnitt von 70 bis 90% ebenfalls signifikant von der Nullvarianten getrennt werden (Variable *diagonal moment*, $F = 20$, $p < 0,05$). Beide ökologischen Proben können von der mineralischen und der Probe K2 unterschieden werden. Für die organisch-biologische Probe ist der Unterschied zu beiden Proben signifikant (Variable *sum variance* ROI 40-80, $F = 30$, $p < 0,05$). Die biologisch-dynamische Variante unterscheidet sich von der integrierten Probe K2 bei einem Bildausschnitt von 40 und 50% signifikant für *sum variance* ($F = 20$, $p <$

0,05), die Trennung von der mineralisch gedüngten Probe M ($F = 10$, ROI 40-70) ist dagegen nicht signifikant ($p = 0,08$).

Für die Auswertung mit der Linearen Diskriminanzanalyse wurden zwei weitere Versuchstage hinzugenommen (56 Bilder pro Probe). Das unter maximaler Variation aufgenommene Ergebnis bestätigte die gezeigte Gruppierung bei einem Mischungsverhältnis von 90/90. Die Anbauverfahren lassen sich deutlich unterscheiden. Die beiden ökologischen Varianten bilden eine Gruppe. Die konventionell erzeugten Proben liegen bei der Nullvarianten. Sowohl die Unterscheidung als auch die Gruppierung ist unabhängig vom Bildausschnitt. Werden die Proben aus ökologischem und konventionellem Anbau in je einer Gruppe zusammengefasst, so ist die Missklassifikation bei 21 %.

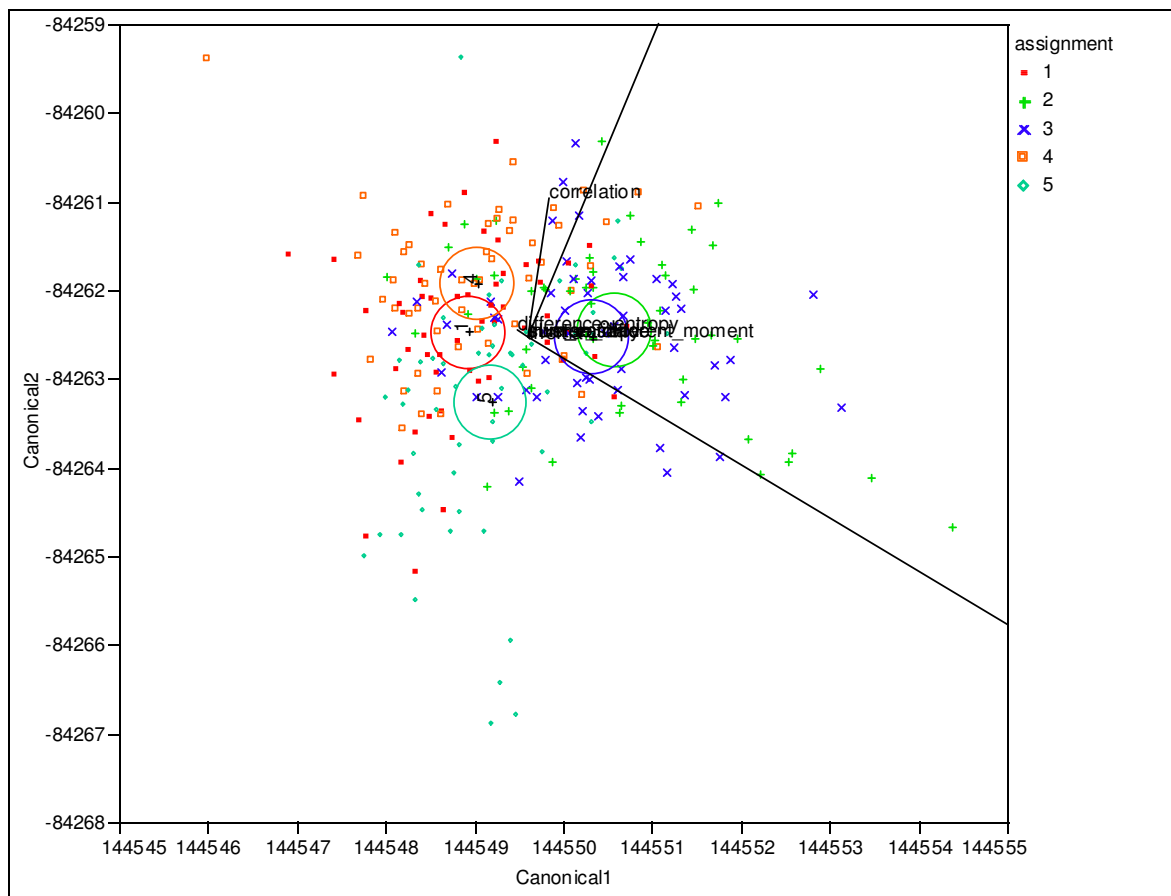


Abbildung 111: Canonical plot (LDA) mit den Variablen der Texturanalyse für die fünf Proben aus dem DOK-Versuch Ernte 2003, einem Mischungsverhältnis von 70/90 und einem Bildausschnitt von 90 % (1: K2; 2: O2; 3: D2; 4: M; 5: N).

Bezug der Ergebnisse der Biokristallisation zu Inhaltsstoffen

Das Ergebnis aus dem Erntejahr 2003 ist überraschend. Der konventionelle Anbau der beiden Proben K2 und M führt zu signifikant höheren Stickstoffgehalten in den Weizenkörnern, wohingegen die Nullvariante (ungedüngt) den geringsten Gehalt an Stickstoff hat. Diese relative Anordnung der Proben durch die N-Düngung und dem folgenden N-Gehalt der Proben wird durch die Methode nicht reflektiert. Die Gruppierung der Proben K2, M zu N kann nicht durch den Stickstoff-Metabolismus erklärt werden. Messungen des sekundären Pflanzenstoffs Lutein in den Weizenkörnern zeigten ein umgekehrt proportionales Verhältnis zum Stickstoffgehalt und können die Ergebnisse der Biokristallisation ebenfalls nicht erklären (s. Dissertation Andreas Werries). Eine ähnliche Zuordnung der konventionellen angebauten Proben in eine Gruppe mit der Nullvariante kann allerdings für die Messung des Kaliumgehaltes in den Weizenkörnern gezeigt werden (s. Abschlussbericht Projekt BÖL 02OE170/F). Dieses Ergebnis ist überraschend, da bisher eher ein Zusammenhang der Ergebnisse der Methode mit dem N-Metabolismus der Pflanze gesehen wurde (vgl. Andersen et al. 2001) und ein anderes Kupfersalz CuSO_4 für den Nachweis von Aminosäuren eingesetzt wird (Biuret-Reaktion). Im Projekt BÖL 02OE170 wurden die Proben parallel mit der Fluoreszenz-Anregungs-Spektroskopie (FAS) gemessen. Die Klassifizierung der fünf Proben nach der Stärke der „samentypischen Ausprägung“ brachte eine vergleichbare Zuordnung mit der hier gezeigten. Dort wurde angenommen, dass die beiden ökologischen Proben eine höhere „samentypische Ausprägung“ als die drei anderen Varianten hätten (Abschlussbericht BÖL 02OE170). Mit den vorliegenden Untersuchungen zur Biokristallisation kann eine Unterscheidung und relative Anordnung von Proben (nominal und ordinal) erfolgreich vorgenommen werden. Eine Klassifizierung der Proben mit definierten Qualitätsaspekten ist aber nur möglich, wenn entsprechende Standards oder Referenzbilder entwickelt werden. Diese Arbeiten können auf den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen aufbauen. Aus der Methode selbst kann aber trotzdem ein Zusammenhang zur Art der Düngung hergestellt werden. Der Vergleich der fünf Proben bei der Variable *diagonal moment* und einem großen Bildausschnitt (90 % der Platte) zeigte für die Ernte, dass sich die mit Mist gedüngten Proben (D2, O2, K2) deutlich von den anderen beiden

unterscheiden lassen. In Abbildung 112 ist daher das Ergebnis der Variablen für die fünf Proben in Abhängigkeit vom Erntejahr dargestellt. Der Effekt zeigt sich in allen drei Jahren. Offenbar hat die Art und Weise, wie der Stickstoff der Pflanze dargereicht wird, einen Einfluss auf das Produkt, der mit der Methode ermittelt werden kann. Die Untersuchungen der Bodenqualität (Mikroorganismen) brachten hinsichtlich der Anbauvarianten vergleichbare Ergebnisse (Mäder 2005).

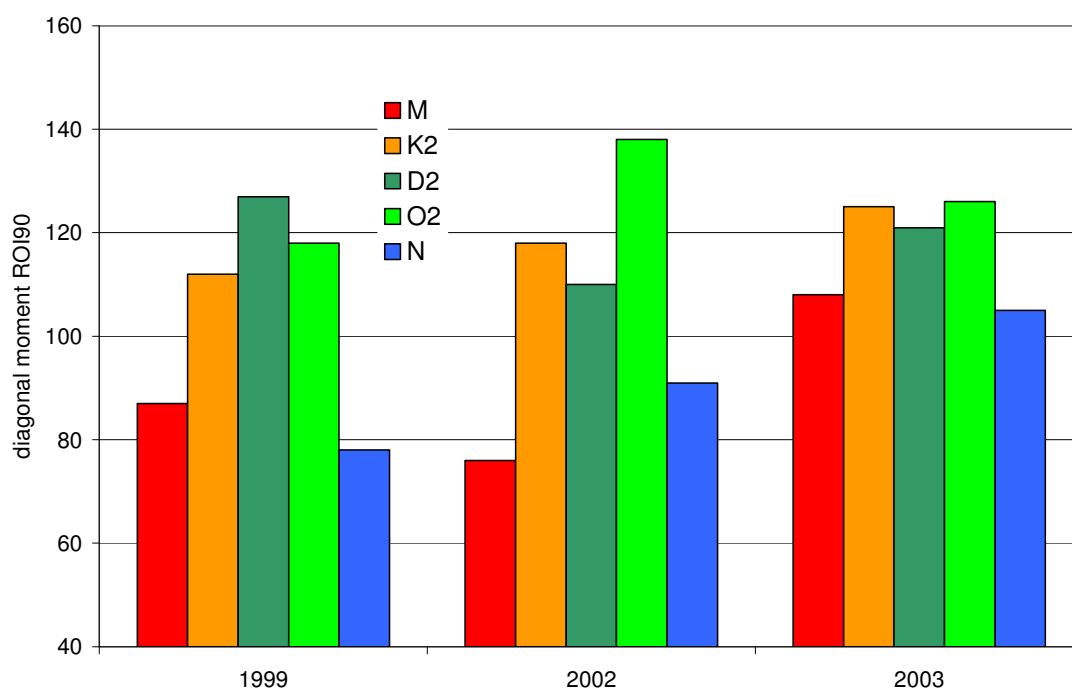


Abbildung 112: Variable *diagonal moment* für die fünf Proben aus dem DOK-Versuch bei ROI 90 in Abhängigkeit vom Erntejahr.

Erst wenn die Probenmenge pro Platte variiert wird, lassen sich auch die Proben M (mineralische Düngung) und N (Nullvariante) unterscheiden. Wie in Abbildung 113 gezeigt, reagiert die Nullvariante weniger stark auf eine Erhöhung der Probenmenge als die konventionelle, nur mineralisch gedüngte Probe.

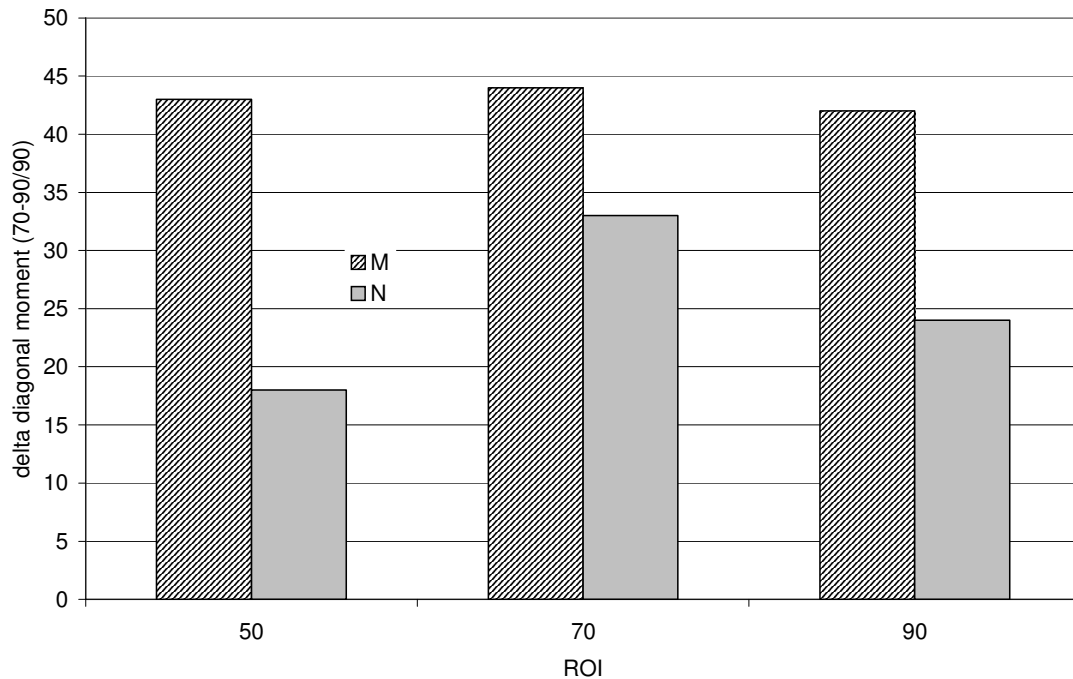


Abbildung 113: Differenz der Variable *diagonal moment* von zwei verschiedenen Mischungsverhältnissen (70/90 und 90/90) für die Proben M und N aus dem DOK-Versuch Ernte 2003 in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Für alle drei Erntejahre konnten die ökologisch angebauten Varianten signifikant von der Nullvarianten unterschieden werden. Die Unterscheidung zwischen ökologisch und konventionell angebauten Proben gelang auch für alle drei Jahre, wobei die Unterscheidung aller Proben nicht für jedes Jahr signifikant war. Der Einsatz multivariater Methoden zur Auswertung der Ergebnisse kann hier eine Verbesserung bringen. Der Unterschied zwischen den Proben ist im Vergleich zur Streuung der Methode gering. Daher muss mit einer mehrfachen Wiederholung der Probenaufbereitung/Tag und der Kristallisation gearbeitet werden. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse ist anschließend nur mit einem verschachtelten lme-Modell möglich.

10.1.2.2 Unterscheidung von Erzeugerproben aus ökologischem und konventionellem Anbau

Nach erfolgreicher Unterscheidung von Weizenproben aus definiertem Anbau in einem Feldversuch wurde die Fähigkeit der Methode getestet, Proben direkt vom Erzeuger (Betrieb) nach Anbauform zu unterscheiden. Dafür wurden von dem Institut für ökologischen Landbau der Bundesforschungsanstalt für

Landwirtschaft (FAL-OEL, PD Dr. G. Rahmann) innerhalb des Projekts BÖL 02OE170/F zufällig und stichprobenartig sechs ökologisch wirtschaftende Betriebe ausgewählt und Proben aus der Ernte 2004 gezogen. Parallel dazu wurden von konventionell wirtschaftenden Betrieben aus der direkten Nachbarschaft (< 2 km) Proben der gleichen Sorte gezogen. Alle zwölf Erzeugerproben (Winterweizen) wurden in Trenthorst (FAL-OEL) kodiert und von dort versandt. Die Proben wurden an je einem Tag mit dreifacher Wiederholung der Probenaufbereitung und sechsfacher Wiederholung der Kristallisation pro Probenaufbereitung kristallisiert. Die Dekodierung erfolgte nach Vorlage der Ergebnisse in Trenthorst im Frühjahr 2005. In Tabelle 9 sind die Proben charakterisiert.

Kodierung	Standort	Sorte	Bodenart (Ökobetrieb)	Vorfrucht (Ökobetrieb)	Öko- Verband
A	Wilmersdorf	<i>Capo</i>	Sandiger Lehm	Klee gras	Bioland
B	Ramsthat/ Poppenhausen	<i>Capo</i>	Lehm/Löss	Klee gras	Naturland
C	Orsingen- Nenzingen/ Dettighofen	<i>Capo</i>	Sandiger Lehm	Rotklee	Bioland
D	Reussenköge/ ATR Landhandel	<i>Bussard</i>	Sandiger Lehm	Klee gras	Demeter
E	Bierbergen/ Allgemissen	<i>Asketis</i>	Lehm	Futtererbse	Bioland
F	Grande/ Trenthorst	<i>Asketis</i>			

Tabelle 9: Charakterisierung der Erzeugerproben Weizen Ernte 2004.

Die Auswertung der Bilder mit der Texturanalyse zeigte bei fünf der sechs Proben Unterschiede zwischen den Anbausystemen. Das Betriebspaar C konnte mit der Variablen *diagonal moment* und einem Bildausschnitt von 50% unterschieden werden ($F = 6$), die Trennung ist aber nicht signifikant ($p = 0,1$).

Das Betriebspaar A konnte mit keiner Variablen unterschieden werden. Die beiden Proben aus dem Betriebspaar F wurden mit mehreren Variablen (u. a. *sum variance*) in einem Bereich des Bildausschnittes von 50-80 % signifikant ($F = 17, p < 0,05$) getrennt. Das Ergebnis für die Variable *kappa* ist bei einem Bildausschnitt von 50% in Abbildung x für alle Erzeugerproben gezeigt. Die beiden Anbausysteme sind nebeneinander gestellt. Für *kappa* können die drei Betriebspaare B, D und E signifikant unterschieden werden ($F = 25, p < 0,05$). Die Abhängigkeit des Trennungsvermögens vom Bildausschnitt ist für *kappa* und diese drei Paare in Abbildung y dargestellt.

Standort- oder sortenspezifische Einflüsse sind bei den drei ausgewählten Variablen nicht erkennbar. Die Sorte *Bussard* lässt sich aber bei einem Bildausschnitt von 90% für die Variablen *kappa* und *sum variance* von allen anderen unterscheiden.

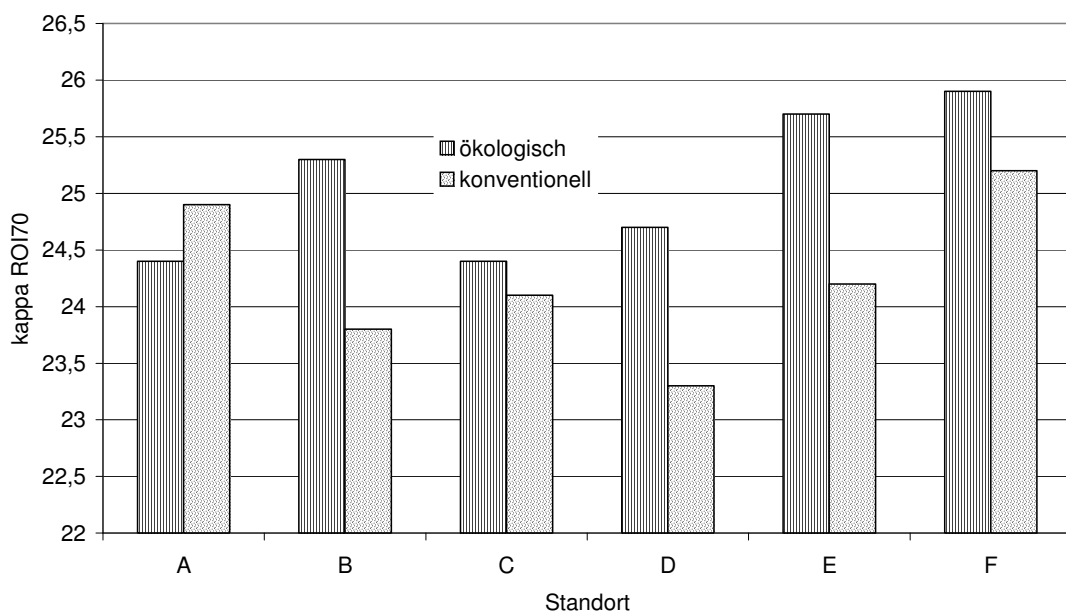


Abbildung 114: Variable *kappa* für sechs verschiedene Probenpaare (ökologisch / konventionell) direkt vom Erzeuger für einen Bildausschnitt von 70 %.

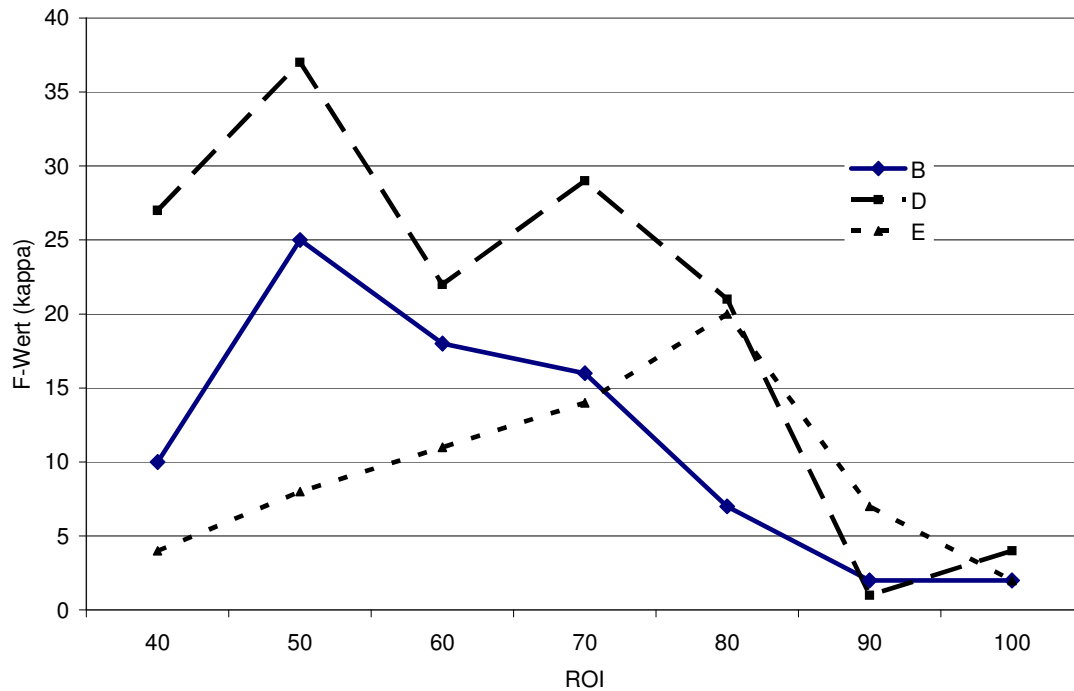


Abbildung 115: F-Wert der Variable *kappa* für die Unterscheidung von drei verschiedene Probenpaare (ökologisch / konventionell) direkt vom Erzeuger in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Für einen Bildausschnitt von 80 % gibt es eine hohe negative Korrelation mit dem bei KWALIS GmbH, Fulda (Dr. P. Stolz) gemessenen proteinogenen Stickstoff ($r = -0,8$, $p = 0,002$). Dagegen korrelieren die Ergebnisse nicht mit den im Extrakt bestimmten elektrochemischen Parametern pH ($r = -0,317$, $p = 0,315$), Leitfähigkeit ($r = 0,464$, $p = 0,129$) und Trockenmasse ($r = 0,382$, $p = 0,22$). Dies zeigt, dass der Gehalt an Trockenmasse in dem Bereich, wie er bei diesen Probe im Extrakt vorliegt (0,62 bis 0,84 %), nicht der für das Ergebnis bestimmende Faktor ist. Ein Zusammenhang der Ergebnisse, mit anderen Eigenschaften der Proben (Stickstoff) besteht aber.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen handelt es sich um eine zufällige Stichprobe von Betriebspaaren aus Deutschland. Es konnte gezeigt werden, dass sich fast 90 % der Proben aus einem Vergleich der Anbausysteme unterscheiden. Es ging dabei um einen Systemvergleich, wobei versucht wurde, einzelne Systemfaktoren wie Sorte und Klima vergleichbar zu halten. Die hier untersuchten Weizensorten stammen aus dem konventionellen Anbau. Der Ökolandbau hat aber seit einigen Jahren die Bedeutung der systemspezifischen Sorte erkannt und vielfältige Initiativen und Projekte gestartet, Sorten für den

Ökolandbau und seine spezifischen Anforderungen zu züchten. Diese Sorten werden aber im konventionellen Landbau nicht angebaut, so dass in einem Systemvergleich der Faktor Sorte zusätzlich variieren wird. Sollte dieser Faktor aber bedeutsam für das System sein, so ist dieser Unterschied ein wichtiger Beitrag zur Unterscheidung der Systeme.

10.2 Anwendung der Methode für verschiedene Fragestellungen mit Möhrenproben

10.2.1 Unterscheidung verschiedener Möhrensorten

10.2.1.1 Sortenversuch am FiBL

Die vier hier untersuchten Möhrensorten stammen aus einem Anbauversuch des FiBL, wo alte und neue Sorten miteinander verglichen werden. Unter den im biologischen Land- und Gartenbau aktiven Forschern und Landwirten wird immer wieder die Frage diskutiert, welche Rolle Hybridsorten in der biologischen Landwirtschaft spielen sollten (Arncken 2006, Fleck et al. 2002). Der Anbauverband Demeter empfiehlt bei Gemüse, offenbestäubende (= Populations-) Sorten (im Folgenden als OP bezeichnet) zu bevorzugen. Allerdings sind Hybridsorten bereits im Ökoanbau etabliert, da sie u. a. höhere Erträge und eine grössere Einheitlichkeit versprechen. Die Qualität von Speisemöhren wird fast ausschliesslich über äussere Merkmale, wie sie in den EU-Handelsklassennormen definiert sind, beurteilt. Gegner der Hybridsorten haben neben politischen, ethischen und ökologischen Bedenken vor allem die Sorge, dass durch die Hybridzüchtung die innere Qualität der Kulturpflanzen leidet. Sie machen auf die Üppigkeit und Betonung der Masse- und Ertragsbildung bei den Hybriden aufmerksam und befürchten, dass die subtileren Aspekte der Reifung und Aromabildung dahinter zurückbleiben. Der bekannteste Vergleich von Hybrid- und Populationssorten wurde mit Möhren vorgenommen. Dabei fanden Fleck et al. (2002) höhere Mineralstoffgehalte und niedrigere Quotienten von Mono- zu Disacchariden bei Populationssorten. Bei diesem Sortenvergleich wurden jedoch verschiedene Möhrentypen mit unterschiedlich langer optimaler Vegetationsdauer (Nantaise-Typen / Berlikumer) verwendet. Der Versuch am FiBL hatte zum Ziel, die Unterschiede ausschliesslich bei Nantaise-Typen zu untersuchen. Dazu wurden sechs

Möhrensorten in einem zweijährigen Feldversuch unter biologisch-dynamischen Bedingungen verglichen.

Das Saatgut war unbehandelt, auf 1,6-1,8 mm kalibriert und aus konventionellem Anbau. Der Versuch stand 2002 und 2003 auf dem Gutsbetrieb Rheinau/CH, der seit 1999 biologisch-dynamisch bewirtschaftet wird. Das Versuchsfeld war auf humosem Sandboden in der Nähe des Rheins. Das Versuchsdesign war „quasi-lateinisch“ mit vier Wiederholungen. Für die vorliegende Untersuchung wurden bulk-Proben aus den vier Wiederholungen verarbeitet. Der Versuch wurde 2002 am 16. August geerntet, 2003 am 22. Oktober. Ca. 30 kg von jeder Parzelle wurden zur Bestimmung des Anteils an marktfähiger Ware und für die weiteren Untersuchungen mitgenommen.

Es wurden die Zuchtsorten *Samson* (OP), *Tiptop* (OP), *Nipomo* (F1) und *Bolero* (F1) kodiert zur Verfügung gestellt. Kodierung und Versand der Proben wurde vom Institut für ökologischen Landbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL-OEL) in Trenthorst im Rahmen des Projektes BÖL 02OE170 durchgeführt. Es wurden Proben aus den Erntejahren 2002 und 2003 untersucht - wobei die Ernte aus 2002 erst im Frühjahr 2003 gemessen wurde - und dafür die Proben aus 2003 zusätzlich zu der Messung direkt nach der Ernte auch noch mal aus dem Lager im Frühjahr 2004. Alle Proben wurden mit einem Mischungsverhältnis von 115/90 kristallisiert.

