



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft



Schlussbericht zum Thema

05. Juni 2024

Analyse des Einflusses einer nachhaltigen und ökologischen Haltung von Legehennen auf die Eiqualität mittels ^1H -NMR-Spektroskopie

FKZ: 2819OE055

Projektnehmer/Projektnehmerin:
DIL Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V.

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau.

Das Bundesprogramm Ökologischer Landbau (BÖL) hat sich zum Ziel gesetzt, die Rahmenbedingungen für die ökologische Landwirtschaft in Deutschland zu verbessern. Es wird vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) finanziert und in der BÖL-Geschäftsstelle in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in die Praxis umgesetzt. Das Programm gliedert sich in zwei ineinandergreifende Aktionsfelder - das Forschungs- und das Informationsmanagement.

Detaillierte Informationen und aktuelle Entwicklungen finden Sie unter:

www.bundesprogramm.de
www.oekolandbau.de/forschung

Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an:

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
Bundesprogramm Ökologischer Landbau
Deichmanns Aue 29
53179 Bonn
Tel.: 0228-6845-3280
E-Mail: boel-forschung@ble.de



DIL Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V.

Abschlussbericht zum Projekt

Analyse des Einflusses einer nachhaltigen und ökologischen Haltung von Legehennen auf die Eiqualität mittels ^1H -NMR-Spektroskopie

Förderkennzeichen: 2819OE055

Zuwendungsempfänger / ausführende Stelle:

DIL Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V.

Dr. A. Juadjur

Prof.-v.-Klitzing-Str. 7

49610 Quakenbrück

Gefördert durch

Kooperationspartner:

Deutsche Frühstücksei GmbH

Gewerbering 31a

49393 Lohne



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Zeitraum 01.02.2020 – 31.01.2024

Quakenbrück, 29.02.2024

Dr. Volker Heinz
(Vorstand)

Dr. Andreas Juadjur
(Geschäftsbereichsleiter Chemische Analytik)

Analyse des Einflusses einer nachhaltigen und ökologischen Haltung von Legehennen auf die Eiqualität mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie

Greta Bischof¹, Andreas Juadjur¹

¹Chemische Analytik, DIL Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V., Prof.-v.-Klitzing-Str. 7, 49610 Quakenbrück, Germany; g.bischof@dil-ev.de; a.juadjur@dil-ev.de

Die Haltungsform von Legehennen wird in Deutschland anhand eines Stempels auf jedem einzelnen Hühnerei vermerkt. Dieser Stempel soll die Rückverfolgung der Herkunft des Eies zulassen, gewährleistet allerdings nicht immer die tatsächliche Authentizität der Eier. Um einen Authentizitätsnachweis zu ermöglichen, wurde im Rahmen dieses Projekts eine $^1\text{H-NMR}$ -Methode entwickelt und validiert, mit der 4.453 authentische Eier von Legehennen bekannten Ursprungs aus vier Haltungsformen (Kleingruppe-, Boden-, Freiland- und ökologischer Haltung) und vier Rassen (Lohmann Selected Leghorn, Dekalb, Lohmann Brown, Sandys) aufgearbeitet und dessen Eigelbextrakte gemessen wurden. Auf Basis dieser $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden mit Hilfe multivariater Datenanalyseverfahren, sog. lineare Diskriminanzanalysen (LDA), berechnet, um die Haltungsform von Legehennen anhand des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des Eigelbextraktes vorhersagen zu können. Das LDA-Modell für die Klassifizierung von Eiern aus konventioneller und ökologischer Haltung zeigt eine Modellgenauigkeit von 99,9 %, während das LDA-Modell zur Klassifizierung von Eiern aus den vier Haltungsformen eine Modellgenauigkeit von 97,1 % aufweist. Zusätzlich konnte ein LDA-Modell für die Vorhersage der Rasse der Legehennen (Lohmann Selected Leghorn + Dekalb, Lohmann Brown, Sandys) mit einer Modellgenauigkeit von 98,4 % berechnet werden. Die entwickelten statistischen Modelle ermöglichen somit die Vorhersage der Haltungsform und der Rasse von Legehennen anhand eines $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums eines Eigelbextraktes und dadurch die Sicherstellung der Authentizität der Eier.

Analysis of the influence of sustainable and ecological housing system of laying hens on egg quality by ^1H NMR spectroscopy

Greta Bischof¹, Andreas Juadjur¹

¹Chemical Analytics, German Institute of Food Technologies (DIL e.V.), Prof.-v.-Klitzing-Str. 7, 49610 Quakenbrück, Germany; g.bischof@dil-ev.de; a.juadjur@dil-ev.de

In Germany, the housing system of the laying hens is noted on each individual hen's egg with a stamp. This stamp is used to trace the origin of the egg but does not always guarantee the authenticity of the egg. To enable proof of authenticity, a ^1H NMR method was developed and validated as part of this project, with which 4,453 authentic eggs from laying hens from four types of housing system - small group, barn, free-range and organic - and four breeds (Lohmann Selected Leghorn, Dekalb, Lohmann Brown, Sandys) were processed and their egg yolk extracts measured. Based on these ^1H NMR spectra, linear discriminant analyses (LDA) were calculated to predict the housing system of the laying hens from the ^1H NMR spectrum of the egg yolk extract. The LDA model for the classification of eggs from conventional and organic farming shows a model accuracy of 99.9%, while the LDA model for the classification of eggs from the four housing systems shows a model accuracy of 97.1%. In addition, an LDA model for predicting the breed of laying hens (Lohmann Selected Leghorn + Dekalb, Lohmann Brown, Sandys) was calculated with a model accuracy of 98.4 %. The developed models thus enable the prediction of the housing system and breed of laying hens based on a ^1H NMR spectrum of an egg yolk extract, ensuring the authenticity of the eggs.

Analyse des Einflusses einer nachhaltigen und ökologischen Haltung von Legehennen auf die Eiqualität mittels ¹H-NMR-Spektroskopie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
1. Einführung	9
1.1. Gegenstand des Vorhabens	9
1.2. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts	10
1.2.1 Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen	11
1.2.2 Wissenschaftliche und/oder technische Arbeitsziele des Vorhabens	12
1.2.3 Arbeitsziele	12
1.3. Planung und Ablauf des Projekts.....	13
2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde	20
2.1 Ei	20
2.2 NMR-Spektroskopie.....	21
2.3 Authentizitätsprüfung von Eiern mittels ¹ H-NMR-Spektroskopie.....	22
3. Material und Methoden	22
3.1. NMR-Methode	22
3.1.1. Aufarbeitungsmethode.....	23
3.1.2. Messmethode	23
3.1.3. Standards	24
3.1.4. Präzision	24
3.2 Lagertest.....	24
3.3 Methode für physikalische Parameter	25
3.4 Statistische Auswertung.....	25
4. Ergebnisse	26
4.1. Methodenentwicklung (AP 2, DIL)	26
4.2 Ergebnisse zur Präzision der Methode.....	33
4.3. Lagertest (AP 2, DIL)	35
4.4. Rohmaterialauswahl (AP 1, DIL + DFE)	39

4.5.	Ergebnisse der statistischen Auswertung der ¹ H-NMR-Messungen (AP 3, DIL)	43
4.5.1.	Alter.....	44
4.5.2.	Haltungsformen	47
4.5.3.	Rasse	51
4.6.	Ergebnisse der physikalischen Parameter.....	53
5.	Diskussion	60
5.1	Auswirkung des Alters der Legehennen auf den Eigelbextrakt.....	60
5.2	Auswirkung der Haltungsform der Legehennen auf den Eigelbextrakt	61
5.3	Auswirkung der Rasse von Legehennen auf den Eigelbextrakt.....	64
5.4	Auswirkung der Haltungsform auf die physikalischen Parameter	65
5.5	Fazit	66
5.6	Ausblick.....	67
6.	Nutzen und Verwertbarkeit	68
6.1.	Wirtschaftliche Erfolgsaussichten	68
6.2.	Wissenschaftliche Erfolgsaussichten.....	68
6.3.	Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit	69
7.	Gegenüberstellung ursprünglich geplanter und erreichter Ziele	70
8.	Zusammenfassung	71
9.	Literaturverzeichnis	72
10.	Übersicht aller Veröffentlichungen	76
11.	Anhang	76

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ANOVA	<i>Analysis of variances</i>
AP	Arbeitspaket
B	Bodenhaltung
cc	Korrelationskoeffizient
DAFA	Deutsche Agrarforschungsallianz
DFE	Deutsche Frühstücksei GmbH & Co. KG
DIL	DIL Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V.
F	Freilandhaltung
FB	Aufgestallte Freilandhaltung
FS	Fettsäure(n)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
KG	Kleingruppenhaltung
LB	Lohmann Brown
LDA	Lineare Diskriminanzanalyse
LSL	Lohmann Selected Leghorn
m	Mittelwert
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NPNK	Nationales Programm für nachhaltigen Konsum
O	Ökologische Haltung
PCA	Hauptkomponentenanalyse
rel. std	relative Standardabweichung
std	Standardabweichung
TMB	Trimethoxybenzol
TMS	Tetramethylsilan
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TSP	Natriumtrimethylsilylpropionat
ZÖL	Zukunftsstrategie ökologischer Landbau

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Projektverlaufs.	13
Abbildung 2: Darstellung des ^1H -NMR-Spektrums eines Eigelb-Extrakts in $\text{CDCl}_3\text{-d}_1/\text{MeOD-d}_3$ (3:2). Die Buchstaben a bis i bezeichnen die Signale im Spektrum, die mit Triacylglyceriden und ihren Fettsäuren (FS) zusammenhängen. b und c: Glycerol Rückgrat, a: Vinyl-Wasserstoff, f: Allylic-methylen Wasserstoff aller ungesättigter Fettsäuren, d: CH_2 -bis-allylic Wasserstoff von PUFA (ω -3 und ω -6 FS), e: Methylen-Gruppe an Carbonyl α -position, g: Methylen-Gruppe an Carbonyl β -position, h: Ethyl-Gruppe, i: Methyl-Gruppe von FS. Die Nummer hängen mit den Signalen der Phospholipide und Cholesterol zusammen. Nummer 1, 2, 4 gehört zum Glycerol Rückgrat, 3, 5, 7 zu Phosphatidylcholin, 4 und 8 zu Phosphatidylethanolamin und 6, 9, 10 zu Cholesterol. Signalzuordnung durch Ackermann, et al. (2019) [3].	26
Abbildung 3: Darstellung der ^1H -NMR-Spektren des Eigelbextrakts, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterol in $\text{CDCl}_3\text{-d}_1/\text{MeOD-d}_3$ (3:2).	27
Abbildung 4: Darstellung der ^1H - ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren des Eigelbextrakts, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterol in $\text{CDCl}_3\text{-d}_1/\text{MeOD-d}_3$ (3:2).	29
Abbildung 5: Darstellung der ^1H - ^{13}C -HMBC-NMR-Spektren des Eigelbextrakts, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterol in $\text{CDCl}_3\text{-d}_1/\text{MeOD-d}_3$ (3:2).	30
Abbildung 6: Darstellung ^1H - ^1H -TOCSY-NMR-Spektren des Eigelbextrakts, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterol in $\text{CDCl}_3\text{-d}_1/\text{MeOD-d}_3$ (3:2). Der ppm-Bereich wurde von 0,5 bis 3,5 ppm aufgenommen.	31
Abbildung 7: Darstellung ^1H - ^1H -TOCSY-NMR-Spektren des Eigelbextrakts, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterol in $\text{CDCl}_3\text{-d}_1/\text{MeOD-d}_3$ (3:2). Der ppm-Bereich wurde von 3,5 bis 6,5 ppm aufgenommen.	32
Abbildung 8: Auftragung der Integrale 1 bis 10 über die Lagerdauer (0, 7, 14, 21, 28, 35 und 42 Tage) für die jeweilige Lagerungsart. Als Lagerungsart wurde Kühlung (+8°C), Tiefgefrieren (-20°C) und Gefriertrocknung plus Tiefgefrieren (-20°C) gewählt. Es wurden ^1H -NMR-Spektrum von 105 Ei-Proben im Lagertest gemessen und 30 Integrale definiert. Je Lagerungsart und Lagerzeit wurden 5 Eier ausgewählt, die Integralwerte aus den ^1H -NMR-Spektren dieser 5 Proben gemittelt und die Standardabweichung berechnet.	36
Abbildung 9: Auftragung der Integrale 11 bis 20 über die Lagerdauer (0, 7, 14, 21, 28, 35 und 42 Tage) für die jeweilige Lagerungsart. Als Lagerungsart wurde Kühlung (+8°C), Tiefgefrieren (-20°C) und Gefriertrocknung plus Tiefgefrieren (-20°C) gewählt. Es wurden ^1H -NMR-Spektrum von 105 Ei-Proben im Lagertest gemessen und 30 Integrale definiert. Je Lagerungsart und Lagerzeit wurden 5 Eier ausgewählt, die Integralwerte aus den ^1H -NMR-Spektren dieser 5 Proben gemittelt und die Standardabweichung berechnet.	37
Abbildung 10: Auftragung der Integrale 21 bis 30 über die Lagerdauer (0, 7, 14, 21, 28, 35 und 42 Tage) für die jeweilige Lagerungsart. Als Lagerungsart wurde Kühlung (+8°C), Tiefgefrieren (-20°C) und Gefriertrocknung plus Tiefgefrieren (-20°C) gewählt. Es wurden ^1H -NMR-Spektrum von 105 Ei-Proben im Lagertest gemessen und 30 Integrale definiert. Je Lagerungsart und Lagerzeit wurden 5 Eier ausgewählt, die Integralwerte aus den ^1H -NMR-Spektren dieser 5 Proben gemittelt und die Standardabweichung berechnet.	38

Abbildung 11: Lineare Diskriminanzanalyse auf Basis der ¹ H-NMR-Spektren der Eigelbextrakte von Legehennen der vier verschiedenen Altersgruppen aus Bodenhaltung. Die Modellgenauigkeit liegt bei 86,6 %.	44
Abbildung 12: Lineare Diskriminanzanalyse auf Basis der ¹ H-NMR-Spektren der Eigelbextrakte von Legehennen aus konventioneller (Kleingruppen-, Boden- und Freilandhaltung) und ökologischer Haltung. A. LDA-Modell. B. LDA-Modell mit FB-Proben (schwarz). Die Modellgenauigkeit liegt bei 99,9 %.	47
Abbildung 13: Lineare Diskriminanzanalyse auf Basis der ¹ H-NMR-Spektren der Eigelbextrakte von Legehennen aus Kleingruppen-, Boden-, Freiland- und ökologischer Haltung. A. LDA-Modell. B. LDA-Modell mit FB-Proben. Die Modellgenauigkeit liegt bei 97,1 %.	48
Abbildung 14. Lineare Diskriminanzanalyse auf Basis der ¹ H-NMR-Spektren der Eigelbextrakte von Legehennen aus Kleingruppen-, Boden-, Freiland- und ökologischer Haltung. A. LDA-Modell zum Vergleich von konventioneller und ökologischer Haltung. B. LDA-Modell zum Vergleich aller vier Haltungsformen. In schwarz sind die aus den Supermärkten und Discountern erworbenen Proben dargestellt.	51
Abbildung 15: Lineare Diskriminanzanalyse auf Basis der ¹ H-NMR-Spektren der Eigelbextrakte von Legehennen vier verschiedener Rassen, wobei die Rassen LSL und Dekalb als „Weiss“ zusammengefasst wurden. Die Modellgenauigkeit liegt bei 98,4 %.	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Arbeits- und Zeitplan des Vorhabens.	18
Tabelle 2: Angabe der Haugh Unit-Werte für die jeweilige Güteklasse.....	25
Tabelle 3: Integralgrenzen der Integrale 1-30.....	33
Tabelle 4: Berechnete Integrale aus den NMR-Spektren der 10fach aufgearbeiteten Proben. M: Mittelwert, STD: Standardabweichung, rel. STD: relative Standardabweichung in %.....	34
Tabelle 5: Korrelationskoeffizienten ($\alpha = 0,05$) berechnet mit den jeweiligen Integralen und der Lagerdauer.....	39
Tabelle 6: Auswahl der Rassen für die jeweilige Haltungsform. LSL = Lohmann Selected Leghorn, LB = Lohmann Brown.	40
Tabelle 7: Zusammenfassung der Gruppeneinteilung nach Alter der Legehennen.....	40
Tabelle 8: Probenbeschaffung 2020 – 2023 von authentischen Proben. Pro Probe wurden ca. 100 Eier untersucht.	41
Tabelle 9. Validierungsproben. Beschafft in 2023. Pro Probe zwischen 8 – 12 Eier.	43
Tabelle 10: Konfusionsmatrix zur Zuordnung des Testsets basierend auf dem LDA-Modell der vier verschiedenen Altersgruppen.	44
Tabelle 11: Integrale berechnet aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Eigelbextrakte. Verschiedene Buchstaben in einer Zeile symbolisieren signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede auf Basis eines Kruskal-Wallis Tests.....	46
Tabelle 12: Konfusionsmatrix zur Zuordnung des Testsets basierend auf dem LDA-Modell der vier verschiedenen Haltungsformen.	48
Tabelle 13: Integrale (Mittelwert m und Standardabweichung std) berechnet aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Eigelbextrakte (KG = Kleingruppe; B = Bodenhaltung; F = Freilandhaltung; O = Ökologische Haltung; FB = aufgestallte Freilandhaltung). Verschiedene Buchstaben in einer Zeile symbolisieren signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede auf Basis eines Kruskal-Wallis Tests.....	49
Tabelle 14: Konfusionsmatrix zur Zuordnung des Testsets basierend auf dem LDA-Modell der vier verschiedenen Rassen.	52
Tabelle 15: Integrale (Mittelwert m und Standardabweichung std) berechnet aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Eigelbextrakte. Verschiedene Buchstaben in einer Zeile symbolisieren signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede auf Basis eines Kruskal-Wallis Tests.....	52
Tabelle 16: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der physikalischen Parameter aller Proben.	55
Tabelle 17: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der physikalischen Parameter aller Proben.	57
Tabelle 18. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten und der tatsächlich erreichten Ziele.....	70

1. Einführung

1.1. Gegenstand des Vorhabens

2017 legten 45,7 Mio. Legehennen in Deutschland im Durchschnitt jeweils 292 Eier je Legehenne. In Deutschland stieg der Pro-Kopf-Verbrauch von Eiern im Jahr 2018 auf 235 Stück. 2022 wurden in Deutschland erstmals über 50 Mio. Legehennen gehalten. Zwar sank der pro Kopf Verbrauch auf 230 Stück, jedoch stieg die Exportrate um 5,2 %. Außerdem stieg der Selbstversorgungsgrad auf fast 76 Prozent, ein Niveau, welches letztmalig 1992 dokumentiert wurde. Der Anteil der Legehennen in ökologischer Haltung lag 2017 bei 11 %, 2021 bereits bei 12,9 %. [1, 2] Eier aus ökologischer Haltung bedingen durch den deutlich höheren zeitlichen, räumlichen und finanziellen Aufwand einen höheren Marktpreis als konventionelle Eier. Die ökologische Haltung von Legehennen sowie die noch höheren Mindestanforderungen von Anbauverbänden wie z.B. Demeter, Bioland und Naturland, fördert durch die Unterschiede zur konventionellen Haltung das Tierwohl der Legehennen. Das Interesse der Verbraucher an bio- und ökologischen Produkten nimmt stetig zu. Unabhängig von der EG-Öko-Verordnung sind die Auflagen z.B. beim Tierwohl zwischen den Mitgliedsstaaten unterschiedlich. Dadurch spielt auch die Herkunft der Eier eine große Rolle. Durch eine analytische Möglichkeit zur Herkunftsbestimmung ließen sich schnell Rückschlüsse auf Tierwohlstandards vor Ort, aber auch auf etwaige aktuelle Risiken, beispielsweise die mögliche Kontamination der Eier mit z.B. Fibronil, ziehen.

Des Weiteren besitzt die Kleingruppenhaltung von Legehennen eine Auslauffrist bis 2025, da diese im Bereich Tierwohl stark diskutiert wurde. Durch eine analytische Methode zur Detektion von Haltungsform und Herkunft könnte schnell überprüft werden, ob Kleingruppenhaltung noch über 2025 bzw. bei evtl. genehmigter Verlängerungsfrist über 2028 hinaus betrieben wird. Die Erfassung entsprechender Daten muss dafür allerdings sehr zeitnah erfolgen, da diese Haltungsform aktuell noch erlaubt ist und somit nur noch bis zum Eintreten des Verbotes entsprechende Referenzproben gewonnen werden können.

Die Fütterung von Legehennen kann stark variieren, da durch das Futter Qualitätsparameter (z.B. Farbe des Eigelbs oder Viskosität des Eiklars) beeinflusst werden können. Die präferierte Eigelbfarbe ist regional von den Verbrauchern abhängig, in Norddeutschland wird eher gelbes Eigelb, in Süddeutschland eher orange-rotes Eigelb vorgezogen. Die vom Verbraucher erwartete Produktqualität des Eies wird somit durch die Fütterungsart, Haltungsform und Regionalität beeinflusst.

Gegenstand des Vorhabens war die Entwicklung einer analytischen Methode zur Qualitätssicherung von Eiern hinsichtlich der Authentizität von Herkunftsangaben wie Haltungsform und Rasse.

1.2. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Das Gesamtziel des Vorhabens ist ein NMR-basiertes Nachweissystem zur Sicherung der Authentizität und Produktqualität, um vor allem auf die Haltungsform schließen zu können. Zusätzlich müssen auch Fütterungsart, geografische Herkunft und Rasse als Qualitätsmerkmale berücksichtigt werden, da Einflüsse resultierend aus der Fütterung von Einflüssen aus der Haltungsform unterschieden werden müssen. Beispielsweise wird der Einfluss der Fütterung (z.B. Fütterungszusätze) auf die Eiqualität mittels NMR-Analytik erfasst. Das Resultat ist eine Qualitätssicherungsmethode für die Authentizität und Produktqualität von Bio-Eiern, die auch Faktoren wie Fütterung, Rasse und Herkunft mitberücksichtigt. Durch die ^1H -NMR-Spektroskopie sollen Veränderungen des Metaboloms (Gesamtheit der Stoffwechselprodukte) detektiert, Abhängigkeiten von den verschiedenen Einflussfaktoren (Haltung, Herkunft, Rasse, Fütterung) auf das Ei identifiziert, sowie mögliche Zusammenhänge zwischen Eiqualität und Metabolom evaluiert werden. Durch die Etablierung einer solch innovativen Analytik, die als non-targeted Methode das Metabolom der Proben erfasst, werden zudem statistische Modelle entwickelt, die direkt auch dem Erzeuger oder Vermarkter helfen. Denn durch die statistische Auswertung der NMR-Spektren werden Abweichungen und Qualitätsunterschiede vom statistischen Spektren-Modell der Referenzmessungen sofort erfasst. In diesem Fall kann der auslösende Faktor direkt identifiziert - z.B. die Fütterung korrigiert - und dadurch eine hohe Eiqualität garantiert werden. Dass sich Eier hinsichtlich der Haltungsformen (ökologisch und konventionell) durch ^1H -NMR-Spektroskopie prinzipiell unterscheiden lassen, wurde bereits gezeigt [3]. Die Produktqualität der Eier soll mit diesem Projekt nachvollziehbar, sicher und sehr schnell messbar werden.

