

## Standardisierung der Steigbildmethode für die Unterscheidung von Proben aus verschiedener Herkunft

Kahl, J.<sup>1</sup>, Zalecka, A.<sup>1</sup>, Busscher, N.<sup>1</sup> und Ploeger, A.<sup>1</sup>

*Keywords: authenticity, quality, picture forming method, standardisation.*

### Abstract

*With the Steigbild technique patterns are produced on thin-layer chromatographic paper and evaluated as a fingerprint of the sample as a whole. To be applied in routine analysis the method has to be standardised according to international standard norms. The operating procedures were documented and a method for the visual evaluation was standardised. Then several factors of influence were tested and the reproducibility was investigated. The method is able to differentiate patterns from samples from different farming treatments and processing steps. Farm pairs of organic and conventional farm management can be distinguished as statistical significant and classified according to the farming system for carrot and wheat samples. This represents a significant step forward beyond the state of the art.*

### Einleitung und Zielsetzung

Die Konsumenten ökologischer Lebensmittel erwarten gesunde und authentische Produkte. Daher werden Screening-Methoden gesucht, die die Qualität der Prozesse am Produkt zeigen. Eine solche Screening-Methode ist die Steigbildmethode, die seit Jahren zur Qualitätsbeurteilung ökologischer Lebensmittel eingesetzt wird (Tauscher et al. 2003). Obwohl die Steigbildmethode geeignet ist, Unterschiede zwischen verschiedenen Anbauweisen, Sorten, Verarbeitungsgraden etc. am Produkt zu belegen (z.B. Meier-Ploeger&Vogtmann 1991), muss diese Methode validiert werden, um wissenschaftlich begründete Aussagen zur Qualität von Lebensmitteln mit dieser Methode treffen zu können (vgl. Tauscher et al. 2003). Dies wurde im Rahmen einer Dissertation im Fachgebiet Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur der Universität Kassel untersucht (Zalecka 2006). Es mussten sowohl die Laborprozeduren als auch die Bildauswertung standardisiert werden. Zudem musste der Bereich charakterisiert werden, in dem die Methode wiederholbare und vergleichbare Ergebnisse liefert (systematische Untersuchung der Einflussgrößen). Erst damit sind Voraussetzungen zur Validierung der Steigbildmethode erfüllt und Einflussfaktoren können bestimmt, die Streuung ermittelt werden.

### Methoden

**Proben:** Bei den Proben handelt es sich um Möhren- und Weizenproben aus definierten Feldversuchen aus verschiedenen Anbausystemen (Öko/Konventionell) und von ökologisch und konventionell wirtschafteten Nachbarbetrieben. Die Probenherkunft (incl. Probenorganisation) ist in Kahl et al. (2007) beschrieben.

**Steigbildmethode:** Bei der Steigbildmethode handelt es sich um einen in drei Schritten hintereinander durchgeführten Steigprozess auf Filterpapier, in dem zuerst die zu untersuchende Probe und anschliessend zwei Metallsalze ( $\text{AgNO}_3$  und  $\text{FeSO}_4$ ) zum Steigen gebracht werden. Als Ergebnis entstehen auf dem Chromatographiepapier zweidimensionale Formen (Steffen 1983). Die Auswertung der Steigbilder erfolgt

---

<sup>1</sup> Fachgebiet Ökologische Lebensmittelqualität und Ernährungskultur, Universität Kassel, Nordbahnhofstr. 1a, 37213 Witzenhausen, Deutschland, aneta.zalecka@wp.pl

visuell anhand der in der Literatur beschriebenen Einteilung der Bilder in drei Zonen und entsprechenden, für jede Zone charakteristischen Kriterien (vgl. Strüh 1987).

Probenaufbereitung: Die Probenaufbereitung erfolgt nach den Standardprozeduren für die Biokristallisation. Sie ist in Kahl et al. (2007) beschrieben. Die Möhrenproben werden versaftet und der Saft verdünnt pipettiert, bei den Weizenproben wird ein wässriger Extrakt hergestellt.

Steigphasen: Die Klimakammer ist in Zalecka (2006) beschrieben. Die Papiere werden in den Glasschälchen auf 24 Plätzen randomisiert verteilt. Temperatur und relative Feuchte werden 30 cm über dem Labortisch gemessen. Die Luftfeuchte wird durch einen Luftbefeuchter reguliert und konstant bei 60% ( $\pm 10\%$ ) gehalten. Es werden Filterpapiere des Typ Whatman 2043A verwendet. Die Glasschälchen werden definiert gereinigt (Laborspülmaschine, Miele Desinfektor, Programm Labor Plus 206). Eine Beschreibung der drei aufeinander folgenden Steigphasen findet sich in Zalecka (2006). Für jedes Experiment werden zur Kontrolle der Bedingungen Wasser- und Standardbilder (Glucoselösung) gemacht. Nach der Trocknungszeit werden die Filterpapiere aus der Klimakammer herausgenommen und ins diffuse Tageslicht für sechs Stunden zur Entwicklung gelegt. In bestimmten Zeitabständen wird die Intensität der UV-Strahlung gemessen.