Die Proben der Ernte 2002 wurden an einem Tag parallel mit einer Wiederholung der Probenaufbereitung und einer vier- bis fünffachen Bildwiederholung pro Kammer in zwei Kammern parallel kristallisiert. Für die Auswertung der Ergebnisse mit der Texturanalyse wurden beide Kammern zusammengefasst.

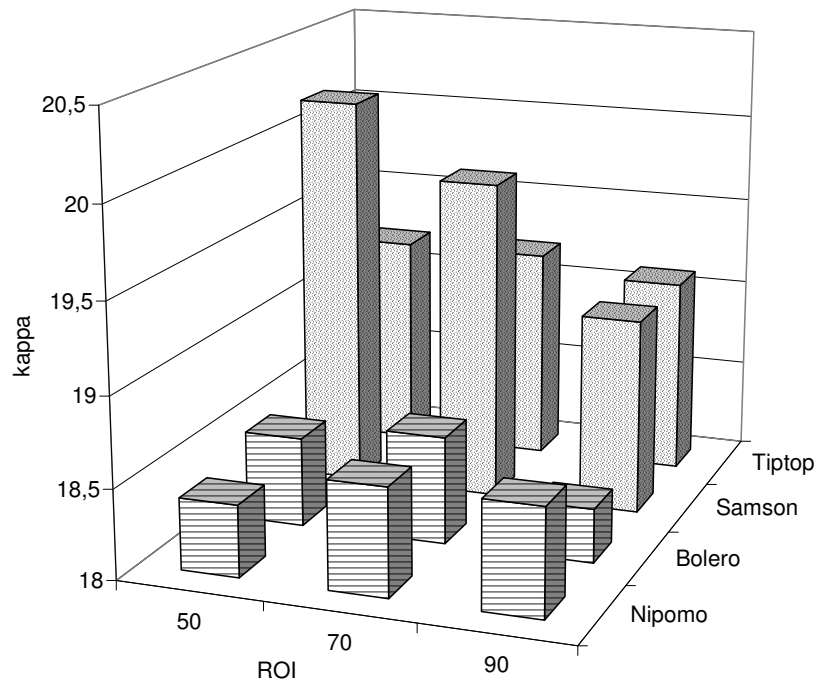


Abbildung 116: Variable *kappa* für die vier Möhrenproben aus dem Versuch am FiBL 2002 in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Die vier Möhrensorten können in zwei Gruppen zusammengefasst werden, die die Unterschiede samenfest und Hybrid abbilden. Die Hybridsorten haben deutlich geringere Werte als die samenfesten. Extreme dabei sind die Sorte Samson und Bolero. Ein vergleichbares Ergebnis zeigt die Variable *sum variance*, während *diagonal moment* die Proben nicht in Hybrid/samenfest trennt. Der Unterschied der Sorten ist größer als die Abhängigkeit des Ergebnisses vom Bildausschnitt. Aufgrund der Streuung der Methode ist bei der geringen Wiederholung der Unterschied zwischen den einzelnen Proben nicht signifikant. Die Trennung der Probe *Samson* von den beiden Hybridsorten weist aber für Bildausschnitte < 70 % F-Werte von 15 - 20 auf, d.h. diese Probe unterscheidet sich deutlich von den beiden anderen.

Die Ergebnisse der Texturanalyse wurden zusätzlich mit Linearer Diskriminanzanalyse ausgewertet. Hier ergab sich ein etwas anderes Ergebnis als auf Basis einer einzelnen Variablen. Die Probe *Bolero* fällt für alle Bildausschnitte als eigene Gruppe heraus, während *Tiptop* und *Nipomo* in eine Gruppe zusammenfallen. Die Unterscheidung dieser beiden Proben zu *Samson*

ist über die verschiedenen Bildausschnitt stabil. Ein Bildausschnitt von 100 % ist für eine Gruppierung der Proben ungeeignet.

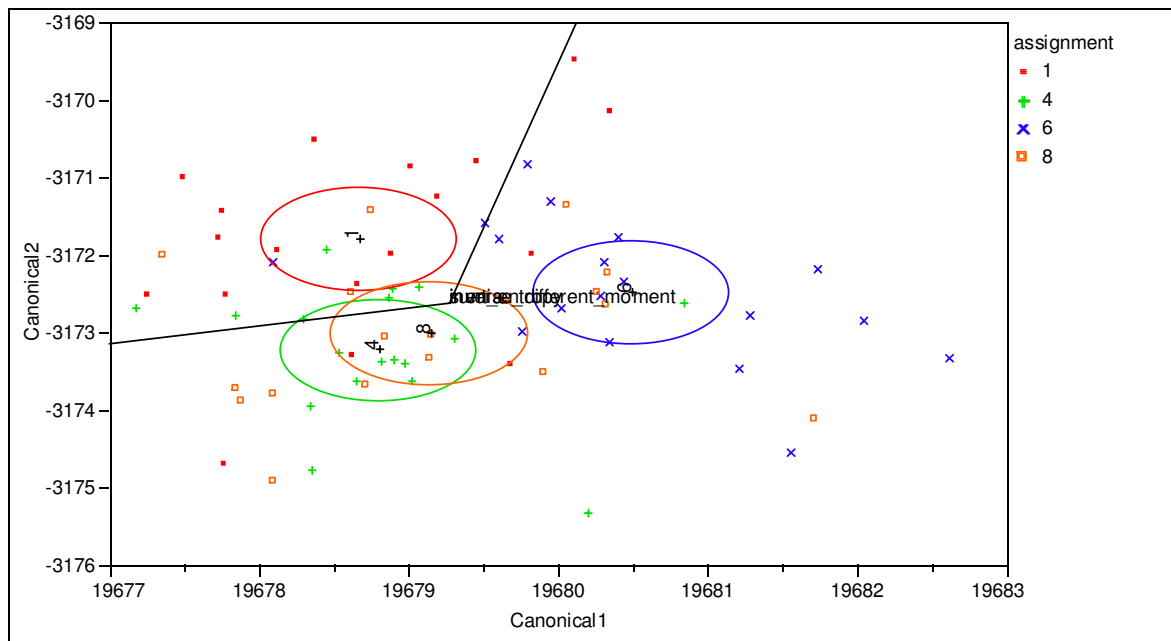


Abbildung 117: Canonical plot (LDA) mit den Variablen der Texturanalyse für die vier Proben aus dem Möhren-Sortenversuch Ernte 2002 und einem Bildausschnitt von 50 % (1: *Samson*; 4: *Nipomo*; 6: *Bolero*; 8: *Tiptop*).

Die Proben der Ernte 2003 wurden direkt nach der Ernte an zwei verschiedenen Tagen mit einer dreifachen Probenaufbereitung pro Tag und einer dreifachen Bildwiederholung pro Probenaufbereitung und Kammer in zwei Kammern parallel kristallisiert. Dies ergab 36 Bilder pro Probe die mit der Texturanalyse ausgewertet wurden.

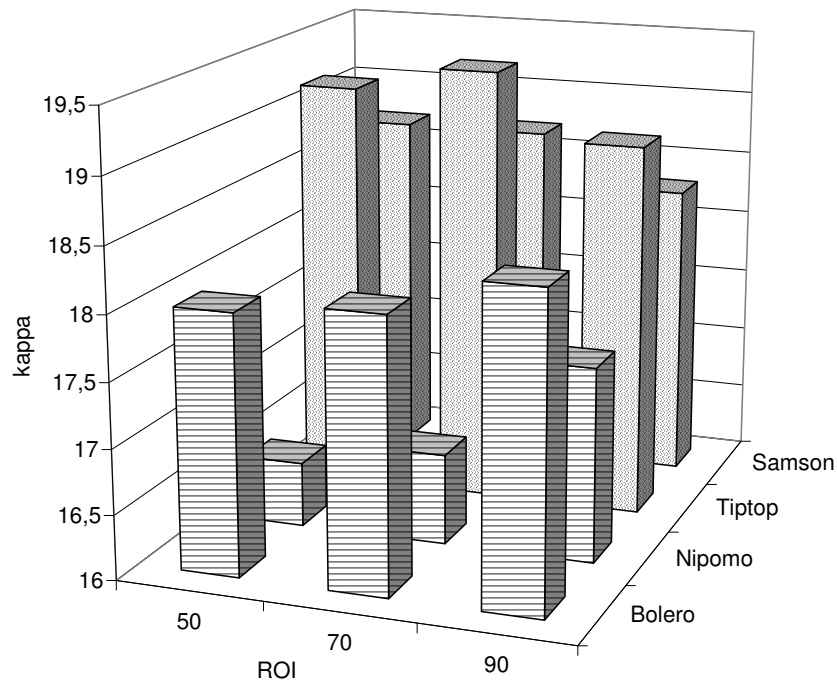


Abbildung 118: Variable *kappa* für die vier Möhrenproben aus dem Versuch am FiBL 2003 in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Das Ergebnis ist mit dem vom Vorjahr vergleichbar. Die samenfesten Sorten zeigen tendenziell höhere Werte für *kappa* als die Hybridmöhren. Der Unterschied ist mit dem vom Vorjahr vergleichbar, allerdings zeigt die Sorte *Bolero* höhere Werte und ist von der Sorte *Samson* nicht zu unterscheiden. Die Variable *sum variance* zeigt auch hier ein vergleichbares Ergebnis, während *diagonal moment* für eine Trennung der Proben ungeeignet ist. Die Probe *Nipomo* kann bei ROI < 80 von allen anderen signifikant getrennt werden (z.B. *sum variance*: $F = 30$, $p < 0,01$). Die hier nicht untersuchte Variable *difference energy* der Texturanalyse ist für die Trennung der Proben besonders geeignet.

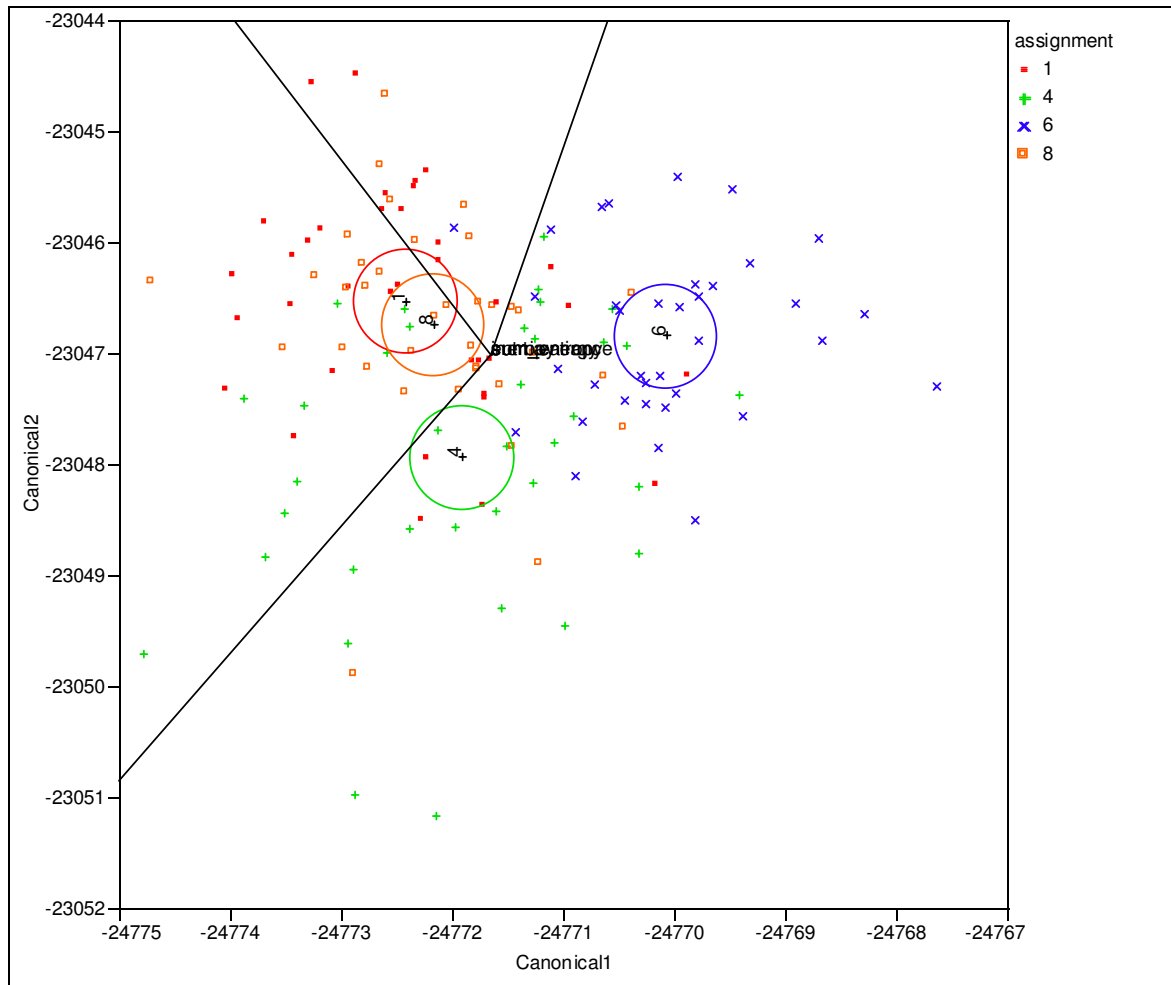


Abbildung 119: Canonical plot (LDA) mit den Variablen der Texturanalyse für die vier Proben aus dem Möhren-Sortenversuch Ernte 2003 und einem Bildausschnitt von 90 % (1: *Tiptop*; 4: *Bolero*; 6: *Nipomo*; 8: *Samson*).

Die Auswertung mit Linearer Diskriminanzanalyse bestätigt das Ergebnis auf Basis der einzelnen Variablen. Die Sorte *Nipomo* fällt deutlich heraus. In Abhängigkeit vom Bildausschnitt lässt sich für ein ROI von 90 allerdings eine weitere Gruppierung vornehmen. Hier liegen die beiden samenfesten Sorten in einer Gruppe zusammen, und die andere Hybridmöhre *Bolero* bildet eine Gruppe für sich, die aber nicht mit *Nipomo* zusammengehört. Für Bildausschnitte kleiner 70 % fallen die drei anderen Proben (*Samson*, *Bolero*, *Tiptop*) in eine Gruppe zusammen.

Die Proben wurden im Frühjahr 2004 aus dem Lager am FiBL kodiert, versandt und in einer Wiederholung der Probenaufbereitung parallel mit einer neunfachen Bildwiederholung pro Kammer in zwei Kammern parallel an einem Tag kristallisiert. Wegen der geringen Wiederholung der Probenaufbereitung

und der hohen Streuung der Methode können die Proben nicht voneinander signifikant unterschieden werden. Die Probe *Nipomo* unterscheidet sich aber wieder deutlich von allen anderen ($F = 20$), was bereits in der Messung direkt nach der Ernte zu sehen war. Allerdings verschiebt offenbar die Lagerung der Proben die optimale Unterscheidung von kleineren zu großen ($ROI > 70$) Bildausschnitten. Die Auswertung mit Linearer Diskriminanzanalyse bestätigt das Ergebnis.

Keiner der zusätzlich erhobenen 30 Parameter (u.a. Brix-Wert, Carotinoide, Zucker, P, K, Ca, Mg, Sensorik) zeigte über beide Jahre einen konsistenten signifikanten Unterschied zwischen den beiden Sortengruppen (Arncken 2006).

10.2.1.2 Sortenversuch Universität Kassel

Für das Projekt BÖL 02OE170/F wurden in einem Feldversuch auf der Domäne Frankenhausen zusätzlich zur Sorte *Rodelika* die Sorte *Rothild* angebaut. Der Versuch ist in Fleck et al. (2005) beschrieben. Die Sorte *Rodelika* (Züchter D. Bauer, Verein Kultursaat e.V.) ist durch positive Massenauslese nach Form und Geschmack aus der Sorte *Rothild* (Züchter: Hild) hervorgegangen. In einem Projekt des Bundesprogramms Ökolandbau (Nr. 03OE488) wurden diese beiden Möhrensorten im Hinblick auf Alternariabefall verglichen. Dabei hatte die Sorte *Rodelika* höhere Werte an Trockenmasse, Zucker- und Carotinoidgehalte und 50 % mehr Befall.

Die beiden Proben aus der Ernte 2004 wurden vom Institut für ökologischen Landbau (FAL-OEL) kodiert und versandt. Die kodierten Proben wurden mit einer dreifachen Wiederholung der Probenaufbereitung und einer dreifachen Bildwiederholung pro Probenaufbereitung und Kammer in zwei Kammern über drei Tage mit einem Mischungsverhältnis von 115/90 kristallisiert. Alle Bilder einer Probe (54) wurden für die Auswertung mit Texturanalyse zusammengefasst. Zusätzlich dazu wurden weitere Parameter aus der Kammerlösung bestimmt.

Probe	Trockenmasse Probe %	Saftausbeute %	Trockenmasse Saft %	pH	Leitfähigkeit
<i>Rodelika</i>	14,7±0,48	39,0±2,5	11,6±0,5	6,5±0,07	4,1±0,08
<i>Rothild</i>	12,9±0,49	39,9±1,2	9,6±0,16	6,4±0,04	4,5±0,16

Tabelle 10: Charakterisierung der beiden Möhrenproben *Rodelika* und *Rothild* aus dem Versuch UniKa Ernte 2004 mit zusätzlichen Methoden.

Die Probe *Rodelika* hat eine größere Trockenmasse der Probe und des Saftes zeigt eine geringere Leitfähigkeit.

Die Unterscheidung der beiden Proben ist für Bildausschnitte kleiner 90 % für alle Variablen der Texturanalyse signifikant ($p < 0,001$). Die größte Trennung zeigt die Variable *sum variance* mit $F = 240$ bei einem Bildausschnitt von 60 %. Die Proben zeigen ein unterschiedliches Verhalten der Variablen mit zunehmendem Bildausschnitt. Für *diagonal moment* nimmt der Wert bei *Rothild* mit zunehmendem ROI zu, während der Wert für *Rodelika* nur gering vom Bildausschnitt abhängig ist.

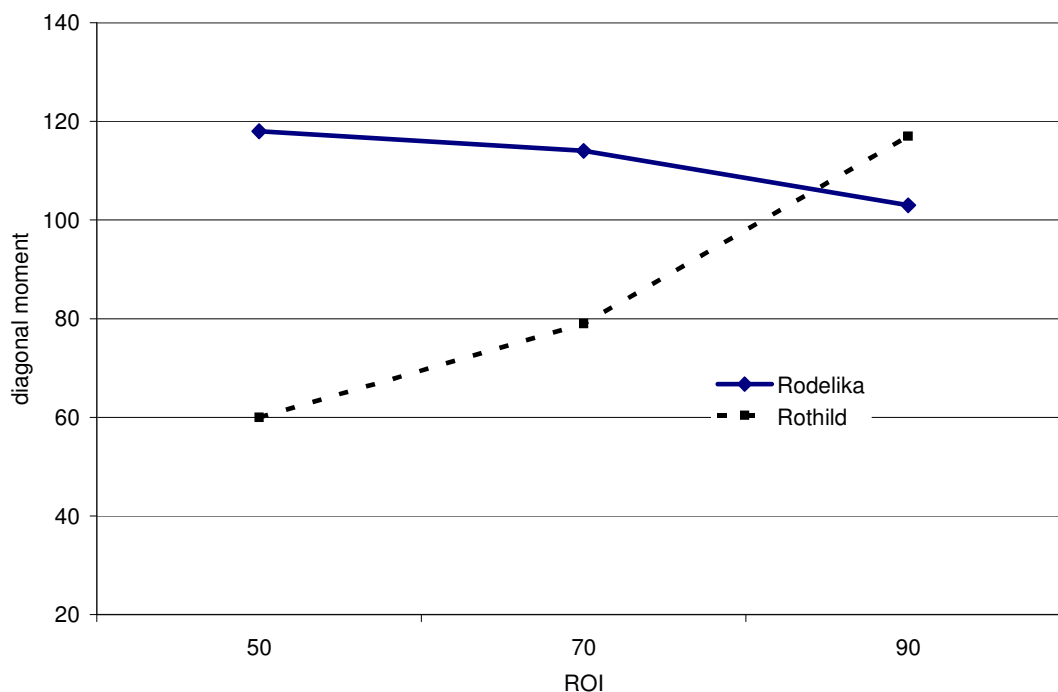


Abbildung 120: Variable *diagonal moment* für die beiden Möhrenproben in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Die Variable *sum variance* zeigt ein ähnliches aber für *Rothild* umgekehrtes Verhalten, während das für die Variable *kappa* nicht beobachtet werden kann. Auch hier zeigt sich wieder, dass die Variablen verschiedene Aspekte der Probe beleuchten.

In den Versuchen zum Mischungsverhältnis und der Extraktionsmenge konnte gezeigt werden, dass zunehmende Probenmengen auf der Platte das Ergebnis beeinflussen. Die Trockenmasse pro Platte unterscheidet sich erheblich für die beiden Proben (s. Tabelle 10, Trockenmasse Saft %). Um zu prüfen, ob die Unterscheidung der Proben lediglich auf die verschiedenen Mengen an Trockenmasse pro Platte zurückzuführen ist, wurden die beiden Sorten aus der Ernte 2005 auf gleiche Trockenmasse pro Platte eingestellt. Auch bei gleicher Trockenmasse pro Platte konnten die Proben noch signifikant getrennt werden ($p < 0,05$). Die visuelle Auswertung zeigte trotz gleich eingestellter Trockenmasse mehr „*Substance spirals*“ (s. Anhang) bei der Sorte *Rodelika*.

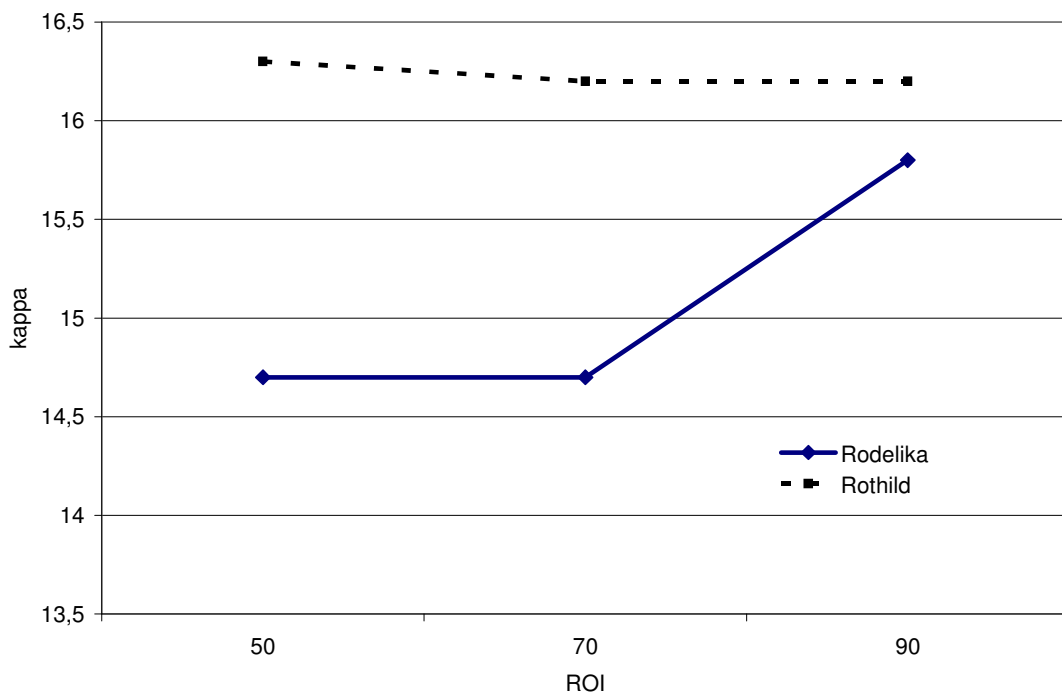


Abbildung 121: Variable *kappa* für die beiden Möhrenproben in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Um den Einfluss verschiedener Bildausschnitte auf das Unterscheidungsvermögen zu testen, wurden neben den Kreisen um das

Zentrum herum verschiedene Bildausschnitte, wie sie bereits Andersen (2001) untersuchte, gewählt. Ringförmige Ausschnitte (xx-yy%) von 10-20 % um das Zentrum herum, brachten dabei ebenso wenig eine Verbesserung wie die systematische Abtrennung von Ausschnitten vom Rand ausgehend (100-x %).

10.2.2 Unterscheidung von Möhrenproben aus verschiedenem Anbau

Nach erfolgreicher Unterscheidung von Möhrenproben aus definiertem Anbau in einem Feldversuch, wurde die Fähigkeit der Methode getestet, Proben direkt vom Erzeuger nach Anbauform zu unterscheiden. Dafür wurden von dem Institut für ökologischen Landbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL-OEL, PD Dr. G. Rahmann) innerhalb des Projekts BÖL 02OE170/F zufällig und stichprobenartig fünf ökologisch wirtschaftende Betriebe ausgewählt und Proben aus der Ernte 2004 gezogen. Parallel dazu wurden von konventionell wirtschaftenden Betrieben aus der direkten Nachbarschaft (< 2 km) Proben mit gleicher Sorte genommen. Alle zwölf Erzeugerproben wurden in Trenthorst (FAL-OEL) kodiert und von dort versandt. Die Proben wurden an je einem Tag (pro Betriebspaar) mit dreifacher Wiederholung der Probenaufbereitung und sechsfacher Wiederholung der Kristallisation pro Probenaufbereitung kristallisiert. Die Dekodierung erfolgte nach Vorlage der Ergebnisse in Trenthorst im Frühjahr 2005. In Tabelle 11 sind die Proben charakterisiert.

Kodierung	Standort	Sorte	Bodenart (Ökobetrieb)	Vorfrucht (Ökobetrieb)	Öko- Verband
O	Friedrichsgabenkoog	<i>Narbonne</i>		Kartoffel	Bioland
P	Westerdeichstrich/ Kronprinzenkoog	<i>Nerac</i>	Sandiger Lehm	Weißkohl	Bioland
Q	Hedwigenkoog	<i>Nerac</i>	Schluffiger Ton	Weißklee/ Weizen	Bioland
R	Kronprinzenkoog/ Friedrichsgabenkoog	<i>Nerac</i>	Schluffiger Lehm	Kartoffel	Bioland
S	Hedwigenkoog	<i>Narbonne</i>	Schluffiger Ton	Möhren	Bioland

Tabelle 11: Charakterisierung der Erzeugerproben Möhre Ernte 2004.

Die Auswertung mit der Texturanalyse zeigte, dass Unterschiede zwischen den Proben, bezogen auf das Anbausystem, bei vier der fünf Proben gefunden werden konnten. Das Betriebspaar O konnte mit der Variablen *kappa* und einem Bildausschnitt von 70 % unterschieden werden ($F = 8$), die Trennung ist aber nicht signifikant ($p = 0,09$), und das Verhältnis ist zu den anderen Betriebspaaren umgekehrt, was nicht erklärt werden kann. Für Bildausschnitte von 30-50 %, 40-60 % und 50-70 % konnten die Proben des Betriebspaares O für mehrere Variablen u. a. *kappa* und *sum variance* signifikant getrennt werden ($F = 12$, $p < 0,05$). Das Betriebspaar S konnte mit keiner Variablen unterschieden werden ($F = 2,5$). Die beiden Proben aus den Betriebspaaren P, Q, R wurden mit mehreren Variablen (u. a. *sum variance* oder *kappa*) in einem Bereich des Bildausschnittes von 50-80 % signifikant getrennt.

Betriebspaar	Variable	F-Wert	p-Wert
P	<i>sum variance</i>	30	<0,05
Q	<i>kappa</i>	20	<0,05
R	<i>sum variance</i>	50	<0,05

Tabelle 12: F-und p-Werte der Trennung von zwei Möhrenproben aus einem Betriebspaar ökologisch/konventioneller Anbau.

Das Ergebnis für die Variable *kappa* ist bei einem Bildausschnitt von 70 % in Abbildung 122 für alle Erzeugerproben dargestellt. Die beiden Anbausysteme sind nebeneinander gestellt.