Die zentrale Hypothese dieses Projekts ist, dass die Gehalte charakteristischer Metabolite bei unterschiedlichen Haltungsformen, Fütterungsarten und Herkunft variieren. Besonders der Einfluss verschiedener Fütterungszusätze auf die Eiqualität soll mittels ^1H -NMR-Spektroskopie und physikalischer Analytik detektiert werden. Um dieses Vorhaben zu realisieren, wurden große Mengen authentischer Eiprobe spezifizierter Haltung, Herkunft, Fütterung, Rasse und Alter benötigt, mittels ^1H -NMR und Eiquälitätsparametern analysiert, statistisch ausgewertet, auf Korrelationen mit den erfassten Einfluss- und Qualitätskriterien untersucht und die ^1H -NMR-Methodik im Anschluss verifiziert.

1.2.1 Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen

Das Forschungsprojekt nimmt Bezug auf die Bekanntmachung Nr. 12/18/31 über die Durchführung von FuE-Vorhaben zum Thema „Ökologisch und nachhaltig erzeugter Lebensmittel zu zukunftsfähigen Ernährungssystemen“ im BÖL.

Die Projektziele ordnen sich besonders in die Analyse zur Authentizität ökologischer/nachhaltiger Lebensmittel betreffend Identifikation von Lebensmitteln (Metabolomics) ein. Somit werden nach der Nutztierstrategie des BMEL sowie der Zukunftsstrategie ökologischer Landbau (ZÖL) ökologische Lebensmittel gestärkt, indem die Qualität ökologisch produzierter Produkte verbessert, analytisch detektierbar und nachvollziehbar wird. Außerdem wird dadurch die Nachhaltigkeitsstrategie der Bundesregierung, nach der der Anteil landwirtschaftlicher Flächen unter ökologischer Bewirtschaftung zukünftig 20 % betragen soll, unterstützt. Des Weiteren orientieren sich die Projektziele an den Empfehlungen des Fachforums Ökologische Lebensmittelwirtschaft der Deutschen Agrarforschungsallianz (DAFA). Die Projektziele unterstützen den Transfer von Vertrauenseigenschaften durch Kontrollverfahren bzw. Herkunftsnachweise, sowie die Sicherung von Öko-Prinzipien in der Lebensmittelkette. Ebenso können weitere Qualitätsmerkmale für die ökologischen Lebensmittel erarbeitet werden. Dies dient als Basis für eine höhere Akzeptanz der Verbraucher, dadurch eine stärkere Unterstützung der ökologischen Tierhaltung und somit des Tierwohls. Durch eine steigende Nachfrage nach entsprechend gekennzeichneten, nachhaltig produzierten Eiern, wird auch der Anteil der Legehennen steigen, die nach den Richtlinien des ökologischen Landbaus gehalten werden.

Darüber hinaus unterstützen die Projektziele die Ziele des Nationales Programms für Nachhaltigen Konsum (NPNK) im Themenfeld Ernährung. Die Basis für eine gesunde Ernährungsweise ist laut NPNK gesunde Lebensmittel, zu denen auch der Faktor geeignete Verhältnisse bzgl. Umgebung gehört. Somit stellt der Konsum von Bio-Eiern ein nachhaltiges Ernährungsmuster dar, dass durch dieses Projekt das Vertrauen der Verbraucher und die Qualität der Eier unterstützt.

Dieses Projekt trägt zur Sicherung der Authentizität und Produktqualität von Eiern und insbesondere zur Unterstützung der Erzeuger und Verarbeiter von Eiern und Eiprodukten aus ökologischer Haltung bei. Es ist ein Projekt mit sehr hoher Praxisrelevanz, da die generierten Ergebnisse und die angestrebte NMR-Methode dem Erzeuger direkt helfen, die angestrebten Produktqualität und Authentizität zu garantieren, sich gleichzeitig aber auch stark auf die Nachhaltigkeit dieser Produkte, wie z.B. das Tierwohl, auswirken. Parallel resultiert aus den ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen ein

Nachweisverfahren für Eier verschiedener Haltungsformen (Bio, Freiland), das einen hohen Beitrag zu ökologischer Erzeugung von Eiern und Eiprodukten leistet, indem es das Verbrauchervertrauen in diese Produkte durch die analytische Überprüfbarkeit einer nachhaltigen Erzeugung weiter stärkt und somit die Erzeuger gleich in zweifacher Weise unterstützt.

1.2.2 Wissenschaftliche und/oder technische Arbeitsziele des Vorhabens

Bei der im Vorfeld des Projektes durchgeführten Recherche zeigte sich, dass zu dem damaligen Stand keine zuverlässige Qualitätssicherungs- und Detektionsmethode für Eier, insbesondere in Bezug auf die Haltung, aber auch Fütterung und Regionalität der Legehennen, vorhanden ist. Durch die derzeit angewandten Tests und physikalischen Messungen, wurden lediglich unmittelbare Auswirkungen auf den prozentualen Anteil von Eigelb und Eiklar, den pH-Wert, sowie Eigelbfarbe und Eiklarviskosität erfasst. Die Isotopenanalyse von Eiern zur Herkunftsdetektion und zur Detektion der Fütterung und Haltung, liefert aktuell zwar Hinweise, allerdings keine statistisch sicheren Ergebnisse. Die Einflussfaktoren einer ökologischen Haltung auf das Inhaltsstoffprofil des Eies sind aktuell noch nicht vollständig untersucht. Dadurch ist es nicht möglich aus dem analytisch erfassten Inhaltsstoffprofil eines Eies, Rückschlüsse auf eine nachhaltige und ökologische Haltungsform zu ziehen. Diese analytische Lücke füllt dieses Projekt mit einem NMR-spektroskopischen Ansatz als geeigneteres Mittel gegenüber der Isotopenanalytik.

1.2.3 Arbeitsziele

a. Beschaffung authentischer Proben

Die Beschaffung authentischer Proben kann nicht durch einen „Besuch“ im Supermarkt gewährleistet werden, sondern muss durch eine lückenlose Nachverfolgung vom Hof bis ins DIL gegeben sein. Da allein die Beschaffung direkt vom Hof bzw. durch den Vertrieb sehr aufwendig ist, und hinzu noch sämtliche Authentizitätsparameter in möglichst gleichen Verhältnissen abgedeckt werden müssen, ist dies als ein wichtiges Arbeitsziel deklariert. Das Arbeitsziel Beschaffung der authentischen Proben ist die Basis für das gesamte Projekt.

b. Methodenentwicklung & Messung

Die Methodenentwicklung und Messung aller Proben sind als zweites Arbeitsziel zu nennen. Die Methode zur Aufarbeitung und Messung der Proben muss reproduzierbar sein, damit die Proben verglichen werden können. Eine Validierung ist demnach unabdingbar.

c. Statistische Analyse und Erstellung eines statistischen Modells

Das letzte Arbeitsziel bezeichnet die statistische Analyse aller erhobenen Daten. Auf dieser Analyse basiert die Qualitätssicherungsmethode, da nur unter Abgleich der Messergebnisse der authentischen Proben eine unbekannte Probe bzgl. ihrer Authentizität untersucht werden kann.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieses Projekts eine Methode entwickelt, mit der die Authentizität von Hühnereiern bestimmt werden kann. Diese Methode basiert auf einem statistischen Modell, dessen Grundlage die hohe Anzahl an authentischen Proben bildet. Dadurch soll ein sicherer Nachweis von ökologischen Haltungsbedingungen der Legehennen ermöglicht werden, und somit auch die Aufmerksamkeit und das Vertrauen des Verbrauchers auf ökologische Haltung gelenkt werden.

1.3. Planung und Ablauf des Projekts

Vorhabenbezogene Ressourcenplanung

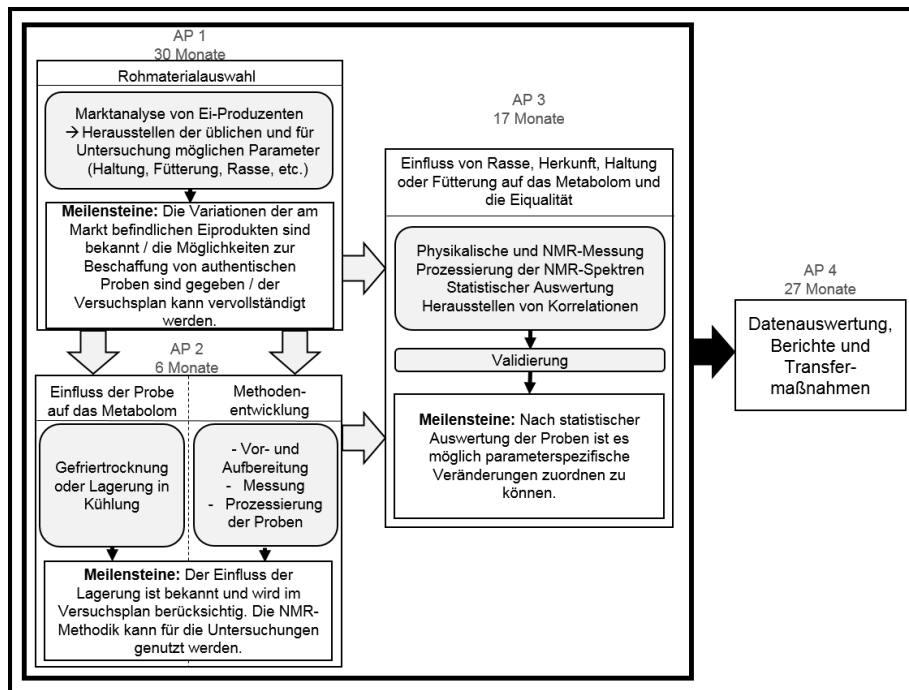


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Projektverlaufs.

Das Vorhaben wurde in vier Arbeitspakete (APs) unterteilt, bei denen AP1 in den Aufgabenbereich der Deutsche Frühstücksei GmbH fällt und AP2-4 in den Aufgabenbereich des DIL. Für die Bearbeitung dieser Arbeitspakete war das notwendige Personal bei beiden Projektpartnern bereits vorhanden. Ebenso lagen auch die benötigten Sachmittel, abgesehen von den Verbrauchsmaterialien und den zu messenden Proben, im notwendigen Umfang vor.

AP 1: Beschaffung von authentischem Probenmaterial (DFE)

In AP 1 wurde eine Erhebung der am Markt regulär zu erwerbenden Eier verschiedener Erzeuger mit allen verfügbaren Informationen – Rasse (Legehybride aus z.B. weißes Leghorn, Rohdeländer, etc.), Herkunft (Ort), Haltung (Bio, Freiland, Boden, Kleingruppen) und Fütterung (Mais, Grünfutter, Lutein, etc.) erstellt, um die Beschaffung authentischer Proben sicherzustellen. Der Kooperationspartner Deutsche Frühstücksei GmbH (DFE) sowie der hinzugezogene Ökoberater Dr. Friedhelm Deerberg waren für die Organisation und Beschaffung authentischer Proben verantwortlich. Vor Versuchsbeginn wurde sichergestellt, dass definiert ist:

- a. inwieweit die Eiproduzenten Eier liefern können, bei denen nur ein Parameter variiert, und
- b. wie sichergestellt werden kann, dass die Proben authentisch sind (z.B.: Eistempel, Besuch der Landwirte)

Ziel war es, die bestmöglich spezifizierten Proben für die Untersuchungen zu erhalten. Die Transportart und -dauer der Eier, sowie ihre Größe wurden nicht als Variationsparameter genutzt, jedoch wurden diese Informationen aufgeführt.

Der Fokus der Untersuchungen lag auf dem Parameter Haltung. Hierbei wurden die vier Formen Kleingruppen-, Boden-, Freiland- und ökologische Haltung untersucht. Besonders die Unterscheidung zwischen ökologisch und konventionell gehaltenen Legehennen ist von großem Interesse. Die weiteren Parameter wurden mit in die Untersuchungen aufgenommen. Dies war zwingend notwendig, da ein Einfluss durch weitere Parameter wie Rasse, Fütterung, Alter erst ausgeschlossen oder eingeschätzt werden musste, um ein sicheres statistisches Modell bzgl. der Haltungsform der Legehennen aufzubauen. Der Vorteil an dieser zwingend notwendigen Dokumentation weiterer Einflussfaktoren war, dass gegen Ende des Projekts die Proben auch hinsichtlich der Einflüsse der Fütterung, Rasse, etc. ausgewertet werden könnten. Der Parameter Rasse wurde auf ca. fünf Variablen beschränkt (z.B. Sandys, LSL, etc.). Der Parameter Fütterung war von der hier in AP 1 detektierten realistischen Bedingungen abhängig, und wurde vorab auf zehn unterschiedliche Fütterungsformen geschätzt. Für

eine statistische Sicherheit bzgl. der Haltungsform wurde ein Mindestprobenumfang von $n = 200$ pro Parameter notwendig. Es werden circa 4.000 $^1\text{H-NMR}$ -Versuche durchgeführt.

Meilenstein: Die regulär am Eiermarkt genutzten Haltungsformen, Rassen und Fütterungsarten waren bekannt. Möglichkeiten zur Beschaffung authentischer Proben waren gegeben und der Versuchsplan war konkretisiert bzw. vervollständigt.

AP 2: Methodenentwicklung (DIL)

Probenlagerung: Da die Aufbereitung und Untersuchung der Proben im Rahmen des Forschungsvorhabens nicht direkt nach der Probenahme erfolgen konnte, war es nötig, dass eine geeignete Lagerungsform der Proben entwickelt wurde. Daher wurde der Einfluss des Alters des Eigelbs und Eiklar in Kühlung/Einfrieren und nach Gefriertrocknung auf das Metabolom untersucht. Dazu wurden aus mindestens 10 verschiedenen Eigelb und Eiklar pro Lagerungsart (insgesamt mind. 20) in Kühlung und nach Gefriertrocknung im Kühlschrank gelagert. Die Probenahme erfolgte nach 0, 7, 14, 21, 28 Tagen. Diese Proben wurden physikalisch und mittels NMR-Spektroskopie untersucht.

Physikalische Analytik: Die Messungen sollten möglichst zeitsparend und reproduzierbar ausfallen. Dafür wurde ein Kamerasystem aufgebaut, mit dem stichprobenartig die Eier vor und nach Aufschlagen fotografiert und vermessen werden können. Damit konnten die Parameter Haugh Unit, Yolk Index und Air cell size bestimmt werden. Die Farbe des Eigelbs wurde mittels Farbfächer (Roche) erfasst. Im Anschluss an die sensorischen Messungen wurde das Eigelb gefriergetrocknet und für die Analytik mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (400 MHz) vorbereitet.

Probenvorbereitung NMR: Ziel der NMR-Messungen war es, einen möglichst großen Anteil des Metaboloms einer Eigelb-Probe analytisch zu erfassen. Dafür wurden verschiedene Extraktionsmethoden mit unterschiedlichen Lösungsmitteln (Ethanol-Hexan und Methanol-Chloroform), in denen 0,45 g Eigelb homogenisiert wurde, eruiert. Des Weiteren wurde die Menge (0,3 – 2 g) des verwendeten Probenmaterials optimiert und ein geeigneter interner Standard für die Analytik gesucht und etabliert.

Messung und Prozessierung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren: Um die zur statistischen Auswertung benötigten standardisierten Spektren der Eiprobe zu erhalten, wurde eine eindimensionale $^1\text{H-NMR}$ -Messmethode mit zg Pulssequenz durch Optimierung der Akquisitionsparameter entwickelt. Für die Darstellung und den Vergleich der Spektren werden Prozessiermethoden für optimale Baseline- und Phasenkorrektur erstellt.

Meilenstein: Der Einfluss der Lagerung auf das Metabolom ist bekannt. Kritische Parameter sind erfasst und werden im Versuchsplan berücksichtigt. Die NMR-Methodik kann für die weiteren Untersuchungen genutzt werden.

AP 3: Bestimmung von Korrelationen zwischen den Metabolomveränderungen im Ei durch Haltung, Fütterung, Herkunft und physikalischen Veränderungen der Eiqualität. (DIL)

Messung: Die authentischen Proben wurden zunächst stichprobenartig physikalisch begutachtet. Hierbei wurden die Qualitätsparameter Farbe des Eigelbs nach den Roche-Werten (1-15), Viskosität des Eiklars (Haugh Unit), Gewicht des Eis, Eigelb und Eiklar, Yolk Index, pH-Wert Eigelb und Eiklar und Luftkammerhöhe (in mm) bestimmt. Des Weiteren wurden die Eier visuell auf Blutflecken untersucht. Nach der Analyse wurden die Proben für die ¹H-NMR-Messung aufbereitet und vermessen.

Auswertung: Um eine zielgerichtete statistische Auswertung zu ermöglichen, wurde zum Vergleich der NMR-Spektren eine Skalierung anhand interner Standards durchgeführt. Daraufhin wurde, abhängig von den bereits identifizierten Einflussfaktoren, eine Integrationsmethode zur Identifizierung und Quantifizierung der Metabolite, die mit der Haltungsform korrelieren, entwickelt. Weiter wurde analysiert, ob die Einflussfaktoren wie Fütterung, Herkunft und Rasse ebenfalls mit spezifischen Metaboliten korrelieren.

Um eine Trennbarkeit nach Haltungsform und weiteren Einflussfaktoren wie Rasse, Herkunft, Fütterung zu überprüfen, sowie zur Reduktion der Dimensionen, wurde mit den erhobenen Daten eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. Basierend darauf erfolgte eine Auftrennung der Gruppen durch eine lineare Diskriminanzanalyse (LDA), die validiert und geprüft wird. Zur Gewährleistung der Zuverlässigkeit der Methodik wurde diese mit entsprechend hoher Proben- bzw. Spektrenanzahl erarbeitet, um eine hohe statistische Sicherheit zu erreichen.

Die ¹H-NMR-Ergebnisse wurden auf Korrelationen mit den physikalischen Ergebnissen mittels statistischer Verfahren (ANOVA oder t-Test) untersucht. Dadurch könnten Aussagen über potenzielle Einflussfaktoren auf die Eiqualität getroffen werden, beispielsweise über die Optimierung der Fütterung.

Validierung: Zur Validierung und Etablierung der entwickelten Methodik wurden Analysen mit bekannten Proben (Testset) sowie unbekanntem Proben (aus Supermarkt/Discounter) durchgeführt. Diese Proben wurden entsprechend der entwickelten Methoden aufgearbeitet, gemessen, prozessiert und ausgewertet. Die Ergebnisse wurden dann mit den generierten Daten verglichen.

Meilenstein: Nach statistischer Auswertung der physikalischen und ^1H -NMR-Messungen war bekannt, welche parameterspezifische Veränderungen der Eiqualität messbar und abhängig von der Fütterung und den weiteren im Projekt definierten äußeren Einflussfaktoren sind.

AP 4: Datenauswertung, Berichte und Transfermaßnahmen (DIL)

Um einen Transfer der entwickelten Lösungsansätze in die Wirtschaft zu gewährleisten, wurden regelmäßig Daten ausgewertet, Berichte erstellt und Maßnahmen zum Ergebnistransfer durchgeführt. Es wurden Resultate auf nationalen Konferenzen vorgestellt und in laufende Lehrveranstaltungen integriert.

Meilenstein: Die Datenauswertung war abgeschlossen. Die Methode zur Qualitätssicherung der Authentizität und Qualität von Bio-Eiern, berücksichtigt mit sämtlichen Einflussfaktoren (z.B. Rasse), ist abgeschlossen. Der Wissenstransfer hat stattgefunden.

Meilensteinplanung

Das Vorhaben war auf 30 Monate ausgelegt. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die zeitliche Abfolge und Dauer der einzelnen Arbeitspakete, sowie über die geplante Zusammenarbeit zwischen den Projektpartnern. Die Tätigkeiten des Antragstellers und des Kooperationspartner sind in den Arbeitspaketen in Arbeitsfeldern aufgeteilt und angegeben.

Tabelle 1: Arbeits- und Zeitplan des Vorhabens.

	Part ner	Monate nach Projektstart																																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30				
AP1: Beschaffung authentischem Probenmaterial																																			
Koordination	DIL																																		
Proben- beschaffung	DFE																																		M
Projekt Meetings	alle																																		
AP2: Methodenentwicklung																																			
Methoden- entwicklung	DIL									M																									
AP3: Bestimmung von Korrelationen zw. Metabolomveränderungen im Ei durch Einflussparameter																																			
Messung	DIL																																	M	
Auswertung	DIL																																	M	
AP4: Datenauswertung, Berichte, Wissenstransfer																																			
Datenauswer- tung	DIL																																		M
Wissenstranf- er	alle																																		M

Arbeitsfeld 1 – Projektkoordination (DIL)

Das DIL hat für die gesamte Projektlaufzeit die Arbeiten koordiniert und den Austausch mit dem Projektpartner organisiert. Besonders wichtig waren aufgrund der begrenzten Lagerungsmöglichkeiten von frischen Eiern die Koordination zwischen Probenbeschaffung, Eintreffen am DIL und Bearbeitung der Proben. Weiterhin wurde das DIL unter Berücksichtigung der Meilensteine im Projektablauf die Einhaltung des Zeitplans der einzelnen Arbeiten kontrollieren. Zudem steht das DIL im Austausch mit der BLE hinsichtlich inhaltlicher und organisatorischer Belange.