Bildauswertung: Für die Bildauswertung wurden zwei Methoden aus den in der sensorischen Beurteilung von Lebensmitteln entwickelten DIN-Normen adaptiert. Beschrieben werden immer alle Bilder einer Probe vergleichend zu den Bildern anderer Proben („Einfach Beschreibende Prüfung“ aus DIN 10964:1996). Da immer mit mindestens einer Wiederholung der Probenaufbereitung und der Steigprozesse gearbeitet wurde, wurden pro Probe vier bis zehn Bildern gleichzeitig ausgewertet. Für die Prüfung wie stark/signifikant der Unterschied von Steigbildern von zwei Proben unterschiedlicher Herkunft ist, wurde der „Triangeltest“ angewendet. Dafür wurde die in der sensorischen Prüfung von Lebensmitteln eingesetzte „Dreiecksprüfung“ (DIN 4120) an die Steigbildmethode adaptiert. Die hier beschriebenen Ergebnisse wurden mit einem geschulten Panel von 7-8 Personen erreicht. Für die statistische Auswertung wurde das für die Sensorik entwickelte Computerprogramm "FIZZ" (Biosystems, Couteron/Frankreich) benutzt. Alle Bilder wurden zusätzlich standardisiert gescannt und gespeichert, so dass sie für eine spätere Auswertung mit entsprechenden Computerprogrammen zur Verfügung stehen.

## Ergebnisse

Die Prozeduren für die Steigbildmethode lassen sich als Standardarbeitsanweisung dokumentieren. Für Weizen- und Möhrenproben wurden Prozeduren für die Probenaufbereitung entwickelt und dokumentiert. Die für alle Proben vergleichbare Prozedur der Steigprozesse, Trocknung und Lagerung wurden ebenfalls dokumentiert. Die Dokumentation ist formal an bestehende Normen für analytische Labormethoden angelehnt. Mit den so dokumentierten Methoden wurden Vergleichsversuche zwischen drei Laboratorien durchgeführt (LBI/NL und BRAD/DK). Die Auswertung der Bilder zeigte, dass sich die Prozedurbeschreibungen erfolgreich zu anderen Orten transferieren lassen. Für die Standardisierung der Methoden wurden verschiedene Einflussfaktoren getestet und soweit möglich die Variation ausgewählter Schritte beschrieben.

Der Einfluss von Faktoren während der Probenaufbereitung, der Steigprozesse und der Entwicklung der Bilder wurde mittels der „Einfach beschreibenden Prüfung“ dokumentiert. Für die Prüfung der Variation durch Person und Tag wurde zusätzlich der „Triangeltest“ verwendet. Den größten Einfluss auf die morphologischen Kriterien der Steigbilder hatten die klimatischen Bedingungen während der Steigprozesse. Auch der Einfluss der Konditionierung war mit dem der Feuchte vergleichbar groß. Der

nächst große Einflussfaktor war die Konzentration des Saftes (bei Möhren) bzw. die Mehlmenge pro Extrakt (bei Weizen). Auch die Extraktionsdauer zeigte einen Einfluss auf das Bildmuster. Eine Veränderung der Dauer brachte keine Verbesserung des Unterscheidungsvermögens.

Als nächst wichtige Faktoren sind die Bedingungen während der Entwicklung der Bilder zu nennen. Hier wurden unterschiedliche Lichtverhältnisse (Lichtquellen und Wellenlängen untersucht). Dabei zeigte sich, dass der UV-Anteil der Lichtquelle entscheidend für die Entwicklung der Bilder ist.

Die standardisierte Steigbildmethoden wurden für die nominale Unterscheidung von Proben aus unterschiedlichem Anbau und unterschiedlicher Verarbeitungsprozessen eingesetzt. Sowohl zwei Möhrensäfte unterschiedlicher Verarbeitung („frisch und vergoren“) als auch zwei Weizensorten (*Titlis* und *Tamaro*) konnten signifikant ( $p < 0,0001$ ) mit der Methode getrennt werden. Der vom geschulten Panel festgestellte Unterschied zwischen den Möhrensorten *Rodelika* und *Rothild* war für zwei Düngungsstufen und in Jahren statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ). Die Bilder von codierten Möhren- und Weizenproben aus ökologischem und konventionellem Anbau (Paarvergleich) wurden mit der „Einfach beschreibenden Prüfung“ ausgewertet. Die Proben konnten im Paarvergleich nach Anbausystem differenziert werden. Zusätzlich wurden die Proben richtig nach Anbausystem gruppiert und nach einer Lernphase im ersten Anbaujahr auch korrekt nach Anbausystem klassifiziert.

Es zeigte sich, dass der Sorteneinfluss sich stark im Bild ausprägt und dass dieser Einfluss stärker als der anderen Faktoren (Düngung, Standort, Pflanzenschutzmaßnahmen) sein kann. Bei den Weizen- und Möhrenproben konnten ca. 90% der Betriebspaare trotzdem korrekt klassifiziert werden. Die Prüfung der Bilder von Möhrenproben mit dem „Triangeltest“ mittels eines geschulten Panels brachte für beide Jahre eine signifikante Unterscheidung der Anbausysteme für die Möhrenproben pro Betriebspaar.