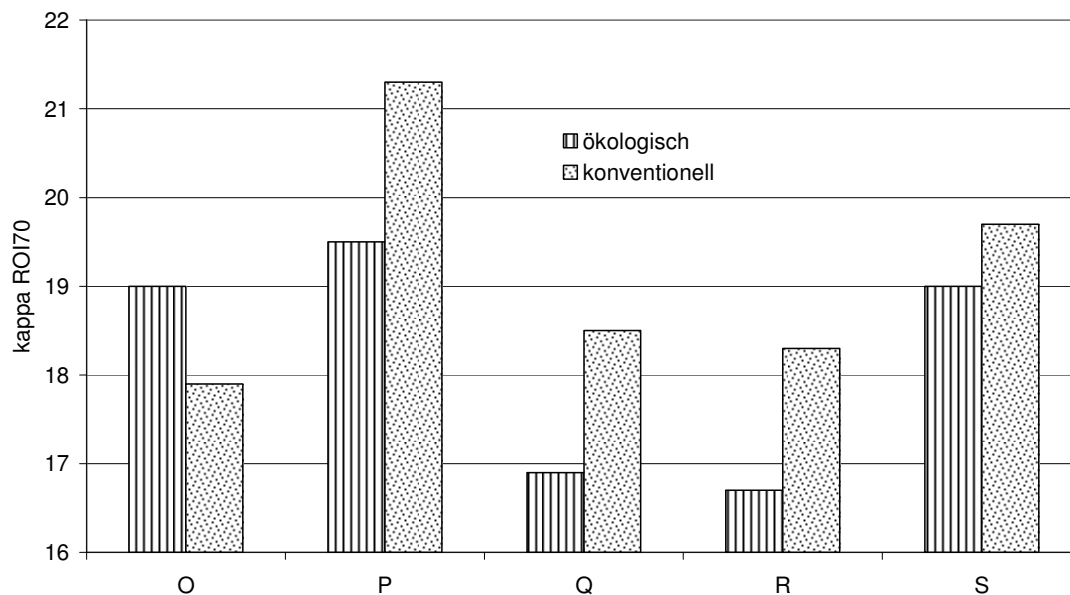


Abbildung 122: Variable *kappa* für sechs verschiedene Möhren-Probenpaare (ökologisch / konventionell) direkt vom Erzeuger für einen Bildausschnitt von 70 %.

Ein Vergleich mit anderen, am gleichen Probenmaterial gemessenen Parameter zeigt, dass die Ergebnisse für die Bestimmung von *Botrytis* (FH Fulda, Prof. Dr. K.-F. Lücke, D. Steinhauer) hoch mit den in Abbildung 122 dargestellten Ergebnissen für *kappa* korrelieren ($r = 0,8$, $p = 0,005$). Die Ergebnisse korrelieren aber nicht mit den bei KWALIS GmbH, Fulda gemessenen Werten für proteinogenen Stickstoff ($r = -0,023$, $p = 9,949$),

Wie bereits für die Erzeugerproben Weizen gezeigt, hängt auch hier das Unterscheidungsvermögen vom Bildausschnitt je nach Betriebspaar ab. Dies ist in Abbildung 123 für den Verlauf des F-Wertes der statistischen Analyse mit zunehmendem Bildausschnitt dargestellt.

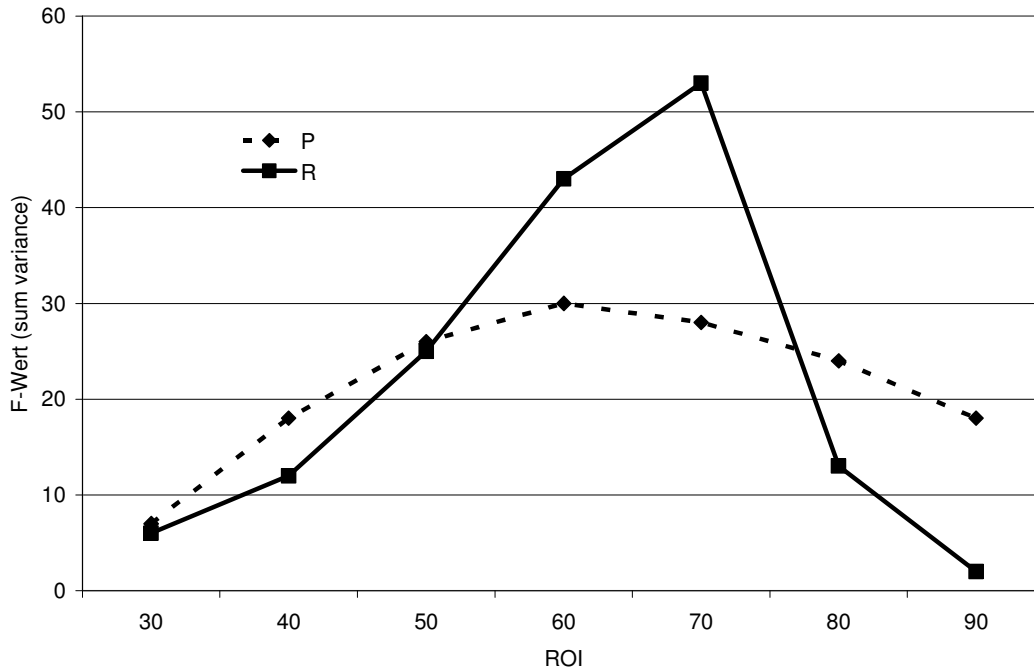


Abbildung 123: F-Wert (Variable *sum variance*) für die Unterscheidung von zwei verschiedene Möhren-Probenpaare (ökologisch / konventionell) direkt vom Erzeuger in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Um das Unterscheidungsvermögen zu verbessern, wurden neben den Kreisen um das Zentrum herum verschiedene andere Bildausschnitte gewählt. Ringförmige Ausschnitte (xx-yy %) von 10-20 % um das Zentrum herum und die systematische Abtrennung von Ausschnitten vom Rand ausgehend (100-x %) brachten dabei leichte Verbesserungen.

Bei der Betrachtung sortenspezifischer Einflüsse fällt auf, dass vor allem die Betriebspaare der Sorte *Nerac* deutlich unterschieden werden konnten, während dies für die Paare der Sorte *Narbonne* schwieriger war. Alle die hier gemessenen Proben sind Hybridsorten.

Wie bereits für die Möhren aus dem Anbauversuch an der Universität Kassel wurden auch für die Erzeugerproben zusätzliche Parameter (vgl. 02OE170/F) bestimmt. Innerhalb des Projektes 02OE170/F wurden die Variablen der Texturanalyse für einen Bildausschnitt von 70% mit diesen Parametern korreliert. Die drei ausgewählten Variablen zeigten weder eine Abhängigkeit von der Leitfähigkeit ($r = 0,26$, $p = 0,47$), noch vom pH-Wert ($r = 0,198$, $p = 0,58$) oder der Trockenmasse im Saft ($r = -0,3$, $p = 0,39$). Für die untersuchten Proben sind also die elektrochemischen Eigenschaften und der

Trockenmassegehalt der Probenlösung kein abhängiger Parameter. Werden die drei Variablen miteinander verglichen, so korreliert *kappa* hoch negativ mit *diagonal moment* ($r = -0,75$, $p = 0,012$) und hoch positiv mit *sum variance* ($r = 0,648$, $p = 0,043$). *Diagonal moment* korreliert aber nicht mit *sum variance* ($r = -0,360$, $p = 0,29$); womit wieder bestätigt ist, dass die verschiedenen Variablen unterschiedliche Aspekte des Bildes und damit der Probe zeigen. Daher wurde zusätzlich zur Auswertung auf Basis der Einzelvariablen auch eine Lineare Diskriminanzanalyse mit allen Variablen durchgeführt (schrittweise LDA).

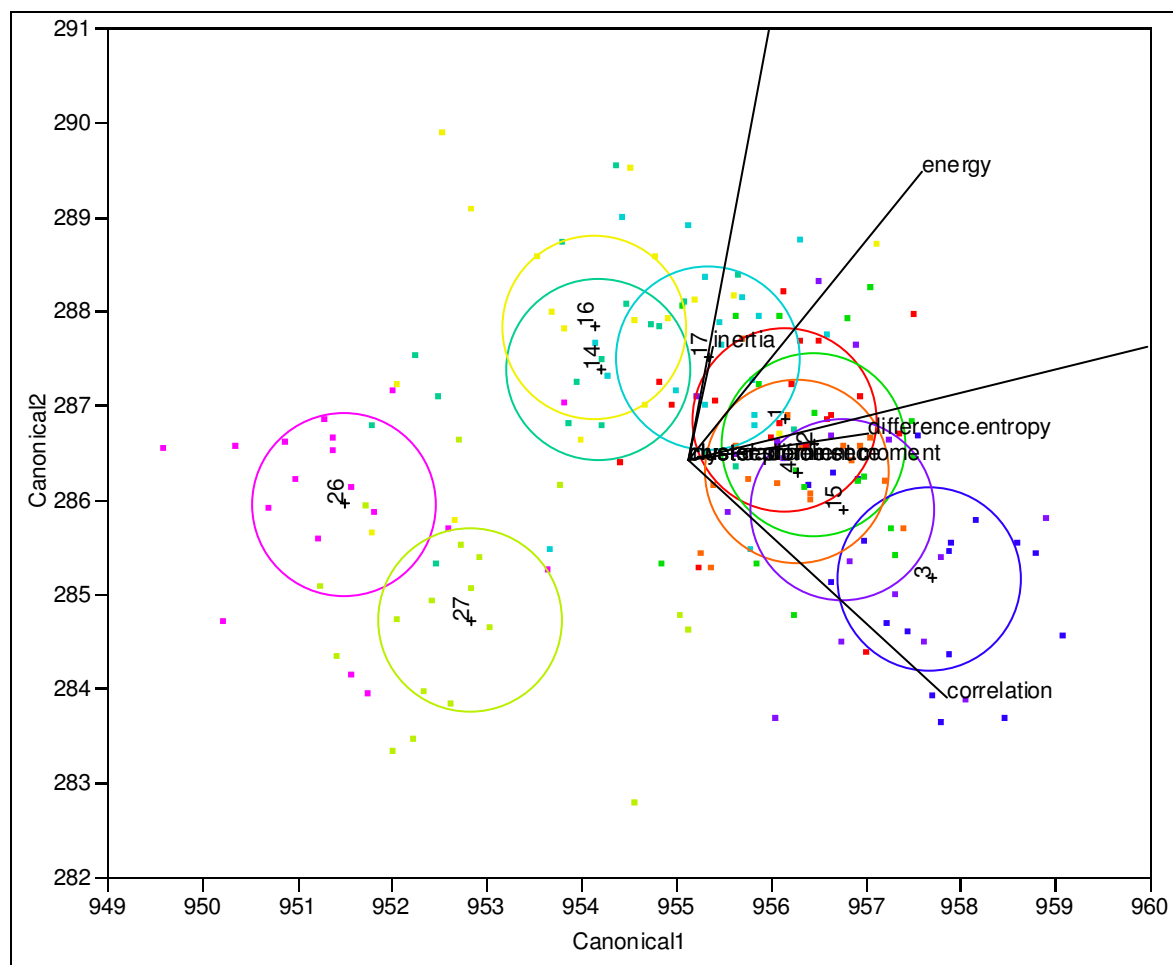


Abbildung 124: Canonical plot (LDA) mit den Variablen der Texturanalyse für die 10 Erzeugerproben Möhre, Ernte 2004 und einem Bildausschnitt von 70 % (1: Oöko; 2: Okonvi; 3: Röko; 4: Rkonvi; 14: Qkonvi; 15: Qöko; 16: Skonvi; 17: Söko; 26: Pkonvi; 27: Pöko).

Das Betriebspaar P wird als eigene Gruppe von allen anderen Proben separiert. Die beiden Proben des Betriebspaares Q liegen im Vergleich zu den anderen Paaren am weitesten auseinander. Die Proben Qkonvi / Skonvi und Röko /

Qöko bilden Extreme. Mit einem multivariaten Ansatz ist also eine weitere Aussage zur relativen Zuordnung der Proben untereinander möglich, der über die Trennung in Anbausysteme hinausgeht. Dabei wird ein Betriebspaar völlig von den anderen getrennt und innerhalb der verbleibenden bilden Proben in Abhängigkeit vom Anbausystem die Extreme.

10.2.3 Unterscheidung von Möhrenproben mit unterschiedlicher Stickstoff-Düngung

Der Versuch ist in Fleck et al. (2005) beschrieben. Die Düngungsvariante wurde mit 150 kg N / ha in Form von Hornspänen gedüngt. Die Feldwiederholungen wurden zu einer bulk-Probe zusammengefasst. Es wurden die Proben aus den Ernten 2002 (Mitte August), 2003 (Mitte September) und 2004 (Anfang Oktober) untersucht. Die beiden Proben wurden jeweils vom Institut für ökologischen Landbau (FAL-OEL) kodiert und versandt. Die Proben der Ernte 2002 wurden nach Lagerung in Trenthorst im Frühjahr 2003 untersucht. Die kodierten Proben wurden mit einer 6fachen Wiederholung der Probenaufbereitung für die Erntejahre 2002 und 2003 und dreifacher Wiederholung für die Ernte 2004 und einer sechsfachen (2002, 2003) bzw. dreifachen (2004) Bildwiederholung pro Probenaufbereitung und Kammer in zwei Kammern über drei Tage mit einem Mischungsverhältnis von 115/90 (in 2002 zusätzlich mit 100/100) kristallisiert. Alle Bilder einer Probe wurden für die Auswertung mit Texturanalyse für jedes Jahr getrennt zusammengefasst. Der Unterschied zwischen den beiden Düngungsstufen kann von der Methode nur in den Erntejahren 2002 und 2004 erfasst werden. In Abbildung 125 ist die Differenz der beiden Proben für die Variable *kappa* für diese beiden Erntejahre dargestellt. Für das Mischungsverhältnis 115/90 ist der Unterschied nur für Bildausschnitte kleiner 50 % signifikant ($F = 10, p < 0,05$). Die Unterschiede sind gering und werden nur durch mehrfache Wiederholung der einzelnen Schritte deutlich. In 2003 konnte mit einem Mischungsverhältnis von 115/90 kein optimales Bild für die visuelle Auswertung erhalten werden. Dadurch wurden diese Proben mit einem Mischungsverhältnis von 45/90 kristallisiert. Bei diesem Mischungsverhältnis konnten die Proben mit der Texturanalyse aber nicht mehr getrennt werden.

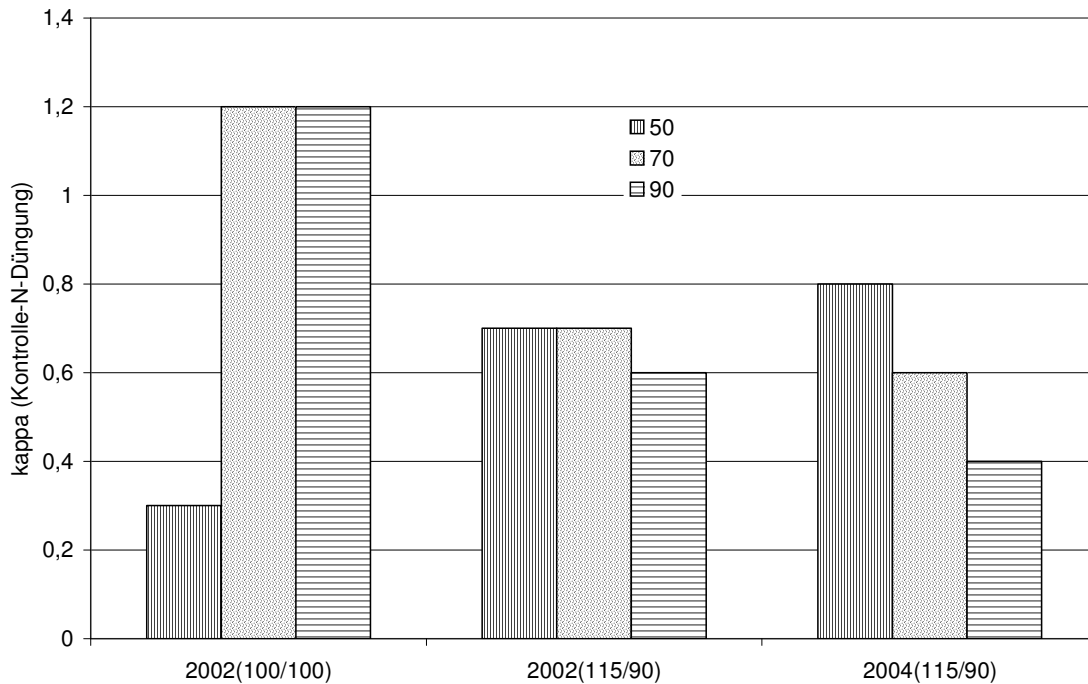


Abbildung 125: Differenz der Variable *kappa* für die Unterscheidung der Proben mit unterschiedlichen N-Düngungsstufen in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

10.2.4 Einfluss des Wachstumsprozesses von Möhren auf das Ergebnis

In einem Versuch mit Möhren aus dem Versuch an der Universität Kassel, Domäne Frankenhausen wurde untersucht, wie die Methode auf das Wachstum der Möhre (Aufbauprozesse) reagiert. Die Möhren aus dem Versuchsjahr 2004 wurden an drei verschiedenen Ernteterminen mit einer Probenaufbereitung und unterschiedlichen Mischungsverhältnissen in einer Kammer kristallisiert und die Ergebnisse mit der Texturanalyse ausgewertet. In Tabelle 13 sind die Erntezeitpunkte und charakteristische Parameter der Kammerlösung zusammengefasst.

Termin	1	2	3
Trockengewicht	5,6	7,2	9,8
Saft %			
Saftausbeute %	52,7	46,5	39,9
Datum	22.06.2004	15. 07.2004	31.08.2004

Tabelle 13: Angaben zu den drei Ernteterminen der Möhrenproben für die Untersuchung des Einflusses des Wachstums auf das Ergebnis der Methode.

Die Ergebnisse der Methode sind für die Variablen *diagonal moment* und *kappa* in Abhängigkeit zunehmender Menge an Probe pro Platte (70, 115, 160 mg) bei gleicher Menge an CuCl_2 (90 mg) und für zunehmende Mengen an CuCl_2 (45, 90, 135 mg) bei gleicher Menge an Probe (115 mg) und in Abhängigkeit von zwei der drei gewählten ROIs (50 und 90) in den folgenden Abbildungen dargestellt. Die Ergebnisse für die Variable *sum variance* sind mit *kappa* vergleichbar.

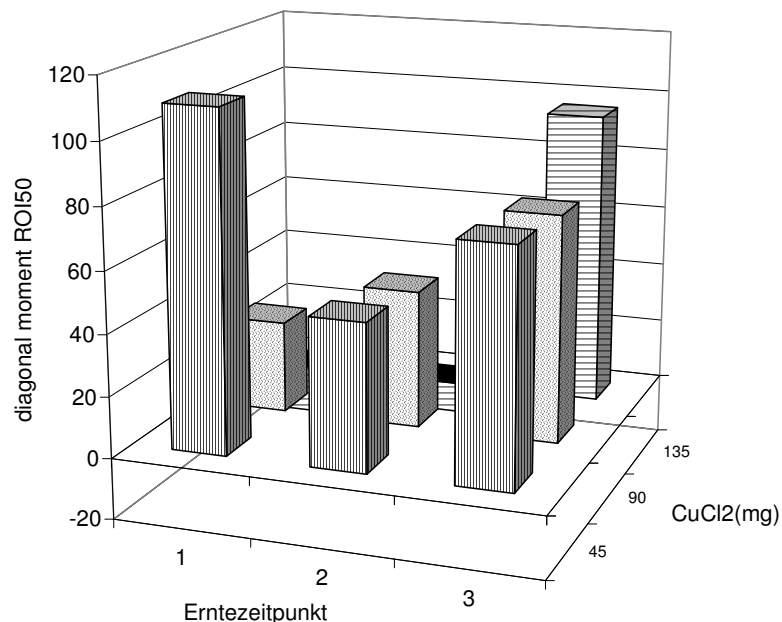


Abbildung 126: Variable *diagonal moment* für drei aufeinander folgende Erntezeitpunkte von Möhrenproben Abhängigkeit unterschiedlicher Mengen an CuCl_2 und einem Bildausschnitt von 50 %.

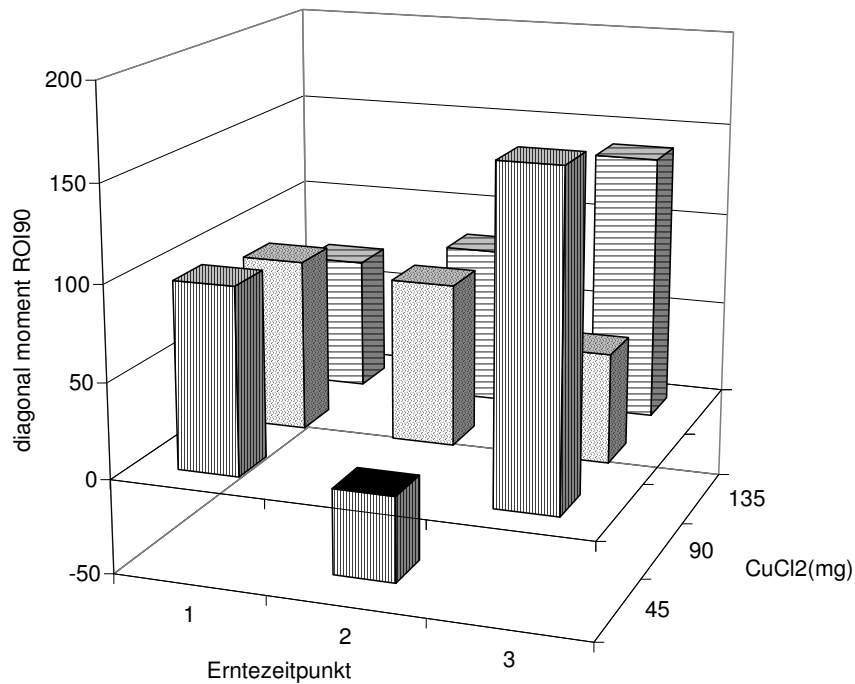


Abbildung 127: Variable *diagonal moment* für drei aufeinander folgende Erntezeitpunkte von Möhrenproben Abhängigkeit unterschiedlicher Mengen an CuCl_2 und einem Bildausschnitt von 90 %.

Der Erntezeitpunkt hat einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der Methode. Für *diagonal moment* ist der Einfluss abhängig von der Menge an CuCl_2 pro Platte und vom Bildausschnitt. Bei 45 mg CuCl_2 gibt es keinen monotonen Zusammenhang mit Erntezeitpunkt und Ergebnis der aber für die beiden anderen Mengen beobachtet werden kann. Die drei Erntezeitpunkte können durch die verschiedene Abhängigkeit der Variablen von der Menge an CuCl_2 unterschieden werden (CuCl_2 -Vektor). Für ROI nimmt die Abhängigkeit mit fortschreitendem Zeitpunkt ab, für ROI 90 ist die Abhängigkeit nicht monoton, sondern hängt je nach Erntezeitpunkt von der Menge an CuCl_2 pro Platte ab.

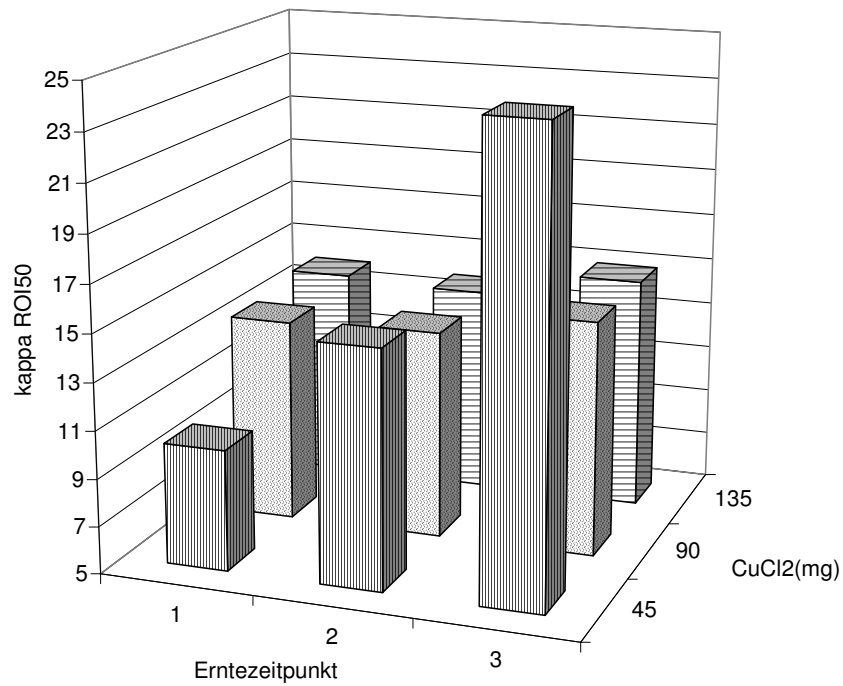


Abbildung 128: Variable κ für drei aufeinander folgende Erntezeitpunkte von Möhrenproben Abhängigkeit unterschiedlicher Mengen an CuCl_2 und einem Bildausschnitt von 50 %.

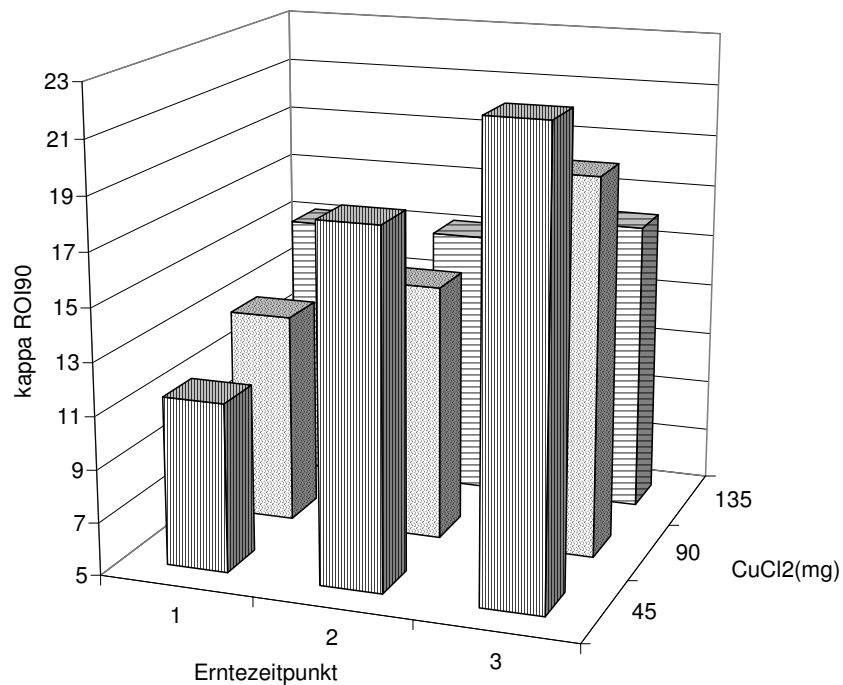


Abbildung 129: Variable κ für drei aufeinander folgende Erntezeitpunkte von Möhrenproben Abhängigkeit unterschiedlicher Mengen an CuCl_2 und einem Bildausschnitt von 90 %.

Für die Variable κ ist der Einfluss verschiedener Erntezeitpunkte für kleine Bildausschnitte nur bei 45 mg CuCl_2 pro Platte zu sehen, die anderen Mengen zeigen den Effekt nicht. Grosse Bildausschnitte zeigen eine monotone Zunahme der Variable mit dem Erntezeitpunkt auch bei einer Menge von 90 mg. Die Veränderung mit zunehmendem Erntezeitpunkt liegt außerhalb der Methodenstreuung, dies gilt für alle untersuchten Variablen. Auch für κ verändert sich das Verhalten der Probe auf steigende Mengen an CuCl_2 . Beim ersten Erntezeitpunkt steigen die Werte mit zunehmender Menge, beim dritten fallen sie.

Für zunehmende Probenmengen liefert die Variable *diagonal moment* keine eindeutigen Ergebnisse. Die Variablen κ und *sum variance* zeigen dagegen für größere Bildausschnitte einen Anstieg der Werte mit zunehmender Probenmenge für alle gewählten Mengen. Der Anstieg wird mit zunehmender Probenmenge steiler. Auch das Verhalten der Probe gegenüber dem Probenvektor ändert sich mit dem Erntezeitpunkt, wie bereits für den CuCl_2 -Vektor beobachtet.