Arbeitsfeld 2 – Beschaffung der authentischen Proben (DFE)

Die DFE war für die gesamte Projektlaufzeit zuständig für die Probenbeschaffung authentischer Proben verantwortlich sein. Besonders wichtig war hierbei die zuverlässige Dokumentation der verschiedenen Parametern (Haltung, etc.), sowie die Probenbeschaffung aus sämtlichen Parameterabhängigen Feldern (unterschiedliche Haltungformen, unterschiedliche Fütterungen, unterschiedliche Rassen, etc.).

Arbeitsfeld 3 – Projektmeetings (alle)

Für die Koordination und Organisation des Projekts wurden einmal im Jahr Projektmeetings veranstaltet, in denen über den Fortlauf des Projekts und Projektergebnisse diskutiert werden konnte.

Arbeitsfeld 4 – Methodenentwicklung (DIL)

Die Methodenentwicklung wurde am DIL durchgeführt. Hierbei war wichtig, dass die Methoden von der Aufarbeitung der Proben bis hin zur Messung entwickelt wurden.

Arbeitsfeld 5 – Messung (DIL)

Die ¹H-NMR-Messungen fanden am DIL mit einem 400 MHz Bruker Ascend NMR-Spektrometer statt. In diesem Arbeitsfeld wurden sämtliche authentische Proben für die Messung nach der vorher entwickelten Method vorbereitet und gemessen.

Arbeitsfeld 6 – Auswertung (DIL)

Die Auswertung fand am DIL statt. Während der Messungen fand parallel die erste Auswertung der ¹H-NMR-Spektren statt. Dies diente zur Validierung der Methode und Vergleichbarkeit der Proben untereinander.

Arbeitsfeld 7 – Datenauswertung, Darstellung der Projektergebnisse (DIL)

Die gesamte Auswertung aller gewonnenen Daten fand vom DIL statt. Hier wurden die Daten hinsichtlich aller betrachteten Parameter ausgewertet, mögliche Einflussfaktoren benannt und eine Qualitätssicherungsmethode etabliert und validiert.

Arbeitsfeld 8 – Wissenstransfer (alle)

Der Wissenstransfer wurde von dem DIL vorangetrieben. Die Ergebnisse wurden auf Tagungen vorgestellt und veröffentlicht. Außerdem sollte im Rahmen von Publikation und bspw. dem Zertifikationskurs des DILs die Projektergebnisse in die Praxis transferiert werden.

Bei den relevanten Meilensteinen handelte es sich um folgende:

Meilenstein AP 1:

- Analyse der sich auf dem Markt befindlichen Eier bezüglich ihrer Herkunft, Haltung, Fütterung, Rasse, Alter der Legehennen und Alter des Eis.
- Beschaffung der für die NMR-Spektroskopie notwendigen authentischen Proben.

Meilenstein AP 2:

- Erfolgreiche Methodenentwicklung für die Extraktion und Messung der Proben.

- Analyse des Einflusses der Probenlagerung

Meilenstein AP 3:

- Alle authentischen Proben sind gemessen. Statistische Auswertung hinsichtlich der Einflussfaktoren sind abgeschlossen.
- Validierung des statistischen Modells.

Meilenstein AP 4:

- Datenauswertung ist vollständig abgeschlossen. Die Methode zur Qualitätssicherung der Authentizität und Qualität von Bio-Eiern, berücksichtigt mit sämtlichen Einflussfaktoren, ist abgeschlossen.
- Wissenstransfer in die Wirtschaft

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

2.1 Ei

Die Eiqualität kann in zwei Unterkategorien eingeteilt werden: innere Eiqualität (Eigelb und Eiklar) und Eischalenqualität. Die Eischalenqualität ist abhängig von der Eigröße, -form, -farbe, -oberflächenstruktur, Eischalenstabilität und -dicke. [4] Die innere Eiqualität bezieht sich auf die Farbe des Eigelbs (Roche-Werte), Eiklarqualität (Haugh Unit-Messung), Luftkammerhöhe (Air cell size) und Stärke der Vitellinmembran [5] (Eigelb-umgebende Membran). [6, 7]

Alter der Legehennen und des Eis: Die Auswirkung des Alters der Legehennen sowie des Eies wurde von Silversides, et al. (2001) [8] auf das Gewicht von Schale, Eiklar und Eigelb untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass der Anteil des Eiklars mit dem Alter der Legehennen und des Eies zunimmt. Außerdem ist der Anteil des Eiklars abhängig von der verwendeten Rasse der Legehennen. Der pH-Wert des Eiklars ist bzgl. der zwei Rassen gleich und zeigte eine Abhängigkeit zur Lagerungszeit des Eies. [8-11] Akyurek, et al. (2009) [12] konnten zeigen, dass mit steigendem Alter der Henne, der Lagerungszeit und Lagerungstemperatur des Eies ein Gewichtsverlust zu beobachten ist. Somit seien diese Parameter Einflussfaktoren für die Eiqualität [12]. Generell lässt sich festhalten, dass das Eigewicht mit dem Alter der Legehennen zunimmt [8-13].

Rasse: Zita, et al. (2009) [14] zeigten, dass sich bei drei verschiedene Rassen die Qualität des Eiklars (Haugh Unit) und Eigelbs (Yolk index) voneinander unterscheiden. Somit variiert die Eiqualität zwischen den verschiedenen Rassen der Legehennen. [14, 15]. Neben diesen gängigen Qualitätsnachweisen, mit denen näherungsweise der Proteingehalt und die frische des Eies bestimmbar sind, werden viele weitere wichtige Qualitätsparameter, wie z.B. Mikronährstoffe und Vitamine, nicht berücksichtigt und erfasst.

Haltung: Singh, et al. (2009) [16] haben gezeigt, dass die Haltungsform eine Auswirkung auf das Körpergewicht sowie die Mortalität von Legehennen hat, allerdings zeigen sich keine Einflüsse in Bezug auf Futterkonsum und Fütterungseffizienz. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Legehennen in Bodenhaltung ein höheres Körpergewicht, Eigewicht sowie eine andere Eigelbfarbe haben als Legehennen in Käfighaltung. Hierbei wurden vier verschiedene Rassen betrachtet, drei kommerzielle und eine Kreuzung. [16] Weiterhin ist bekannt, dass die Eigelbfarbe stark abhängig von der Haltungsform ist. So wird bei Eiern aus Freilandhaltung ein höherer Roche-Wert als bei Eiern aus der Käfighaltung beobachtet [13, 17]. Dies lässt sich auf das veränderte Futterangebot durch Gras oder Kräuter zurückführen. Puertas, et al. (2019) [18] konnten zeigen, dass die Aufnahme von UV-VIS- und NIR-Spektren, und damit einhergehend eine indirekte Bestimmung der enthaltenen Carotinoide, einen Hinweis auf die Haltungsform der Legehennen geben kann. Ein ¹H-NMR-spektroskopischer Ansatz würde nicht nur Rückschlüsse auf die Carotinoidgehalte zulassen, sondern die fütterungsbedingten Abhängigkeiten des Inhaltsstoffprofils (Metabolom), detektierbar machen.

Fütterung: 1960 konnte bereits von Marusich, et al. (1960) [19] gezeigt werden, dass Carotinoide im Futter eine Auswirkung auf die Eigelbfarbe haben. Hierbei ist zu unterscheiden, welche Carotinoide beigemischt werden, da z.B. Zeaxanthin das Eidotter gelblich, und bspw. Canthaxanthin rot-orange färbt. Roberson, et al. (2005) [20] haben Fütterungsexperimente an Legehennen bzgl. der Eigelbfarbe durchgeführt. Hierbei wurden als Grundfutter ein Gemisch aus Mais und Soja verwendet, das einen Fütterungszusatz, der Xanthophyll und als Co-produkt aus der Ethanol-Produktion abfällt, enthält. Mit steigendem Anteil des Zusatzes wurde die Eigelbfarbe intensiver.[20] Der Fütterungszusatz kann je nach Carotinoidgehalt und Zusammensetzung eine Auswirkung auf die Farbe des Eigelbs haben [19-23] und lässt sich demnach ebenfalls mittels NMR-Spektroskopie detektieren.

2.2 NMR-Spektroskopie

Die *nuclear magnetic resonance* (NMR) Spektroskopie wird hauptsächlich zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen genutzt. Im Bereich der Metabolomik gewinnt die NMR-Spektroskopie

immer größere Bedeutung, da hier innerhalb einer einzigen Messung alle Moleküle des Metaboloms, vorausgesetzt sie liegen über der physikalisch bedingten Detektionsgrenze (mikromolarer Bereich), detektiert werden können. Hauptsächlich wird für die Messungen die eindimensionale ^1H pulse-Sequenz genutzt. In diesem Zusammenhang gibt es zwei Hauptanwendungen – NMR-Spektroskopie mit Lösungen für die Detektion löslicher Metaboliten aus Zelllysaten oder Gewebeextrakten (1) und die HR-MAS (*high resolution magic angle spinning*) für die Messung von Metaboliten in semi-festen Proben wie bspw. Geweben (2) [24]. Im Lebensmittelbereich findet zumeist die ^1H -NMR-Spektroskopie als Authentizitäts- und Inhaltsstoffanalyse Anwendung [25], wozu hauptsächlich *high-field*-NMR-Spektrometer zur Analyse von Proben in Lösung Anwendung finden. Durch die Messung wird das Inhaltsstoffprofil der gelösten bzw. extrahierten Lebensmittelprobe als Spektrum dargestellt. Einzelne Inhaltsstoffe können über ihre charakteristischen Signale quantitativ bestimmt (targeted; zielgerichtet) und zusätzlich das gesamte Spektrum als non-targeted Analyse statistisch ausgewertet werden. Dieses Verfahren wird bereits für Fruchtsaft [26], Wein [26], Honig [27], Haselnuss [28] und Kaffee [29] als Qualitäts- und Authentizitätsprüfung angewandt. Durch den Abgleich mit einer Datenbank auf der Grundlage einer großen Anzahl an Referenzspektren, kann ein Authentizitätsnachweis mit abschließender Bewertung der Qualität einer Lebensmittelprobe erfolgen. Zur Erstellung entsprechender Datenbanken werden die Spektren, bspw. durch lineare Diskriminanzanalyse oder analysis of variances (ANOVA), statistisch ausgewertet, indem Bereiche in den Spektren identifiziert werden, die mit einem oder mehreren der gesuchten Qualitätsparameter, wie beispielsweise Frische oder Haltungsform, korrelieren.

2.3 Authentizitätsprüfung von Eiern mittels ^1H -NMR-Spektroskopie

Zur Authentizitätsprüfung von Eiern mittels ^1H -NMR-Spektroskopie konnte nur eine aktuelle Publikation gefunden werden. Ackermann, et al. (2019) [3] beschreiben, dass sich durch die statistische Auswertung von 344 ^1H -NMR-Spektren von Eigelbproben, Eier aus konventioneller Haltung ($n = 214$; Freiland: 61; Boden: 153) und aus ökologischer Haltung ($n = 130$), anhand ihrer Unterschiede im detektierten Metabolom mit einer 93 %igen statistischen Sicherheit voneinander unterscheiden lassen [3]. Aufgrund des großen Probenumfangs von $n > 4.000$ in diesem Projekt, und somit einer großen Stichprobe, ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass diese große Stichprobe die Grundgesamtheit aller Eier besser widerspiegelt als kleinere Stichproben aus der Literatur.

3. Material und Methoden

3.1. NMR-Methode

3.1.1. Aufarbeitungsmethode

Die Aufarbeitungsmethode ist angelehnt an die beschriebene Methode von Ackermann, et al. (2019) [3]. Das Ei wird aufgeschlagen und das Eigelb vom Eiweiß getrennt. 3 g des Eigelbs werden abgewogen, für 1 h bei -20°C gelagert und für 18 h in die Gefriertrocknung gestellt. Im Anschluss daran wird das getrocknete Eigelb in dem Probengefäß zu einem feinen Pulver gemörsert. 100 mg des Probenmaterials werden in 938 µL Chloroform-Methanol-Wasser (10:5:1) mit zwei Edelstahl-Beads (Durchmesser: 3,2 mm) im Homogenisator (Bead Ruptor Elite Bead Mill Homogenisator; Omni International) für zweimal 30 s bei 3,1 m/s homogenisiert. Im Anschluss daran werden die Proben für 10 min in dem Thermoschüttler (Auslenkung: 3 mm; Hettich MKR 13, Hettich GmbH & Co. KG) bei 800 rpm und 22°C geschüttelt. Nach der Extraktion wurden die Proben bei 14000 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert (Rotorradius: 85 mm, Hettich Universal 320 R, Hettich GmbH & Co. KG). Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt, 62,5 µL 0,05 M NaCl-Lösung hinzugegeben und für 10 s auf den Vortexer (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) gestellt. Die Proben werden bei 14000 rpm und 4°C für 3 min zentrifugiert. 400 µL der organischen Phase (gelbe Farbe; unten) werden in ein neues Gefäß überführt und unter Stickstoff bei 50°C für 60 min abgedampft. Das getrocknete Pellet wird in 400 µL CDCl₃-*d*1 gelöst. Es folgt ein zweiter Abdampfungsschritt unter Stickstoff bei 50°C für 180 min. Das getrocknete Pellet wird in 800 µL CDCl₃-*d*1/MeOD-*d*3 (3:2) mit 3 mM Trimethoxybenzol und 0,03 % Tetramethylsilan als internen Standard gelöst. Nach kurzem vortexen werden 600 µL der Lösung in ein NMR Röhren (5 mm, Deutero GmbH) überführt.

3.1.2. Messmethode

Die Messungen finden mit einem 400 MHz Ascend NMR-Spektrometer von Bruker Biospin GmbH statt. Die ¹H-NMR Spektren werden mit einem zg Pulsprogramm und folgenden Parametern aufgenommen: Pulse angle: 90°, pulse time: 8.110 µs, spectral width: 8223 Hz, number of points: 65536, number of scans: 128, number of dummy scans: 4, acquisition time: 3,9 s, relaxation delay: 6,0 s. Eine Messung dauert ca. 30 min. Für Lock und Shim wird das Methanolsignal verwendet.

Das ¹H-¹³C-HSQC wurde mit folgenden Parametern gemessen: Pulsprog: hsqcetgpsisp2.2, spectral width F1: 165 ppm F2: 11 ppm; number of points F1: 256 F2: 2048, number of scans: 8, number of dummy scans: 64, acquisition time F1: 0,0077 s F2: 0,2327 s, relaxation delay: 2,0 s.

Das ¹H-¹³C-HMBC wurde mit folgenden Parametern gemessen: Pulsprog: hmbcetgpnd, spectral width F1: 220 ppm F2: 11 ppm; number of points F1: 256 F2: 2048, number of scans: 16, number of dummy scans: 32, acquisition time F1: 0,0058 s F2: 0,2327 s, relaxation delay: 2,0 s.

Das ^1H - ^1H -TOCSY wurde mit folgenden Parametern gemessen: Pulsprog: mlevphpp, spectral width F1: 3 ppm F2: 3 ppm; number of points F1: 256 F2: 2048, number of scans: 8, number of dummy scans: 16, acquisition time F1: 0,1066 s F2: 0,8531 s, relaxation delay: 2,0 s. Bei der ersten Messung wurde O1 auf 2 ppm, bei der zweiten Messung auf 5 ppm gesetzt, um den gesamten Bereich des Spektrums abdecken zu können.

Die Messung und Prozessierung aller Spektren wird mit der Software Topspin 3.5 pl 7 (Bruker Biospin GmbH) durchgeführt.

3.1.3. Standards

Für den Abgleich der in den NMR-Spektren sichtbaren Signale wurden neben dem Literatur- und Datenbankabgleich die drei Hauptstandardkomponenten mit den unter 3.1.2 erwähnten Methoden gemessen. Hierbei handelt es sich um L- α -Phosphatidylcholin from egg yolk ($\geq 99\%$; Sigma Aldrich), L- α -Phosphatidylethanolamine from egg yolk ($\geq 97\%$; Sigma Aldrich) und Cholesterol ($\geq 95\%$; Sigma Aldrich). Es wurde jeweils 1 mg der Standardsubstanz in 1 mL CDCl_3 -*d*1/MeOD-*d*3 (3:2) mit 3 mM Trimethoxybenzol (TMB) und 0,03 % Tetramethylsilan (TMS) gelöst. 600 μL der Lösung wurden in ein NMR tube (5 mm, Deutero GmbH) überführt.

3.1.4. Präzision

Die Messpräzision wird wöchentlich kontrolliert, in dem eine Standardlösung (90 % H_2O , 10 % D_2O , Kaliumphosphatpuffer, NaN_3 , Natriumtrimethylsilylpropionat (TSP), Zitronensäure (18 g/L); QuantRefA, 600 μL ; Bruker Biospin GmbH) gemessen wird. Die wöchentlichen Ergebnisse werden miteinander verglichen und die Standardabweichung berechnet. Eine relative Standardabweichung $\pm 2\%$ wird als ausreichend betrachtet. Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit wurde die gleiche Probe zehnmal aufgearbeitet und die resultierenden NMR-Spektren miteinander verglichen. Für den Vergleich wurden die Signale in den ^1H -NMR-Spektren integriert, sowie ihre Standardabweichung berechnet.

3.2 Lagertest

Für den Lagertest wurden 105 frische Eier von B-004 verwendet. Die Lagerungsart variierte zwischen Kühlung (8°C), Tiefgefrieren (-20°C), Gefriertrocknung mit Lagerung (-20°C). Die Probenahme erfolgte nach 0, 7, 14, 21, 28, 35 und 42 Tagen. Es wurden jeweils pro Probenahme 5 Eier verwendet.

- a. 35 Eigelb direkt an dem gekauften Tag gefriertrocknen und bei -20°C lagern
- b. 35 Eigelb bei -20°C einfrieren

c. 35 Eier im Kühlschrank bei +8°C lagern

Die Probenaufarbeitung und -messung wurde, wie in 2.1.1 und 2.1.2 beschrieben, durchgeführt.

3.3 Methode für physikalische Parameter

Aus dem Probenumfang von je 100 Eiern werden 10 Eier für die physikalische Untersuchung verwendet. Das Gewicht der Eier wird bestimmt. Die Größe der Luftblase wird mittels einer Schierlampe und einem Lineal bestimmt. Im Anschluss wird das Ei auf einer Glasplatte aufgeschlagen. Die Farbe des Eigelbs wird mit dem Roche-Fächer bestimmt. Falls Blutflecken vorhanden sind, werden diese gezählt. Die Breite und Höhe des Eigelbs, sowie die Höhe des Eiweiß (1 cm neben dem Eigelb) werden mittels eines Lineals gemessen. Für die Gewichtsverteilung werden weitere 10 Eier ausgewogen. Es wird das Gewicht des gesamten Eis, des Eigelbs und des Eiweiß bestimmt. Aus diesen Daten kann die Haugh Unit [30] und der Yolk Index [31] berechnet werden.

$$\text{Haugh Unit} = 100 \cdot \log (\text{Höhe des Eiklars [mm]} - (1,7 \cdot \text{Gewicht des Eis [g]}^{0,37} + 7,6)) \quad (1)$$

$$\text{Yolk Index} = \frac{\text{Höhe des Eigelbs [mm]}}{\text{Breite des Eigelbs [mm]}} \quad (2)$$

Die Haugh Unit kann Werte zwischen 0 und 130 annehmen, der mit der Güteklasse der Eier zusammenhängt. Die Einteilung der Werte in Güteklassen ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Angabe der Haugh Unit-Werte für die jeweilige Güteklasse.

Güteklasse	Haugh Unit
A+	> 72
A	60 – 71
B	31 – 59
C	< 30

Der Yolk Index hängt mit der Frische des Eis zusammen. Je frischer das Ei, desto höher der Yolk Index.

3.4 Statistische Auswertung

Die Datenanalyse findet mit der Software Matlab R2018a (The Mathworks) statt. Die Signalintensitäten der ¹H-NMR-Spektren werden in Relation zum Signal des internen Standards TMB skaliert, damit sie untereinander vergleichbar sind. Für die statistische Analyse werden die skalierten ¹H-NMR-Spektren in 682 Buckets (gleich große Bereiche im Spektrum) von 0.5 bis 8 ppm eingeteilt. Die Lösemittel-Signale bei 3.35 ppm (MeOD) und bei 4.5 ppm (D₂O) werden exkludiert. Die statistische Analyse basiert auf einer Hauptkomponentenanalyse zur Dimensionsreduktion und anschließend einer linearen Diskriminanzanalyse (LDA). Um das LDA-Modell zu testen, wurde ein Test- (20% der Daten) und

Modelset (80% der Daten) angelegt. Mit dem Modelset wird das Modell berechnet, das Testset dient dazu, das berechnete Modell zu prüfen.

Lagertest: Die Signalintensitäten der ^1H -NMR-Spektren werden in Relation zum Signal des internen Standards TMB skaliert, damit sie untereinander vergleichbar sind. Es wurden 30 Integrale über das gesamte Spektrum definiert, die auch für die Überprüfung der Messpräzision verwendet wurden (Tabelle 3). Von den Integralen der jeweils 5 Proben pro Lagerart und Dauer wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Zur weiteren Beurteilung von signifikanten Veränderungen der Integrale mit der Lagerdauer wurde der Korrelationskoeffizient ($\alpha = 0,05$) berechnet.