## Diskussion

Die Steigbildmethode wurde standardisiert, indem alle Prozessschritte von der Probenahme bis zur Auswertung in Standardarbeitsanweisungen niedergelegt worden sind. Mit der „Einfach beschreibenden Prüfung“ und dem „Triangle-Test“ wurde die Variation einzelner Prozessschritte in den Bildmustern ermittelt. Es zeigte sich, dass Bildvariation und der Einfluss der Probenaufbereitung geringer sind als die Variation der Bilder an unterschiedlichen Tagen. Dies ist auf eine Schwankung der Feuchte in der Klimakammer zurückzuführen. Daher ist es wichtig, die Klimakammer zu kontrollieren. Die Untersuchung zum Einfluss wichtiger Faktoren in den einzelnen Prozessschritten zeigte, dass z.B. die Luftfeuchte während der Steigphasen einen erheblichen Einfluss auf die Bildmuster und das Unterscheidungsvermögen der Methode hat. Sie muss konstant gehalten werden. Ob sich eine Standardlösung (Glucose) als Kontrollkarte für diese Einflüsse einsetzen lässt, muss je nach Probenart weiter untersucht werden. Es kann sein, dass Glucose robuster/anfälliger gegen Störeinflüsse ist, als die jeweilige Probe. Weitere Faktoren, wie Konzentration, Mehlmenge pro Extrakt und vor allem die Konditionierung der Papiere haben ebenfalls einen Einfluss auf das Bildmuster und das Unterscheidungsvermögen. Sie müssen daher für jede Probenart ermittelt, standardisiert und dokumentiert werden. Es wurde gezeigt, dass mit der Steigbildmethode Proben aus unterschiedlichem Anbau und Verarbeitungsschritten differenziert und nach Herkunft korrekt klassifiziert werden können. Für die Klassifizierung der untersuchten Möhren- und Weizenproben ergab sich eine korrekte Zuordnung von codierten Proben zum Anbausystem von über 90%. Dabei können nur valide Aussagen getroffen werden, wenn, wie hier beschrieben, Standardarbeitsanweisungen und standardisierte Bildauswertung eingesetzt werden.

## Schlussfolgerungen

Nach den Vorarbeiten von Steffen (1983) wurden zum ersten Mal methodische Grundlagen zur Anwendung der Steigbildmethode in der Ökolandbauforschung durchgeführt. Ohne Beachtung dieser Ergebnisse kann u. E. die Methoden nicht nach den heutigen Voraussetzungen an wissenschaftliches Arbeiten eingesetzt werden. Die Methode arbeitet mit den hier beschriebenen Prozeduren der Bildentstehung und Bildauswertung auf einer nominalen Skala (Unterschiede). Für eine Rangordnung der Proben und folgend eine Bewertung in diskreten Abstufungen der durch die Methode bestimmten Probenqualität ist der Aufbau einer Referenzbibliothek von Bildern definierter Herkunft und Bearbeitung unerlässlich. Da alle für die vorliegende Arbeit erstellten Steigbilder eingescannt wurden, ist ein erster Schritt in diese Richtung gemacht.

## Danksagung

Wir danken Prof. Dr. P. v. Fragstein, (Uni Kassel), Prof. Dr. G. Rahmann (MRI) und Dr. P. Mäder (FiBL) für die Bereitstellung der Proben im Rahmen des vom BMVEL geförderten Projektes BÖL 02OE170/F und M. Huber und P. Doesburg (LBI/NL) sowie K. Skjerbaek und B. Pyskow (BRAD/DK) für die gute methodische Zusammenarbeit. Der Software AG Stiftung Darmstadt, der Evidenz-Stiftung Arlesheim und der Zukunftsstiftung Landwirtschaft Bochum ein Dank für die finanzielle Unterstützung zu den methodischen Untersuchungen.

## Literatur

- Kahl J., Busscher N., Ploeger A. (2007): Differenzierung und Klassifizierung von Öko-Produkten mittels validierter analytischer und ganzheitlicher Methoden. Final report project 02OE170, Bundesprogramm Ökolandbau.
- Meier-Ploeger A., Vogtmann H. (1991): Lebensmittelqualität - Ganzheitliche Methoden und Konzepte. Ökologie und Landbau, Karlsruhe.
- Steffen W. (1983): Untersuchungen zu den experimentellen und physikalisch-chemischen Grundlagen der Steigbildmethode. Elemente der Naturwissenschaft 38: 36-49.
- Strüh J. (1987): Grundlegende Phänomene bei der Ausbildung der Steigformen. Bildtypen und pharmazeutische Prozesse. Elemente der Naturwissenschaft 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".
- Zalecka A. (2006): Entwicklung und Validierung der Steigbildmethode zur Differenzierung von ausgewählten Lebensmitteln aus verschiedenen Anbausystemen und Verarbeitungsschritten. Dissertation, Universität Kassel, FB 11, Witzenhausen.