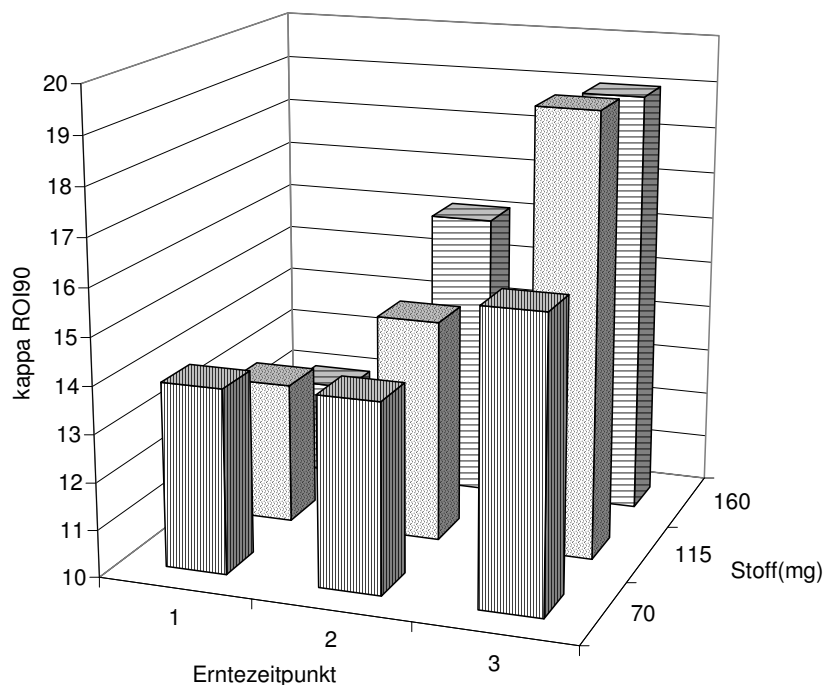


Abbildung 130: Variable κ für drei aufeinander folgende Erntezeitpunkte von Möhrenproben Abhängigkeit unterschiedlicher Mengen an Probe und einem Bildausschnitt von 90%.

Wie bereits oben gezeigt, gibt es keinen einfachen Zusammenhang zwischen Trockenmasse und Ergebnis der Methode. In diesem Versuch ist die Zunahme der Trockenmasse mit dem Erntezeitpunkt nicht mit der Veränderung der Variablen vergleichbar. Ein wichtiges Merkmal ist das unterschiedliche Verhalten auf zunehmende Mengen an Probe und CuCl_2 (Vektor) in Abhängigkeit von dem Erntezeitpunkt. Hier zeigt sich, dass die Kristallisation bei mehreren Mischungsverhältnissen parallel weitere Informationen über die Probe bringen kann.

10.2.5 Unterscheidung von Möhrenproben aus unterschiedlichen Verarbeitungsprozessen

In Ergänzung zu den Untersuchungen an unbehandelten Proben, wurde der Einfluss folgender Behandlungen auf das Ergebnis der Methode geprüft:

10.2.5.1 Einfluss der Erwärmung (Mikrowelle) von entsafteten Möhrenproben auf das Ergebnis

Im Rahmen eines von der Software AG Stiftung finanzierten Projekt „Effects of microwave heating on food quality and human health“ unter Leitung von Jens-Otto Andersen in Dänemark (BRAD) wurden im Labor in Witzenhausen Möhrenproben entsaftet und anschließend verschieden lange in einer handelsüblichen Mikrowelle (Whirlpool AT 315) erhitzt.

Die Möhrenprobe der Sorte *Nairobi* stammte von einem humusarmen Boden aus Dänemark. Vorfrucht war Roggen. Die Probe hatte eine Trockenmasse von 9,1%. Die Probe wurde einmal vorbereitet und mit drei Stufen der Mikrowelle behandelt. Die Behandlung erfolgte mit 750 W für 180 s, die Temperatur der Lösung war 85 °C. Für die Stufe 2 und 3 wurden die Lösungen der vorherigen Stufen jeweils auf 25 °C abgekühlt, das Volumen mit destilliertem Wasser ausgeglichen und weiter behandelt. Alle Proben wurden mit einem Mischungsverhältnis von 95/125 (Vorgabe des Projektleiters) in zwei Kammern parallel kristallisiert. Der Versuch wurde an einem anderen Tag wiederholt und die Ergebnisse beider Tage für die Auswertung mit Texturanalyse zusammengefasst.

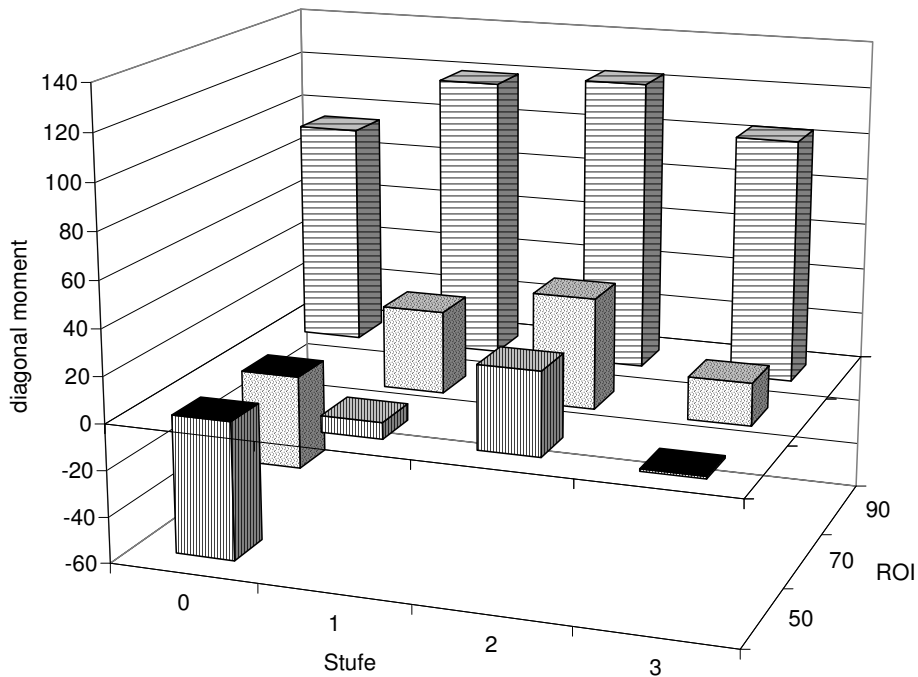


Abbildung 131: Variable *diagonal moment* für unterschiedliche Dauer der Erwärmung einer entsafteten Möhrenprobe in der Mikrowelle in Abhängigkeit des Bildausschnittes.

Bereits die erste Stufe der Erwärmung zeigt einen deutlichen Effekt auf die Variable *diagonal moment* für ROIs unter 70. Grosse Bildausschnitte (90 %) zeigen den Effekt nicht. Auch für kleine Bildausschnitte ist die Änderung nicht signifikant. Die beiden anderen Variablen reagieren stark auf die Erwärmung. Der Unterschied von unbehandelter Probe und erster Stufe ist für Bildausschnitte um 60 % für beide Variablen signifikant ($F_{\text{kappa}} = 40$, $p < 0,05$). Die Variable *kappa* zeigt eine monotone Abnahme der Werte mit zunehmender Dauer der Erwärmung unabhängig vom Bildausschnitt, wobei sich die Abhängigkeit vom Bildausschnitt je nach Stufe verändert.

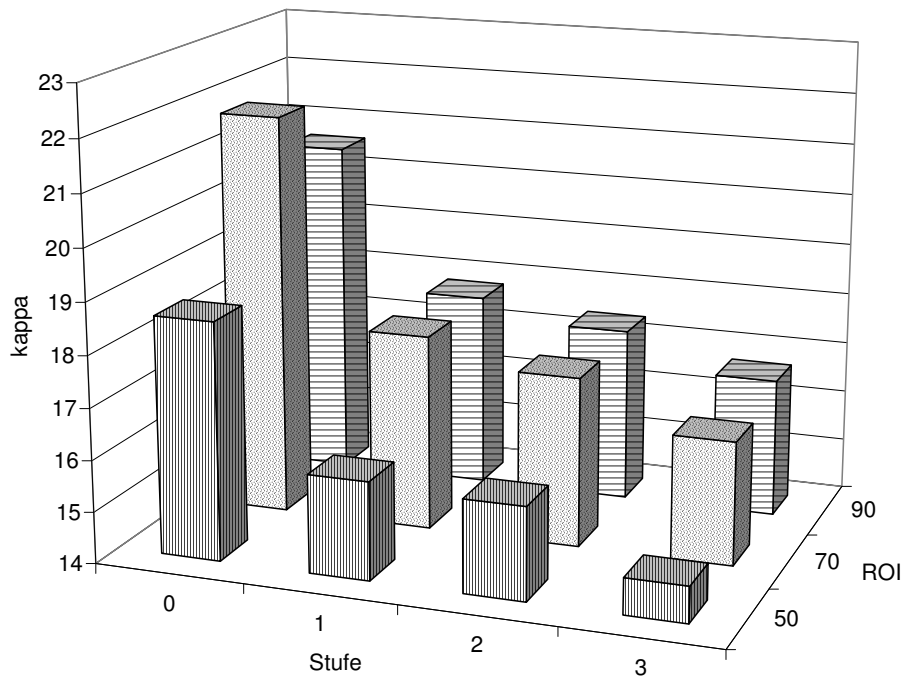


Abbildung 132: Variable κ für unterschiedliche Dauer der Erwärmung einer entsafteten Möhrenprobe in der Mikrowelle in Abhängigkeit des Bildausschnittes.

Der Effekt der Erwärmung ist eindeutig zu sehen und konnte in den Laboratorien in Holland (LBI) und Dänemark (BRAD) reproduziert werden. Ob er auf den Einfluss der Mikrowelle zurückgeführt werden kann, ist nicht Gegenstand der Untersuchung und sollte in Abhängigkeit verschiedener Heizquellen geprüft werden. Erwärmung der Proben führt zur Abnahme der Werte, wie sie auch bei Alterungsprozessen (s. o.) beobachtet werden konnte, während die oben beschriebenen Wachstumseinflüsse zu einer Erhöhung der Werte z.B. für κ führen. Es wurden hier aber keine Untersuchungen mit anderen Mischungsverhältnissen durchgeführt. Daher sind die Ergebnisse nicht direkt mit anderen Versuchen, die mit verschiedenen Mischungsverhältnissen durchgeführt wurden, zu vergleichen.

10.2.5.2 Einfluss der Gefriertrocknung von Möhrenproben auf das Ergebnis

Für diese Untersuchung wurden die Proben aus dem Sortenversuch an der Universität Kassel/Domäne Frankenhausen der Ernte 2004 gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Proben wurden in einer dreifachen Probenaufbereitung

in ultrafiltriertem Wasser gelöst und mit dem 110 µm Nylonsieb gesiebt. Um das Mischungsverhältnis mit den frischen Proben vergleichbar zu halten, wurde 11,5 mg pro Platte eingewogen.

Auch gefriergetrocknete Möhrenproben liefern Kristallbilder. Visuell sind diese Bilder mit denen von frischen Proben bzgl. der Grundstruktur der Bilder vergleichbar, der Einfluss des Prozesses ist aber deutlich zu sehen (Zerfall der Struktur, dem Effekt der Alterung vergleichbar). Beide Möhrensorten zeigen einen Effekt der Gefriertrocknung bei der Variable *diagonal moment*. Der Einfluss ist für *Rodelika* stärker als für *Rothild*, aber abhängig vom Bildausschnitt. Der Effekt liegt oberhalb der Methodenstreuung. Für *Rodelika* ist der Unterschied z.B. für einen Bildausschnitt von 50 signifikant ($F = 80$, $p < 0,01$), für *Rothild* z.B. bei ROI 80 ($F = 38$, $p < 0,01$). Dabei hängt der F-Wert, wie für die Differenz der Mittelwerte stark vom Bildausschnitt ab.

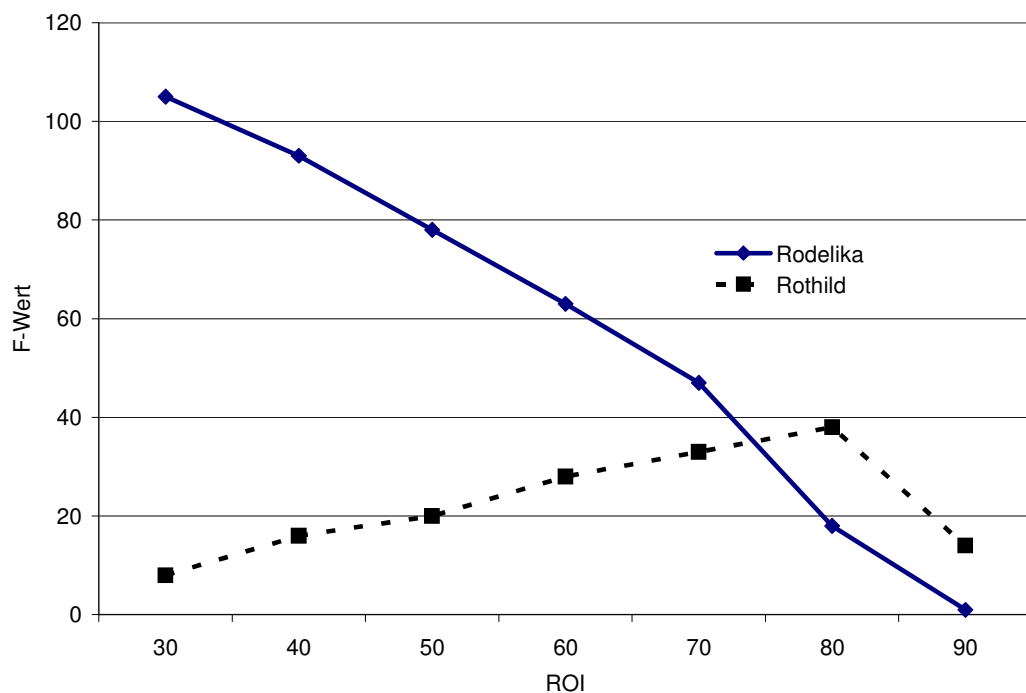


Abbildung 133: F-Wert der Variable *diagonal moment* für die Unterscheidung von frischen und gefriergetrockneten Proben der beiden Möhrenproben in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Für beide Proben konnte damit ein Einfluss der Gefriertrocknung auf das Ergebnis nachgewiesen werden. Dass der Einfluss bei *Rodelika* stärker ist als bei *Rothild*, kann mit dem unterschiedlichen Trockenmassegehalt der frischen

Proben zusammenhängen. Die Gefriertrocknung wird üblicherweise in der Analytik zur Stabilisierung und Homogenisierung von Probenmaterial eingesetzt (z. B. für die Analyse sekundärer Pflanzenstoffe). Da die Biokristallisation aber kein Einzelstoffnachweis ist, sondern die möglichst ganze Probe untersucht, ist diese Art der Probenaufbereitung nur dann anwendbar, wenn sichergestellt wird, dass entweder die Probe nicht beeinflusst wird oder dass der Einfluss der Gefriertrocknung auf die Fragestellung vernachlässigt werden kann. Für die Variable *diagonal moment* kann das Verfahren nicht eingesetzt werden. Auch die visuelle Bildauswertung zeigt den Effekt der Gefriertrocknung deutlich (vgl. Kap. 6).

Die Variable *kappa* zeigt keinen signifikanten Einfluss dieses Verfahrens. Der Unterschied zwischen den Sorten bleibt für diese Variable erhalten, ist aber nicht mehr signifikant.

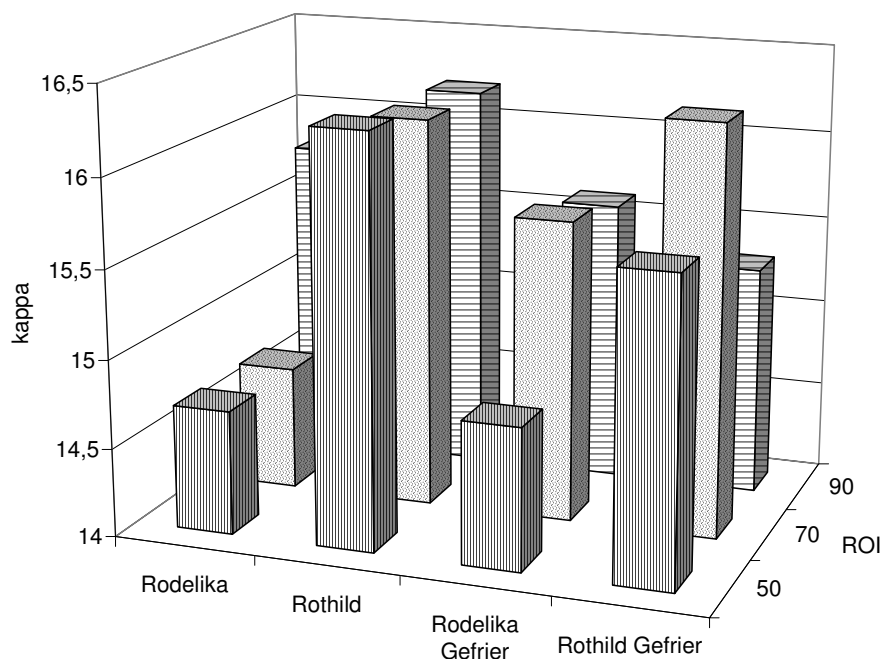


Abbildung 134: Variable *kappa* für die beiden Möhrenproben frisch und gefriergetrocknet in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Da die Gefriertrocknung von Möhrenproben sowohl einen Einfluss auf die einzelnen Variablen, als auch auf das Unterscheidungsvermögen hat, wird sie nicht in der Probenaufbereitung eingesetzt.

10.2.5.3 Einfluss der unterschiedlichen Saffherstellung (frisch und vergoren) von Möhrenproben auf das Ergebnis

Es wurden zwei Möhrensäfte der Firma NATUDIS (Niederlande) untersucht, die sich in der Verarbeitung unterschieden. Beide Säfte sind Demeter-Gemüsesäfte. Es handelt sich um einen Frischsaft (99,5% Möhren, 0,5% Zitronensaft, Saft F) und einen mit Milchzucker vergorenen Saft (Saft V). Die Säfte wurden in mehreren Flaschen aus einer Charge geliefert. Pro Versuchstag wurde eine neue Flasche geöffnet. Die Proben wurden direkt durch das Nylonsieb 110 μm gesiebt und mit CuCl_2 -Lösung vermischt. Es wurde mit einem Probenvektor und drei Mischungsverhältnissen (90/90, 115/90 und 135/90) gearbeitet. Mit dem Mischungsverhältnis 90/90 wurde an zwei, mit 115/90 an drei verschiedenen Tagen mit je einer Probenaufbereitung und einer 6fachen Bildwiederholung in zwei Kammern parallel gearbeitet. Für die Auswertung wurden die verschiedenen Tage und Kammern zusammengefasst. Die statistische Analyse wurde nur für die beiden Mischungsverhältnisse 90/90 und 115/90 durchgeführt, da hier eine mehrfache Wiederholung auch der Probenaufbereitung gemacht wurde.

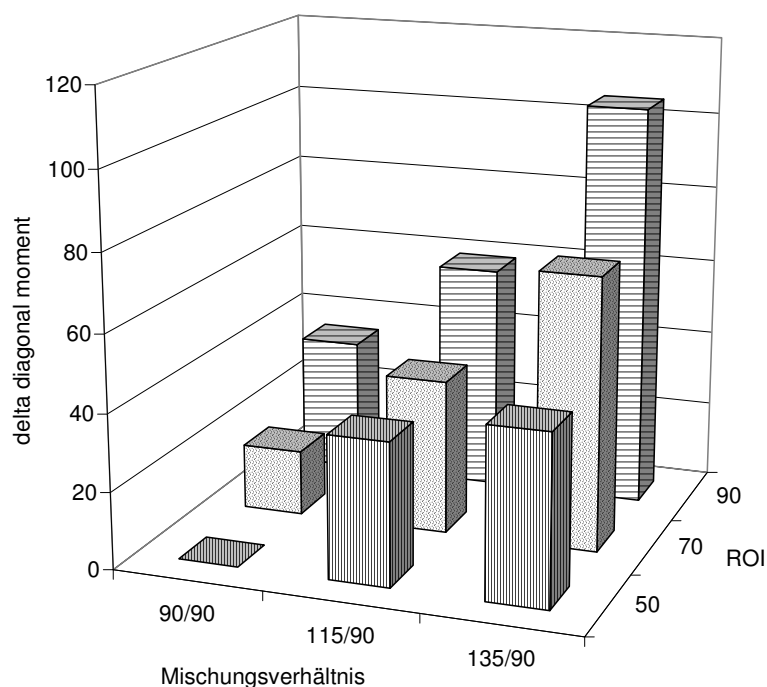


Abbildung 135: Variable *diagonal moment* für die beiden Möhrensäfte frisch und vergoren in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis und Bildausschnitt.

Die Variable *diagonal moment* zeigt den Einfluss der unterschiedlichen Saftherstellung. Das Unterscheidungsvermögen nimmt dabei mit der Menge an Probe pro Platte und dem Bildausschnitt zu. Für 115/90 ist die Trennung für alle ROIs signifikant ($F = 30$, $p < 0,01$). Auch *kappa* kann die beiden Proben bei einem Mischungsverhältnis von 115/90 signifikant unterscheiden ($F = 30$, $p < 0,01$), wobei große Bildausschnitte ($> 80\%$) keine Trennung mehr erlauben. Für ein Mischungsverhältnis von 90/90 können die beiden Säfte mit keiner Variablen signifikant getrennt werden. Die Variable *sum variance* zeigt ein zu *kappa* vergleichbares Verhalten.

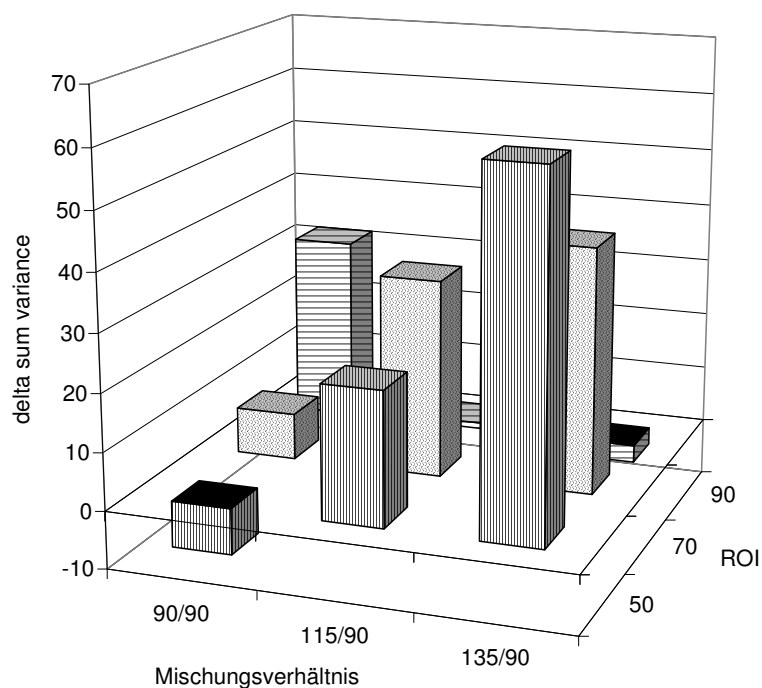


Abbildung 136: Variable *sum variance* für die beiden Möhrensäfte frisch und vergoren in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis und Bildausschnitt.

Die Methode ist in der Lage Möhrensäfte aus unterschiedlicher Verarbeitung signifikant zu unterscheiden. Das Mischungsverhältnis und der Bildausschnitt beeinflussen das Unterscheidungsvermögen stark und müssen für jede Frage angepasst werden.

10.3 Anwendung der Methode für verschiedene Fragestellungen mit Apfelproben

Nachdem die Methode für Fragestellungen an Weizen- und Möhrenproben angewendet wurde, konnten zwei verschiedene Fragestellungen an Apfelproben geprüft werden. Es handelt sich um Vorversuche, um das Potenzial der Methode für andere Probenarten zu untersuchen.

10.3.1 Unterscheidung verschiedener Apfelsorten in Abhängigkeit von der Alterung der Probenlösungen

Für die Untersuchung wurden drei verschiedene Apfelsorten aus dem lokalen tegut-Markt untersucht. Es handelt sich um Öko-Ware aus Neuseeland mit den Proben *Cox orange*, *Gala royal* und *Breaburn*. Die Proben wurden an einem Tag mit einer dreifachen Wiederholung der Probenaufbereitung und einer achtfachen Bildwiederholung pro Kammer in zwei Kammern parallel mit einem Mischungsverhältnis von 180/135 kristallisiert. Für die Auswertung wurden die Platten beider Kammer zusammengefasst. Die drei Probenlösungen wurden in 50 mL sterilen Plastiktubes bei 26 °C für 3 Tage gelagert (Alterungseffekt) und dann noch einmal unter gleichen Bedingungen kristallisiert.

Ergebnis Sortenunterschied

Mit der Variablen *diagonal moment* sind die drei Proben nicht zu unterscheiden. Die Streuung der Methode ist größer als der Unterschied zwischen den Proben. Für die Variablen *kappa* kann die Probe *Breaburn* von den beiden anderen für Bildausschnitte kleiner 80 % signifikant getrennt werden ($p < 0,05$).

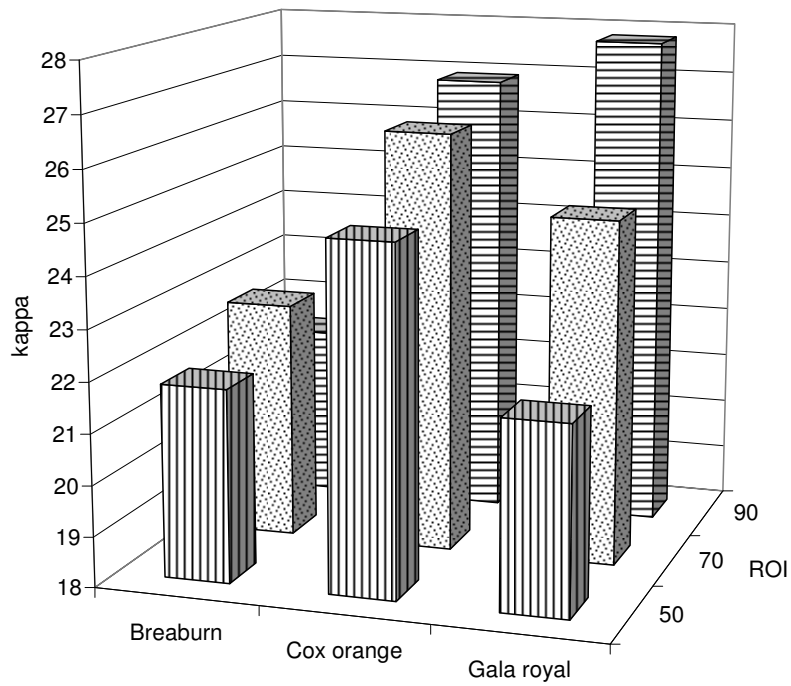


Abbildung 137: Variable κ für die drei Apfelproben in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

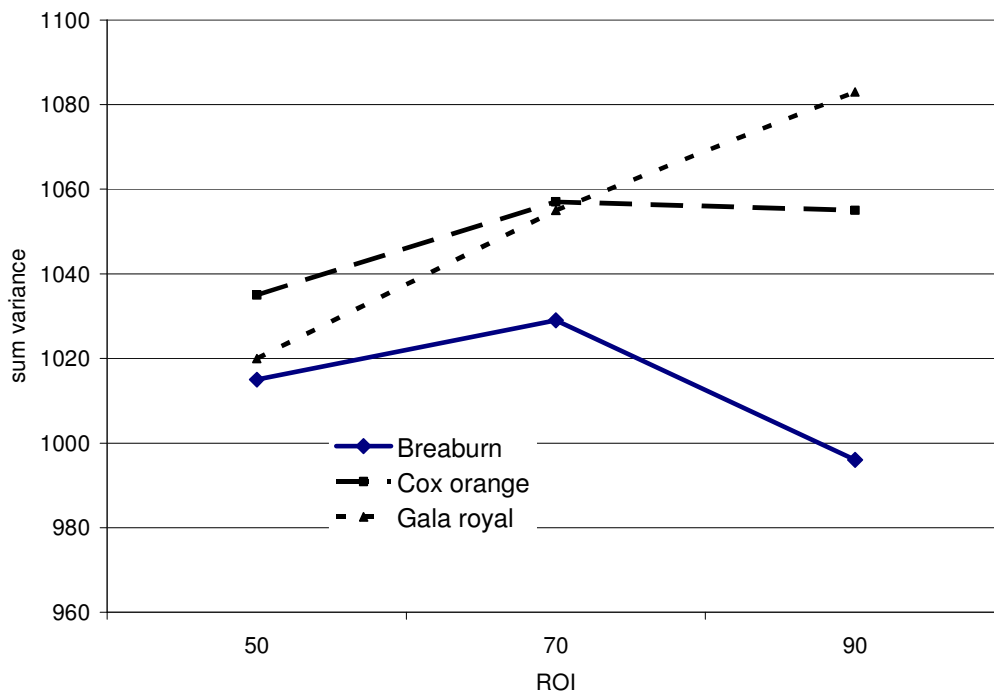


Abbildung 138: Variable sum variance für die drei Apfelproben in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Die Werte der Variablen reagieren für die drei Proben unterschiedlich auf den zunehmenden Bildausschnitt. Wie in Abbildung 138 für *sum variance* gezeigt, hat nur die Probe *Gala royal* einen monotonen Anstieg mit dem ROI.