4. Ergebnisse

4.1. Methodenentwicklung (AP 2, DIL)

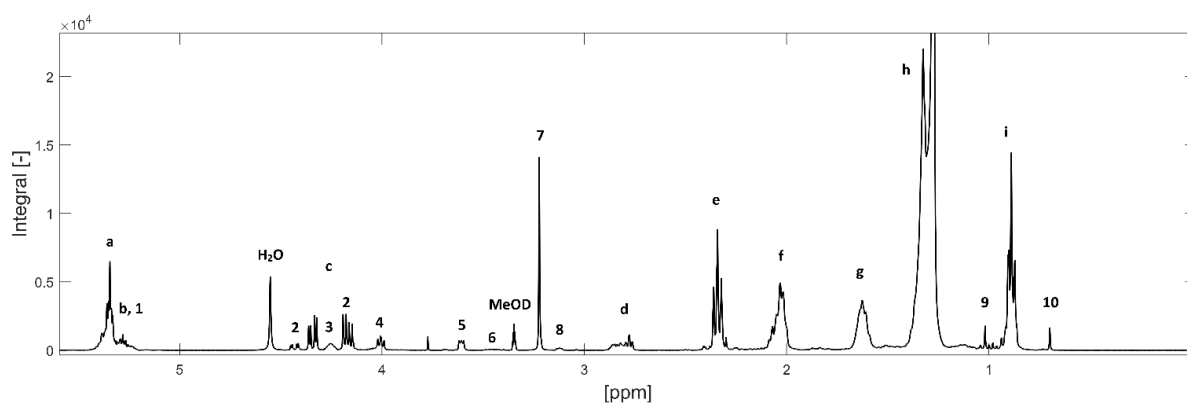


Abbildung 2: Darstellung des ^1H -NMR-Spektrums eines Eigelb-Extrakts in $\text{CDCl}_3\text{-}d_1/\text{MeOD-}d_3$ (3:2). Die Buchstaben a bis i bezeichnen die Signale im Spektrum, die mit Triacylglyceriden und ihren Fettsäuren (FS) zusammenhängen. b und c: Glycerol Rückgrat, a: Vinyl-Wasserstoff, f: Allylic-methylen Wasserstoff aller ungesättigter Fettsäuren, d: CH_2 -bis-allylic Wasserstoff von PUFA (ω -3 und ω -6 FS), e: Methylen-Gruppe an Carbonyl α -position, g: Methylen-Gruppe an Carbonyl β -position, h: Ethyl-Gruppe, i: Methyl-Gruppe von FS. Die Nummer hängen mit den Signalen der Phospholipide und Cholesterol zusammen. Nummer 1, 2, 4 gehört zum Glycerol Rückgrat, 3, 5, 7 zu Phosphatidylcholin, 4 und 8 zu Phosphatidylethanolamin und 6, 9, 10 zu Cholesterol. Signalzuordnung durch Ackermann, et al. (2019) [3].

Die 1-dimensionale NMR-Messung von Wasserstoffatomen gibt Aufschluss über die, in organischen Verbindungen enthaltenen, Wasserstoffatome in der Probe. Die Position eines Wasserstoffatoms im NMR-Spektrum ist von seiner chemischen Verschiebung, also der Abschirmung des Wasserstoffkerns durch Elektronen, abhängig. Die Abschirmung der einzelnen Wasserstoffatome wird von seinen intra- und intermolekularen Nachbaratomen und deren Wechselwirkungen beeinflusst. Jedes Wasserstoffatom liefert somit ein individuelles Signal. Durch dieses Prinzip ist die NMR-Spektroskopie neben der Strukturaufklärung von organischen Verbindungen auch für ein non-targeted Screening der Inhaltsstoffe geeignet.

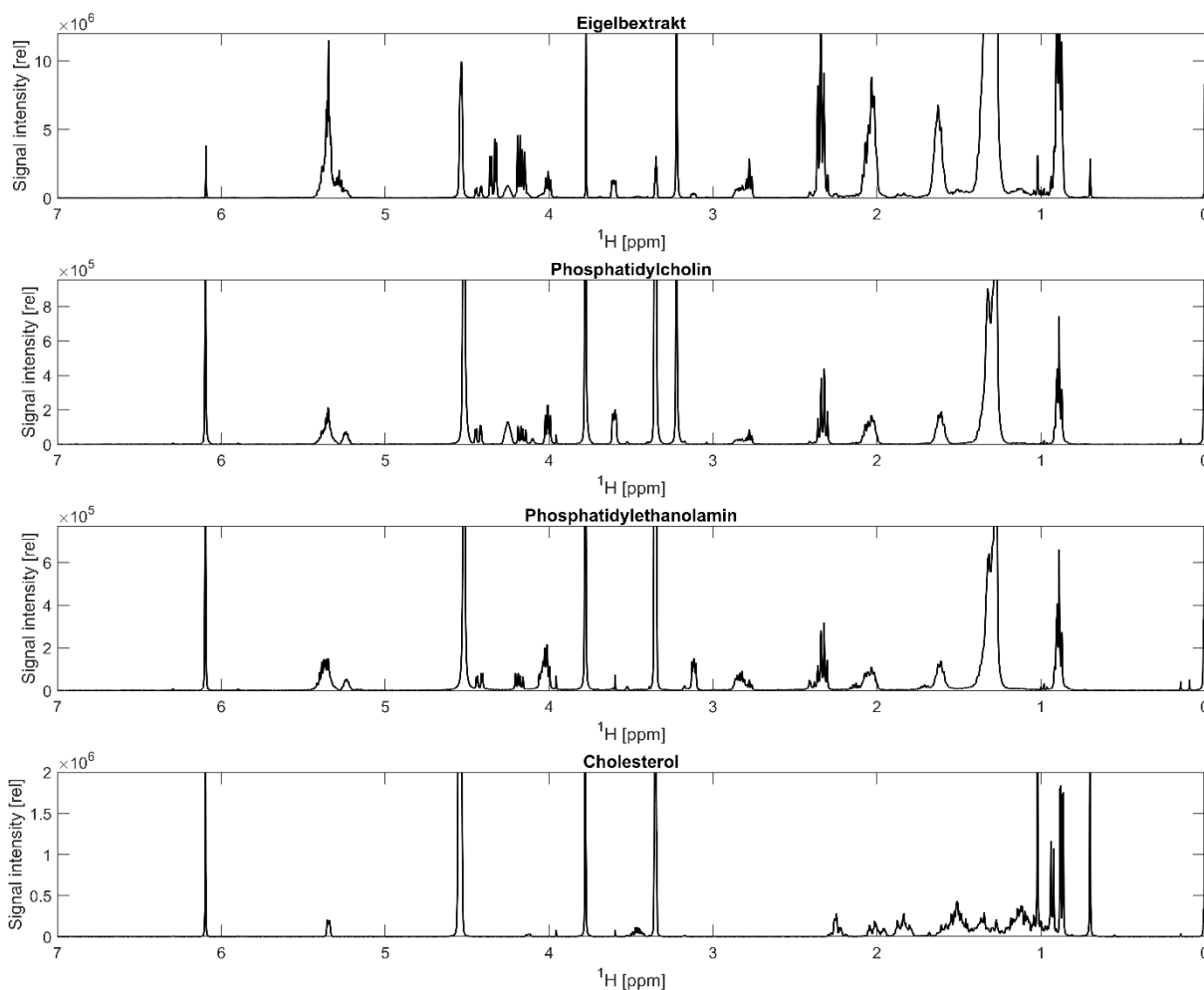


Abbildung 3: Darstellung der ^1H -NMR-Spektren des Eigelbextrakts, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterol in $\text{CDCl}_3\text{-}d_1/\text{MeOD-}d_3$ (3:2).

In Abbildung 2 ist das ^1H -NMR-Spektrum einer Ei-Probe dargestellt. Die jeweiligen Signale sind ihrer jeweiligen Verbindung zugeordnet. Die Fläche unter den Signalen (Integrale) ist abhängig von der Anzahl der Wasserstoffatome, die dieses Signal verursachen, und steht indirekt im Zusammenhang mit der Konzentration der jeweiligen organischen Verbindung in der Probe. Das Spektrum wurde mit den Spektren von Ackermann, et al. (2019) [3] sowie den Spektren der gemessenen Standards Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterol verglichen.

In Abbildung 3 sind die ^1H -NMR-Spektren des Eigelbextraktes sowie der drei Standards abgebildet. In diesem Vergleich zeigt sich, dass Zusammenhänge zwischen den jeweiligen Signalen im Eigelbextrakt und den jeweiligen Standardkomponenten bestehen. Diese Ergebnisse unterstützen die Aussagen und

Signalzuordnung von Ackermann, et al. (2019) [3]. Um die Identifizierung der Signale weiter zu verifizieren, wurden auch die HSQC-, HMBC- und TOCSY-Spektren der Eigelbextraktprobe und der jeweiligen Standards betrachtet und miteinander verglichen (Abbildung 4 bis Abbildung 7).

Die Messung eines ^1H - ^{13}C -HSQC (Abbildung 4) ist eine 2-dimensionale Methode, in der die chemische Verschiebungen von Wasserstoffatomen (^1H) und Kohlenstoffisotopen (^{13}C) korreliert werden. Die vertikale Achse stellt die Protonenverschiebung, die horizontale Achse die ^{13}C -Verschiebung dar. Bei dem HSQC wird die direkte Bindung H-C betrachtet. Durch diese Messung können die Signale der Standardkomponenten im HSQC mit denen im Eigelbextrakt-HSQC verglichen werden.

Eine weitere 2-dimensionale Messung ist das ^1H - ^{13}C -HMBC (Abbildung 5). Hierbei werden wie im HSQC die chemischen Verschiebungen der Wasserstoffatomen und Kohlenstoffisotopen miteinander korreliert. Allerdings wird im HMBC nicht die H-C-Bindung betrachtet, sondern über mehrere Bindungen hinaus gebundene Nuklide wie **H-C-C** und **H-C-C-C**. Dadurch werden zusätzliche Informationen über die intramolekulare Struktur der Verbindung erhalten und ein Rückschluss auf die potenziellen Nachbaratome ist möglich. In diesem Fall werden die HMBC-Spektren der Eigelbextraktprobe mit denen der Standards verglichen, um die Identifizierung der Signale noch stärker abzusichern.

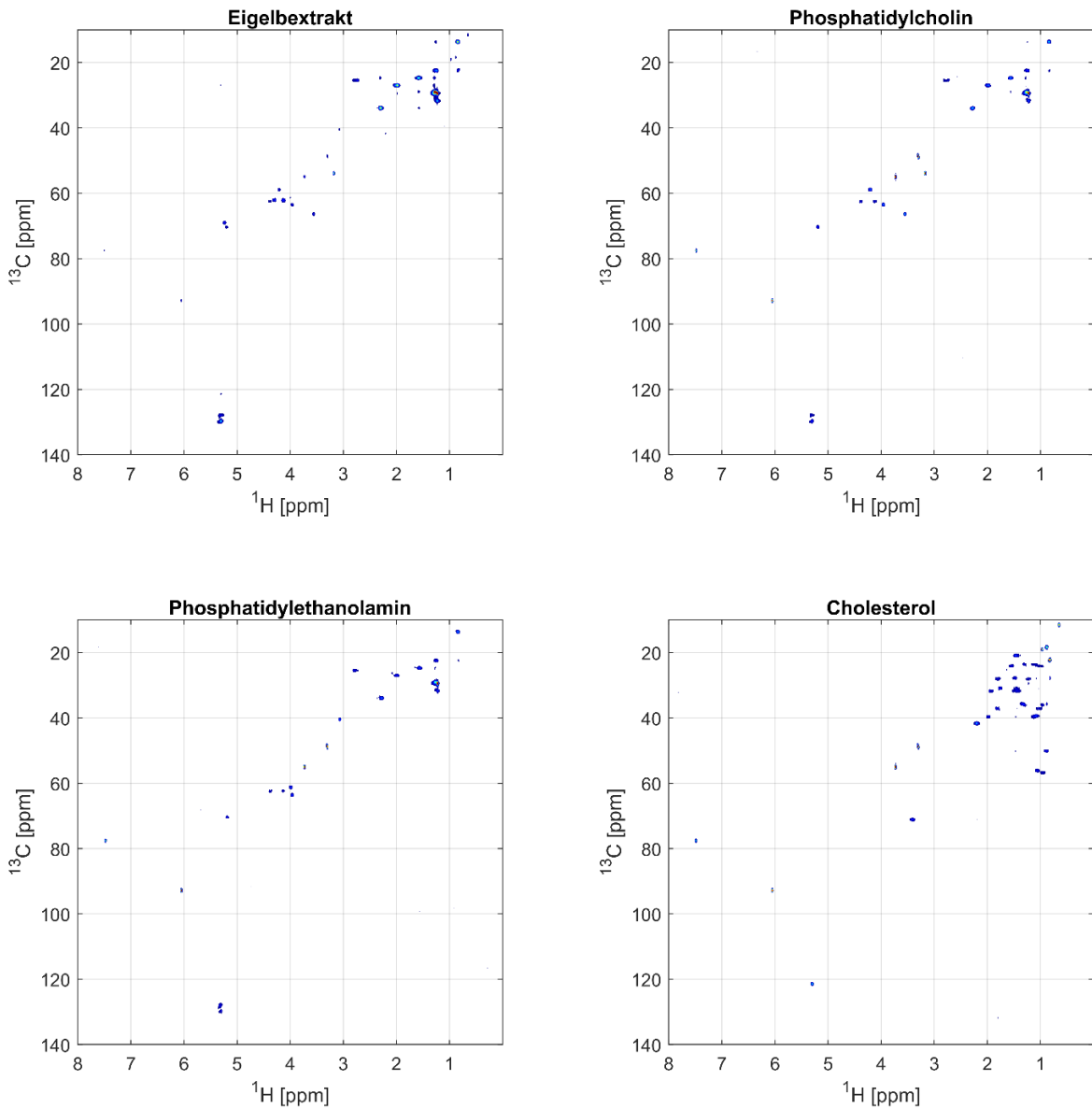


Abbildung 4: Darstellung der ^1H - ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren des Eigelbextrakts, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterol in $\text{CDCl}_3\text{-}d_1/\text{MeOD-}d_3$ (3:2).

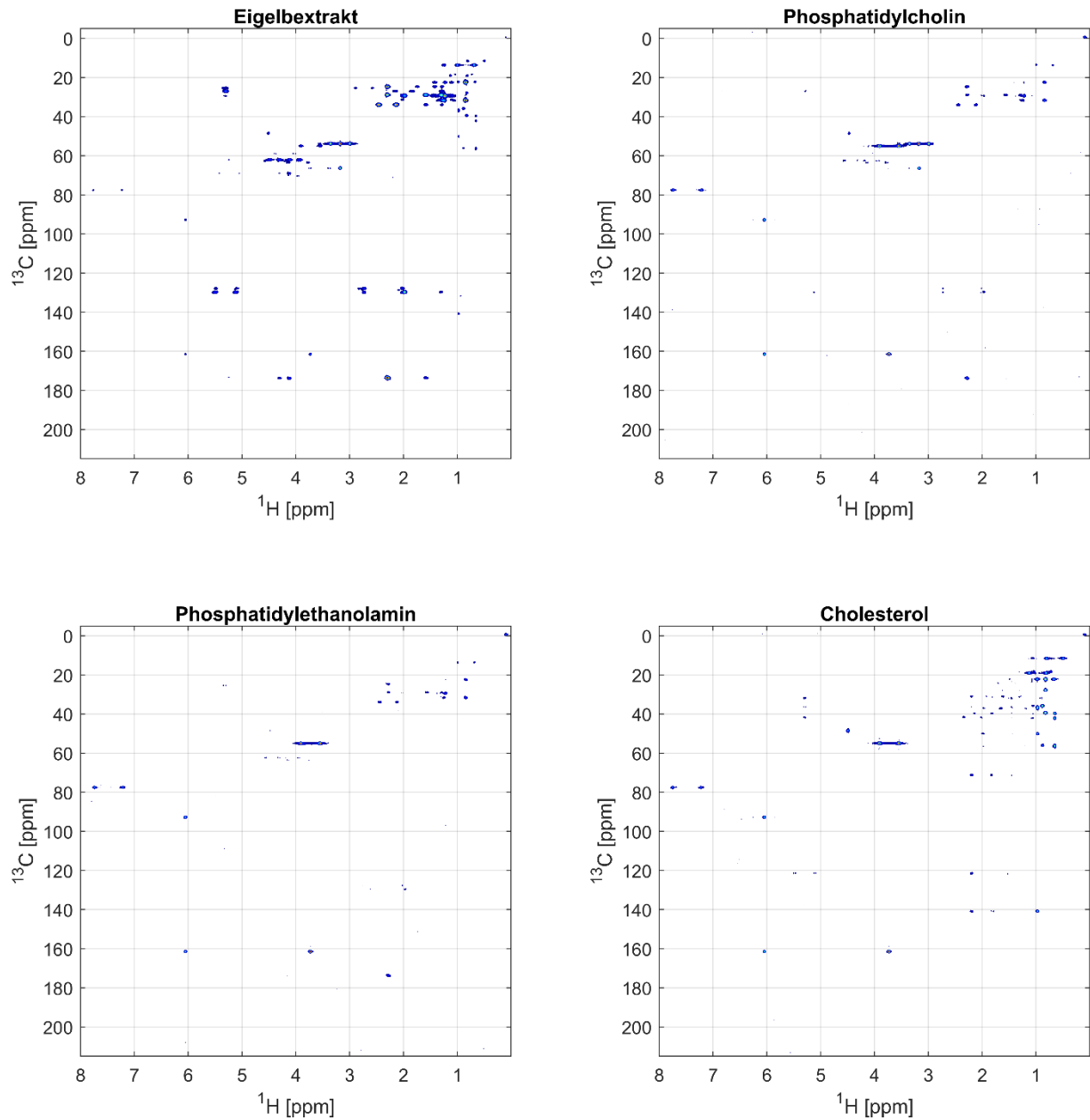


Abbildung 5: Darstellung der ^1H - ^{13}C -HMBC-NMR-Spektren des Eigelbextrakts, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterol in $\text{CDCl}_3\text{-}d_1/\text{MeOD-}d_3$ (3:2).

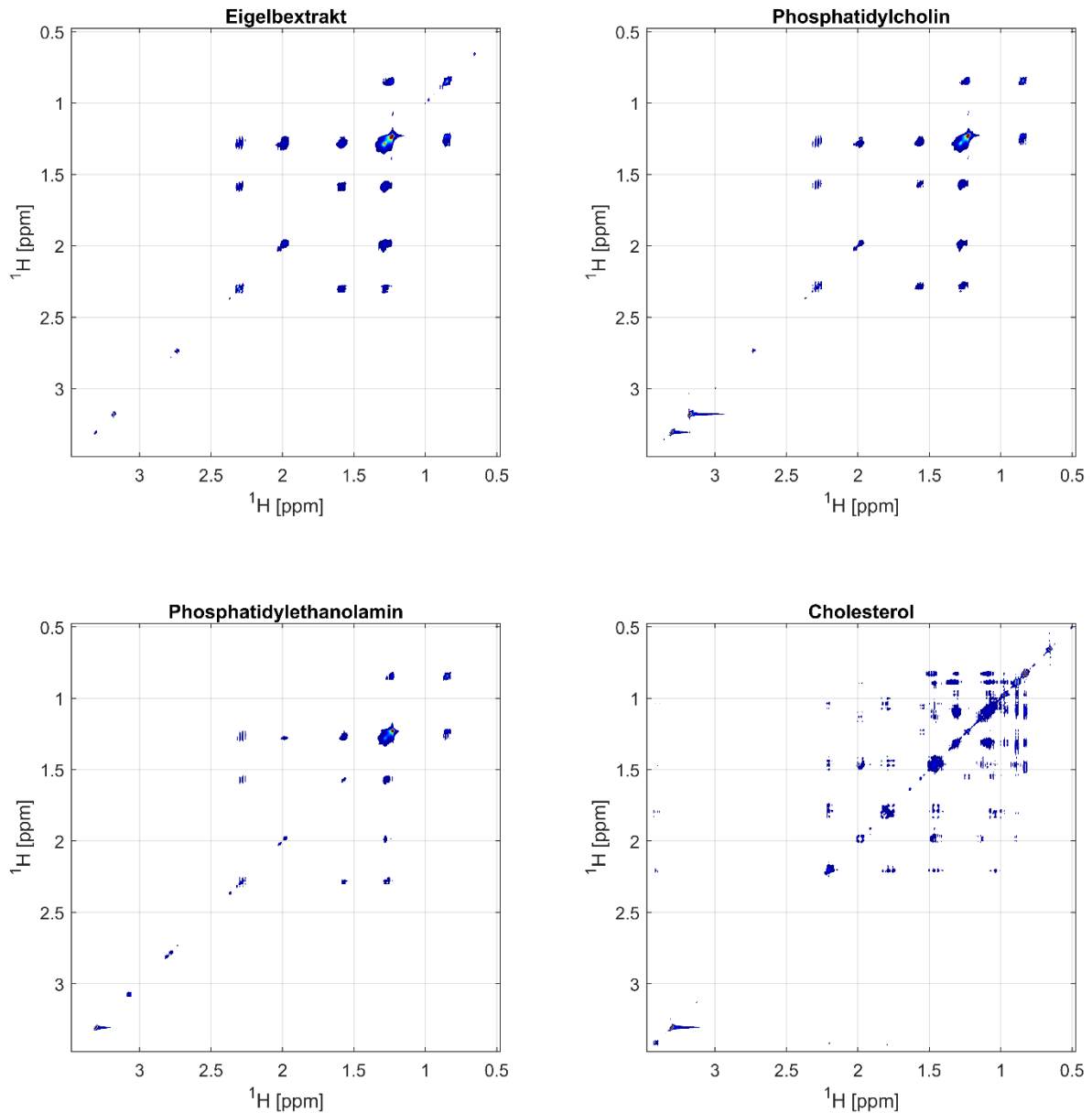


Abbildung 6: Darstellung ^1H - ^1H -TOCSY-NMR-Spektren des Eigelbextrakts, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterol in $\text{CDCl}_3\text{-}d_1/\text{MeOD-}d_3$ (3:2). Der ppm-Bereich wurde von 0,5 bis 3,5 ppm aufgenommen.

Eine 2-dimensionale homonukleare Messung ist das ^1H - ^1H -TOCSY (Abbildung 6 und Abbildung 7). Hiermit können die Kopplungen zwischen den Wasserstoffatomen gemessen und miteinander korreliert werden. Im TOCSY werden auch Korrelationen zwischen dem Ausgangskern und indirekt verbundenen Kernen (über mehrere Kopplungen hinaus) dargestellt.

Insgesamt betrachtet, lassen sich mithilfe der 2-dimensionalen NMR-Spektren die Signale im Eigelbextrakt-Spektrum sicher den Signalen der Standards zuordnen. Bei Cholesterol können nur drei Signale im Eigelbextrakt-Spektrum identifiziert werden, da die weiteren Cholesterol-Signale im Verhältnis deutlich kleiner sind und somit von Signalen anderer Verbindungen überlagert werden.

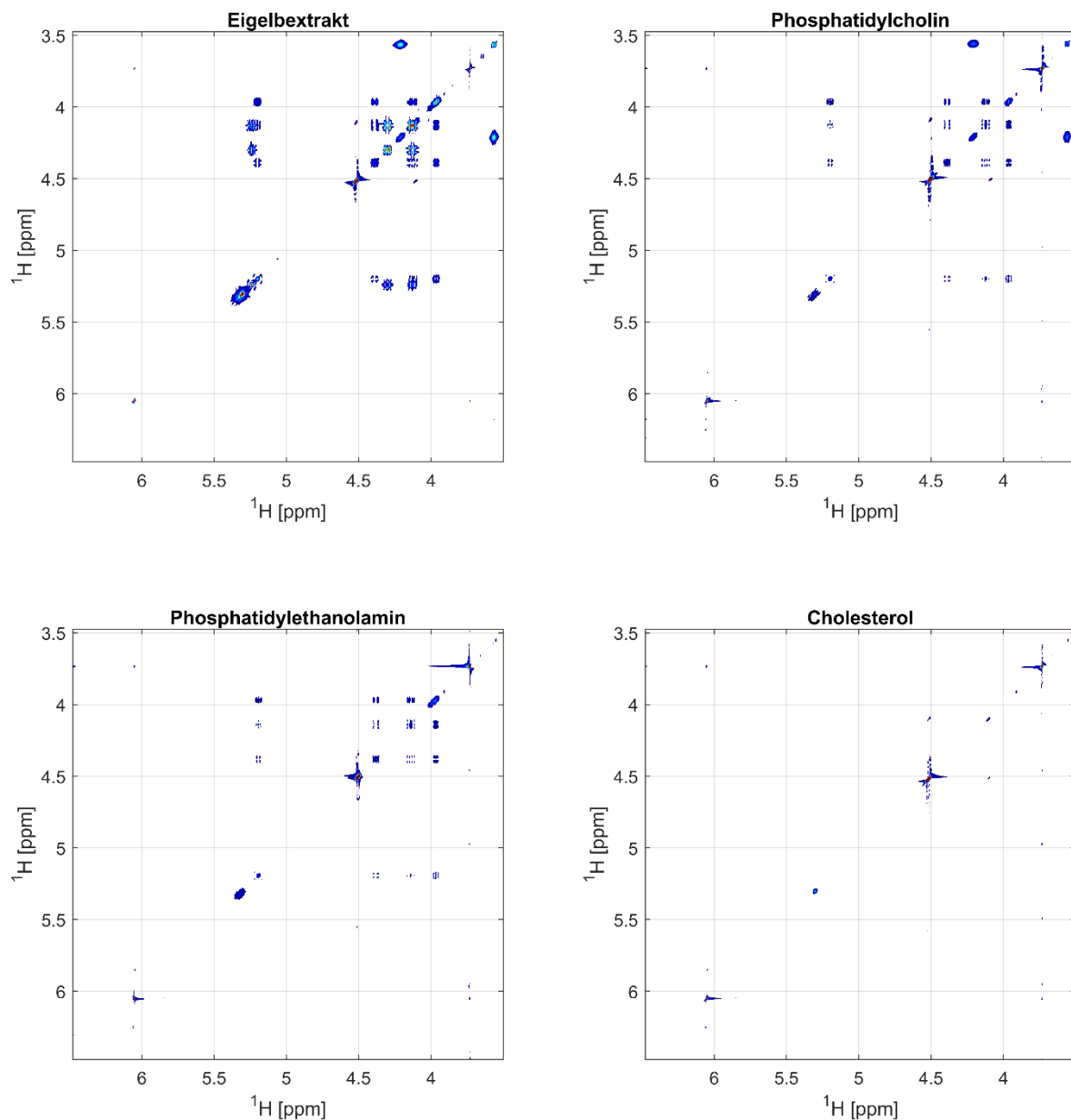


Abbildung 7: Darstellung ^1H - ^1H -TOCSY-NMR-Spektren des Eigelbextrakts, Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterol in $\text{CDCl}_3\text{-}d_1/\text{MeOD-}d_3$ (3:2). Der ppm-Bereich wurde von 3,5 bis 6,5 ppm aufgenommen.

4.2 Ergebnisse zur Präzision der Methode

Die ¹H-NMR-Spektren wurden mit den in Tabelle 3 dargestellten Integralgrenzen integriert. Die daraus resultierende Integralwerte wurden gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Um diese besser in Relation zu den weiteren Integralen setzen zu können, wurde die relative Standardabweichung berechnet. Die Werte sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 3: Integralgrenzen der Integrale 1-30.

Integral	von [ppm]	bis [ppm]	Integral	von [ppm]	bis [ppm]	Integral	von [ppm]	bis [ppm]
1	0,6520	0,7730	11	2,2712	2,4655	21	3,6569	3,7139
2	0,7731	0,9545	12	2,4656	2,5361	22	3,7488	3,8089
3	0,9546	1,0621	13	2,5821	2,6474	23	3,8090	3,9685
4	1,0622	1,1920	14	2,6964	2,9109	24	3,9686	4,0887
5	1,1921	1,4384	15	3,0214	3,0608	25	4,0888	4,2156
6	1,4385	1,5578	16	3,0808	3,1528	26	4,2157	4,2965
7	1,5579	1,7530	17	3,1529	3,3057	27	4,2966	4,3900
8	1,7531	1,9245	18	3,3191	3,3799	28	4,3901	4,4702
9	1,9246	2,1167	19	3,4096	3,5083	29	5,0650	5,6000
10	2,1168	2,2711	20	3,5551	3,6568	30	7,2420	7,4200

Die berechnete relative Standardabweichung für die Messpräzision liegt bei jeder Messung im Bereich von $\pm 2\%$. Für die Methodenpräzision sind die Ergebnisse in Tabelle 4 dargestellt. Die relative Standardabweichung aller Integrale liegt unter 5% .

Abschlussbericht 2024 – OekoEiSpec (FKz: 2819OE055)

Tabelle 4: Berechnete Integrale aus den NMR-Spektren der 10fach aufgearbeiteten Proben. M: Mittelwert, STD: Standardabweichung, rel. STD: relative Standardabweichung in %.

Integral	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10	M	STD	rel. STD [%]
1	12,36	12,65	12,49	12,63	12,31	11,78	12,06	12,07	12,46	11,92	12,27	0,30	2,44
2	325,46	334,30	326,29	333,46	323,00	307,79	319,19	321,77	333,67	314,75	323,97	8,65	2,67
3	29,58	30,04	29,64	30,17	29,33	27,84	28,61	28,71	29,91	28,37	29,22	0,79	2,71
4	37,34	38,67	38,03	39,45	38,18	35,71	36,70	36,95	38,17	36,71	37,59	1,11	2,95
5	2015,72	2071,07	2015,83	2050,82	1988,40	1909,04	1978,63	1996,29	2068,87	1944,45	2003,91	52,37	2,61
6	31,17	31,62	30,92	31,71	30,83	29,12	30,05	30,20	31,49	29,86	30,70	0,86	2,81
7	199,31	204,59	199,21	202,62	196,42	188,56	195,47	197,34	204,56	192,22	198,03	5,19	2,62
8	14,41	14,67	14,40	14,77	14,35	13,54	13,93	14,05	14,61	13,83	14,26	0,40	2,83
9	246,80	253,92	246,70	250,56	242,85	234,06	242,68	245,02	253,89	237,93	245,44	6,44	2,62
10	14,40	14,55	14,29	14,37	14,04	13,43	13,80	13,90	14,44	13,62	14,08	0,38	2,73
11	196,10	201,17	195,75	198,38	192,56	185,60	192,32	194,09	201,08	188,54	194,56	5,06	2,60
12	1,40	1,38	1,35	1,37	1,34	1,26	1,34	1,34	1,41	1,32	1,35	0,04	3,26
13	0,56	0,57	0,56	0,59	0,58	0,52	0,54	0,54	0,59	0,57	0,56	0,02	3,84
14	52,53	53,05	52,11	52,24	51,10	49,14	50,62	50,92	52,76	49,70	51,42	1,33	2,59
15	0,59	0,57	0,58	0,56	0,56	0,54	0,54	0,56	0,56	0,54	0,56	0,02	3,03
16	4,53	4,47	4,44	4,37	4,35	4,15	4,24	4,26	4,38	4,16	4,33	0,13	2,97
17	87,55	86,10	85,90	83,93	83,55	80,41	81,62	81,62	84,31	80,12	83,51	2,53	3,04
18	15,89	15,79	15,89	15,71	15,90	15,84	15,82	15,76	15,71	15,79	15,81	0,07	0,44
19	3,95	3,93	3,88	3,85	3,78	3,64	3,74	3,76	3,88	3,66	3,81	0,11	2,79
20	20,11	19,75	19,71	19,26	19,17	18,45	18,72	18,74	19,35	18,39	19,17	0,58	3,03
21	1,43	1,35	1,35	1,35	1,30	1,25	1,29	1,30	1,37	1,28	1,33	0,05	3,92
22	3,52	3,49	3,49	3,49	3,51	3,49	3,49	3,48	3,49	3,50	3,49	0,01	0,40
23	3,09	2,88	2,98	2,95	2,90	2,70	2,85	2,86	2,97	2,84	2,90	0,10	3,61
24	28,61	28,13	28,08	27,53	27,35	26,27	26,72	26,75	27,66	26,28	27,34	0,81	2,97
25	62,58	64,33	62,52	63,54	61,59	59,29	61,52	62,15	64,36	60,34	62,22	1,63	2,62
26	19,80	19,50	19,45	19,04	18,92	18,23	18,50	18,52	19,13	18,18	18,93	0,56	2,96
27	48,15	50,08	48,38	49,54	47,72	46,08	47,97	48,60	50,35	47,02	48,39	1,33	2,75
28	11,83	11,67	11,72	11,44	11,32	11,01	11,06	11,19	11,56	10,96	11,38	0,32	2,78
29	213,68	218,54	213,10	215,37	209,33	201,78	208,73	210,58	218,21	204,66	211,40	5,49	2,60
30	0,35	0,33	0,32	0,37	0,35	0,32	0,33	0,32	0,33	0,32	0,33	0,02	4,80

4.3. Lagertest (AP 2, DIL)

Hintergrund des Lagertests war eine geeignete Lagerungsart für die authentischen Proben zu finden, um das Inhaltsstoffprofil des Eis über einen Zeitraum von bis zu 42 Tagen bestmöglich zu erhalten. Die Proben sollten mindestens bis zur Aufarbeitung für die $^1\text{H-NMR}$ -Messung lagerfähig sein. Im Optimalfall lässt die ausgewählte Lagerungsart auch eine längere Aufbewahrung über die gesamte Projektlaufzeit zu. Aus diesem Grund wurden drei verschiedene Lagerungsarten betrachtet: Kühlung, Tiefgefrieren und Gefriertrocknung plus Tiefgefrieren.

Alle 105 $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aus den verschiedenen Proben wurden miteinander verglichen und der Korrelationskoeffizient mit der Lagerdauer berechnet. Korrelationskoeffizienten weisen Werte zwischen -1 und +1 auf, wobei ± 1 für eine starke Korrelation und 0 für keine Korrelation steht. Die Integrale der Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum korrelieren mit der Konzentration des jeweiligen Inhaltsstoffs, der das Signal verursacht. Somit kann über die Auswertung der Integrale indirekt auf eine Konzentrationsveränderung des jeweiligen Inhaltsstoffs oder auf Veränderungen in den Verhältnissen zwischen den Inhaltstoffen geschlossen werden.

Die Integrale der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von den Proben der jeweiligen Lagerungsart wurden graphisch gegen die Lagerdauer aufgetragen.

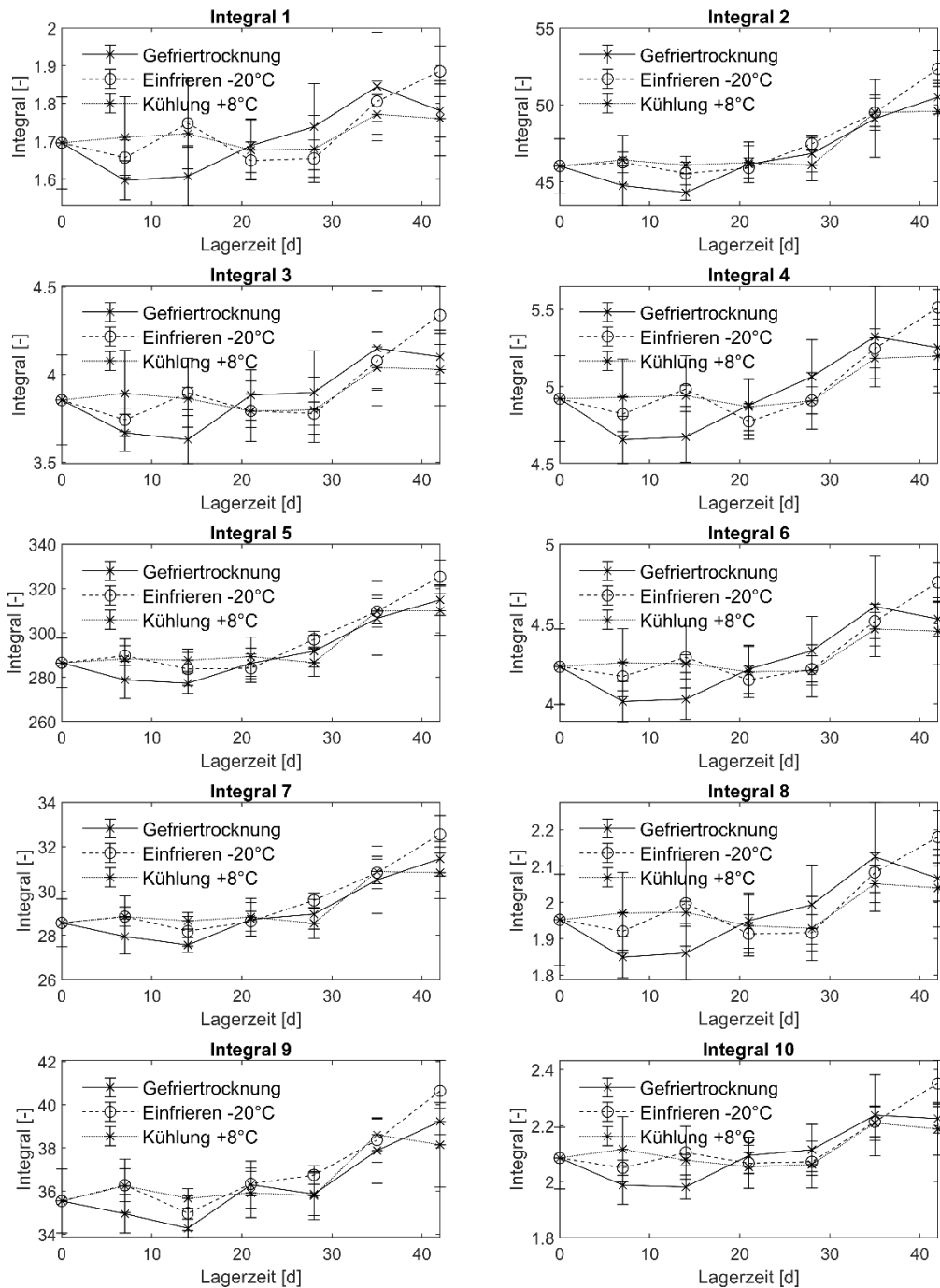


Abbildung 8: Auftragung der Integrale 1 bis 10 über die Lagerdauer (0, 7, 14, 21, 28, 35 und 42 Tage) für die jeweilige Lagerungsart. Als Lagerungsart wurde Kühlung (+8°C), Tiefgefrieren (-20°C) und Gefriertrocknung plus Tiefgefrieren (-20°C) gewählt. Es wurden ¹H-NMR-Spektren von 105 Ei-Proben im Lagertest gemessen und 30 Integrale definiert. Je Lagerungsart und Lagerzeit wurden 5 Eier ausgewählt, die Integralwerte aus den ¹H-NMR-Spektren dieser 5 Proben gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

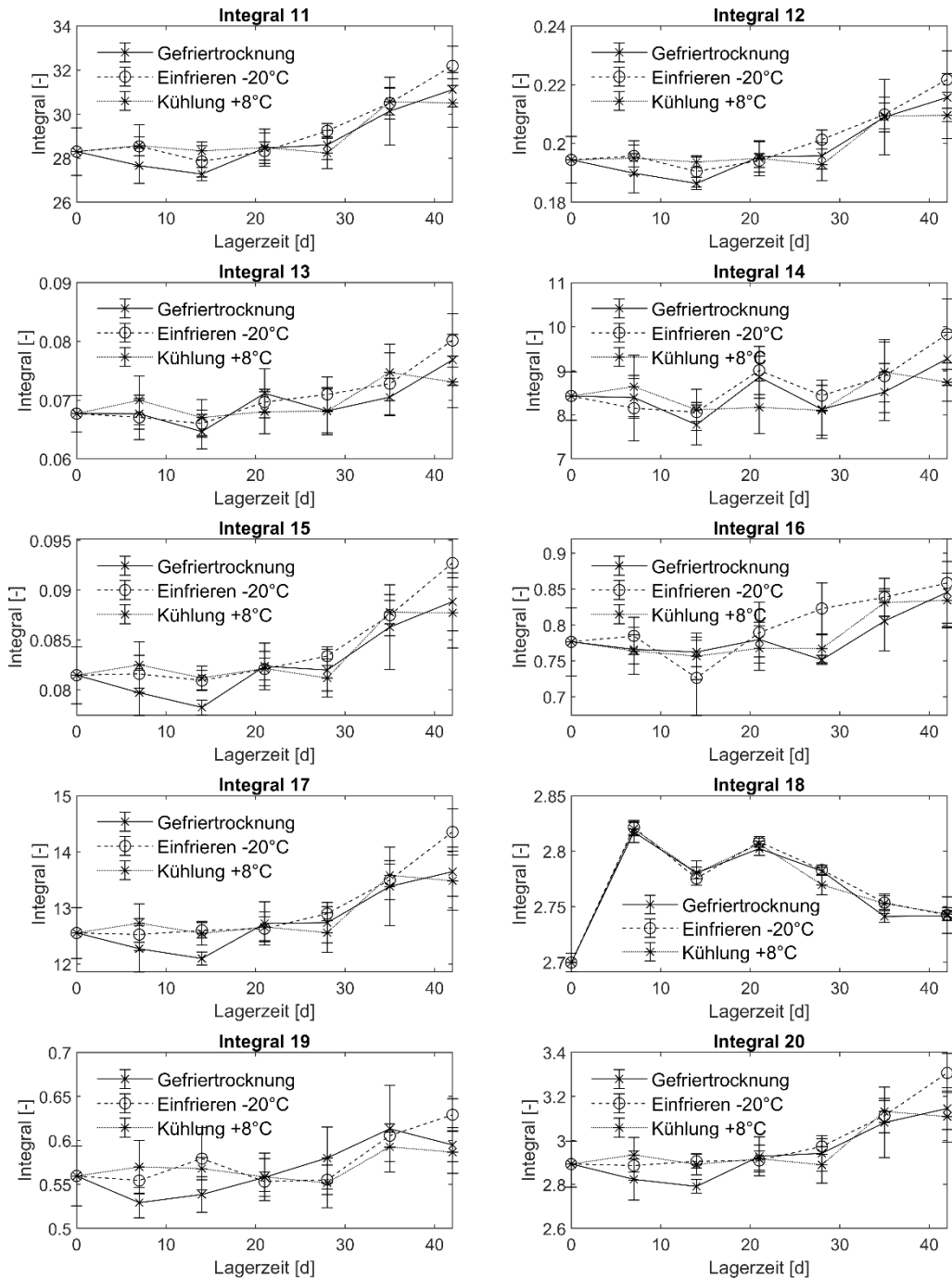


Abbildung 9: Auftragung der Integrale 11 bis 20 über die Lagerdauer (0, 7, 14, 21, 28, 35 und 42 Tage) für die jeweilige Lagerungsart. Als Lagerungsart wurde Kühlung (+8°C), Tiefgefrieren (-20°C) und Gefriertrocknung plus Tiefgefrieren (-20°C) gewählt. Es wurden ¹H-NMR-Spektren von 105 Ei-Proben im Lagertest gemessen und 30 Integrale definiert. Je Lagerungsart und Lagerzeit wurden 5 Eier ausgewählt, die Integralwerte aus den ¹H-NMR-Spektren dieser 5 Proben gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

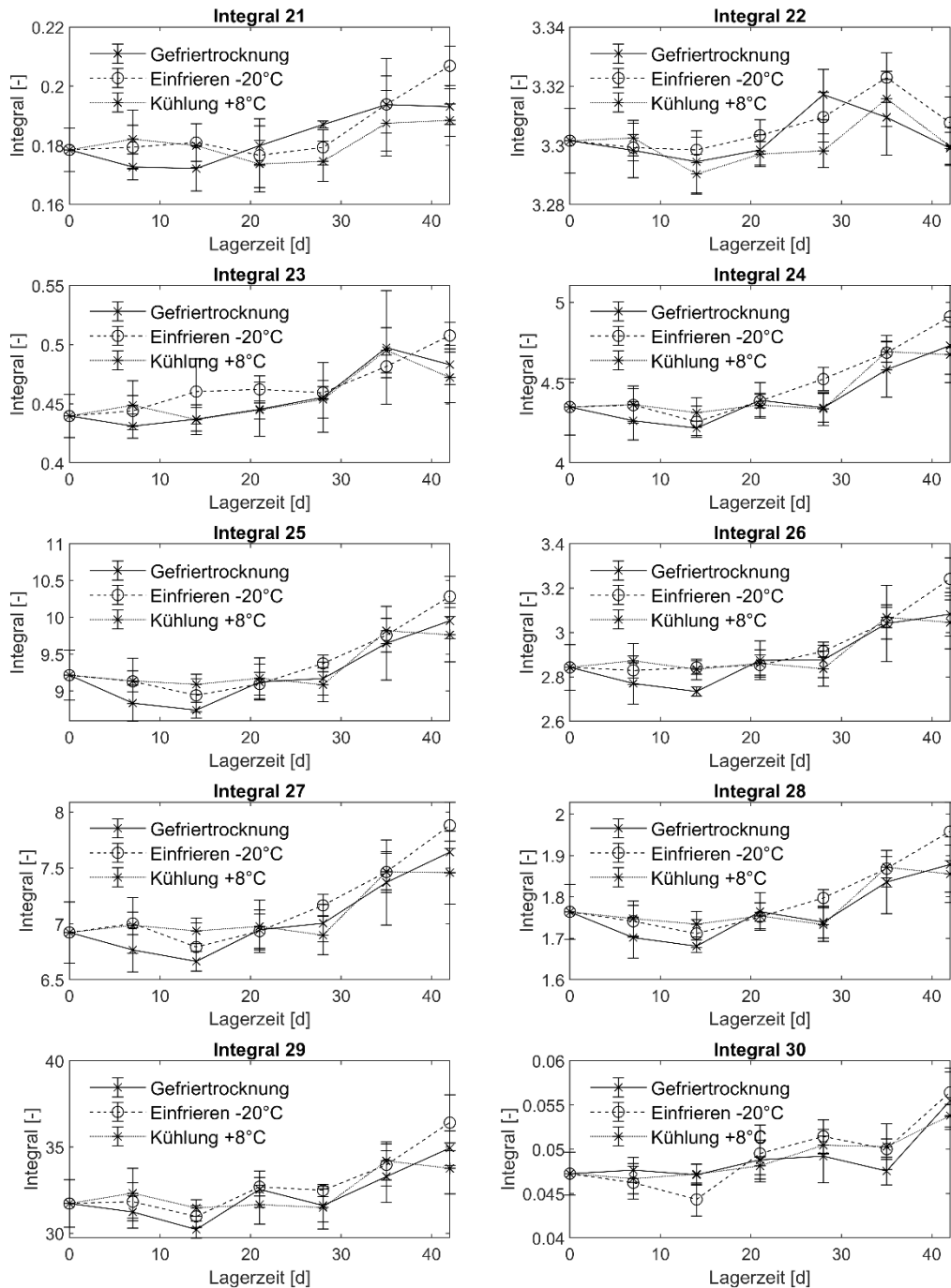


Abbildung 10: Auftragung der Integrale 21 bis 30 über die Lagerdauer (0, 7, 14, 21, 28, 35 und 42 Tage) für die jeweilige Lagerungsart. Als Lagerungsart wurde Kühlung (+8°C), Tiefgefrieren (-20°C) und Gefriertrocknung plus Tiefgefrieren (-20°C) gewählt. Es wurden ¹H-NMR-Spektren von 105 Ei-Proben im Lagertest gemessen und 30 Integrale definiert. Je Lagerungsart und Lagerzeit wurden 5 Eier ausgewählt, die Integralwerte aus den ¹H-NMR-Spektren dieser 5 Proben gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

In Abbildung 8 bis Abbildung 10 sowie Tabelle 5 zeigt sich, dass unter der Berücksichtigung der Standardabweichung und der Betrachtung der errechneten Korrelationskoeffizienten keine der gewählten Lagerungsarten einen hoch signifikanten Einfluss (Korrelationskoeffizienten < 0,85) auf das

in den ¹H-NMR-Spektren dargestellte Inhaltsstoffprofil der Eier hat. Allerdings lassen sich leicht signifikante Veränderungen (Korrelationskoeffizient $0,7 \leq cc < 0,85$) durch die Lagerungsart feststellen. In Abbildung 8 bis Abbildung 10 zeigt sich, dass der Einfluss der Lagerdauer auf einen großen Anteil der Integrale erst ab 35 Tagen eine Auswirkung hat und diese einen Anstieg aufweisen. Das bedeutet, dass die Lagerung der Eier bis mindestens 28 Tage möglich ist und keine oder kaum Auswirkungen auf das Inhaltsstoffprofil des Eis hat.