Ergebnis Alterung

Die drei Proben zeigen ein unterschiedliches Ergebnis auf die Alterung der Säfte. Während *Gala royal* ($F_{sum\ variance} = 20$, $p < 0,05$, ROI 70) und *Breaburn* ($F_{kappa} = 80$, $p < 0,001$, ROI > 80) einen deutlichen Einfluss zeigen, sind die Ergebnisse der Texturanalyse bei *Cox orange* nicht signifikant ($F = 10$, $p = 0,08$). Wie für *sum variance* in Abbildung 139 gezeigt, ist auch die Antwort für *Gala royal* und *Breaburn* nicht eindeutig und vergleichbar. Es muss geprüft werden, ob das gewählte Mischungsverhältnis für die Untersuchung eines Alterungseffekts bei Apfelproben geeignet ist.

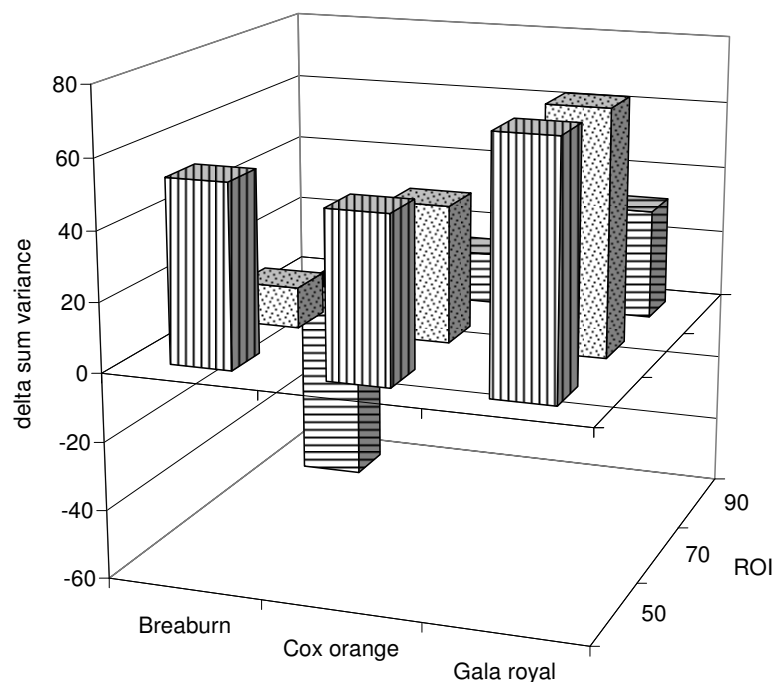


Abbildung 139: Differenz der Variable *sum variance* für die drei Apfelsorten frisch und drei Tage gealtert in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

10.3.2 Unterscheidung Apfelproben aus verschiedenem Anbau

Nach den Vorversuchen an verschiedenen Apfelsorten, wurde die Fähigkeit der Methode getestet, Proben aus dem Handel nach Anbauform zu unterscheiden.

Dafür wurden vom Forschungsinstitut für Biologische Landbau (FiBL) in Frick/CH (Dr. Franco Weibel) Proben aus einem Paarvergleich von Apfelanbauern in der Schweiz zur Verfügung gestellt. Es sind Proben der Ernte 2004 aus integrierter und aus biologisch-dynamischer Produktion als Nachbarbetriebe. Die fünf Betriebspaare sind über die ganze Schweiz verteilt. Die Sorte ist *Golden Delicious*. Die beiden Anbausysteme sind in Zürcher et. al. 2003, Widmer et al. 2004 und Weibel & Widmer 2004 beschrieben. Das Institut für ökologischen Landbau der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL-OEL, PD Dr. G. Rahmann) hat innerhalb des Projekts BÖL 02OE170/F diese Proben kodiert und von dort versandt. Die Proben wurden an je einem Tag (pro Betriebspaar) mit dreifacher Wiederholung der Probenaufbereitung und 6facher Wiederholung der Kristallisation pro Probenaufbereitung und einem Mischungsverhältnis von 180/125 (das ergab sich aus einem Vorversuch als optimales Bild) kristallisiert. Die Dekodierung erfolgte nach Vorlage der Ergebnisse in Trenthorst im Frühjahr 2005. Wie bei den Erzeugerproben Möhren sind die Proben tabellarisch beschrieben.

Kodierung	Standort	IP/Bio	Reihenabstand (m)	Baumhöhe (m)	Baumabstand (m)
H1	Popp/TG	Bio	4,8	3,5	1,6
H2	Stäger/SG	IP	2,8	3	0,7
J1	Vogt/AG	Bio	3	3	0,8
J2	Schwarz/AG	IP	3,6	3,2	2,5
K1	Felix/VD	IP	3,9	3,5	1,6
K2	Suter/VD	Bio	3,7	3,3	1,5
L1	Guy/WS	Bio	4,5		2,3
L2	Häfliger 1/WS	IP	3,8	3,5	2
M1	Häfliger 2/WS	IP	3,8	3,5	2
M2	Guy/WS	Bio	3,8	3,5	1,7

Tabelle 14: Charakterisierung der Erzeugerproben Apfel Ernte 2004.

Die Auswertung mit der Texturanalyse zeigte, dass Unterschiede zwischen den Proben, bezogen auf das Anbausystem, bei drei der fünf Proben gefunden werden konnten, wobei die relative Zuordnung der Proben nicht eindeutig ist. Das Betriebspaar H hat ein umgekehrtes Verhältnis zu den anderen Paaren. Für Bildausschnitte von 100-xx % konnten die Proben des Betriebspaares K für mehrere Variablen u. a. *sum variance* signifikant getrennt werden ($F = 6$, $p < 0,05$). Für Bildausschnitte von 60-80 und 70-90 konnten die Proben signifikant getrennt werden ($F = 9$, $p < 0,05$). Für das Betriebspaar M gelang eine signifikante Unterscheidung für ROI 100-80 ($p < 0,05$). Die beiden Proben aus den Betriebspaaren H, J, L wurden mit mehreren Variablen (u. a. *sum variance* oder *kappa*) in einem Bereich des Bildausschnittes von 50 bzw. 80 % signifikant getrennt.

Betriebspaar	ROI	F-Wert	p-Wert
H	50	30	<0,05
J	>80	20	<0,05
L	<70	30	<0,05

Tabelle 15: F-und p-Werte der Trennung von zwei Apfelproben aus einem Betriebspaar ökologisch/konventioneller Anbau.

Das Ergebnis für die Variable *sum variance* ist bei einem Bildausschnitt von 70% in Abbildung 140 für alle Erzeugerproben gezeigt. Die beiden Anbausysteme sind nebeneinander gestellt.

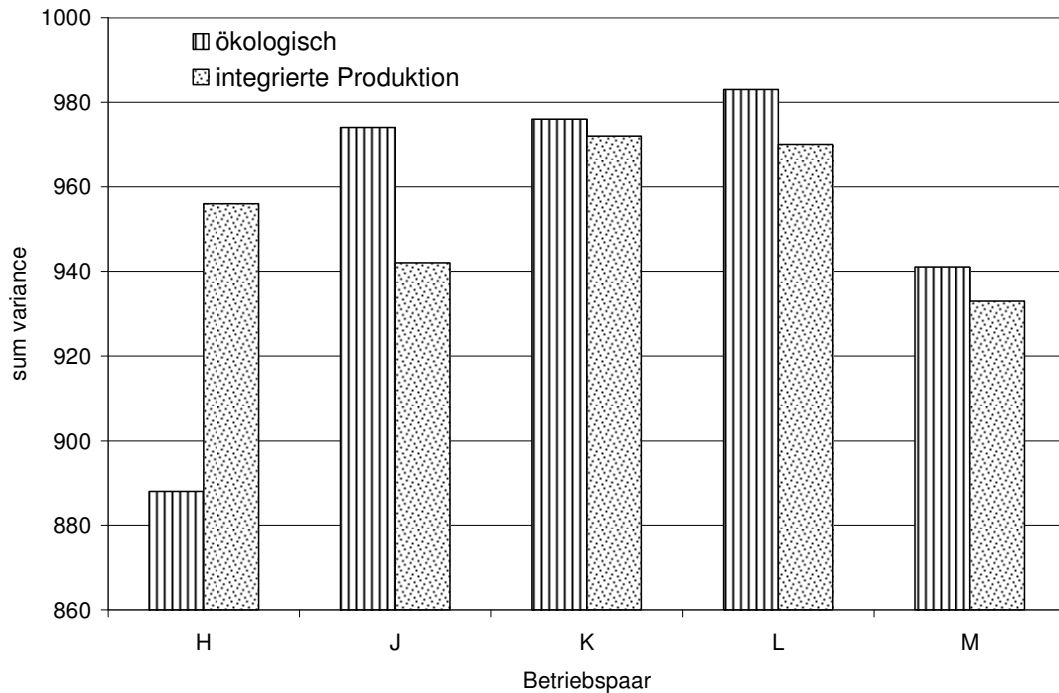


Abbildung 140: Variable *sum variance* für sechs verschiedene Probenpaare (ökologisch / konventionell) direkt vom Erzeuger für einen Bildausschnitt von 70 %.

Wie bereits für die Erzeugerproben Weizen und Möhre gezeigt, hängt auch hier das Unterscheidungsvermögen vom Bildausschnitt je nach Betriebspaar ab. Um das Unterscheidungsvermögen zu verbessern, wurden neben den Kreisen um das Zentrum herum verschiedene andere Bildausschnitte gewählt. Ringförmige Ausschnitte (xx-yy %) von 10-20 % um das Zentrum herum und die systematische Abtrennung von Ausschnitten vom Rand ausgehend (100-x %) brachten dabei leichte Verbesserungen. Trotzdem ist das Ergebnis nicht befriedigend. Die Methode kann die Proben nicht durchgängig nach Anbausystem unterscheiden. Andere Faktoren (Standort, Behandlung) spielen offenbar eine größere Rolle und müssen getrennt untersucht werden. Dabei kann eine Veränderung des Mischungsverhältnisses oder die parallele Kristallisation mit einem Probenvektor u. U. die Aussage erheblich verbessern. Ein Vergleich der Ergebnisse mit anderen, am gleichen Probenmaterial gemessenen Parametern zeigte, dass das Muster einer Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe (Flavonole), gemessen an der Technischen Universität München (Prof. Dr. D. Treutter), und der Messwert R40w der Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie, gemessen bei KWALIS GmbH, Fulda (Dr. J. Strube) auch die Probe H1 als Probe mit dem geringsten Wert und in umgekehrter

Reihenfolge klassifiziert. Auf Rückfrage bei Dr. Franco Weibel, kam die Information, dass der Betrieb H1 durchaus als sehr gut beurteilt wird, aber in diesem Jahr Pflanzenschutzprobleme (mit Schorf) hatte, was sich ggf. auf die Qualität der Probe ausgewirkt hat.

Wie bereits bei der Untersuchung von verschiedenen Apfelsorten gezeigt, spielt die Wahl des Mischungsverhältnisses eine entscheidende Rolle. Aufgrund der großen Streuung der Methode muss mit mehreren Wiederholungen gearbeitet werden. Da die Kammer nur 43 Plätze für die Kristallisation hat, wurde für die Prüfung der statistischen Unterscheidung von Betriebspaaren nur mit einem Mischungsverhältnis gearbeitet. Obst- und Gemüseproben sind Frischware und verändern sich mit der Lagerdauer. Die Durchführung von Vorversuchen, in denen das Mischungsverhältnis mit dem größten Unterscheidungsvermögen gefunden werden kann, bedingt einen wesentlich höheren Zeitaufwand, der kostenmäßig nur schwer darzustellen ist. Die Lösung liegt in der Reduzierung der Variation in der Kammer oder, wenn dies mit einer Verringerung des Signals (Unterscheidungsvermögen) einhergeht, die Arbeit mit einem Probenvektor unter statistischer Einbeziehung der Mischungsverhältnisse als Wiederholungen während der Kristallisation.

10.4 Kristallisation von verschiedenen Probenarten (*Aloe vera*, Mais, Milch)

Abschließend werden Ergebnisse von Vorversuchen dargestellt, die das Potenzial der Methode für weitere Probenarten beleuchten. Für die drei Probenarten *Aloe vera* (als Lösung), Mais und Milch wurden zunächst verschiedene Mischungsverhältnisse unter Variation sowohl der Mengen an Probe, als auch der Mengen an CuCl_2 getestet, um für die visuelle Bildauswertung optimale Bilder zu erhalten. Als Probenaufbereitung wurden die *Aloe vera*- und Milchproben mit ultrafiltriertem Wasser verdünnt bzw. ohne weitere Aufbereitung mit CuCl_2 -Lösung vermischt. Die Maisproben wurden zunächst wie die Weizenproben behandelt. Dabei stellte es sich jedoch heraus, dass der Schritt Filtration mit einer erheblich längeren Dauer als für Weizenproben verbunden war. Daher wurden die Maisproben zentrifugiert (5 min, 2500 U/min, 50 mL Zentrifugenröhrchen; Hettich Universal 32 R) und der Überstand mit CuCl_2 -Lösung vermischt. Um zu prüfen, wie weit sich Bilder aus

dem Filtrat mit dem aus dem Überstand der Zentrifugenlösung vergleichen lassen, wurde eine extrahierte Maisprobe parallel gefiltert und zentrifugiert und die Lösungen parallel kristallisiert. Die Bilder zeigten keinen Unterschied. Darüber hinaus wurde für Maisproben die Streuung der Methode ermittelt, die beiden untersuchten Milchproben wurden unter sechsfacher Wiederholbedingung vorbereitet und kristallisiert. Die Untersuchung der Maisproben erfolgte im Rahmen des Projektes BÖL 02OE170/F, die Milchproben in der Diplomarbeit von Jennifer Wohlers 2003.

10.4.1 Unterscheidung von zwei *Aloe vera* Lösungen mit unterschiedlicher Konzentration

Die Firma Pharmos (Uffing/D) führte 2004 eine Gesundheitsstudie zum Wirkungsnachweis von *Aloe vera* bei Krebspatienten durch. Dafür wurden an einer Universitäts-Kinderklinik Patienten behandelt, um die Nebenwirkung der Chemo- und/oder Bestrahlungstherapie abzufangen. Es wurden dafür zwei *Aloe vera* Lösungen eingesetzt:

1. AV 1000, 10 % *Aloe vera* und 90 % Wasser ohne weitere Zusatzstoffe
2. AV 2000, 100 % *Aloe vera* ohne weitere Zusatzstoffe

Diese beiden Lösungen wurden kodiert von der Firma Pharmos in einer dreifachen Wiederholung (200 mL) erhalten und untersucht. Nach Vorlage der Ergebnisse wurde von der Firma Pharmos dekodiert.

Die Untersuchungen zu dem Einfluss von 16 verschiedenen Mischungsverhältnissen zeigte, dass alle verschiedenen Mischungsverhältnisse Bilder brachten, wobei der für die visuelle Evaluierung optimale Bereich bei einem Faktor 13 mehr Probenmenge pro Platte lag, als für Möhrenproben bisher eingesetzt. Das optimale Mischungsverhältnis wurde bei 1500/50 gefunden. Bei diesem Mischungsverhältnis wurden beide Proben parallel mit einer dreifachen Wiederholung der Probenaufbereitung und einer sechsfachen Bildwiederholung pro Kammer in einer Kammer kristallisiert. Zusätzlich wurden Parameter der Probenlösung bestimmt (s. Tabelle 16).

Parameter	AV1000	AV2000
Trockenmasse%	0,13	0,38
pH	4,95	4,73
Leitfähigkeit mS/cm	1,2	3,1

Tabelle 16: Charakterisierung der Lösungen für die beiden *Aloe vera* Proben.

Für Bildausschnitte ist der Unterschied zwischen beiden Proben für alle Variablen der Texturanalyse außer *cluster shade* signifikant. Besonders *kappa* reagiert auf die Unterscheidung ($F = 200$, $p < 0,001$ für ROI 60-70), die Variable *diagonal moment* weniger.

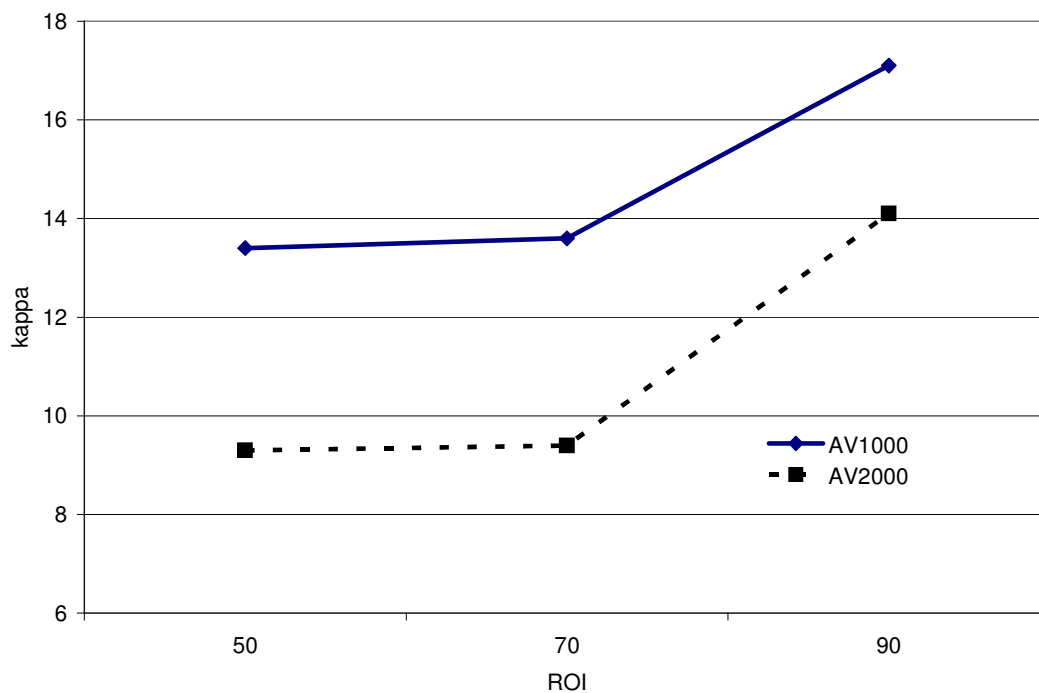


Abbildung 141: Variable *kappa* für die beiden *Aloe vera* Proben in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Um die beiden Proben auch unter gleicher Menge an Trockenmasse pro Platte zu vergleichen, wurden beide Proben parallel mit einem Mischungsverhältnis von 500/25 kristallisiert (unterschiedliche Verdünnungen der Säfte für die Probenlösung). Die beiden Proben konnten zwar immer noch signifikant unterschieden werden ($F_{kappa} = 15$, $p < 0,05$), aber das

Unterscheidungsvermögen war deutlich geringer. Das kann aber auch an dem verschiedenen Mischungsverhältnis liegen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Ergebnis der Texturanalyse nicht die Trockenmasse der Probenlösung abbildet. Das Ergebnis und die Trockenmasse sind nicht durchgängig korreliert. In Tabelle 17 sind die Probenmengen pro Platte den Trockenmassen der Probenlösungen von den bisher untersuchten Proben gegenübergestellt. Dabei wird deutlich, dass die Menge an Trockenmasse pro Platte und das optimale Mischungsverhältnis, das Ergebnis der Texturanalyse und das Unterscheidungsvermögen der Methode nicht zwischen den einzelnen Probenarten verglichen werden kann. Während Apfel- und Möhrenproben mit einer durchschnittlichen Trockenmasse von 12 % 115 bzw. 180 mg Probe pro Platte benötigen, liegt die Menge für *Aloe vera* bei 1500 mg. Der Unterschied zwischen *Aloe vera* und Möhre ist bezogen auf die Trockenmasse bei einem Faktor 30, bezogen auf die Probenmenge bei einem Faktor von 13. Obwohl Weizen als extrahierte Probe der CuCl₂-Lösung zugemischt wird, ist die Menge an Probe pro Platte nicht mit der von *Aloe vera* vergleichbar, obwohl die Trockenmassen der Probenlösungen von der Größenordnung her vergleichbar sind.

	Trockenmasse Lösung %	Mischungsverhältnis
Apfel	14	180/125
Möhre	12	115/90
Weizen	0,8	70/90
<i>Aloe vera</i>	0,38	1500/50

Tabelle 17: Vergleich verschiedener untersuchter Probenarten hinsichtlich Trockenmasse und Mischungsverhältnis.

10.4.2 Anwendung der Methode bei Maisproben

Die Proben stammen aus dem seit 1977 laufenden DOK-Versuch in Therwil/Schweiz. Dieser Langzeit-Versuchsanbau wurde bereits in Kapitel 10.1.2.1 beschrieben. Die Proben wurden noch unreif geerntet, gedroschen und im Institut für ökologischen Landbau in Trenthorst (FAL-OEL) gelagert und

kodiert versandt und im Labor in Witzenhausen kristallisiert. Die Dekodierung der Proben erfolgte erst nach Hinterlegung der Ergebnisse in Trenthorst bzw. am FiBL. Alle Proben wurden als bulk-Proben, d.h. eine Mischung der vier Feldwiederholungen mit einer doppelten Probenaufbereitung und Bildwiederholung und an drei verschiedenen Tagen in zwei Kammern parallel und einem Mischungsverhältnis von 175/100 kristallisiert. Die kristallisierten Platten wurden gescannt und mit der Texturanalyse ausgewertet. Die Nullvariante (N) konnte von allen anderen Proben bei einem Bildausschnitt kleiner als 60 % signifikant getrennt werden ($F_{diagonal\ moment} = 10, p < 0,01$). Die anderen Varianten konnten nicht unterschieden werden (die visuelle Bildauswertung zeigte dagegen Unterschiede auch zwischen den vier anderen Proben). Zusätzlich zu den Maisproben aus dem DOK-Versuch wurden für die Ernte 2002 auch die Kartoffelproben kristallisiert (Ergebnis eines Vorversuches, hier nicht dargestellt). Auch hier konnte die Nullvariante von allen anderen Proben getrennt werden. Damit kann mit den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden, dass die Methode in der Lage ist, aus einem definierten Feldversuch für mehrere Probenarten und Jahre die behandelten Varianten von der Kontrolle signifikant zu unterscheiden. Die Unterscheidung der Anbausysteme ökologisch / konventionell ist mit der dafür optimierten Methode bei Weizen zusätzlich möglich. Für Mais- und Kartoffelproben müssen entsprechende Optimierungsschritte (u. a. Variation des Mischungsverhältnisses) noch durchgeführt werden.

Für zwei Proben aus dem DOK-Versuch wurde die Streuung der Schritte Probenaufbereitung und Kristallisation (Wiederholpräzision) ermittelt. Dafür wurde eine Probe in einer sechsfachen Wiederholung aufbereitet und in einer sechsfachen Bildwiederholung bei einem Mischungsverhältnis von 175/100 kristallisiert. Die Ergebnisse sind für die drei ausgewählten Variablen in Abhängigkeit von dem Bildausschnitt in den Abbildungen 142-144 dargestellt und mit der Streuung der Methode bei Weizenproben vergleichbar, wobei die Abhängigkeit vom Bildausschnitt verschieden ist.

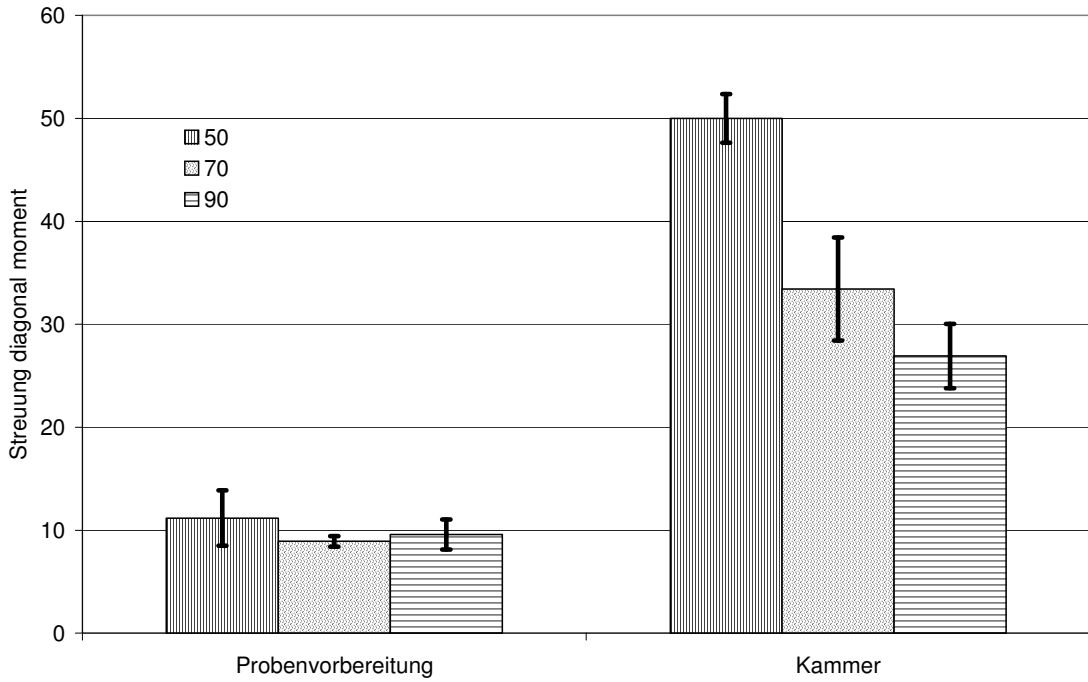


Abbildung 142: Streuung der Variable *diagonal moment* für die Maisproben aus dem DOK-Versuch in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

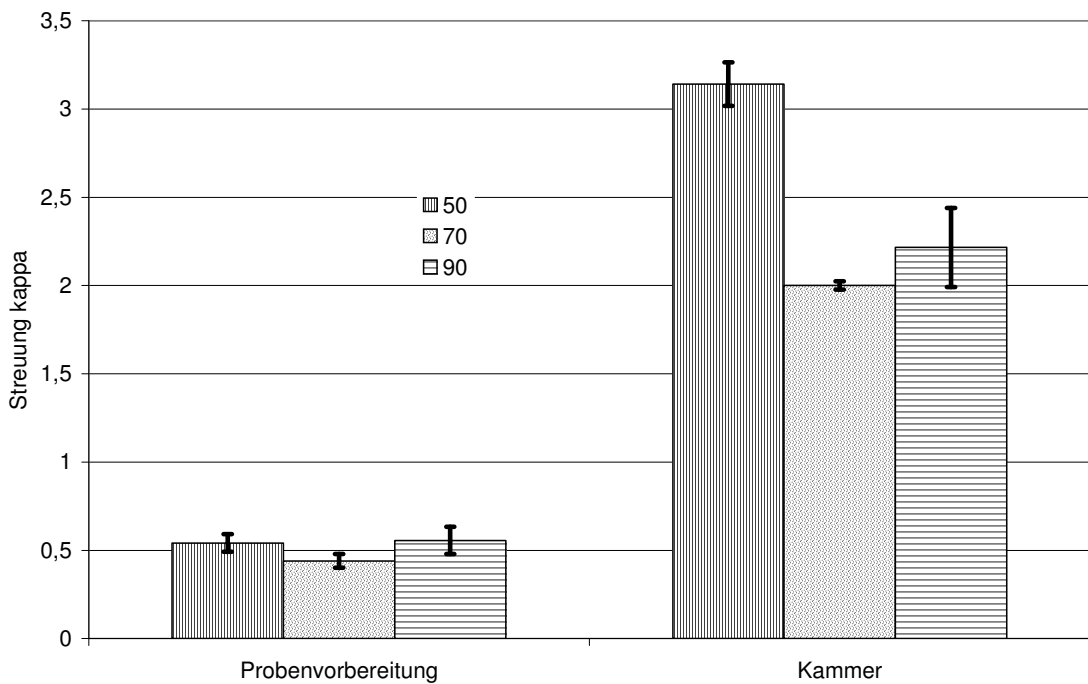


Abbildung 143: Streuung der Variable *kappa* für die Maisproben aus dem DOK-Versuch in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

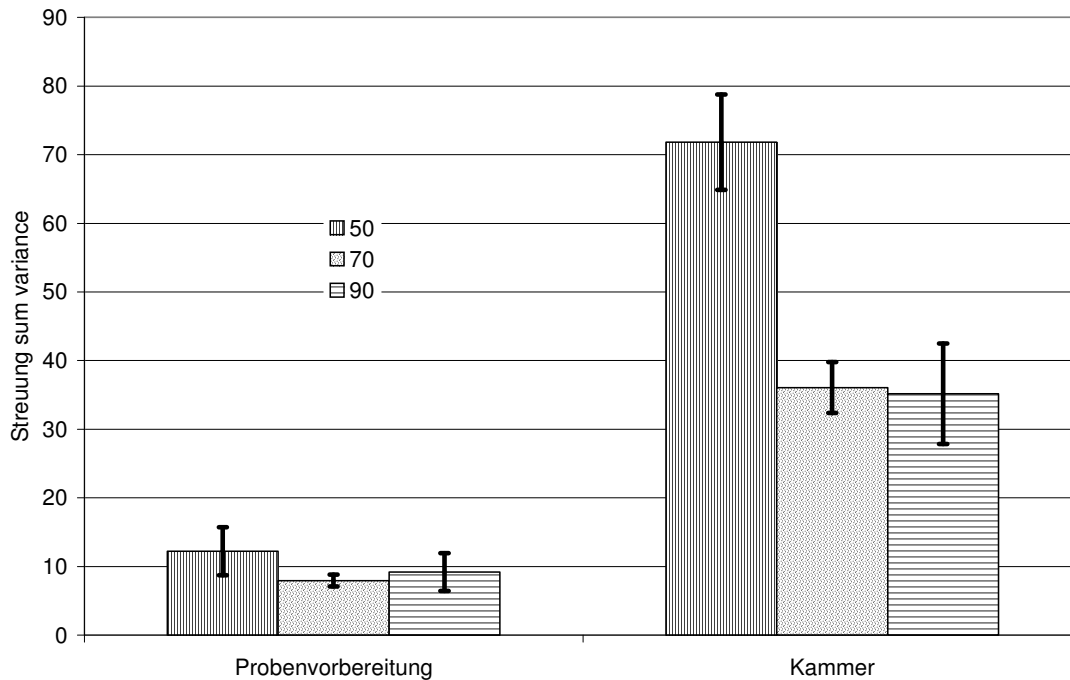


Abbildung 144: Streuung der Variable *sum variance* für die Maisproben aus dem DOK-Versuch in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

Zwei Proben aus dem DOK-Versuch wurden in einem weiteren Versuch in der Mikrowelle mit unterschiedlicher Dauer erwärmt. Dazu wurde die Probenlösung mit 750 W einmal 60 s (Stufe 1) und einmal 240 s (Stufe 2) in der Mikrowelle behandelt. Die Temperatur der Lösung betrug nach Stufe 1 40 °C und für Stufe 2 94,5 °C. Bevor die Lösungen mit CuCl₂-Lösung vermischt wurden, wurden sie auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Proben wurden mit einer neunfachen Bildwiederholung pro Kammer in zwei Kammern parallel kristallisiert. Die beiden Proben zeigten ein vergleichbares Ergebnis.