Tabelle 5: Korrelationskoeffizienten ($\alpha = 0,05$) berechnet mit den jeweiligen Integralen und der Lagerdauer.

Integral	Gefriertrocknung	Einfrieren	Kühlung
1	0,44	0,54	0,28
2	0,62	0,80	0,70
3	0,43	0,64	0,35
4	0,54	0,66	0,50
5	0,63	0,77	0,72
6	0,54	0,67	0,47
7	0,62	0,79	0,70
8	0,49	0,58	0,36
9	0,61	0,76	0,66
10	0,52	0,67	0,45
11	0,61	0,78	0,70
12	0,60	0,75	0,68
13	0,45	0,72	0,50
14	0,19	0,59	0,28
15	0,59	0,79	0,69
16	0,32	0,62	0,61
17	0,61	0,79	0,68
18	-0,07	0,00	0,00
19	0,49	0,64	0,34
20	0,62	0,80	0,68
21	0,71	0,52	0,37
22	0,17	0,48	0,30
23	0,58	0,76	0,68
24	0,54	0,80	0,71
25	0,55	0,73	0,66
26	0,60	0,78	0,67
27	0,60	0,77	0,68
28	0,48	0,75	0,64
29	0,50	0,75	0,58
30	0,53	0,69	0,82

4.4. Rohmaterialauswahl (AP 1, DIL + DFE)

Bei dem Vergleich der Korrelationskoeffizienten zwischen den verschiedenen Lagerungsarten zeigt sich jedoch, dass die Korrelationskoeffizienten bei der Lagerung nach Gefriertrocknung und Einfrieren einen kleineren Betrag aufweisen als bei den anderen Lagerarten, was bedeutet, dass die Lagerungsart-induzierten Unterschiede hier am geringsten sind. Aus diesem Grund wurde sich für die Lagerung nach Gefriertrocknung der Eier entschieden. Die Rohmaterialauswahl wurde zusammen mit

dem Projektpartner Deutsche Frühstücksei GmbH & Co. KG (DFE) und dem externen Experten für ökologische Legehennenhaltung Herr Dr. Friedhelm Deerberg besprochen. Die Proben der verschiedenen Haltungsformen wurden, wie in Tabelle 6 beschrieben, ausgewählt. Das Rohmaterial wurde hinsichtlich des Alters der Legehennen gruppiert (Tabelle 7) und die verschiedenen Varianten der Fütterung aller Proben erfasst. Pro Probe werden mind. 100 Eier als Probenumfang angesetzt, wobei 90 Eier für die NMR-Analytik und 10 Eier für die Erfassung der physikalischen Parameter genutzt werden.

Tabelle 6: Auswahl der Rassen für die jeweilige Haltungsform. LSL = Lohmann Selected Leghorn, LB = Lohmann Brown.

Haltungsform	Rasse				Platz nach Tierschutzbund (2021) [32]
Bodenhaltung	LSL	Dekalb	LB	-	1.100 cm ² /Henne
Freilandhaltung	LSL	Dekalb	LB	Sandys	1.000 cm ² /Henne Mind. 4 m ² /Henne Auslauf
Ökologische Haltung	LSL	Dekalb	LB	Sandys	1.600 cm ² /Henne Mind. 4 m ² /Henne Auslauf
Kleingruppenhaltung	LSL	-	-	-	800 cm ² /Henne

Tabelle 7: Zusammenfassung der Gruppeneinteilung nach Alter der Legehennen.

Alter – Gruppe	Alter
Gruppe 1	Bis Legewoche 25
Gruppe 2	Legewoche 26 bis Legewoche 35
Gruppe 3	Legewoche 36 bis Legewoche 55
Gruppe 4	Ab Legewoche 56

Bei den Legehennen aus der Kleingruppenhaltung wird vom Projektpartner ein Futterzusatz verwendet. Legehennen aus der Freilandhaltung bekommen ein Futter, das in der Deklaration anders bezeichnet wird. Über den Projektzeitraum können die Futterrezepturen durch äußere Faktoren wie Preis, Verfügbarkeit und Qualität der Rohwaren variieren. Daher können keine deutlichen Unterschiede beispielsweise zwischen den Legemehlen 1-3 benannt werden. Es ist nicht möglich, die Deklaration sämtlicher Chargen zu prüfen, einen Zusammenhang der Chargen mit den Legehennenherden darzustellen, und/oder zu kontrollieren, dass die Fütterung der Hennen nur mit Futter einer Charge durchgeführt wurde. Mit Blick auf die Zusammensetzung des Futters können allerdings wenige Unterschiede zwischen der Fütterung von Bodenhaltungshennen und

Freilandhaltungshennen festgestellt werden. Es ist festzustellen, dass bei den Futterrezepturen des Freilandhaltungsfutters (FH-Futter) Oregano als Fütterungszusatz vorkommt. Oregano als Futterzusatz kann eine antimikrobielle, antioxidative, antiseptische und antiparasitäre Wirkung haben und erhöht die Eiproduktion, das Eigewicht und die Fütterungseffizienz [33, 34]. In vier der sieben vorliegenden BH-Futter-Chargen-Zusammensetzung konnte Weizenkleie als Futterzusatz festgestellt werden. Weizenkleie als Futterzusatz kann die Futterraufnahme und die Eieranzahl/Henne reduzieren, den Cholesterolgehalt im Eigelb signifikant senken und den Gehalt an α -Tocopherol und mehrfach ungesättigte Fettsäuren erhöhen [35, 36].

Generell ist das Futter der Legehennen je nach Alter unterschiedlich zusammengesetzt. Nach der Einstellung der Legehennen erhalten sie für gewöhnlich Legestarter 1 (LS 1). In LS 1 ist Monocalciumphosphat enthalten, um die Eischale zu stabilisieren [37]. Dieser Zusatz befindet sich in den Legemehlen nicht mehr. Die genaue Zusammensetzung der verschiedenen Futter unterliegt der Geheimhaltung. Das Futter für die Legehennen in ökologischer Haltung variiert zwischen Fertigmischfutter oder Hofmischungen. Es können Futterzusätze in Form von Kräutern (z.B. Oregano) oder Gemüse (z.B. Möhren, Kürbis) vorkommen.

Tabelle 8: Probenbeschaffung 2020 – 2023 von authentischen Proben. Pro Probe wurden ca. 100 Eier untersucht.

Proben	Haltungsform	Rasse	Alter [Wochen]	Futter	Probenahmejahr
B-001	Bodenhaltung	LSL	22 3/7	LS 1	2020
B-002	Bodenhaltung	Dekalb	75	LM 3*	2020
B-003	Bodenhaltung	Dekalb	33 6/7	LM 1	2020
B-004	Bodenhaltung	LSL	32 4/7	LM 1	2020
B-005	Bodenhaltung	Dekalb	23 1/7	LS 1	2020
B-006	Bodenhaltung	LB	67	LM 3	2020
B-007	Bodenhaltung	LB	28 6/7	LM 1	2020
B-008	Bodenhaltung	Dekalb	58 6/7	LM 3	2021
B-009	Bodenhaltung	Dekalb	39	LM 2	2021
B-010	Bodenhaltung	LSL	66 2/7	LM 3	2021
B-011	Bodenhaltung	LSL	51 5/7	LM 2	2021
B-012	Bodenhaltung	LB	64 3/7	LM 2	2022
B-013 ^a	Bodenhaltung	LB	22 4/7	LS 1	2022
B-014 ^a	Bodenhaltung	LB	28 4/7	LM 1	2022
B-015 ^a	Bodenhaltung	LB	43 4/7	LM 1	2022
B-016 ^a	Bodenhaltung	LB	59 6/7	LM 1	2022
B-017	Bodenhaltung	LSL	24	LM 1	2022
K-001	Kleingruppe	LSL	47 4/7	LM 2 + X	2020
K-002	Kleingruppe	LSL	30 1/1	LM 1 + X	2020
K-003	Kleingruppe	LSL	77 1/7	LM 3 + X	2021
K-004	Kleingruppe	LSL	45 2/7	LM 2 + X	2021
K-005	Kleingruppe	LSL	72 5/7	LM 3 + X	2021
K-006	Kleingruppe	LSL	20 5/7	LS 1	2021
K-007	Kleingruppe	LSL	62 2/7	LM 3 + X	2021
K-008	Kleingruppe	LSL	65 5/7	LM 2 + X	2022

Proben	Haltungsform	Rasse	Alter [Wochen]	Futter	Probe- nahmehjahr
F-001	Freiland	LSL	33 2/7	LM 1 FH	2021
F-002	Freiland	Dekalb White	40 3/7	LM 1 FH	2021
F-003	Freiland	Dekalb White	53 3/7	LM 1 FH	2021
F-004	Freiland	LB	60 5/7	LM 1 FH	2021
F-005	Freiland	Dekalb White	21 4/7	LS 1 FH	2021
F-006	Freiland	LB	21	LS 1 FH	2021
F-007	Freiland	Dekalb White	34 1/7	LM 1 FH	2021
F-008	Freiland	LSL	50	LM 2 FH	2021
F-009	Freiland	Sandys	74 4/7	LM 2	2022
F-010	Freiland	Dekalb White	64 6/7	LM 1 FH	2022
F-011	Freiland	LB	44 5/7	LM 1	2022
F-012	Freiland	LSL	60 2/7	LM 2	2022
F-013	Freiland	LB	31	LM 1 FH	2022
F-014	Freiland	Sandys	23	LM 1 FH	2022
F-015	Freiland	Sandys	30 3/7	LM 1 FH	2023
F-016	Freiland	Sandys	40 2/7	LM 1 FH	2023
O-001	Ökologisch; stationär	LB	41	Hofmischung mit Ergänzungsfutter + Einzelkomponenten; mit > 10 g Körnerzugabe	2021
O-002	Ökologisch; mobil	LB	31	Fertigmischfutter; Oregano; Gemüse (Möhren, Kürbis)	2021
O-003	Ökologisch; stationär	Dekalb White	81	Fertigmischfutter	2021
O-004	Ökologisch; stationär **	LSL Light	22	Fertigmischfutter	2021
O-005	Ökologisch; stationär**	Sandys	29	Fertigmischfutter	2022
O-006	Ökologisch; stationär	LB	94	Hofmischung + Oregano + Futtersäure + Maissilage	2022
O-007	Ökologisch; stationär	LSL Light	45	Fertigmischfutter	2022
O-008	Ökologisch; stationär	Sandys	49	Fertigmischfutter	2022
O-009	Ökologisch; mobil	LB	24	Fertigmischfutter	2022
O-010	Ökologisch; stationär	Sandys	58 6/7	BE-Ö LM 2	2022
O-011	Ökologisch; stationär	Dekalb White	29 4/7	VÖ LES Starter	2022
O-012	Ökologisch; stationär	Dekalb White	21 5/7	LES Standard	2022
O-013	Ökologisch; stationär	Sandys	65	Fertigmischfutter + Monocalciumphosphat + ASCAROM	2022
O-014	Ökologisch; stationär	LSL	61	Alleinmischfutter + Monocalciumphosphat + ASCAROM	2022
O-015	Ökologisch; stationär	Dekalb	37	Fertigmischfutter	2022
O-016	Ökologisch; stationär	Sandys	35	Fertigmischfutter	2022
O-017	Ökologisch; stationär	LSL	33 5/7	-	2023
FB-001	Aufgestalltes Freiland	Dekalb White	48 6/7	LM 1 FH	2022
FB-002	Aufgestalltes Freiland	LB	44 2/7	LM 1 FH	2022
FB-003	Aufgestalltes Freiland	LB	40	LM 1 FH	2022

* Futterabweichung: 10-fach höherer Anteil eines Farbstoffs der Klasse Carotinoide

** Aufgestallt zwei Wochen vor Probenahme

^a dieselbe Herde

Für die Anwendung der berechneten, statistischen Modelle wurden mehrere Proben (Tabelle 9) aus verschiedenen Supermärkten und Discountern erworben und gemessen.

Tabelle 9. Validierungsproben. Beschafft in 2023. Pro Probe zwischen 8 – 12 Eier.

Proben	Haltungsform laut Stempel*	Farbe der Eischale	Größe laut Verpackung
V-001	Ökologisch	Braun	M
V-002	Freiland	Braun	M
V-003	Ökologisch	Braun	-
V-004	Freiland	Weiß	-
V-005	Ökologisch	Weiß	S
V-006	Bodenhaltung	Weiß	M
V-007	Ökologisch	Braun	M
V-008	Freiland	Braun	L
V-009	Bodenhaltung	Braun	L
V-010	Bodenhaltung	Braun	M
V-011	Ökologisch	Braun	-
V-012	Ökologisch	Braun	M
V-013	Freiland	Weiß	M
V-014	Bodenhaltung	Weiß	M
V-015	Freiland	Weiß	M
V-016	Bodenhaltung	Weiß	M
V-017	Ökologisch	Braun	L
V-018	Ökologisch	Weiß	M
V-019	Freiland	Weiß	M
V-020	Bodenhaltung	Weiß	M
V-021	Bodenhaltung	Braun	M
V-022	Freiland	Braun	M
V-023	Freiland	Braun	L
V-024	Bodenhaltung	Weiß	M
V-025	Privat	Gemischt	-
V-026	Freiland	Braun	-
V-027	Privat	Weiß	-
V-028	Ökologisch	Braun	-
V-029	Freiland	Gemischt	M
V-030	Bodenhaltung	Weiß	L

* 0 – Ökologisch, 1 – Freiland, 2 – Bodenhaltung, Privat – von Privatperson, ungestempelt

4.5. Ergebnisse der statistischen Auswertung der ¹H-NMR-Messungen (AP 3, DIL)

Zusammenfassend wurden 57 Proben aus vier Haltungsformen und 3 Proben von aufgestallten Freilandhennenherden (FB) aufgearbeitet und mittels ¹H-NMR-Spektroskopie gemessen. Daraus resultierten 4.453 ¹H-NMR-Spektren, die für die Auswertung genutzt werden konnten.

4.5.1. Alter

Um die Auswirkung des Alters der Legehennen auf das Eigelb zu untersuchen, wurden von einer Legehennenherde in jeder Altersgruppe Proben bezogen, sodass vier Proben (B-013 bis B-016) derselben Herde in verschiedenen Altersstufen mit leicht abweichender Fütterung vorliegen. Auf Grundlage der ¹H-NMR-Spektren dieser vier Proben wurde eine LDA berechnet (Abbildung 11). Die Modellgenauigkeit nach Kreuzvalidierung beläuft sich auf 86,6 %. Es wurden 98,5 % der Proben des Testsets (n = 65) der korrekten Altersgruppe zugeordnet. Die Konfusionsmatrix (Tabelle 10) zeigt, dass lediglich eine Probe des Testsets falsch zugeordnet wurde. Allerdings ist die Modellgenauigkeit von 86,6 % nicht ausreichend für abgesicherte Aussagen. Trotzdem lässt sich anhand dieser Auswertung zeigen, dass das Alter der Legehennen eine Auswirkung auf die Zusammensetzung des Eigelbs hat.

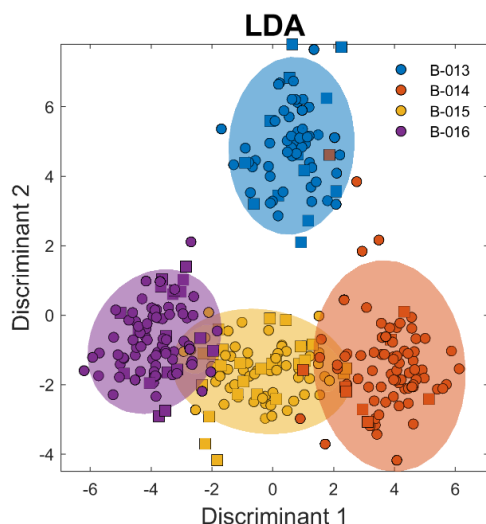


Abbildung 11: Lineare Diskriminanzanalyse auf Basis der ¹H-NMR-Spektren der Eigelbextrakte von Legehennen der vier verschiedenen Altersgruppen aus Bodenhaltung. Die Modellgenauigkeit liegt bei 86,6 %.

Tabelle 10: Konfusionsmatrix zur Zuordnung des Testsets basierend auf dem LDA-Modell der vier verschiedenen Altersgruppen.

		Vorhergesagte Klasse			
		B-013	B-014	B-015	B-016
Echte Klasse	B-013	13	1	0	0
	B-014	0	8	0	0
	B-015	0	0	25	0
	B-016	0	0	0	18

Dies bestätigen auch die Ergebnisse des Kruskal-Wallis Tests (Tabelle 11) der einzelnen Integralen der ^1H -NMR-Spektren. Bei allen 28 Integralen wurden signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede in den Integralen der ^1H -NMR-Spektren über die Altersgruppe der Legehennen detektiert.

Abschlussbericht 2024 – OekoEiSpec (FKz: 2819OE055)

Tabelle 11: Integrale berechnet aus den ¹H-NMR-Spektren der Eigelbextrakte. Verschiedene Buchstaben in einer Zeile symbolisieren signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede auf Basis eines Kruskal-Wallis Tests.

Inte- gral	von [ppm]	bis [ppm]	B-013		B-014		B-015		B-016					
			m	std	m	std	m	std	m	std				
1	0,6520	0,7730	1,88	± 0,12	a	1,68	± 0,10	b	1,66	± 0,07	b	1,78	± 0,12	c
2	0,7731	0,9545	48,32	± 1,59	a	47,42	± 2,07	b	46,37	± 1,93	c	47,26	± 2,13	b
3	0,9546	1,0621	4,18	± 0,24	a	3,76	± 0,21	b	3,78	± 0,15	b	4,05	± 0,27	c
4	1,0622	1,1920	5,36	± 0,26	a	4,96	± 0,25	b	4,88	± 0,20	b	5,11	± 0,28	c
5	1,1921	1,4384	298,37	± 10,41	a	296,10	± 13,45	ab	288,87	± 12,60	c	292,56	± 13,45	bc
6	1,4385	1,5578	4,60	± 0,22	a	4,25	± 0,22	b	4,20	± 0,17	b	4,41	± 0,24	c
7	1,5579	1,7530	29,74	± 1,00	a	29,44	± 1,30	a	28,81	± 1,24	b	29,27	± 1,34	ab
8	1,7531	1,9245	2,13	± 0,12	a	1,94	± 0,11	b	1,92	± 0,08	b	2,04	± 0,13	c
9	1,9246	2,1167	37,31	± 1,36	a	36,93	± 1,79	a	36,01	± 1,62	b	36,75	± 1,78	a
10	2,1168	2,2711	2,26	± 0,10	a	2,08	± 0,11	b	2,07	± 0,09	b	2,19	± 0,13	c
11	2,2712	2,4655	29,45	± 0,99	a	29,11	± 1,28	a	28,52	± 1,24	b	28,98	± 1,33	ab
12	2,4656	2,5361	0,20	± 0,01	a	0,20	± 0,01	ab	0,20	± 0,01	b	0,20	± 0,01	b
13	2,5821	2,6474	0,07	± 0,00	a	0,07	± 0,00	b	0,07	± 0,00	ab	0,07	± 0,01	a
14	2,6964	2,9109	8,67	± 0,55	a	8,14	± 0,65	b	8,29	± 0,57	b	8,81	± 0,79	a
15	3,0214	3,0608	0,08	± 0,00	a	0,08	± 0,00	a	0,08	± 0,00	b	0,08	± 0,00	ab
16	3,0808	3,1528	0,76	± 0,04	a	0,78	± 0,05	b	0,76	± 0,04	a	0,75	± 0,05	a
17	3,1529	3,3057	12,96	± 0,44	a	12,84	± 0,49	ab	12,65	± 0,58	b	12,83	± 0,58	ab
18	3,4096	3,5083	0,61	± 0,03	a	0,55	± 0,03	b	0,55	± 0,02	b	0,58	± 0,03	c
19	3,5551	3,6568	2,98	± 0,10	a	2,96	± 0,11	ab	2,91	± 0,13	b	2,95	± 0,13	ab
20	3,6569	3,7139	0,19	± 0,01	a	0,19	± 0,01	a	0,18	± 0,01	b	0,18	± 0,01	ab
21	3,8090	3,9685	0,48	± 0,02	a	0,46	± 0,02	b	0,44	± 0,02	c	0,46	± 0,02	b
22	3,9686	4,0887	4,42	± 0,16	ab	4,43	± 0,19	a	4,34	± 0,17	b	4,36	± 0,18	b
23	4,0888	4,2156	9,68	± 0,39	a	9,41	± 0,42	b	9,24	± 0,39	c	9,40	± 0,42	bc
24	4,2157	4,2965	2,93	± 0,10	a	2,91	± 0,11	ab	2,86	± 0,13	b	2,90	± 0,13	ab
25	4,2966	4,3900	7,23	± 0,26	a	7,14	± 0,33	a	7,00	± 0,31	b	7,11	± 0,34	ab
26	4,3901	4,4702	1,80	± 0,07	a	1,79	± 0,07	ab	1,76	± 0,07	b	1,77	± 0,07	ab
27	5,0650	5,6000	33,05	± 1,23	a	32,26	± 1,57	b	31,90	± 1,44	b	32,82	± 1,75	a
28	7,2420	7,4200	0,05	± 0,00	a	0,05	± 0,00	b	0,05	± 0,01	a	0,04	± 0,01	c

4.5.2. Haltungsformen

Anhand der ^1H -NMR-Spektren wurde ein LDA-Modell (Abbildung 12) für die konventionelle und ökologische Haltung entwickelt. Die Modellgenauigkeit beläuft sich auf 99,9 %. Das Testset ($n = 838$) wurde zu 99,9 % der korrekten Haltungsform zugeordnet. Außerdem wurden alle FB-Proben bei der konventionellen Haltung eingeordnet.

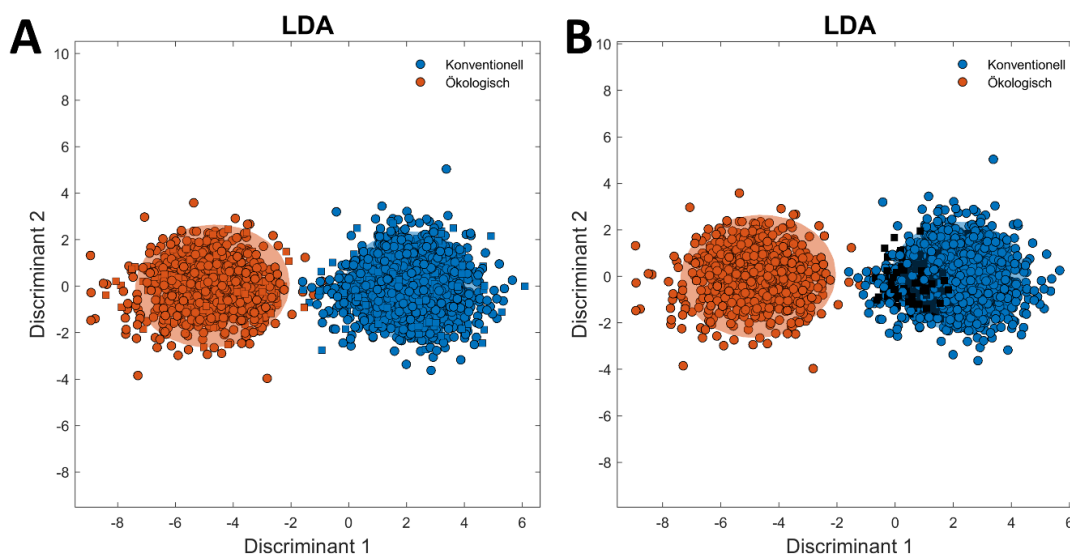


Abbildung 12: Lineare Diskriminanzanalyse auf Basis der ^1H -NMR-Spektren der Eigelbextrakte von Legehennen aus konventioneller (Kleingruppen-, Boden- und Freilandhaltung) und ökologischer Haltung. A. LDA-Modell. B. LDA-Modell mit FB-Proben (schwarz). Die Modellgenauigkeit liegt bei 99,9 %.

Ein weiteres LDA-Modell (Abbildung 13) wurde anhand der ^1H -NMR-Spektren der Proben aus Kleingruppen-, Boden-, Freiland- und ökologischer Haltung berechnet. Die Modellgenauigkeit beläuft sich auf 97,1 %. Das Testset ($n = 838$) wurde zu 96,9 % der korrekten Haltungsform zugeordnet. Die Konfusionsmatrix (Tabelle 12) zeigt, dass bei 26 ^1H -NMR-Spektren die Vorhersage der Haltungsform falsch war.

Die häufig auftretende Aufstallungspflicht der Freiland-Legehennen wurde genutzt, um drei Proben zu ziehen. Die Legehennen erhielten weiterhin das Futter, das für die Freilandhaltung vorgesehen war, waren allerdings aufgestallt, was bedeutet, dass sie keinen Auslauf außerhalb des Stalls hatten. Die Eier dieser Legehennen werden korrekterweise dann mit der Zahl 2 für Bodenhaltung bestempelt. Nun stellte sich innerhalb dieses Projekts die Frage, welcher Haltungsform die Eier dieser aufgestallten Legehennen in dem Modell zugeordnet werden. Diese Proben wurden als FB-Testset geführt und

umfing 265 ¹H-NMR-Spektren. Die Abbildung des LDA-Modells (13B) zeigt, dass sich die FB-Proben im Modell bei den Haltungsformen Bodenhaltung und Kleingruppe widerfinden.

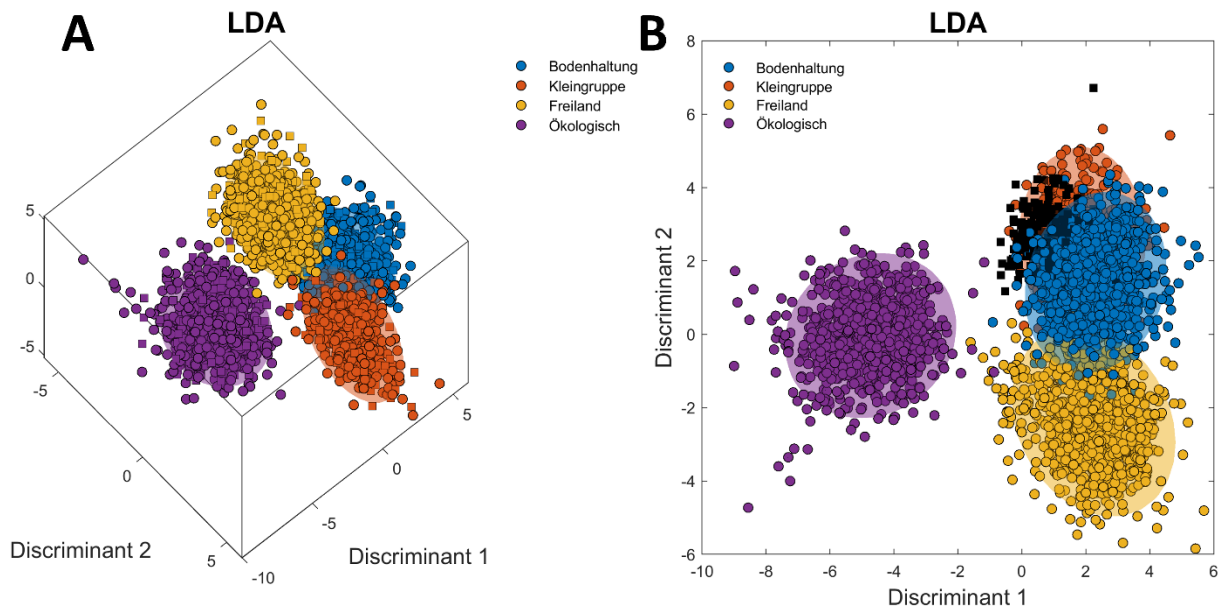


Abbildung 13: Lineare Diskriminanzanalyse auf Basis der ¹H-NMR-Spektren der Eigelbextrakte von Legehennen aus Kleingruppen-, Boden-, Freiland- und ökologischer Haltung. A. LDA-Modell. B. LDA-Modell mit FB-Proben. Die Modellgenauigkeit liegt bei 97,1 %.

Es wurden 154 ¹H-NMR-Spektren der Haltungsform Bodenhaltung und 111 ¹H-NMR-Spektren der Haltungsform Kleingruppe zugeordnet. Es kann derzeit nicht erklärt werden, wieso eine so hohe Anzahl an ¹H-NMR-Spektren der Haltungsform Kleingruppe zugeordnet werden. Insgesamt lässt sich aber festhalten, dass keine FB-Probe der Haltungsform Freilandhaltung zugeordnet wurde.

Tabelle 12: Konfusionsmatrix zur Zuordnung des Testsets basierend auf dem LDA-Modell der vier verschiedenen Haltungsformen.

		Vorhergesagte Klasse			
		Ökologisch	Freiland	Boden	Kleingruppe
Echte Klasse	Ökologisch	257	1	0	0
	Freiland	0	222	5	1
	Boden	0	12	256	7
	Kleingruppe	0	0	0	77

Abschlussbericht 2024 – OekoEiSpec (FKz: 2819OE055)

Tabelle 13: Integrale (Mittelwert m und Standardabweichung std) berechnet aus den ¹H-NMR-Spektren der Eigelbextrakte (KG = Kleingruppe; B = Bodenhaltung; F = Freilandhaltung; O = Ökologische Haltung; FB = aufgestallte Freilandhaltung). Verschiedene Buchstaben in einer Zeile symbolisieren signifikante (p < 0,05) Unterschiede auf Basis eines Kruskal-Wallis Tests.

I	von [ppm]	bis [ppm]	KG		B		F		O		FB						
			m	std	m	std	m	std	m	std	m	std					
1	0,6520	0,7730	1,59	± 0,12	a	1,72	± 0,16	b	1,76	± 0,24	c	1,75	± 0,21	c	1,60	± 0,10	a
2	0,7731	0,9545	46,25	± 2,38	ab	47,19	± 3,28	c	47,47	± 3,62	c	47,03	± 4,07	a	45,75	± 2,52	b
3	0,9546	1,0621	3,76	± 0,25	a	3,95	± 0,38	b	3,96	± 0,56	b	4,25	± 0,54	c	4,06	± 0,23	c
4	1,0622	1,1920	4,72	± 0,30	a	4,98	± 0,42	b	5,05	± 0,56	b	5,02	± 0,50	b	4,72	± 0,28	a
5	1,1921	1,4384	292,15	± 15,76	a	292,92	± 20,78	a	293,93	± 22,33	a	290,77	± 26,80	b	282,24	± 16,54	c
6	1,4385	1,5578	4,08	± 0,25	a	4,32	± 0,36	b	4,40	± 0,46	c	4,37	± 0,42	bc	4,12	± 0,24	a
7	1,5579	1,7530	29,01	± 1,53	ab	29,37	± 2,02	ac	29,49	± 2,25	c	29,39	± 2,59	a	28,69	± 1,58	b
8	1,7531	1,9245	1,86	± 0,13	a	1,98	± 0,18	b	2,03	± 0,25	c	2,02	± 0,22	c	1,87	± 0,11	a
9	1,9246	2,1167	36,76	± 1,98	a	37,75	± 2,72	b	37,94	± 3,03	b	38,01	± 3,45	b	37,36	± 1,90	b
10	2,1168	2,2711	1,99	± 0,12	a	2,13	± 0,17	b	2,16	± 0,21	c	2,15	± 0,21	bc	2,04	± 0,11	d
11	2,2712	2,4655	28,74	± 1,52	ab	29,10	± 1,99	ac	29,17	± 2,23	c	29,15	± 2,56	ac	28,47	± 1,55	b
12	2,4656	2,5361	0,19	± 0,01	ab	0,20	± 0,01	cd	0,20	± 0,01	c	0,20	± 0,02	ad	0,19	± 0,01	b
13	2,5821	2,6474	0,06	± 0,01	a	0,07	± 0,01	b	0,07	± 0,01	bc	0,07	± 0,01	c	0,07	± 0,01	d
14	2,6964	2,9109	8,01	± 0,79	a	8,71	± 1,13	b	8,60	± 1,15	b	9,55	± 1,56	c	10,01	± 0,84	d
15	3,0214	3,0608	0,08	± 0,00	a	0,08	± 0,01	b	0,08	± 0,01	b	0,08	± 0,01	c	0,08	± 0,00	a
16	3,0808	3,1528	0,79	± 0,06	a	0,78	± 0,07	bc	0,77	± 0,08	d	0,79	± 0,10	ab	0,77	± 0,05	cd
17	3,1529	3,3057	12,43	± 0,64	a	12,82	± 0,88	b	12,87	± 0,99	b	12,66	± 1,07	c	12,50	± 0,67	ac
18	3,4096	3,5083	0,54	± 0,03	a	0,57	± 0,05	b	0,58	± 0,06	c	0,57	± 0,05	b	0,54	± 0,03	a
19	3,5551	3,6568	2,87	± 0,15	a	2,95	± 0,20	b	2,96	± 0,22	b	2,91	± 0,24	a	2,88	± 0,15	a
20	3,6569	3,7139	0,18	± 0,01	a	0,18	± 0,02	b	0,18	± 0,02	c	0,18	± 0,02	c	0,17	± 0,01	d
21	3,8090	3,9685	0,45	± 0,03	a	0,46	± 0,03	b	0,46	± 0,04	b	0,46	± 0,04	b	0,45	± 0,02	ab
22	3,9686	4,0887	4,35	± 0,24	ab	4,42	± 0,30	c	4,41	± 0,34	ac	4,41	± 0,38	abc	4,32	± 0,22	b
23	4,0888	4,2156	9,27	± 0,51	ab	9,37	± 0,65	a	9,38	± 0,72	a	9,37	± 0,83	a	9,14	± 0,50	b
24	4,2157	4,2965	2,81	± 0,15	a	2,90	± 0,20	b	2,90	± 0,22	b	2,86	± 0,24	c	2,82	± 0,15	ac
25	4,2966	4,3900	7,08	± 0,38	ab	7,14	± 0,50	a	7,15	± 0,56	a	7,14	± 0,64	ab	6,98	± 0,39	b
26	4,3901	4,4702	1,74	± 0,10	ab	1,77	± 0,12	c	1,76	± 0,13	c	1,76	± 0,15	a	1,72	± 0,09	b
27	5,0650	5,6000	31,94	± 1,81	a	33,22	± 2,53	b	33,20	± 2,82	b	34,15	± 3,13	c	34,15	± 1,84	c
28	7,2420	7,4200	0,04	± 0,01	a	0,04	± 0,01	b	0,03	± 0,01	c	0,03	± 0,00	d	0,03	± 0,01	d

Die Kruskal-Wallis Tests für die jeweiligen Integrale, berechnet aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren, für die jeweilige Haltungsform zeigen, dass bei allen Integralen signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen mindestens einer Haltungsform zu den weiteren vorliegen. Besonders hervorzuheben ist das Integral 14, da es sich signifikant ($p < 0,05$) zwischen drei der vier Haltungsformen unterscheidet. Das Integral 14 enthält die Signale von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, was bedeutet, dass die Gehalte dieser im Eigelbextrakt zwischen den Haltungsformen signifikant variiert.

Zur Bewertung und Prüfung der LDA-Modelle wurden 30 Proben aus Supermärkten, Discountern und von Privatpersonen mit je 8 bis 12 Eiern bezogen. Es wurden davon 305 $^1\text{H-NMR}$ -Spektren gemessen, wovon 18 $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von privaten Proben und 287 $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von käuflich erworbenen Proben entstammen. Die Vorhersagen der Haltungsform anhand des LDA-Modells zum Vergleich von konventioneller und ökologischer Haltung stimmten bei den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 254 Eiern mit dem Eistempel überein (Abbildung 14A). Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 26 Eiern, dessen Stempel eine konventionelle Haltung labelt, wurden der ökologischen Haltung zugeordnet, während die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 7 Eiern, die laut Stempel aus ökologischer Haltung entstammten, zur konventionellen Haltung zugeordnet wurden. Die 26 Eier gehören zu drei Proben, die mit der Nummer 1 für Freilandhaltung bestempelt wurden. Eine Probe von Privatpersonen wurde in die konventionelle Haltung eingeordnet, die zweite Probe der ökologischen Haltung zugeordnet.

Die Einordnung $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der erworbenen Proben im LDA-Modell der vier Haltungsformen zeigte bei 173 Eiern eine Übereinstimmung mit dem Eistempel (Abbildung 14B). Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 53 mit „2“ gelabelten Eiern wurde als Freilandhaltung, die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 21 mit „1“ gelabelten Eiern wurde als ökologische Haltung, die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 20 mit „1“ gelabelten Eiern wurde als Bodenhaltung, die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 9 mit „2“ gelabelten Eiern wurde als ökologische Haltung, die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 8 mit „2“ gelabelten Eiern wurde als Kleingruppenhaltung und die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 4 mit „0“ gelabelten Eiern wurde als Freilandhaltung vorhergesagt. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Eier von Privatpersonen wurden alle der ökologischen Haltung zugeordnet.

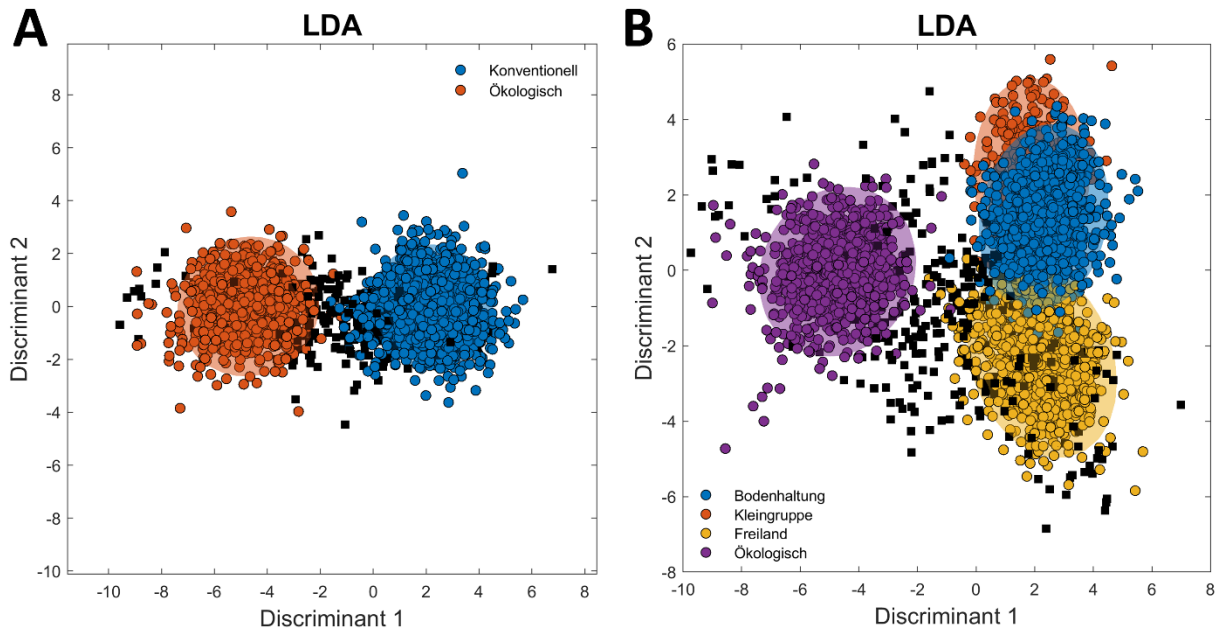


Abbildung 14. Lineare Diskriminanzanalyse auf Basis der ^1H -NMR-Spektren der Eigelbextrakte von Legehennen aus Kleingruppen-, Boden-, Freiland- und ökologischer Haltung. A. LDA-Modell zum Vergleich von konventioneller und ökologischer Haltung. B. LDA-Modell zum Vergleich aller vier Haltungsformen. In schwarz sind die aus den Supermärkten und Discountern erworbenen Proben dargestellt.

4.5.3. Rasse

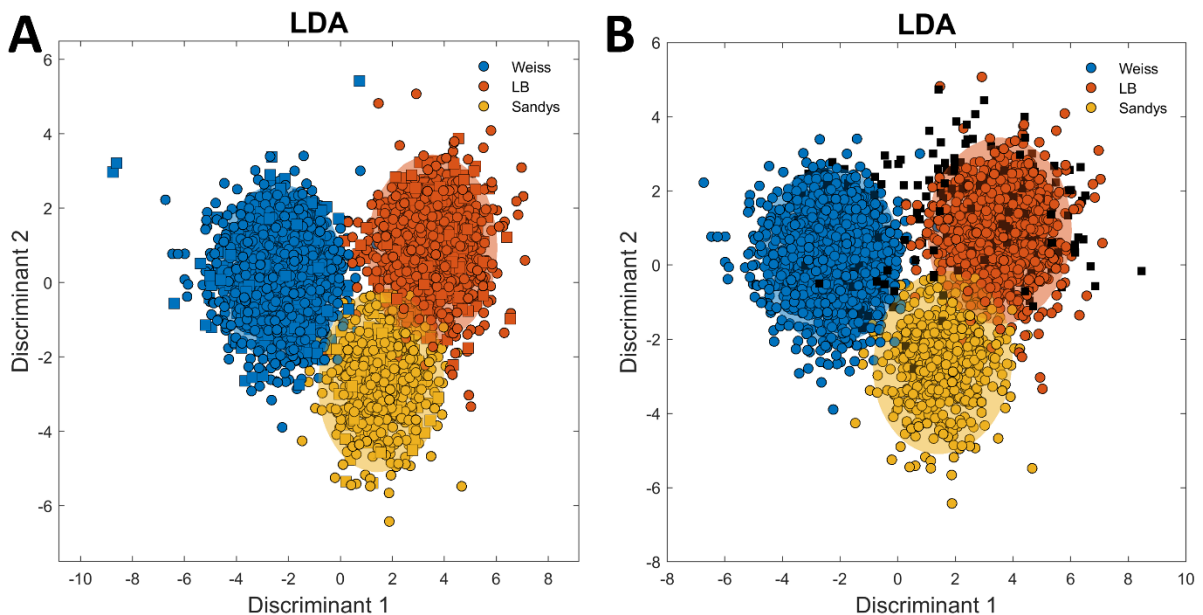


Abbildung 15: Lineare Diskriminanzanalyse auf Basis der ^1H -NMR-Spektren der Eigelbextrakte von Legehennen vier verschiedener Rassen, wobei die Rassen LSL und Dekalb als „Weiss“ zusammengefasst wurden. Die Modellgenauigkeit liegt bei 98,4 %.