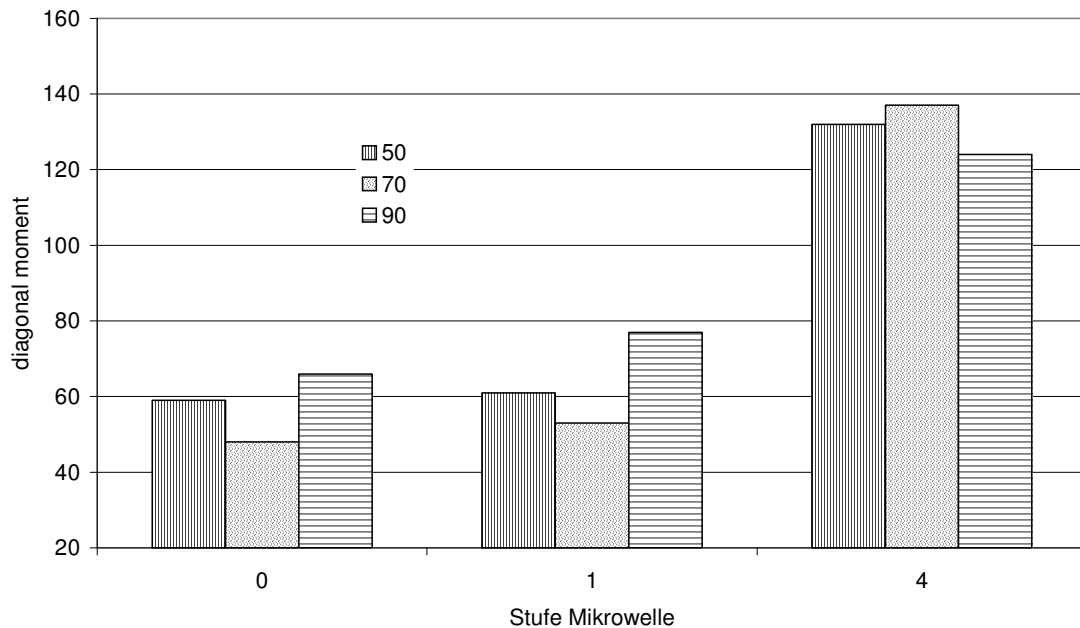


Abbildung 145: Variable *diagonal moment* für die Maisprobe O2 DOK-Versuch in Abhängigkeit der unterschiedlichen Dauer einer Erwärmung und vom Bildausschnitt (50, 70, 90%).

Die Werte für *diagonal moment* steigen nach einer Behandlung in der Mikrowelle von 60 s (40 °C) leicht an, die Veränderung ist aber nicht signifikant. Nach 240 s Behandlung (94,5 °C) steigen die Werte weiter an, und die so behandelte Probe unterscheidet sich von der unbehandelten signifikant ($F = 150$, $p < 0,05$, ROI 80). Die Variablen *kappa* und *sum variance* zeigen ein vergleichbares, aber zu *diagonal moment* inverses Verhalten, wobei *sum variance* empfindlicher auf die Erwärmung reagiert als *kappa* (Faktor 2). Auch für diese Variablen ist der Unterschied zur Stufe 4 signifikant.

Da in diesem Vorversuch nur eine Wärmequelle eingesetzt wurde, kann nicht diskutiert werden, ob die mit der Texturanalyse gezeigte Änderung der Bilder auf die Erwärmung der Lösung generell oder auf den Effekt der Mikrowellenbehandlung zurückzuführen ist. Da bei 94 °C aber bereits z. B. die Proteine in der Lösung denaturieren und die Probe zerfällt, kann vermutet werden, dass der Effekt der Erwärmung, zunächst unabhängig von der Wärmequelle, das Ergebnis der Methode beeinflusst.

10.4.3 Anwendung der Methode bei Milchproben

Für Milchproben der Herde im Versuchsgut der Universität Kassel in Frankenhausen wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Jennifer Wohlers 2003 Kristallbilder angefertigt. Wie bereits in der Literatur beschrieben (s. Kap. 4.3), reagiert die Methode auf Veränderung der Milch empfindlich, wenn die Bilder visuell ausgewertet werden. Bei der Ermittlung des für die visuelle Bildauswertung optimalen Mischungsverhältnisses zeigte sich, dass Milch ein mit Lysozym vergleichbares Muster liefert: Lange, dicke Nadelzüge mit wenig Seitennadeln, die die Platte vollständig bedecken, und wenn zuviel Probenmenge auf die Platte kommt, die Auswertung mit der Texturanalyse erschweren. Bei einem Mischungsverhältnis von 350/175 wurden zwei Milchproben (Mischprobe) von Kühen mit Anfang und Ende der Laktationsperiode in einer sechsfachen Wiederholung der Probenaufbereitung und einer sechsfachen Bildwiederholung pro Kammer an einem Tag in zwei Kammern parallel kristallisiert. Die beiden Proben konnten mit der Texturanalyse signifikant für die Variable *diagonal moment* und Bildausschnitten kleiner 70 % unterschieden werden ($p < 0,05$), wobei das Unterscheidungsvermögen vom ROI abhängt (s. Abbildung 146). Die Variablen *kappa* und *sum variance* trennten die beiden Proben nicht.

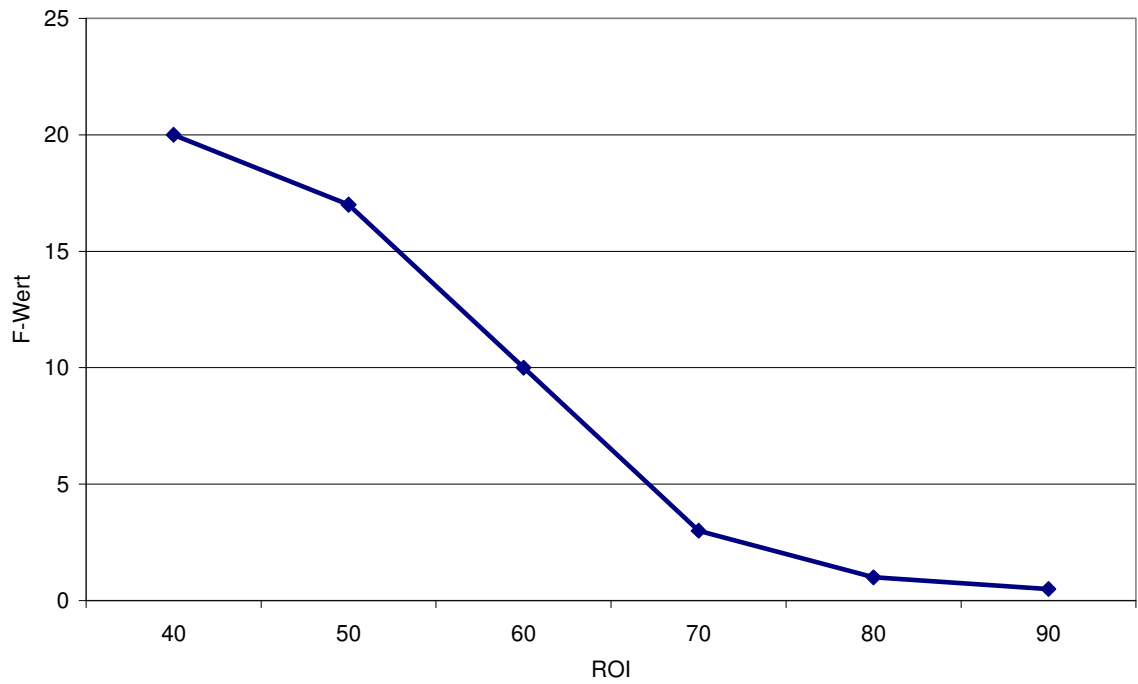


Abbildung 146: F-Wert der Variable *diagonal moment* für die Unterschiede zwischen Milchproben vom Anfang und Ende der Laktation in Abhängigkeit vom Bildausschnitt.

11 Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass das ganzheitliche Verfahren der Biokristallisation für die Unterscheidung von Weizen-, Möhren- und Apfelproben aus verschiedenem Anbau und Verarbeitungsschritten validiert werden kann. Die dafür notwendigen Validierungsprozeduren und -merkmale lassen sich aus bereits vorgegebenen Beispielen analytischer Methoden übernehmen, adaptieren und je nach Methode ergänzen. Verfahrensmerkmale wie Präzision oder Robustheit können bestimmt werden, die Richtigkeit (noch) nicht, da kein geeignetes Referenzmaterial existiert. Die bei analytischen Methoden bestimmbare lineare Abhängigkeit des Signals von der Stoffmenge ist der Arbeitsbereich der Methode (vgl. bei HPLC-DAD). Bei der Biokristallisation ist es ein Arbeitspunkt in der Matrix aus verschiedenen Mischungsverhältnissen zwischen Probe und Salz. Verdampfungszeit und Kristallisationsdauer sind verfahrensspezifische Merkmale, die in dieser Arbeit zum ersten Mal als solche beschrieben werden. Für die Bestimmung der Verfahrensmerkmale und für die Untersuchung zum Einfluss verschiedener Faktoren wurden die Prozeduren der einzelnen Methoden dokumentiert; das Format der Dokumentation ist an internationale Normen angelehnt. Dies ist eine wichtige Voraussetzung valide Ergebnisse erhalten zu können. Jeder Schritt im Labor, von der Probennahme bis zur Auswertung der Ergebnisse, ist durch detaillierte Prozessbeschreibungen vorgegeben. Die Dokumentation jeder Bestimmung wird über ein speziell dafür entwickeltes Computerprogramm (*LabDoc*) erfasst, wo die eingesetzten Chemikalien, die Laborbedingungen, die Bedingungen in der Klimakammer, sowie weitere Schritte (u. a. Scannen der Bilder) dokumentiert werden. Diese Informationen stehen dann bei der Auswertung mittels Texturanalyse (Programm *acia*) zur Verfügung. Der Anspruch dieser Arbeit ist, zu zeigen, dass die Ergebnisse zu einem anderen Zeitpunkt, in einer anderen Kammer, von einer anderen Person und in einem anderen Labor reproduziert werden können. Die bisherigen Ansätze hatten diesen Anspruch nicht, sie waren labor- und personengebunden. Während frühe Arbeiten zum Verfahren nähere Angaben zur Versuchsdurchführung machen (vgl. Selawry & Selawry 1957, von Hahn 1962) fehlen diese Angaben bei anderen Arbeiten weitgehend (vgl. Balzer-Graf & Balzer 1994 oder Balzer-Graf et al. 1998).

Mit der hier dargestellten Dokumentation der Prozesse und Versuchsbedingungen kann das Verfahren auch in anderen Laboratorien angewendet werden, was die Ergebnisse einer Laboreignungsprüfung belegen (Test der Hypothese 1). Solche Prüfungen wurden zum ersten Mal überhaupt für das Verfahren durchgeführt und beschrieben. Das in Witzenhausen charakterisierte Standardmaterial konnte für Vergleichsmessungen verschiedener Labore und Kammern erfolgreich eingesetzt werden. Es handelt sich um eine Laboreignungsprüfung zur nominalen Unterscheidung von Proben, die mit Instituten in den Niederlanden, Dänemark, Belgien und der Schweiz durchgeführt wurden. Die Unterschiede zwischen den Laboren in der ersten Vergleichsmessung zeigt, dass nicht die Regulierung der Feuchte allein, sondern die Einhaltung vergleichbarer Verdampfungs- und Kristallisationszeiten die gewünschte Vergleichbarkeit der Ergebnisse bringt. Die Ergebnisse zeigten auch, dass wenn verschiedene Kammertypen eingesetzt werden, die Laborprozeduren (u.a. das Mischungsverhältnis) angepasst werden müssen.

Mit dem hier beschriebenen Verfahren können die Ergebnisse, die in der Literatur entsprechend beschrieben worden sind, reproduziert werden. Dies gilt sowohl für die Kristallisation von Einzelstoffen, als auch für den Effekt der Alterung der Probenlösung (Test der Hypothese 2). Der von Andersen et al. (1999) gefundenen Verlauf der Variable κ mit zunehmendem Polymerisationsgrad von Polyvinylpyrrolidon konnte bestätigt und durch die Abhängigkeit vom Bildausschnitt ergänzt werden. Die von Andersen et al. (2001) beschriebene Antwort des Verfahrens mit Texturanalyse auf die Alterung von Möhrenproben konnte für die drei in der vorliegenden Arbeit verwendeten Variablen ebenfalls bestätigt werden. Ergänzend wurde gezeigt, dass das Ergebnis zusätzlich vom gewählten Mischungsverhältnis abhängig ist. Mit der Kristallisation von Glykogen wurden mit dem in der vorliegenden Arbeit dokumentierten Verfahren Bilder gewonnen, die mit denen aus der Literatur (Morris & Morris 1941, Barth 1997) visuell vergleichbar sind. Die Gruppierung der Proben aus dem DOK-Versuch mittels multivariater Statistik, konnten die in Mäder et. al (1993) diskutierten qualitativen Ergebnisse von Balzer-Graf für weitere Erntejahre (1999, 2002 und 2003) bestätigen. Das in der vorliegenden

Arbeit beschriebene Verfahren ist in der Lage, Proben aus verschiedenen Anbausystemen auch signifikant zu trennen, dies konnte in Mäder et al. (1993) nicht gezeigt werden.

Die bisherige Auswertung der Bilder, wie sie in der Literatur beschrieben worden ist (vgl. Kap. 4.3), geschah visuell. Die Bilder wurden betrachtet und anhand vorgegebener Merkmale oder einer freien Beschreibung miteinander verglichen. Unterschiedliche Autoren verwenden unterschiedliche Merkmale, häufig wird der gleiche Begriff (z.B. Textur) für verschiedene Phänomene (Merkmale) verwendet (vgl. Kap. 4.3). Dieses Problem wurde durch die Adaption von bereits existierenden Normen aus der sensorischen Beurteilung von Lebensmitteln gelöst. Die in der vorliegenden Arbeit diskutierten Ergebnisse der visuellen Bildauswertung lassen sich auf definierte, anhand von Referenzbilder standardisierte, Merkmale zurückführen und wiederholbar und unabhängig von der Person anwenden. Kritisch bleibt die Anzahl und Auswahl der zu beurteilenden Bilder. Während bei der Texturanalyse bisher alle Bildwiederholungen in die Auswertung eingehen, wird für die visuelle Bildauswertung aufgrund des Umfangs an Bildmaterial pro Probe und begrenzten Mitteln (Personal und Zeit) mit einer Auswahl von Bildern gearbeitet. Dies ist bereits in der Literatur beschrieben. Während Selawry & Selawry (1957) 4 von 5 Wiederholungen auswerten, sind es bei Bessenich (1951) 3 von 5 und bei von Hahn (1962) 10-20 Platten. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewählten Auswahlkriterien beschränken sich auf technisch eindeutig definierbare Fehler oder messbare Größen wie die Verdampfungszeit. Ob die drei Bilder pro Probe die Streuung abbilden, muss weiter untersucht werden. Es konnten Methoden für die visuelle Auswertung der Bilder in Anlehnung an bereits anerkannte Methoden der sensorischen Prüfung von Lebensmittelproben entwickelt und charakterisiert werden, mit denen die Ergebnisse auch einer statistischen Prüfung zugänglich sind. Für die *Profilprüfung* konnten Bilder von Proben aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten signifikant unterschieden werden. Damit wird für die Biokristallisation zum ersten Mal eine methodisch beschreib- und prüfbare, nicht an Einzelpersonen gebundene visuelle Auswertung der Bilder dargestellt (Test der Hypothese 3.2).

Eine bereits entwickelte computergestützte Texturanalyse (vgl. Andersen et al. 1999) wurde für die Unterscheidung von Proben aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten erfolgreich eingesetzt. Diese wurde für verschiedene Probenarten in Abhängigkeit vom Bildausschnitt charakterisiert. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde ein Modell entwickelt, das die Verschachtelung der Wiederholungen der einzelnen Prozessschritte entsprechend berücksichtigt (Test der Hypothese 3.1). Damit kann das hier dokumentierte Verfahren validiert werden, denn es können sowohl die Einflussfaktoren als auch die Streuung der Methoden getestet werden. Aufgrund des Umfangs der Ergebnisse wurden die hier vorgelegten Untersuchungen für eine Auswahl von drei der 15 Variablen zweiter Ordnung ausgewertet. Diese Variablen repräsentieren jeweils eine Gruppe von Variablen bezogen auf die Abhängigkeit vom Bildausschnitt. Alle drei Variablen sind grundsätzlich für eine Differenzierung von Bildern verschiedener Proben geeignet. Die Variable *diagonal moment* zeigt in vielen Fällen eine von *kappa* und *sum variance* verschiedene Antwort. So ist diese Variable nicht geeignet, die Streuung zwischen den verschiedenen Laboren für das gewählte Standardmaterial zu erfassen. Dies kann für andere Proben anders sein, dies zeigen Untersuchungen an Milchproben, wo nur diese Variable die beiden untersuchten Proben trennt. *Diagonal moment* reagiert für die Unterscheidung dann, wenn die Nadeln wenig verzweigt und grob durch das ganze Bild gehen, die Variablen *kappa* und *sum variance*, wenn das Bild eine feine Verästelung aufweist. *Diagonal moment* reagiert besonders stark auf Prozesse wie Gefriertrocknung oder Erwärmung. Untersuchungen, welche Variablen sich für welches Probenmaterial besonders eignen und ob die Normalisierung der Bilder (Gauß, Hyperbolisch etc) sowie die Farbwahl (Rot-Gelb-Blau Verhältnis) die Differenzierung verbessern kann, werden z. Zt. in der Dissertation von Aumaporn Meelursarn im Fachgebiet Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur weitergeführt. Die Korrelation der verschiedenen Variablen untereinander hinsichtlich einer Gruppenbildung wurde im Rahmen eines Projektes im Bundesprogramm Ökolandbau durchgeführt und bestätigten die hier vorgelegten Ergebnisse (BÖL 02OE170/F).

Um sicherzustellen, dass die Unterschiede in den Ergebnissen der Bestimmung verschiedener Proben nicht auf den Einfluss der Probenbehandlung im Labor, sondern auf die unterschiedliche Probenherkunft zurückzuführen sind, wurden die Methoden (bzw. das Verfahren) charakterisiert. Dafür wurde eine systematische Prüfung der Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen, durchgeführt, dies wird für die Ergebnisse der Texturanalyse diskutiert. Es konnten sowohl verfahrens- als auch methodenspezifische Faktoren ermittelt und der Einfluss auf das Ergebnis (Variable, Trennungsvermögen) bestimmt werden (Test der Hypothese 4.1). Wichtige Einflussfaktoren des Verfahrens sind das Mischungsverhältnis von Probe und CuCl_2 , die Klimabedingungen (Temperatur, Feuchte) während der Verdampfung und Kristallisation und die Wahl des Bildausschnittes. Hier zeigte sich, dass im Verlauf der Untersuchungen das Mischungsverhältnis und der Bildausschnitt als Verfahrenskenngrößen definiert werden können, die für jedes Probenmaterial bestimmt werden müssen.

Wie wichtig das Mischungsverhältnis für das Verfahren ist, wurde bereits ausführlich in der Literatur beschrieben (vgl. u. a. Bessenich 1951, Selawry & Selawry 1957, Engquist 1975, Andersen 2001, Andersen et al. 2003). Von Hahn schreibt dazu: „Die Konzentration der beiden Komponenten (...), Kupferchloridlösung und pflanzlicher/tierischer Extrakt, spielt (...) eine weit bedeutendere Rolle als bei den meisten chemischen und biologischen Arbeitsweisen.“ (1962, S. 43) und stellt die Regel auf: „Nur gleiche Konzentrationen können miteinander verglichen werden“ (ebda., S. 44).

Die Regelung der klimatischen Bedingungen in der Kammer hat sich als notwendige Voraussetzung für die Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowohl für die visuelle Bildauswertung als auch für die Auswertung mit Texturanalyse bestätigt. Die Feuchte zu Beginn der Kristallisation beeinflusst die Streuung der Verdampfungszeiten der 43 Platten eines Kammerdurchgangs. Je trockener die Luft, desto eher beginnt die Kristallisation. Die Variablen der Texturanalyse reagieren allerdings nur schwach auf diesen Einfluss. Lediglich PVP-Proben zeigten eine starke Abhängigkeit der Variablen von der Feuchte. Bereits Pfeiffer (1930) und Bessenich (1951) führten die Klimabedingungen während der Kristallisationszeit als besonders starke Einflussgrößen an. Von Hahn (1962) und Selawry &

Selawry (1957) führten systematische Untersuchungen dazu durch, die später durch Andersen (2001) und Ballivet et al. (1999) bestätigt wurden. Für die Vergleichbarkeit der Bilder scheint aber weniger die Angabe der Feuchte, sondern die Kenntnis der Verdampfungszeit und Kristallisationsdauer notwendig zu sein.

Zu den methodenspezifischen Einflussfaktoren gehören z.B. die Vermahlung, die Extraktionsmenge und die Extraktionsdauer bei Weizen und die Entsaftung bei Möhren- und Apfelproben. Diese Faktoren müssen daher kontrolliert werden. Die Extraktmenge bei Weizenproben beeinflusst das Ergebnis, wobei der Einfluss sowohl von der Variablen als auch von dem Bildausschnitt abhängig ist. Diese hier gefundene Abhängigkeit der Stärke des Einflusses externer Faktoren von der Variablen der Texturanalyse, als auch vom ROI, hat sich durchgängig für alle untersuchten Einflussgrößen bestätigt. Dazu kommt, dass sich verschiedene Prozessschritte gegenseitig beeinflussen, wie z.B. die Extraktmenge und das Mischungsverhältnis. Auch die Extraktionsdauer beeinflusst das Ergebnis: mit zunehmender Dauer steigen die Werte der Variablen der Texturanalyse, es kommt aber zu einem Sättigungseffekt. Es konnte eine Extraktionsdauer gefunden werden, bei der das Unterscheidungsvermögen für die untersuchten Proben am größten ist. Bei der Filtration der Lösung hat der Porendurchmesser einen Einfluss. Der Einsatz eines Siebes kann aufgrund der erhöhten Streuung der Ergebnisse nicht empfohlen werden. Die Schritte Scannen der Bilder und Lagerung der Platten sind vernachlässigbar, wenn die Klimabedingungen, die während der Kristallisation herrschen, eingehalten werden. Für die Überwachung des Scanners wurde bei jedem Scan-Vorgang ein Referenzdia eingescannt, mit dem die Farbstabilität über einen längeren Zeitraum überprüft werden kann.

Prozessschritt	Weizen	Möhre	Apfel	Einfluss
Labor	x	x		++++
Kammer	x	x	x	+++
Feuchte		x		+++
Person (geschult)	x	x		+
Probenaufbereitung	x	x	x	+++
Vermahlung/Entsaftung	x	x	x	+++
Extraktion	x			++
Filtration	x	x	x	++
Mischungsverhältnis	x	x	x	+++
Scannen	x	x		+

Tabelle 18: Untersuchte Prozessschritte und ihr Einfluss auf das Ergebnis (Variable, Unterscheidungsvermögen).

Eine Änderung der hier beschriebenen Prozeduren führt zu Unterschieden im Ergebnis. Daher müssen solche Änderungen dokumentiert und bei der Ergebnisdarstellung mitgeliefert werden. Zur Dokumentation einer Kristallisation gehört auch die Bestimmung von Verdampfungszeit und Kristallisationsdauer pro Platte. Die visuelle Bildauswertung ist ohne die Angaben dieser Zeiten nicht möglich, da die Kriterien stark davon abhängig sind. Die Variation der Zeiten ist ein statistischer (zufälliger) Effekt. Durch Variation der Feuchte in der Kammer können die Zeiten beeinflusst werden. Obwohl die Korrelation der Variablen der Texturanalyse mit den Zeiten der einzelnen Platten für die gewählten Bildausschnitte (50, 70, 90%) keinen eindeutigen Zusammenhang ergab, wird vermutet, dass die Einbeziehung dieser Information in die Auswertung das Unterscheidungsvermögen stark verbessert. Wie beim Mischungsverhältnis kann auch die Zeitinformation als eine Verfahrenskenngröße festgelegt werden, während Feuchte und Temperatur als Einflussgrößen getestet werden müssen. Für das Verfahren wurde ein Standardmaterial eingesetzt, das über einen längeren Zeitraum stabil ist und eine mit frischen Weizen- und Möhrenproben vergleichbare Verdampfungszeit und Kristallisationsdauer hat. Dieser Standard wurde für den Aufbau einer Kontrollkarte verwendet. Dies ist bisher in der Literatur für dieses Verfahren nicht beschrieben worden.

„Es liegt an der unzutreffenden Ansicht, die zunächst einfach erscheinende Methode sei leicht auszuführen, dass viele Publikationen über die Kupferchlorid-Kristallisation unzureichend sind, und dass einzelne Forscher (...) sie wieder aufgegeben haben, weil ihrer Ansicht nach die Ergebnisse nicht genügend reproduzierbar sind“ (von Hahn 1962, S. 4). Dieser vor über 40 Jahren geschriebene Satz in einem der Grundlagenwerke zum Verfahren war bisher noch gültig, da die Reproduzierbarkeit der Methode bisher nur ungenügend nachgewiesen werden konnte. Während Selawry (1961) und Nickel (1968) die Streuung der Bilder einer Probe diskutieren, veröffentlicht Balzer-Graf (Balzer-Graf & Balzer 1994, Balzer-Graf et al. 1998) qualitative Interpretationen zur Unterscheidung zwischen Proben verschiedener Anbauweisen ohne auf die Signifikanz der Trennung einzugehen. Wie bereits bei von Hahn (1962) wird auch bei Balzer-Graf von der Variabilität der einzelnen Bildwiederholungen einer Probe gesprochen, die Abwägung, ob diese größer ist als der Unterschied zweier Proben verschiedener Herkunft wird aber nicht diskutiert. Auch Knijpena (1994) spricht von einer „Schwankungsbreite der Phänomene“, wie das auf die konkrete Streuung bezogen werden kann, wird nicht berührt. Für die Bestimmung der Stärke (Signifikanz) eines Effektes (hier: die Unterscheidung von Proben) ist aber die Kenntnis der Streuung einer Methode unerlässlich. Hier zeigt sich auch der besondere Beitrag der vorliegenden Arbeit zur Bereitstellung einer ganzheitlichen Untersuchungsmethode für die Bestimmung der ökologischen Produktqualität: Basierend auf detailliert dokumentierten Prozessen und der Kenntnis über die verschiedenen Einflussgrößen wurde für die Auswertung der Bilder der Biokristallisation mit der computergestützten Texturanalyse eine Streuung ermittelt. Die Wiederholpräzision, die laborinterne Reproduzierbarkeit und Laborvergleichsuntersuchungen wurden für ausgewählte Variablen der Texturanalyse in Abhängigkeit vom Bildausschnitt bestimmt bzw. durchgeführt (Test der Hypothese 4.2). Die Wiederholpräzision ist gering, die Streuung der Methode hoch. Dabei hat der Schritt „Kristallisation“ den größten Einfluss. Die Streuung in diesem Schritt liegt für alle untersuchten Probenarten um einen Faktor 2-4 über den der anderen Schritten (z.B. innerhalb der Probenaufbereitung). Dieser Schritt darf aber nicht der Messung „analytischer“ Methoden zur Einzelstoffbestimmung (z.B. durch HPLC-DAD) gleichgesetzt

werden. Bei der Biokristallisation wird der Einfluss der Probenlösung auf die Kristallisation eines Salzes bestimmt, dort die Konzentration (der Gehalt) eines Analyten gemessen. Das Verfahren arbeitet dabei so empfindlich, dass trotz der großen Streuung, Proben aus unterschiedlichem Anbau signifikant unterschieden werden können (Test der Hypothese 4.3).

Im einzelnen konnten Weizenproben aus einem definierten Feldversuch mit dem Vergleich verschiedener Anbausysteme (DOK-Versuch) statistisch signifikant differenziert und mit multivariater Statistik gruppiert werden. Die Ernten der Jahre 1999, 2002 und 2003 wurden untersucht. In allen drei Jahren konnten die ökologischen von den konventionell angebauten Proben getrennt und innerhalb der Anbausysteme gruppiert werden. Die Stellung der Nullvarianten in der Zuordnung zur einen oder anderen Gruppe ist abhängig vom Erntejahr. 1999 und 2002 kann die Probe der Nullvarianten von den vier anderen Proben (Behandlungen) abgetrennt werden, 2003 fällt sie zusammen mit den Proben aus konventionellem Anbau. Dies ist insofern erstaunlich, da vom N-Gehalt die Nullprobe eher den ökologischen Varianten zugeordnet wird (geringerer N-Gehalt). Die Variable *diagonal moment* zeigte in allen drei Jahren bei einem Bildausschnitt von 90 % für die mit Mist gedüngten Proben höhere Werte als die Nullvariante und die Probe mit mineralischer Düngung: Dies stimmt mit den Ergebnissen zur Bodenqualität überein (vgl. Mäder 2005). Auch bei den Maisproben aus diesem Versuch konnte die Nullvariante von den gedüngten Proben signifikant unterschieden werden.

Diese Unterscheidung der Proben aus verschiedenen Anbausystemen war auch für die Mehrzahl von Weizen- und Möhrenproben direkt vom Erzeuger (Handel) möglich. Dabei zeigte sich aber, dass die Sorte einen großen Einfluss auf die Bilder hat. Bei Weizen konnten die Proben der Sorte *Bussard* auf einem Standort von den beiden anderen Sorten stärker getrennt werden, als die Proben aus den beiden Anbausystemen innerhalb einer Sorte. Das gleiche gilt für die Möhrenproben. Hier zeigte sich, dass die Trennung der Proben nach Anbausystem abhängig von der Sorte ist. Bei der Sorte *Nerac* konnten die Proben besser unterschieden werden, als bei der Sorte *Narbonne*. Auch Apfelproben aus integriertem und ökologischen (Schweiz) Anbau konnten unterschieden werden. Da es sich aber bei den Erzeugerproben um eine nicht

repräsentative Stichprobe handelt (jeweils fünf bis sechs Paarvergleiche), ist eine Aussage über die Möglichkeit, mit dem Verfahren die Anbausysteme generell am Produkt zu unterscheiden, noch nicht möglich.

Der Einfluss der Sorte auf die Bilder konnte sowohl für Weizen- und Möhrenproben, als auch für Apfelproben gezeigt werden. Die beiden im DOK-Versuch angebauten Weizensorten *Titlis* und *Tamaro* konnten ebenso signifikant mit den Variablen der Texturanalyse getrennt werden, wie die Proben aus einem Sortenversuch an der Universität Kassel (*Rodelika* und *Rothild*) oder verschiedene Apfelsorten aus dem Handel. Der Vergleich von Proben als samenfeste und Hybridsorten zeigte, dass die Methode die samenfesten Sorten in beiden Erntejahren richtig gruppiert, die Zuordnung der Hybridsorten zu einer Gruppe aber nicht möglich war. Bisher ist der Faktor „Sorte“ nicht in den entsprechenden Richtlinien geregelt. Es dürfte also selbst für das ganzheitliche Verfahren der Biokristallisation schwierig sein, Proben gemäß dem Anbausystem zu unterscheiden, solange die Sorte nicht ein festgelegter Faktor des Systems ist.

Die von Andersen et al. 2001 gezeigten Ergebnisse zum Einfluss verschiedener N-Düngung auf die Bilder bei Möhrenproben konnten nicht bestätigt werden, wenn der Sorte *Rodelika* am Standort Versuchsgut Frankenhausen zwei verschiedene N-Düngungsmengen gegeben wurden. Die Proben konnten nicht durchgehend in allen drei Erntejahren signifikant getrennt werden.

Wie in der Literatur qualitativ beschrieben (vgl. von Hahn 1962, Engquist 1975) reagiert das Verfahren auch besonders auf die Verarbeitung von Proben. Bilder von gealterten, erhitzten oder gefriergetrockneten Proben lassen sich statistisch signifikant von der jeweiligen unbehandelten Kontrolle unterscheiden. Damit kann das Verfahren auch für die Untersuchung der Verarbeitung ökologischer Lebensmittel eingesetzt werden. Hier besteht ein großer Bedarf in der Überprüfung kritischer Prozessschritte mit zum systemischen Ansatz passenden ganzheitlichen Verfahren (vgl. Schmid et al. 2004).

Herkunft	Weizen	Möhre	Apfel
Anbausystem	x	x	x
N-Düngung		x	
Sorte	x	x	x
Saftherstellung		x	
Erhitzung		x	
Alterung		x	x

Tabelle 19: Untersuchtetes Probenmaterial und Herkunft.

Durch die Verwendung dokumentierter Laborprozeduren, den Einsatz eines computergestützten Labordokumentationssystems, mess- und kontrollierbare Klimakammern und durch die Kenntnis der wichtigen Einflussgrößen und der Streuung der Methoden konnten zum ersten mal überhaupt valide Ergebnisse mit der Biokristallisation für die Unterscheidung von Proben aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten erbracht werden. Das Verfahren kann nun für Fragen der Qualität ökologischer Lebensmittel (z. B. Authentizitätsprüfung) weiterentwickelt werden. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten und diskutierten Ergebnisse überwinden damit die bisherige Kritik an dem Verfahren, wie sie in der Literatur zu finden ist (vgl. Woese et al. 1995, Alföldi et al. 2001, Soil Association 2001, Tausscher et al. 2003, Siederer et al. 2005). Auch der von der Europäischen Union konstatierte „anecdotal evidence“ (EUR Commission 2005, S.9) wird durch eine valide Untersuchungsmethode ersetzt, die unabhängig von Person und Labor Ergebnisse zur Unterscheidung von Proben liefert und deren Streuung bekannt ist (womit auch die Signifikanz berechnet werden kann). Dies unterscheidet die vorliegende Arbeit von allen bisher in der Literatur dargestellten Ergebnissen zum Verfahren.

Das besondere des Verfahrens ist, dass nicht Einzelstoffe, sondern Eigenschaften einer Probe bestimmt werden. Dabei wurde bisher davon ausgegangen, dass diese Eigenschaften die „Vitalität“ oder „Vitalaktivität“ (vgl. Balzer-Graf & Balzer 1991), andere Autoren sprechen von gestaltbildender Kraft (von Hahn 1962, Engquist 1975), einer Probe seien. Diese Begriffe werden aber nicht oder wenn, dann nur unzureichend wissenschaftlich erläutert

oder mit entsprechenden Konzepten versehen, aus denen sich naturwissenschaftliche, mit Labormethoden prüfbare Hypothesen entwickeln liessen. Daher wurde im Kapitel 4 das Verfahren im Kontext seiner Ganzheitlichkeit und des systemischen Anspruchs in der Charakterisierung ökologischer Lebensmittel erläutert. Als Arbeitshypothese wurde das Konzept der Selbstorganisation, wie es Nitschmann (1993) für das Verfahren vorschlägt, zugrunde gelegt. Dieses wird z. Zt. im Fachgebiet Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur von Dr. Nicolaas Busscher im Zusammenhang mit dem Verfahren bearbeitet und experimentell untersucht. Das Besondere an diesem Konzept ist, dass das organisierte Ganze mehr ist als die Summe seiner Teile, d.h. das Kristallbild kann nicht aus dem Gehalt der Einzelstoffe in der Lösung abgeleitet werden. Das Bild entsteht nicht, weil z.B. Aminosäuren in der Lösung sind, sondern aufgrund physikalischer Effekte wie Strömungen, Temperatur- oder Konzentrationsgradienten. Morris & Morris (1939) diskutierten einzelne Stoffe (Kohlenhydrate, Aminosäuren) in ihrer Bedeutung für die Bildausprägung und Beckmann (1959) untersuchte den Einfluss verschiedener N-haltiger Substanzen auf das Kristallwachstum. Obwohl die Lösung wegen der hohen CuCl_2 -Gehaltes kurz vor der Kristallisation sehr niedrige pH-Werte hat (vgl. Selawry & Selawry 1957), liegt ein Vergleich mit der sog. Biuret-Reaktion zum Nachweis von Proteinen nahe (verdünnte Kupfersulfatlösung in stark alkalischem Milieu mit charakteristischer Blaufärbung). Die Korrelation der Variablen der Texturanalyse mit den am gleichen Proben gut gemessenen Aminosäuren brachte allerdings kein konsistentes Ergebnis. Bei Andersen et al. (2001) konnte zwar bei dem Faktor Summe der Aminosäuren ein Zusammenhang mit der Biokristallisation gefunden werden, andere Stoffe zeigten den Zusammenhang aber nicht (getestet wurden Zucker, Carotinoide, Vitamin C, Trockenmassen, Nitrat, Ca, Mg).

Im Projekt 02OE170/F des Bundesprogramms Ökolandbau werden z. Zt. die 15 Variablen zweiter Ordnung der Texturanalyse mit den Ergebnissen weiterer Verfahren für Weizen-, Möhren-, Mais- und Apfelproben korreliert. Dazu gehören eine Reihe sekundärer Pflanzenstoffe, Aminosäuren, Trockenmasse aber auch Ertrag und mikrobiologische Parameter. Die Ergebnisse werden in dieser Arbeit erstmals für die Weizen-, Apfel- und Möhrenproben aus

unterschiedlichen Anbausystemen berücksichtigt. Es zeigt sich, dass das Verfahren der Biokristallisation Ergebnisse liefert, die nicht durchgängig für alle untersuchten Proben mit dem Gehalt an Einzelstoffen oder anderen Eigenschaften der Probe (z. B. auch der Trockenmasse, pH-Wert, Leitfähigkeit) korreliert. Wie gezeigt werden konnte, hat die Probenmenge pro Platte einen Einfluss auf das Ergebnis. Es ist aber nicht die Trockenmasse allein, die das Ergebnis bestimmt, sonst müsste sich eine konsistente Korrelation mit der Trockenmasse über die Probe ergeben. Außerdem konnten zwei Möhrenproben mit verschiedener Trockenmasse, die signifikant getrennt werden konnten, trotz gleich eingestellter Trockenmasse pro Platte noch immer signifikant unterschieden werden. Darüber hinaus zeigt die Gefriertrocknung von Möhrenproben, dass dieser Prozess bereits das Ergebnis beeinflusst.

Wenn das Konzept der Selbstorganisation die beobachteten und in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich Validität getesteten Ergebnisse des Verfahrens wissenschaftlich erklären kann, macht eine Korrelation der Ergebnisse mit Einzelstoffen auch nur dann Sinn, wenn nachgewiesen werden soll, ob das Verfahren eine Zusatzinformation zur Qualität ökologischer Lebensmittel liefert, oder quasi als Summenparameter eingesetzt werden kann. Die hier vorgelegten Untersuchungen (vgl. besonders Kap. 10) legen nahe, dass ein zusätzlicher Aspekt abgebildet wird.

Die Bilder zeichnen sich durch eine Gestalt aus. Bei der visuellen Prüfung werden einzelne Strukturmerkmale ausgewertet. Zusätzlich hat das Bild eine Textur, die mit einer Texturanalyse bestimmt werden kann. Damit erfassen einzelne morphologische Kriterien oder Einzelvariable der Texturanalyse einen Ausschnitt aus der Gesamtinformation, die das Bild zu bieten hat. Die Texturanalyse stößt dabei bereits an ihre Grenzen, wie die Untersuchungen zum Mischungsverhältnis gezeigt haben (vgl. Kap. 8.2.2). Es wird daher empfohlen, die Klassifizierung von Produkten mit einer Kombination der verschiedenen Variablen der Texturanalyse bzw. der Kriterien der visuellen Bildauswertung vorzunehmen. Dies wurde durch den Einsatz einer multivariaten Methode (Lineare Diskriminanzanalyse) begonnen. Zusätzlich sollte die Strukturinformation, die das Bild zu bieten hat, mehr genutzt werden. Die für die visuelle Auswertung definierten Kriterien können eine wertvolle Basis

für die Entwicklung einer computergestützten Strukturanalyse sein. Für die Entwicklung einer solchen Strukturanalyse stehen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit kristallisierten Bildserien zur Verfügung. Jedes Bild ist gut dokumentiert und als Image gespeichert sowie als Platte gelagert. Da mit der vorliegenden Arbeit Einflussgrößen und Streuung bekannt sind, kann untersucht werden, inwieweit eine Strukturanalyse diese abbilden und ob die Trennung der in Kapitel 10 beschriebenen Proben im Vergleich zur Texturanalyse verbessert werden kann.

Die erfolgreiche Gruppierung kodierter Proben zu dem jeweiligen Anbausystem, wie sie für das ganzheitliche Verfahren der Biokristallisation für einige Proben gezeigt werden konnte, ist vergleichend möglich. Es wird daher empfohlen, mit den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten und validierten Methoden zunächst weiter vergleichend zu arbeiten. Darüber hinaus sollten sie zur Optimierung im Anbau und in der Verarbeitung von Lebensmittel als ein produktbezogenes Steuerungsinstrument eingesetzt werden. Der Einsatz des ganzheitlichen Verfahrens der Biokristallisation ist dabei nur möglich, wenn dieses validiert ist. Für neue Probenarten oder andere Fragestellungen müssen daher Methoden entwickelt und validiert werden. Dass dies prinzipiell möglich ist, konnte z. B. an Mais- und Milchproben gezeigt werden. Auf dieser Grundlage werden mehrere neue Forschungsfelder eröffnet:

Zum einen die Forschung zu den Verfahren selber, was es aussagt und wie diese Aussage in Verbindung mit der Qualität der Probe steht. Bei der Biokristallisation wird es dabei um die Integration wissenschaftlicher Konzepte wie z.B. das der Selbstorganisation gehen.

Zum anderen die Untersuchung zum Zusammenhang der bestimmten Merkmale der Bilder (Textur-, Struktur- und Gestaltkriterien) mit den verschiedenen Qualitätsanforderungen (z.B. Haltbarkeit, Natürlichkeit, Herkunft, Gesundheitswert) an die Probe. Mit dem im Rahmen dieser Habilitationsschrift untersuchten Verfahren der Biokristallisation wurde ein valides Instrument entwickelt, Qualitätsaspekte von Proben *in vitro* zu studieren, die offenbar unabhängig von dem absoluten Gehalt an zusätzlich gemessenen Einzelstoffen oder anderen Eigenschaften der Probe sind.

12 Zusammenfassung

Die Qualität ökologischer Produkte wird über den Prozess und nicht am Produkt selbst bestimmt. Die zunehmende Nachfrage nach ökologischen Produkten fordert Methoden, die den Prozess am Produkt zeigen (Authentizitätsprüfung). Eine Literaturstudie für die vorliegende Habilitationsschrift ergab, dass ganzheitliche Verfahren sich dazu besonders eignen. Diese ganzheitlichen Verfahren bilden das Produkt entweder unzerstört ab (wie die Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie), bestimmen konsumentenrelevante Produkaspekte mit den menschlichen Sinnen (Sensorik) oder liefern ein Bild, das den Prozess am Produkt direkt zeigen soll. Zu solchen ganzheitlichen, bildgebenden Verfahren gehört die Biokristallisation. Bei diesem Verfahren kristallisiert eine Mischung aus Probe und CuCl_2 auf einer Glasplatte zu einem Bild, das sowohl visuell, als auch computergestützt ausgewertet werden kann. Die Ergebnisse des Verfahrens wurden bisher wissenschaftlich kontrovers diskutiert, da das Verfahren nicht validiert war. Daher war die Aufgabe für diese Arbeit, die Biokristallisation für die Unterscheidung von Proben aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten zu validieren. Dafür wurden zunächst alle Schritte im Labor dokumentiert und entsprechende Standardarbeitsanweisungen erstellt. Mit einem eigens entwickelten Computerprogramm werden die Bedingungen während der Probenaufbereitung und Kristallisation für jede Probe und jedes Bild erfasst. Mit einer Texturanalyse können auch die für diese Arbeiten erstellte große Menge an Bildern ausgewertet und die Ergebnisse statistisch bearbeitet werden. Damit ist es möglich das Verfahren und Methoden für Weizen- und Möhrenproben zu charakterisieren. Als Charakterisierungsmethode gemäß ISO 17025 wurde die systematische Überprüfung der Einflussgrößen gewählt. Das Verfahren ist besonders gegenüber Änderungen in der Probenvorbereitung (z.B. Vermahlung, Mischungsverhältnis) empfindlich.

Es wurde sowohl die Methodenstreuung, als auch der Anteil einzelner Schritte an der Gesamtstreuung für Weizen-, Möhren- und Apfelproben ermittelt. Die Verdampfung und Kristallisation hat den größten Anteil an der Gesamtstreuung. Die Durchführung eines Laboreignungstests zeigte, dass die so dokumentierten und charakterisierten Methoden in anderen Laboratorien erfolgreich eingesetzt

werden können. Änderung in den Prozeduren führen allerdings zu einer Verminderung des Unterscheidungsvermögens.

Das Verfahren wurde für die nominale Unterscheidung von Weizen-, Möhren- und Apfelproben aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten eingesetzt. Weizen-, Möhren- und Apfelproben aus definiertem Anbau können signifikant unterschieden werden. Dies war für Weizenproben aus dem DOK-Versuch in der Schweiz auch für drei verschiedene Erntejahre möglich. Weizen-, Möhren- und Apfelproben vom Erzeuger (Markt) konnten im Paarvergleich (ökologisch, konventionell) teilweise signifikant getrennt werden.

Das Verfahren ist auch für die Charakterisierung von verarbeiteten Proben einsetzbar. Es konnte der Einfluss von Safftherstellung, Erwärmung und Alterung signifikant gezeigt werden. Darüber hinaus lässt sich das Verfahren auf weitere Probenarten (getestet wurden *Aloe vera*, Mais und Milch) anwenden.

Das Verfahren arbeitet ganzheitlich, d.h. es werden keine Einzelstoffe analytisch bestimmt, sondern als Ergebnis wird ein Bild erhalten. Die Textur- und Struktureigenschaften dieses Bildes können mit standardisierten Methoden ausgewertet werden. Für die nominale Unterscheidung von Proben reicht die verwendete Texturanalyse auf Basis der einzelnen Variablen aus. Für die weitere Entwicklung des Verfahrens hinsichtlich einer Ordinal- oder Intervallskalierung der Ergebnisse (z. B. Klassifizierung der Proben) wird die Einbeziehung von Strukturmerkmalen (standardisierte visuelle Bildauswertung und computergestützte Strukturanalyse) empfohlen.

13 Literaturverzeichnis

Alföldi T, Granado J, Kieffer E, Kretschmar U, Morgner M, Niggli U, Schädeli A, Speiser B, Weibel F, Wyss G, Schmidt G, Schmidt W, **2006**. Qualität und Sicherheit von Bioprodukten. FiBL-Dossier 4.

Alföldi T, Bickel R, Weibel F, **2001**. Vergleichende Qualitätsforschung: Neue Ansätze und Impulse täten gut. *Ökologie & Landbau* 117 (1), 11-14.

Andersen J-O, Huber M, Kahl J, Busscher N, Meier-Ploeger A, **2003**. A concentration matrix procedure for determining optimal combinations of concentrations in biocrystallization, *EdN*, 79, 97-114.

Andersen J-O, **2001**. Development and application of the biocrystallisation method. *Biodynamic Research Association Denmark, Report 1*.

Andersen J-O, Kaack K, Nielsen M, Thorup-Kristensen Kr, Labouriau R, **2001**. Comparative study between biocrystallisation and chemical analysis of carrots (*Daucus carota* L.) grown organically using different levels of green manures. *BAH* 19, 29–48.

Andersen J-O, Henriksen CB, Laursen J, Nielsen AA, **1999**. Computerised image analysis of biocrystallograms originated from agricultural products. *Computers and electronics in agriculture* 22, 51–69.

Andersen J-O, Laursen J, Kolster P, **1998**. A refined biocrystallisation method applied in a pictomorphological investigation of a polymer. *EdN* 68, 1–20.

Arncken C, **2006**. Möhren: Offenbestäubende und Hybridsorten im Vergleich. 41. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung DGQ 2006, Wädenswil/CH, Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung, 29.

Asami DK, Hong Y-J, Barrett DM, Mitchel AE, **2003**. Comparison of the Total Phenolic and Ascorbic Acid Content of Freeze-Dried and Air-Dried Marionberry, Strawberry, and Corn Grown Using Conventional, Organic, and Sustainable Agricultural Practices. *J. Agric. Food Chem.* 51 (5), 1237-1241.

ASTM 5245-92, **1998**. Standard Practice for Cleaning Laboratory Glassware, Plasticware, and Equipment Used in Microbiological Analyses. ASTM, West Conshohocken, USA.

Ballivet C, Knijpenga H, Barth J-G, Clad R, **1999**. Zur Empfindlichkeit der Methode der Kupferchloridkristallisation. *EdN* 70, 1-32.

Balzer-Graf U, **2001**. Vitaqualität-Qualitätsforschung mit bildschaffenden Methoden. *Ökologie & Landbau*, 117, 1, 22-24.

Balzer-Graf U, Hoppe H, Straub M, **1998**. Äpfel – organisch und biologisch-dynamisch. Erntemenge und Vitalqualität im Vergleich. *Lebendige Erde* 5, 387-395.

- Balzer-Graf U, Balzer F, **1996**. Vitalqualität von Weizen aus unterschiedlichem Anbau. Beiträge zur Förderung der biologisch-dynamischen Landwirtschaft 44, 440-450.
- Balzer-Graf U, Balzer F, **1994**. Die Qualität ökologisch erzeugter Produkte. In: Ökologischer Landbau. Perspektiven für die Zukunft (Mayer et al. Hg.) Stiftung Ökologie und Landbau, 261–290.
- Balzer-Graf U, Balzer F, **1991a**. Steigbild und Kupferchloridkristallisation. Spiegel der Vitalaktivität von Lebensmitteln. In: Meier-Ploeger A , Vogtmann H, (Hg.) 1991. Lebensmittelqualität - Ganzheitliche Methoden und Konzepte. Schriftenreihe der Stiftung Ökologie und Landbau, 66. Verlag C.F. Müller, Karlsruhe, 163-210.
- Balzer-Graf U, Balzer F, **1991b**. Milchqualität im Spiegel bildschaffender Methoden. Lebendige Erde 42, 236-255.
- Balzer-Graf U, Balzer F, **1987**. Vitalaktivität von Nahrungsmitteln im Spiegel bildschaffender Methoden. EdN 46, 69-92.
- Barberi P, Mazzoncini M, **2005**. The MACOT (Mediterranean Arable Systems Comparison Trial) long-term experiment (Pisa, Italy). Internal report, University of Pisa.
- Barth J-G, **2004**. Cupric chloride crystallisation with additives and its applications. EdN 81, 5-22.
- Barth J-G, **1997**. Image de cristallisation du chlorure cuivrique et structure chimique de l'additif. EdN 66, 16-42.
- Bartlett MS, **1937**. Properties of sufficiency and statistical tests. Proc. Royal Stat. Soc. A, 160, 268-282.
- Bates D, **2005**. R-News 5/1.
- Beck A, **2000**. What is organic food processing. In: Stucki E, Meier U, (Eds.), Proceedings 1st International Seminar "Organic Food Processing", 28-29th of August 2000 in Basel, 29-30.
- Beckmann H, **1959**. Über Keimbildung, Einkristallwachstum und Auffächerungswachstum von $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in rein wässrigen und eiweißhaltigen Lösungen. Diss. Universität Bonn.
- Bennett RN, Wallsgrove RM, **1994**. Transley review 72: Secondary metabolites in plant defense mechanisms. New Phytologist 127, 617-633.
- Bessenich F, **1951**. Beiträge zur Erforschung der Bildekräfte durch empfindliche Kristallisation. Schriftenreihe der naturwissenschaftlichen Sektion am Goetheanum 1.
- Bloksma J, Northolt M, Huber M, **2001a**. Parameters for Apple Quality, Part 1 Report. Louis Bolk Institute, Driebergen.

Bloksma J, Northolt M, Huber M, **2001b**. Parameters for Apple Quality, Part 2 Annexes. Report Louis Bolk Institute, Driebergen.

BMVEL (Ministerium für Verbraucherschutz, Lebensmittel und Landwirtschaft), **2005**. Marktinformationen zu Öko-Obst in Deutschland, BLE, Bonn.

BMVEL (Ministerium für Verbraucherschutz, Lebensmittel und Landwirtschaft), **2004**. Aktuelles Ökobarometer: mehr Bio für die Kids!. Eid – Umfrage im Auftrag des Bundesministeriums (tns emnid 29. März 2004).

Bösch-Saadatmandi C, Hundhausen C, Blank R, Wolfram S, Rimbach G, **2006**. Evaluation of the protective effects of polyphenols and vitamin E against ochratoxin A induced cytotoxicity in liver and kidney cells. 41. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung DGQ 2006, Wädenswil/CH, Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung, 10.

Breda E, **1973**. Bericht über Arbeiten aus dem Institut für Biologisch-Dynamische Forschung-Qualitätsuntersuchungen von Möhren und Rote Beete. Lebendige Erde 4, 132-137.

Buckenhüskens HJ, **2006**. Aktuelles und Historisches zur Bewertung der Frische von Lebensmitteln. 41. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung DGQ 2006, Wädenswil/CH, Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung, 12-13.

Busch-Stockfisch M, **2002**. Praxishandbuch Sensorik in der Produktentwicklung und Qualitätssicherung; Hamburg.

Busscher N, Kahl J, Mergardt G, Andersen J-O, Huber M, Meier-Ploeger A, **2003**. Vergleichbarkeit von Qualitätsuntersuchungen mit den Bildschaffenden Methoden (Kupferchloridkristallisation). Beiträge zur 7. Wissenschaftstagung zum Ökologischen Landbau, Wien, 217–220.

Carstensen JM, **2006**. persönliche Mitteilung.

Carstensen JM, **1992**. Description and simulation of visual texture. Ph.D. thesis. Department of Mathematical Modelling. Technical University of Denmark.

Clarke T, **2001**. Green apples upset cart. Nature 410, 930-931.

CMA, **2005**. Öko für alle? Eine strategische Zielgruppenanalyse. CMA, Bonn.

Codex Alimentarius Commission, **2005**. Draft Guidelines for evaluating acceptable methods of analysis. CL 2005/44-MAS. Rome.

Codex Alimentarius Commission, **2001**. Report of the 23. session of the codex committee on method of analysis and sampling. ALINORM 01/23. Rome.

Daalgard P, **2002**. Introductory Statistics with R. Springer, New York.

DGQ, **1992**. Qualitätssicherung von Lebensmitteln. DGQ-Schriftenreihe 21/11, Frankfurt/M.

DIN 10967-4, **2002**. Sensorisches Prüfverfahren. Profilprüfung, Teil 4: Prüfpläne. DIN, Berlin.

DIN 10967-1, **1999**. Sensorisches Prüfverfahren. Profilprüfung, Teil 1: Konventionelles Profil. DIN, Berlin.

DIN 10967-2, **1999**. Sensorisches Prüfverfahren. Profilprüfung, Teil 2: Konsensprofil. DIN, Berlin.

DIN 10963, **1997**. Sensorische Prüfverfahren. Rangordnungsprüfung. DIN, Berlin.

DIN 10962, **1997**. Prüfbereiche für sensorische Prüfungen. Anforderungen an Prüfräume. DIN, Berlin.

DIN 10961, **1996**. Schulung von Prüfpersonen für sensorische Prüfungen. DIN, Berlin

DIN 10964, **1996**. Sensorische Prüfverfahren. Einfach beschreibende Prüfung. DIN, Berlin

DIN 10952, **1983**. Sensorische Prüfverfahren. Bewertende Prüfung mit Skalen. Erstellen von Prüfskalen und Bewertungsschemata. DIN, Berlin.

DIN EN 45020, **1993**. Allgemeine Fachausdrücke und deren Definition betreffende Normung und damit zusammenhängende Tätigkeiten. DIN, Berlin.

DIN EN 45002, **1990**. Allgemeine Kriterien zum Begutachten von Prüflaboratorien. DIN, Berlin.

DIN EN ISO 8402, **1995**. Qualitätsmanagement. Begriffe. DIN, Berlin.

EG-Öko-Verordnung, **1991**. Verordnung (EWG) Nr. 2092/91 des Rates vom 24. Juni 1991 über den ökologischen Landbau / die biologische Landwirtschaft und die entsprechende Kennzeichnung der landwirtschaftlichen Erzeugnisse und Lebensmittel (zuletzt geändert durch die Verordnung (EG) Nr. 223/2003 der Kommission vom 5. Februar 2003).

Engelsmann M, Ersbøll B, **2004**. Structure in Biocrystallograms - A Computer Vision Pilot Study. The Technical University of Denmark, IMM Technical report 2004/03.

Engquist M, **1975**. Physische und lebensbildende Kräfte in der Pflanze. Vittorio Klostermann Verlag, Frankfurt/M.

Engquist M, **1970a**. Gestaltkräfte des Lebendigen. Vittorio Klostermann Verlag, Frankfurt/M.

Engquist M, **1970b**. Untersuchungen an getrockneten und tiefgekühlten Gemüsen mit Hilfe der Kupferchlorid-Kristallisations-Methode. Lebendige Erde 21, 15-19.

Engquist M, **1963**. Pflanzenwachstum in Licht und Schatten. Lebendige Erde 14, 51-60 und 72-73.

Engquist M, **1961**. Strukturveränderungen im Kristallisationsbild durch Pflanzensubstanzen bei Alterung und Düngung. *Lebendige Erde* 3, 112-123.

EU Commission, **2005**. Organic Food and Farming Research in Europe. EUR 21713.

EU Commission, **2004**. Europäischer Aktionsplan für ökologische Landwirtschaft und ökologisch erzeugte Lebensmittel. Brüssel SEK 739.

EU Commission, **2002**. Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysenmethoden und die Auswertung von Ergebnissen, 2002/657/EG.

Finamore A, Britti MS, Roselli M, Bellovino D, Gaetani S, Mengheri E, **2004**. Novel Approach for Food Safety Evaluation. Results of a Pilot Experiment To Evaluate Organic and Conventional Foods. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7425-7431.

Fleck M, von Fragstein P, Heß J, **2005**. Ertrag und Zuckergehalte bei Möhren nach Applikation der biologisch-dynamischen Präparate Hornmist und Hornkiesel in verschiedenen Umwelten. Tagungsband 8. Wissenschaftstagung Ökolandbau, Kassel, 89-93.

Fleck M, Sikora F, Rohmund Ch, Gränzdörffer M, von Fragstein P, Heß J, **2002**. Samenfeste Sorten oder Hybriden. Untersuchungen an Speisemöhren aus einem Anbauvergleich an zwei Standorten des Ökologischen Landbaus. 36. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung DGQ 2002, Hannover, Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung, 167-172.

Fliedner I, Wilhelmi F, **2003**. Grundlagen und Prüfverfahren der Lebensmittelsensorik, Hamburg.

Geier U, **2005**. Pflanzenorganbildtypen in Kupferchloridkristallisation und Steigbild. Vom Lesen in den Spuren des Lebendigen. *Lebendige Erde* 5, 42-45.

Granstedt AG, Kjellenberg L, **1997**. Long-term experiment in Sweden: effects of organic and inorganic fertilisers on soil fertility and crop quality. In Lockeretz, W. (Ed.) *Agricultural production and Nutrition, Proceedings of an International Conference*, Boston, MA: School of Nutrition Science and Policy, Tufts University), 79-90.

Grindner-Pedersen L, Rasmussen SE, Bügel S, Jorgensen LV, Dragstedt LO, Gundersen V, Sandström B, **2003**. Effect of Diets Based on Food from Conventional versus Organic Produktion on Intake and Excretion of Flavonoids and Markers of Antioxidative Defense in Humans. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5671-5676.

Hamm U, Gronefeld F, Halpin D, **2004**. The European market for organic food: Revised and Updated Analysis. Organic Marketing Initiatives and Rural Development (OMIaRD) series. Vol. 5, University of Wales, Aberystwyth.

Heinze H, **1959**. Vom Entstehen der "Methode der empfindlichen Kristallisation" im Dornacher Labor Ehrenfried Pfeiffers. *Lebendige Erde* 10, 3-8.

Hoffmann M (Hg.), **1997**. Vom Lebendigen in Lebensmitteln - Die bioelektronischen Zusammenhänge zwischen Lebensmittelqualität, Ernährung und Gesundheit. Stiftung Ökologie, Bad Dürkheim.

Holleman LWJ, **1966**. Ein Beitrag zum Verständnis der empfindlichen Kristallisation. *EdN* 4, 24-33.

Howard A, **1947**. Mein landwirtschaftliches Testament. Siebeneicher Verlag, Ulm.

Huber H, Kerpen J, Pahlich E, **1991**. Der Physiologische Index - eine Charakteristik von Produkten aus ökologischem und konventionellen Anbau. In: Meier-Ploeger A, Vogtmann H, (Hg.) **1991**. Lebensmittelqualität - Ganzheitliche Methoden und Konzepte. Schriftenreihe der Stiftung Ökologie und Landbau, 66. Verlag C.F. Müller, Karlsruhe, 147-162.

Huyskens-Keil S, Schreiner M, **2003**. Die Entwicklung des Qualitätsbegriffs bei Obst und Gemüse. *Ernährungs-Umschau* 50 (7), 257-261.

IFOAM **2002**. NORMS for Organic Production and Processing. International Federation of Organic Agricultural Movements Basel.

ISO 4120, **2001**. Sensory analysis – Methodology – Triangular test. ISO, Geneva.

ISO 17025, **2000**. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO, Geneva.

ISO 2859, **1999**. Sampling procedures for inspection by attributes. ISO, Geneva.

ISO 11035, **1994**. Sensory Analysis – Identification and selection of descriptors for establishing a sensory profile by multidimensional approach. ISO, Geneva.

ISO GUM, **1993**. Guide to the expression of uncertainty in measurement. ISO, Geneva.

ISO 5725, **1993**. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. ISO, Geneva.

ISO 7002, **1986**. Agricultural food products – layout for a standard method of sampling a lot. ISO, Geneva.

ISO 6658, **1985**. Sensory analysis – Methodology – General guidance. ISO Geneva.

James A, **1993**. Eating Green(s). Discourses of Organic Food. In: Milton K, (Ed.). *Environmentalism. The View from Anthropology*. ASA Monographs 32, 203-218.

Kahl J, Busscher N, Meier-Ploeger A, **2003**. Ganzheitliche Untersuchungsmethoden zur Erfassung und Prüfung der Qualität ökologischer Lebensmittel: Stand der Entwicklung und Validierung, Abschlußbericht Projekt 02OE170, Bundesprogramm Ökolandbau.

Kahl J, **2005**. Interner Bericht. Universität Kassel, FB 11, Witzenhausen.

Kahl J, Busscher N, Meier-Ploeger A, **2005**. Validierung: Charakterisierte Methoden für klare Fragen. Tagungsband 8. Wissenschaftstagung Ökolandbau, Kassel, 565-569.

Klett M, **o.J.** Untersuchungen über Licht- und Schattenqualität. Institut für biologisch-dynamische Forschung, Darmstadt.

Knijpenga H, Ballivet C, Waldburger B, **2005**. Untersuchungen an Knollen transgener Kartoffelpflanzen mit der Empfindlichen Kristallisation. EdN 83, 52-65.

Knijpenga H, Waldburger B, **2004**. Versuchsdesign für Untersuchungen an Pflanzenblättern mit der Methode der Empfindlichen Kristallisation. EdN 80, 45-61.

Knijpenga H, **2001**. Einflüsse unterschiedlicher Behandlungen auf die biologische Wertigkeit von Kuhmilch. EdN 75, 48-60.

Knijpenga H, **1995**. Veränderungen der Lebensmittelqualität bei der Konservierung durch Gammastrahlen? Ökologie & Landbau 94, 17-19.

Knijpenga H, **1994**. Qualitätsforschung an Lebensmitteln, Veränderung der Qualität bei der Konservierung von Lebensmitteln durch Gammastrahlen? Beiträge zur Förderung der biologisch-dynamischen Landwirtschaft 42, 402-410

Kretschmer S, **2003**. Establishing a scientific method - according to principles of sensory analysis - for the visual evaluation of crystal pictures derived from copper chloride crystallization. Master-Thesis, University of Kassel, FB 11, Witzenhausen.

Kromidas S, **2000**. Handbuch Validierung in der Analytik, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim, New York.

Kurfürst U, Desaulles A, Rehnert A, Muntau H, **2004**. Estimation of measurement uncertainty by the budget approach for heavy metal content in soils under different land use. Accred Qual. Assur 9, 64-75.

Lê Gia V, Teisseron G, Michel MC, Cauffet G, **1996**. Application of texture analysis for the crystallization image characterisation. In: Grossmann et al. (Eds.). Proceedings from the Third European Research Symposium: Image Analysis for Pulp and Paper Research and Production. Stockholm, Sweden 1995, 1-9

Lê Gia V, **1995**. Extraction de paramètres de texture d'images de croissance dendritique. Doctoral thesis. Lime, UJF/IUT de Grenoble, France.

LFGB, **2005**. Lebensmittel- und Futtermittel-Gesetzbuch.

Lieblein G, **1993**. Quality and yield of carrots: Effects of composted manure and mineral fertilizer. Doctoral thesis, Agricultural University of Norway.

Mäder P, **2005**. persönliche Mitteilung.

Mäder P, Pfiffner L, Niggli U, Balzer-Graf U, Balzer F, Plochberger K, Velimirov A, Besson JM, **1993**. Effect of three farming systems (bio-dynamic, bio-organic,

conventional) on yield and quality of beetroot (*Beta Vulgaris* L. var. *Esculenta* L.) in a seven year crop rotation. *Acta Hort.* 339, 11-31.

Mäder P, Fließbach A, Dubois D, Gunst L, Fried P, Niggli U, **2002**. Soil Fertility and Biodiversity in Organic Farming. *Science* 296, 1694-1697.

Meier-Ploeger A, Roeger M, **2004**. Holistic concepts for food quality and processing. In: Schmid O, Beck A, Kretschmar U, (Eds). *Underlying Principles in Organic and "Low-Input Food" Processing – Literature Survey*. Research Institute of Organic Agriculture FiBL, CH-5070 Frick/CH.

Meier-Ploeger A, **2002**. Quality of organic food: Perception and Criteria. *Elm Farm Research Centre (EFRC) Bulletin* 60, 10-13.

Meier-Ploeger A, **2001**. Qualitative und gesundheitliche Unterschiede von Lebensmitteln aus ökologischem und konventionellem Landbau - ein Vergleich. *Fachliche Stellungnahme im Auftrag des Bundesministeriums (BMVEL)*.

Meier-Ploeger A, **1995**. Das lebende Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile. Zu ganzheitlichen Erfassung der Lebensmittelqualität. *Ökologie & Landbau* 23, 94, 6-11.

Meier-Ploeger A, Vogtmann H, **1991**. Lebensmittelqualität - Ganzheitliche Methoden und Konzepte. *Schriftenreihe der Stiftung Ökologie und Landbau*, 66. Verlag C.F. Müller, Karlsruhe.

Meltzer HM, Kaernes U, Ydersbond TA, **1992**. Human Nutrition Research: Past, present and future. *Scandinavian Journal of Nutrition* 36, 119-124.

Merten D, Lagoni H, **1958**. Die Kupferchloridkristallisation als analytisches Hilfsmittel in der Milchforschung. *Milchwissenschaft* 13, 21-35.

Milde J, Elstner EF, Graßmann J, **2004**. Synergistic inhibition of LDL-oxidation by rutin, gamma-terpinene and ascorbic acid. *Phytomedicine* 11, 105-113.

Morris D L, Morris C T, **1941**. The modification of cupric chloride crystallization patterns by traces of proteins. *J. Biol. Chem.* 141, 515-520.

Morris D L, Morris C T, **1939**. Specific effects of certain tissue extracts on the crystallisation pattern of cupric chloride. *J. Phys. Chem.* 43, 623–629.

Neuerburg W, Padel S, **1992**. *Organisch-biologischer Landbau in der Praxis*. BLV Verlagsgesellschaft, München.

Neuhaus A, **1957**. Die kristallographischen Grundlagen der "Diagnostischen Kristallisation". In: Selawry, A & O, *Die Kupferchlorid-Kristallisation in Naturwissenschaft und Medizin*. Fischer Verlag, Stuttgart.

Nickel E, **1968**. Die Reproduzierbarkeit der sogenannten empfindlichen Kupferchlorid-Kristallisation. *Bull. Soc. Frib. Sc. Nat.* 57, Fribourg/CH.

- Nitschmann G, **1993**. Gedanken zur empfindlichen Kristallisation mit Kupferchlorid ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). EdN 58, 14-19
- Nuessli J, **2006**. Frische von Früchten und Gemüse im Blickwinkel der Lebensmittelsensorik – ein interdisziplinärer Ansatz. 41. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung DGQ 2006, Wädenswil/CH, Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung, 3.
- Palozza P, Krinsky NI, **1992**. beta-Carotene and alpha-Tocopherol are synergistic antioxidants. Arch. Biochem. Biophys. 297(1), 184-187.
- Pettersson BD, **1982**. Konventionell und biologisch-dynamisch erzeugte pflanzliche Nahrungsstoffe im Vergleich. In: Alternativen im Landbau. Schriftenreihe des Bundesministers für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten. Reihe A: Angewandte Wissenschaft, Heft 263. Landwirtschaftsverlag Münster-Hiltrup, 218-228.
- Pettersson BD, **1970**. Die Einwirkung von Standort, Düngung und wachstumsbeeinflussenden Stoffen auf die Qualitätseigenschaften von Speisekartoffeln. Lebendige Erde 21, 4, 134-140.
- Pettersson BD, **1969**. Beiträge zur Entwicklung der Kristallisationsmethode mit Kupferchlorid nach Pfeiffer, Teil 4. Lebendige Erde 20, 112-126.
- Pettersson BD, **1967**. Beiträge zur Entwicklung der Kristallisationsmethode mit Kupferchlorid nach Pfeiffer. Lebendige Erde 1, 15-31.
- Pettersson BD, **1966**. Beiträge zur Entwicklung der Kristallisationsmethode mit Kupferchlorid nach Pfeiffer, I. EdN 5, 29-32.
- Pettersson BD, Engquist M, **1964**. Die Auswirkungen der Düngung auf die Qualitätseigenschaft von Kartoffeln. Lebendige Erde 15, 199-219.
- Pettersson BD, Engquist M, **1963**. Versuche mit den Präparaten „Hornmist“ und „Hornkiesel“. Lebendige Erde 14, 1-15.
- Pfeiffer E, **1960**. Chromatographische Untersuchungen an Samen, Mehlen, Hefen und deren Produkten. Lebendige Erde 11, 204-216.
- Pfeiffer E, **1930**. Kristalle. Orient-Occident Verlag, Stuttgart.
- Pfeiffer E, **1935**. Empfindliche Kristallisationsvorgänge als Nachweis von Formungskräfte im Blut. Verlag Emil Weise, Dresden.
- Pinheiro JC, Bates DM, **2000**. Mixed-Effects Models in S and S-PLUS. Springer, New York.
- Raupp J, **1996**. Quality investigations with products of the long-term fertilisation with total nitrogen equivalents, Quality of Plant Products Grown with Manure Fertilization: Proceeding of Fourth Meeting (Juva, Finland, 6-9 July 1996) Darmstadt, Institute for Biodynamic Research, 13-33.

- Reganold, JP, Glover, JD, Andrews, PK, Hinman, HR, **2001**. Sustainability of three apple production systems. *Nature* 410, 926-30.
- Royston P, **1995**. A Remark on Algorithm AS 181: The W Test for Normality. *Applied Statistics* 44, 547-551.
- Royston P, **1982a**. The W Test for Normality. *Applied Statistics* 31, 176-180.
- Royston P, **1982b**. An Extension of Shapiro and Wilk's W Test for Normality to Large Samples. *Applied Statistics* 31, 115-124.
- Schaumann W, Haccius M, Koepf HH, **2002**. *Biologisch-Dynamische Landwirtschaft. Biologie im Landbau*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Schmid O, Beck A, Kretzschmar U, **2004**. Underlying Principles in Organic and "Low-Input Food" Processing - Literature Survey. Published by Research Institute of Organic Agriculture (FIBL), CH - 5070 Frick, Switzerland. www.fibl.org.
- Schudel P, Augstburger F, Eichenberger M, Vogtmann H, Matile Ph, **1980**. Kompost- und NPK- Düngung zu Spinat im Spiegel empfindlicher Kristallisation und analytischer Daten, Teil 1. *Lebendige Erde* 31, 67-70.
- Schudel P, Augstburger F, Eichenberger M, Vogtmann H, Matile Ph, **1980**. Kompost- und NPK- Düngung zu Spinat im Spiegel empfindlicher Kristallisation und analytischer Daten, Teil 2. *Lebendige Erde* 31, 101-110.
- Schulz DG, **2000**. Ertrag und Qualität von Kartoffeln im Organischen Landbau: Abhängigkeit von Düngerart und Düngermenge. Köster Verlag, Berlin.
- Seibel J, **2006**. Enzymatische Oligosaccharid-Synthesen: vom Gen zum Produkt. *Nachr. Chem.* 54, 110-114.
- Selawry A, **1975**. Samenkeimung und Metallpotenz im Kristallisationstest. *Forschungsring für biologisch-dynamische Wirtschaftsweise*, Darmstadt.
- Selawry A, **1961**. Neue Einblicke in die Samenkeimung. *Naturwissenschaftliche Sektion am Goetheanum*, 3, Dornach.
- Selawry A, **1959**. Begleiten von Pflanzen-Keimung und Alterung an Kupferchlorid-Kristallisation. *Lebendige Erde* 10, 8-18.
- Selawry A, Selawry O, (Hg.), **1957**. *Die Kupferchloridkristallisation in Naturwissenschaft und Medizin*. Fischer Verlag, Stuttgart.
- Siderer Y, Maquet A, Anklam E, **2005**. Need for research to support consumer confidence in the growing organic food market. *Trends in Food Science & Technology*. 16, 332-343
- Soil Association (Ed.), **2001**. *Organic Farming, food quality and human health*. Soil Association, Bristol.

Spiekermann U, Schönberger GU, **2001**. Wie alternativ ist alternativ? Ernährungsweisen als Ausdruck gesellschaftlichen Wandels. Ernährungs-Umschau 48, 442-444.

Stanner SA, Hughes J, Kelly CNM, Buttriss J, **2003**. A review of the epidemiological evidence for the antioxidant hypothesis. Public Health Nutrition 7(3), 407-422.

Steffen W, **1983**. Untersuchungen zu den experimentellen und physikalisch-chemischen Grundlagen der Steigbildmethode. EdN 38, 36-49.

Steiner R, **1984**. Geisteswissenschaftliche Grundlagen zum Gedeihen der Landwirtschaft. Landwirtschaftlicher Kurs. Verlag am Goetheanum, Dornach.

Stolz P, Strube J, Buchmann M, Hiss C, **2000**. Better Dietary Protein-Quality of Beans Cultivated Biodynamically than by Hydro-Culture. IFOAM 2000-The World grows organic, 13th International IFOAM Scientific Conference Basel, vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, 302.

Strube J, Stolz P, **2004**. Lebensmittel vermitteln Leben – Lebensmittelqualität in erweiterter Sicht. KWALIS Qualitätsforschung Fulda GmbH, Dipperz.

Strube J, Stolz P, **2000**. Fluorescence Excitation Spectroscopy for the Evaluation of Seeds. IFOAM 2000 - The World Grows Organic, 13th International IFOAM Scientific Conference, Basel, vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, 306-309.

Strube J, Stolz P, **1999**. Zerstörungsfreie Lebensmitteluntersuchung an Ganzproben mittels Biophotonen-Fluoreszenz-Anregungsspektroskopie. Tagung Zerstörungsfreie Qualitätsanalyse. 34. Vortragstagung der Deutschen Gesellschaft für Qualitätsforschung DGQ 1999, Freising-Weihenstephan, Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung, 249-254.

Strube J, **1996**. Unterschiede in der Bio-Lumineszenz von Roggensorten. Lebendige Erde 4, 312-315.

Strüh H-J, **1987**. Grundlegende Phänomene bei der Ausbildung der Steigbildform. Bildtypen und pharmazeutische Prozesse. EdN 46, 22-47

Tauscher B, Brack G, Flachowsky G, Henning M, Köpke U, Meier-Ploeger A, Münzing K, Niggli U, Pabst K, Rahmann G, Willhöft C, Meyer-Miebach E, **2003**. Bewertung von Lebensmitteln verschiedener Produktionsverfahren. Statusbericht 2003. Senatsarbeitsgruppe "Qualitative Bewertung von Lebensmitteln aus alternativer und konventioneller Produktion".

Thompson M, Ellison SLR, Wood R, **2002**. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. Pure Appl. Chem. 74 (5), 835-655.

- Thompson M, Wood, R, **1995**. Harmonized guidelines for international quality control in analytical chemistry laboratories. *Pure & Appl. Chem*, 67(4), 649-666.
- Torjusen H, Sangstad L, O'Doherty-Jensen K, Kjaernes U, **2004**. European Consumers' Conceptions of Organic Food: A Review of Available Research. Project report 4-2004. National Institute for Consumer Research, Oslo, 147S.
- Trombino S, Serini S, Di Nicuolo F, Celleno L, Ando S, Calviello G, Palozza P, **2004**. Antioxidant effect of ferulic acid in isolated membranes and intact cells: synergistic interactions with alpha-tocopherol, beta-carotene and ascorbic acid. *J. Agric. Food Chem.* 52 (8), 2411-2420.
- Truscott TG, **2001**. Synergistic effects of antioxidant vitamins. *Bibl. Nutr. Dieta* 55, 68-79.
- Tsikolia N, **2000**. Was ist das Ganze und was der Teil? Überlegungen zum Problem der biologischen Form. *EdN* 72, 1-21.
- van Mansvelt JD, **2001**. Sind Ökolebensmittel qualitativ besser? *Ökologie & Landbau* 117, 1, 6-10.
- VDLUFA, **2000**. www.vdlufa.de/nirs/qs/qssm.pdf
- Velimirov A, **2003**. Biogramm und Qualitätskennzahl. In: 7. Wissenschaftstagung zum Ökologischen Landbau, Wien, 233-236.
- Vester F, **1960**. Zur Indikation biochemischer Vorgänge durch kristallisierendes Kupferchlorid. *Experientia* XVI (6), 279-281.
- Vogtmann H, (Hg.) **1991**. Ökologische Landwirtschaft. Schriftenreihe der Stiftung Ökologie und Landbau, 70. Verlag C.F. Müller, Karlsruhe.
- Volz A, Kley D, **1988**. Ozone measurements in the 19th century: An Evaluation of Montsouris Series. *Nature* 332, 240-242.
- Von Hahn FV, **1962**. Thesigraphie. Franz Steiner Verlag, Wiesbaden.
- Waldburger B, **2005**. Begriff und Kontext in der Methode der Empfindlichen Kristallisation. *EdN* 83, 79-89.
- Watzl B, Leitzmann C, **1999**. Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Hippokrates Verlag, Stuttgart.
- Weibel F, Widmer A, **2004**. Systemvergleichsversuch: Integrierte und biologische Apfelproduktion, Teil III. Innere Qualität – Inhaltsstoffe und Sensorik. *Schweiz. Z. Obst-Weinbau* 7, 10-13.
- Weibel F, Bickel R, Leuthold S, Alföldi T, **2000**: Are organically grown apples tastier and healthier? A comparative field study using conventional and alternativ methods to measure fruit quality. *Acta Hort.* 517, 417-421.

- Widmer A, Husistein A, Bertschinger L, Weibel, F, Fliessbach A, Käser M, **2004**. Systemvergleichsversuch: Integrierte und biologische Apfelproduktion, Teil II. Wachstum, Ertrag, Kalibrierung, Boden. Schweiz. Z. Obst-Weinbau 3, 6-9.
- Willer H, Youssefi M (Eds.), **2006**. The World of Organic Agriculture –Statistics and Emerging Trends. IFOAM, Bonn.
- Whitworth A, **2006**. Supplemental and Dietary Vitamin E, Beta-Carotene, and Vitamin C Intakes and Prostate Cancer Risk. J. Nat. Cancer Inst., 245-254.
- Woese K, Lange, D, Boess C, Bögl KW, **1995**. Ökologisch und konventionell erzeugte Lebensmittel im Vergleich eine Literaturstudie. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Heft 04/05.
- Woodward L, Meier-Ploeger A, **1999**. Does “Organic” mean “Quality”? Ecology and Farming 20, 16-17.
- Woodward L, Meier-Ploeger A, **1998**. Raindrops on roses and whiskers on kittens. Consumer’s Perception of Organic Food Quality. Elm Farm Research Centre. In: Organic Agriculture – The credible solution for the XXIst century. Proceedings of the 12th International IFOAM Scientific Conference in Mar del Plata/Argentina, 81-88.
- Youssefi M, **2006**. Ökolandbau in Deutschland. www.soel.de.
- Zalecka A, **2003**. Evaluation verschiedener Veröffentlichungen zur Biokristallisation. Projektarbeit. Universität Kassel, FB 11, Witzenhausen.
- Zalecka A, **2006**. Entwicklung und Validierung der Steigbildmethode zur Differenzierung von ausgewählten Lebensmitteln aus verschiedenen Anbausystemen und Verarbeitungsschritten. Diss. Universität Kassel, FB 11, Witzenhausen.
- ZMP, **2005**. www.zmp.de, (ÖKOMARKT Forum)
- ZMP, **2004**. www.zmp.de, (ÖKOMARKT Forum)
- Zürcher M, Siegfried M, Höhn H, Husistein A, **2003**. Systemvergleichsversuch: Integrierte und biologische Apfelproduktion, Teil I. Pflanzenschutz. Schweiz. Z. Obst-Weinbau 21, 9-13.

14 Anhang

Aufgrund des Umfanges befindet sich der Anhang auf einer Compact Disc (CD).

- 14.1 Projektarbeit Zalecka 2003 zur Evaluation von Veröffentlichungen über die Biokristallisation
- 14.2 Masterarbeit 2003 zur Entwicklung der visuellen Bildauswertung
- 14.3 Rohdaten (Microsoft Excel) der für diese Arbeit bearbeiteten *acia*-Serien

Erklärung

Auszüge dieser Arbeit wurden auf verschiedenen Tagungen vorgetragen bzw. in Journalen veröffentlicht. Diese Tagungen und Veröffentlichungen sind in meiner Publikationsliste aufgeführt.

Witzenhausen, im März 2006

Dr. Bernhard Johannes Kahl