Als nächstes wurden die ¹H-NMR-Spektren der Proben von den vier verschiedenen Rassen aus allen Haltungsformen mit einem LDA-Modell (Abbildung 15) betrachtet. Dieses Modell zeigt eine Modellgenauigkeit von 98,4 %. Es wurden 98,1 % des Testsets (n = 890) korrekt zugeordnet (**Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.**). Test

Tabelle 14: Konfusionsmatrix zur Zuordnung des Testsets basierend auf dem LDA-Modell der vier verschiedenen Rassen.

		Vorhergesagte Klasse		
		Weiss	LB	Sandys
Echte Klasse	Weiss	470	2	1
	LB	1	274	6
	Sandys	1	6	129

Tabelle 15 zeigt, dass sich die Integrale 9, 13, 14, 18, 21, 26 und 28 der ¹H-NMR-Spektren der Proben signifikant (p < 0,05) zwischen den Rassen unterscheidet. Das Integral 14 enthält die Signale der mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Tabelle 15: Integrale (Mittelwert m und Standardabweichung std) berechnet aus den ¹H-NMR-Spektren der Eigelbextrakte. Verschiedene Buchstaben in einer Zeile symbolisieren signifikante (p < 0,05) Unterschiede auf Basis eines Kruskal-Wallis Tests.

Inte- gral	von [ppm]	bis [ppm]	Weiss		LB		Sandys				
			m	std	m	std	m	std			
1	0,6520	0,7730	1,71 ±	0,20	a	1,72 ±	0,22	ab	1,72 ±	0,16	b
2	0,7731	0,9545	47,27 ±	3,50	a	46,39 ±	3,25	b	47,45 ±	4,02	a
3	0,9546	1,0621	4,01 ±	0,51	a	4,07 ±	0,51	b	4,01 ±	0,38	b
4	1,0622	1,1920	4,98 ±	0,47	a	4,94 ±	0,52	b	4,97 ±	0,43	a
5	1,1921	1,4384	294,75 ±	22,01	a	284,90 ±	20,29	b	294,71 ±	26,07	a
6	1,4385	1,5578	4,31 ±	0,41	a	4,32 ±	0,42	a	4,34 ±	0,37	b
7	1,5579	1,7530	29,49 ±	2,18	a	28,89 ±	2,00	b	29,61 ±	2,55	a
8	1,7531	1,9245	1,98 ±	0,21	a	1,99 ±	0,23	a	2,00 ±	0,18	b
9	1,9246	2,1167	37,43 ±	2,93	a	37,88 ±	2,74	b	38,64 ±	3,27	c
10	2,1168	2,2711	2,11 ±	0,20	a	2,13 ±	0,19	b	2,14 ±	0,18	b
11	2,2712	2,4655	29,20 ±	2,16	a	28,63 ±	1,98	b	29,37 ±	2,52	a
12	2,4656	2,5361	0,20 ±	0,01	a	0,19 ±	0,01	b	0,20 ±	0,02	a
13	2,5821	2,6474	0,06 ±	0,01	a	0,07 ±	0,01	b	0,07 ±	0,01	c
14	2,6964	2,9109	8,71 ±	1,36	a	9,38 ±	1,38	b	8,87 ±	1,06	c
15	3,0214	3,0608	0,08 ±	0,01	a	0,08 ±	0,01	b	0,08 ±	0,01	ab
16	3,0808	3,1528	0,78 ±	0,08	a	0,78 ±	0,07	a	0,79 ±	0,10	a
17	3,1529	3,3057	12,78 ±	0,95	a	12,62 ±	0,88	b	12,73 ±	1,05	ab
18	3,4096	3,5083	0,57 ±	0,05	a	0,57 ±	0,05	b	0,58 ±	0,05	c
19	3,5551	3,6568	2,94 ±	0,22	a	2,91 ±	0,20	b	2,94 ±	0,24	a
20	3,6569	3,7139	0,18 ±	0,02	a	0,17 ±	0,02	b	0,18 ±	0,02	a
21	3,8090	3,9685	0,46 ±	0,03	a	0,46 ±	0,04	b	0,45 ±	0,03	c
22	3,9686	4,0887	4,42 ±	0,33	a	4,36 ±	0,30	b	4,42 ±	0,38	a
23	4,0888	4,2156	9,40 ±	0,70	a	9,20 ±	0,64	b	9,43 ±	0,81	a

Inte- gral	von [ppm]	bis [ppm]	Weiss			LB			Sandys					
			m	std	a	m	std	a	m	std	a			
24	4,2157	4,2965	2,89	±	0,21	a	2,85	±	0,20	b	2,87	±	0,24	ab
25	4,2966	4,3900	7,17	±	0,54	a	7,01	±	0,50	b	7,21	±	0,63	a
26	4,3901	4,4702	1,77	±	0,13	a	1,74	±	0,12	b	1,76	±	0,15	c
27	5,0650	5,6000	33,06	±	2,81	a	33,83	±	2,61	b	33,85	±	2,85	b
28	7,2420	7,4200	0,04	±	0,01	a	0,03	±	0,01	b	0,03	±	0,00	c

Ebenfalls wurde das LDA-Modell genutzt, um die käuflich erworbenen Proben hinsichtlich der Eischalenfarbe zu untersuchen (Abbildung 15B). Dies war insofern möglich, dass die Proben der Rasse LB eine braune Schale, die der Rasse Sandys eine cremefarbene und die der Rassen LSL und Dekalb eine weiße Schale aufweisen. Das LDA-Modell zeigte, dass 94,1 % der käuflich erworbenen Proben der korrekten Eischalenfarbe zugeordnet wurde. Die ¹H-NMR-Spektren von 2 Eiern mit brauner Schale wurden als weiß, die ¹H-NMR-Spektren von 4 Eiern mit brauner Schale wurden als cremefarben, die ¹H-NMR-Spektren von 10 Eiern mit weißer Schale wurden als braun, wobei hier die Eier von derselben Probe stammten, und die ¹H-NMR-Spektren von 2 Eiern mit weißer Schale wurden als cremefarben vorhergesagt.

4.6. Ergebnisse der physikalischen Parameter

Die erhobenen physikalischen Parameter (Tabelle 16 und Tabelle 17) wurden je Haltungsform gemittelt und ihre Standardabweichung berechnet. Mittels einem Kruskal-Wallis Test und einem post hoc Bonferroni-Test wurden die Proben auf signifikante Unterschiede im Median untersucht.

Es zeigt sich, dass die Proben aus ökologischer Haltungsform ein signifikant geringeres Eigewicht ohne Schale aufweisen, als die Proben aus den anderen Haltungsformen. Bei den Parametern Eigewicht mit Schale und des Gewichts des Eigelbs liegen signifikante Unterschiede zwischen Proben aus ökologischer und Kleingruppenhaltung zu Bodenhaltung, Freilandhaltung und aufgestallte Freilandhaltung vor. Das Gewicht des Eiklars zeigte keine Unterschiede zwischen den Proben der jeweiligen Haltungsformen. Die Höhe und Breite des Eigelbs unterscheidet sich signifikant zwischen den Proben aus ökologischer Haltung und den weiteren Haltungsformen.

Die Luftblasengröße ist bei den Proben aus ökologischer Haltung und aufgestallter Freilandhaltung signifikant höher im Vergleich zu den Proben aus den anderen Haltungsformen. Im Roche-Wert zeigt sich, dass die Proben aus ökologischer Haltung und Kleingruppenhaltung einen signifikant geringeren Wert aufweisen als die Proben aus den weiteren Haltungsformen. Bei den Proben aus der Kleingruppenhaltung liegt der Roche-Wert zwischen 3 und 14, abhängig davon, ob die Legehennen

dieser Proben mit oder ohne Farbstoffzusatz gefüttert wurden. Der Mittelwert der Anzahl der Blutflecke liegt bei den Proben aller Haltungsformen unter eins.

Der Median des Yolk Indexes und der Haugh Unit der Proben aus ökologischer Haltung unterscheidet sich signifikant zu dem der Proben aus Boden-, Freiland- und aufgestallte Freilandhaltung.

Tabelle 16: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der physikalischen Parameter aller Proben.

Probe	Gewicht des Eis mit Schale [g]		Luftblasen-größe [mm]		Roche-Wert		Anzahl der Blutflecke		Breite des Eigelbs [mm]		Höhe des Eigelbs [mm]							
	m	std	m	std	m	std	m	std	m	std	m	std						
B-001	49,2	± 2,8	1	± 1	13	± 0	0	± 1	36	± 2	22	± 1						
B-002	58,4	± 2,3	2	± 1	15	± 0	0	± 0	37	± 2	21	± 1						
B-003	56,8	± 3,9	2	± 1	13	± 1	0	± 0	35	± 1	20	± 1						
B-004	51,6	± 0,0	2	± 1	13	± 1	0	± 0	38	± 1	20	± 1						
B-005	52,6	± 4,0	2	± 1	14	± 1	0	± 0	35	± 2	18	± 1						
B-006	61,6	± 5,1	2	± 0	14	± 1	5	± 4	39	± 1	18	± 1						
B-007	60,8	± 3,9	3	± 1	14	± 0	0	± 0	36	± 2	18	± 1						
B-008	59,1	± 4,2	2	± 1	14	± 0	0	± 0	38	± 2	19	± 1						
B-009	61,8	± 3,2	2	± 1	13	± 0	0	± 0	39	± 1	19	± 1						
B-010	66,4	± 3,0	2	± 1	13	± 1	0	± 0	40	± 1	20	± 1						
B-011	62,1	± 2,2	1	± 1	13	± 1	0	± 0	40	± 1	20	± 1						
B-012	62,5	± 4,9	2	± 0	12	± 0	1	± 1	40	± 1	20	± 1						
B-013	53,5	± 5,2	1	± 0	13	± 1	0	± 1	35	± 2	19	± 1						
B-014	59,9	± 5,2	2	± 1	13	± 1	2	± 3	39	± 2	21	± 1						
B-015	59,0	± 4,1	3	± 1	13	± 1	1	± 2	41	± 2	21	± 1						
B-016	63,4	± 3,2	2	± 1	13	± 1	1	± 1	40	± 1	18	± 1						
B-017	51,5	± 3,7	2	± 0	14	± 0	0	± 0	36	± 1	18	± 1						
B	57,5	± 5,7	a	1,8	± 0,8	a	13,5	± 0,8	a	0,6	± 1,8	a	37,8	± 2,5	a	19,5	± 1,6	a
K-001	61,9	± 3,4	2	± 1	13	± 0	0	± 0	42	± 2	17	± 1						
K-002	58,1	± 4,3	2	± 1	13	± 1	0	± 0	36	± 1	19	± 1						
K-003	61,7	± 5,6	1	± 0	3	± 1	0	± 0	40	± 3	20	± 2						
K-004	62,1	± 3,1	2	± 1	14	± 0	0	± 0	39	± 1	21	± 1						
K-005	66,6	± 4,3	2	± 1	13	± 1	0	± 0	41	± 1	18	± 2						
K-006	50,4	± 3,1	1	± 0	3	± 0	0	± 0	33	± 1	19	± 0						
K-007	63,6	± 3,9	1	± 1	14	± 1	0	± 0	39	± 1	20	± 2						
KG	60,3	± 5,8	b	1,7	± 0,8	a	10,5	± 4,6	b	0	± 0	b	38,5	± 3,1	ab	19,0	± 1,6	a
F-001	57,2	± 4,0	1	± 1	15	± 1	0	± 0	40	± 1	18	± 1						
F-002	60,5	± 8,8	1	± 0	15	± 1	0	± 0	37	± 1	18	± 1						
F-003	61,2	± 5,0	2	± 0	14	± 0	0	± 0	39	± 2	20	± 1						

Abschlussbericht 2024 – OekoEiSpec (FKz: 2819OE055)

Probe	Gewicht des Eis mit Schale [g]			Luftblasen-größe [mm]			Roche-Wert			Anzahl der Blutflecke			Breite des Eigelbs [mm]			Höhe des Eigelbs [mm]		
	m	std		m	std		m	std		m	std		m	std		m	std	
F-004	61,1	± 4,9		1	± 0		15	± 0		0	± 0		35	± 1		21	± 1	
F-005	49,4	± 2,7		1	± 0		14	± 0		0	± 0		31	± 1		20	± 2	
F-006	45,8	± 2,7		1	± 1		13	± 1		0	± 1		36	± 3		20	± 1	
F-007	57,8	± 3,8		1	± 1		14	± 1		0	± 0		38	± 1		20	± 1	
F-008	57,1	± 2,5		2	± 0		14	± 1		0	± 0		42	± 1		20	± 1	
F-009	64,0	± 4,0		3	± 1		14	± 1		0	± 0		40	± 1		20	± 1	
F-010	61,4	± 3,2		2	± 1		13	± 1		0	± 0		42	± 2		17	± 1	
F-011	66,1	± 4,1		3	± 1		13	± 1		0	± 0		42	± 1		17	± 2	
F-012	60,8	± 2,6		3	± 1		13	± 0		0	± 0		43	± 1		18	± 1	
F-013	59,4	± 3,5		3	± 1		13	± 1		1	± 1		38	± 1		18	± 1	
F-014	54,2	± 2,4		3	± 1		13	± 0		0	± 0		36	± 1		20	± 1	
F-015	58,2	± 3,9		3	± 1		13	± 1		0	± 1		38	± 2		20	± 1	
F-016	60,4	± 3,7		2	± 1		13	± 1		0	± 0		41	± 1		19	± 1	
F	57,5	± 6,2	a	1,9	± 0,9	a	13,6	± 1,0	a	0,1	± 0,4	b	38,5	± 3,4	b	19,1	± 1,5	a
FB-001	62,1	± 4,9		3	± 1		12	± 1		0	± 0		42	± 2		19	± 1	
FB-002	60,7	± 2,8		4	± 0		12	± 1		0	± 1		40	± 1		18	± 1	
FB-003	63,9	± 4,8		2	± 1		13	± 1		1	± 1		41	± 2		18	± 1	
FB	63,8	± 5,2	a	2,9	± 1,1	b	12,5	± 0,6	c	0,4	± 0,9	ab	41,0	± 1,9	b	18,3	± 0,8	a
O-001	60,3	± 2,8		3	± 1		8	± 3		2	± 3		41	± 2		21	± 1	
O-002	61,6	± 4,0		2	± 0		8	± 1		1	± 2		38	± 1		19	± 1	
O-003	64,3	± 3,5		3	± 1		10	± 1		0	± 0		43	± 2		20	± 1	
O-004	49,7	± 3,6		3	± 1		11	± 1		0	± 0		37	± 1		21	± 1	
O-005	55,8	± 2,3		3	± 1		11	± 1		0	± 0		38	± 2		22	± 1	
O-006	64,0	± 3,6		2	± 1		6	± 3		1	± 2		39	± 1		20	± 1	
O-007	54,3	± 4,5		3	± 1		7	± 1		0	± 0		40	± 1		19	± 1	
O-008	56,7	± 3,8		3	± 1		7	± 3		0	± 0		39	± 1		20	± 1	
O-009	47,7	± 2,2		4	± 4		6	± 1		2	± 2		37	± 1		20	± 2	
O-010	61,5	± 2,9		2	± 1		8	± 1		1	± 1		39	± 4		20	± 1	
O-011	54,5	± 3,2		2	± 1		6	± 1		0	± 0		37	± 1		20	± 1	
O-012	45,5	± 3,2		2	± 0		8	± 1		0	± 0		35	± 1		15	± 0	
O-013	57,7	± 3,9		3	± 1		7	± 1		0	± 1		41	± 2		19	± 2	

Abschlussbericht 2024 – OekoEiSpec (FKz: 2819OE055)

Probe	Gewicht des Eis mit Schale [g]		Luftblasen-größe [mm]		Roche-Wert		Anzahl der Blutflecke		Breite des Eigelbs [mm]		Höhe des Eigelbs [mm]							
	m	std	m	std	m	std	m	std	m	std	m	std						
O-014	60,4	± 4,2	3	± 1	8	± 1	0	± 0	42	± 2	17	± 1						
O-015	62,4	± 4,5	2	± 1	9	± 1	0	± 0	39	± 1	20	± 1						
O-016	50,3	± 3,7	3	± 1	8	± 1	0	± 0	37	± 2	19	± 1						
O-017	57,6	± 3,2	3	± 1	5	± 1	0	± 0	40	± 0	19	± 0						
O	56,8	± 6,5	b	2,7	± 1,0	b	7,8	± 2,1	b	0,4	± 1,3	ab	39,0	± 2,6	c	19,4	± 1,9	b

Tabelle 17: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der physikalischen Parameter aller Proben.

Probe	Höhe Eiklar [mm]		Gewicht Eigelb [g]		Gewicht Eiklar [g]		Gewicht Ei ohne Schale (g)		Yolk Index		Haugh Unit	
	m	std	m	std	m	std	m	std	m	std	m	std
B-001	10	± 0	11,9	± 0,5	31,8	± 1,2	43,7	± 1,3	0,60	± 0,04	101,78	± 0,64
B-002	7	± 1	16,8	± 1,6	32,3	± 1,7	49,1	± 3,0	0,57	± 0,04	85,94	± 5,37
B-003	8	± 2	15,4	± 0,7	33,5	± 5,3	48,9	± 5,5	0,59	± 0,01	87,68	± 10,56
B-004	6	± 1	13,3	± 1,0	30,8	± 0,8	51,3	± 0,8	0,52	± 0,03	79,76	± 9,19
B-005	6	± 1	11,8	± 1,1	33,3	± 3,7	52,4	± 5,0	0,51	± 0,05	85,07	± 12,41
B-006	6	± 1	14,3	± 1,0	38,2	± 3,2	60,5	± 4,7	0,45	± 0,03	72,50	± 8,47
B-007	7	± 2	14,0	± 1,4	37,8	± 3,5	51,8	± 4,1	0,51	± 0,05	83,73	± 9,94
B-008	8	± 1	16,1	± 1,0	33,7	± 3,2	49,8	± 3,9	0,50	± 0,05	88,32	± 6,19
B-009	7	± 1	16,5	± 1,2	34,7	± 2,6	51,2	± 2,8	0,48	± 0,02	80,89	± 5,21
B-010	5	± 1	18,0	± 0,8	38,2	± 1,8	56,3	± 1,8	0,50	± 0,01	68,52	± 4,97
B-011	6	± 1	17,6	± 1,1	33,3	± 2,8	50,9	± 3,5	0,50	± 0,04	73,40	± 6,08
B-012	5	± 1	15,4	± 1,8	37,7	± 3,8	53,1	± 4,4	0,50	± 0,03	63,20	± 8,04
B-013	6	± 1	11,5	± 0,7	34,4	± 2,5	45,8	± 3,0	0,54	± 0,03	78,86	± 5,72
B-014	6	± 1	14,9	± 0,8	35,9	± 3,9	50,9	± 4,3	0,54	± 0,05	74,91	± 7,23
B-015	5	± 1	16,3	± 1,0	36,3	± 2,8	52,6	± 2,9	0,50	± 0,02	70,48	± 6,64
B-016	6	± 1	15,9	± 1,1	35,2	± 3,0	51,0	± 3,4	0,45	± 0,02	78,12	± 6,90
B-017	9	± 1	12,1	± 0,8	31,8	± 2,6	43,9	± 3,0	0,51	± 0,02	97,44	± 5,56

Abschlussbericht 2024 – OekoEiSpec (FKz: 28190E055)

Probe	Höhe Eiklar [mm]			a	Gewicht Eigelb [g]			a	Gewicht Eiklar [g]			a	Gewicht Ei ohne Schale (g)			a	Yolk Index			a	Haugh Unit			a
	m	std			m	std			m	std			m	std			m	std			m	std		
B	6,7	± 1,7	a	14,8	± 2,3	a	34,7	± 3,7	a	50,7	± 5,3	a	0,52	± 0,05	a	80,65	± 12,10	a						
K-001	6	± 1		17,3	± 1,3		36,2	± 3,4		61,9	± 4,4		0,42	± 0,04		73,47	± 6,21							
K-002	6	± 1		16,0	± 0,8		33,8	± 2,5		49,8	± 2,9		0,51	± 0,02		75,73	± 5,58							
K-003	6	± 1		17,3	± 1,7		35,5	± 4,1		55,4	± 3,4		0,49	± 0,03		71,01	± 11,91							
K-004	7	± 1		18,4	± 1,3		37,0	± 2,6		52,8	± 5,1		0,53	± 0,03		83,26	± 6,62							
K-005	6	± 1		18,0	± 1,4		35,5	± 3,6		53,4	± 4,6		0,45	± 0,04		69,96	± 7,13							
K-006	5	± 1		11,3	± 0,7		32,5	± 2,1		43,9	± 2,5		0,58	± 0,03		72,52	± 5,92							
K-007	7	± 1		16,9	± 1,3		34,5	± 4,3		51,4	± 5,4		0,50	± 0,05		83,33	± 7,45							
KG	6,0	± 1,2	ab	16,4	± 2,5	b	35,0	± 3,5	a	51,5	± 5,3	a	0,50	± 0,06	a	75,61	± 8,87	bc						
F-001	6	± 1		16,0	± 0,9		35,3	± 3,2		51,3	± 3,5		0,45	± 0,02		76,72	± 6,20							
F-002	7	± 1		16,6	± 1,3		33,7	± 3,2		50,3	± 3,2		0,50	± 0,03		86,07	± 4,80							
F-003	7	± 1		16,8	± 1,3		35,9	± 3,7		52,8	± 4,6		0,51	± 0,03		84,97	± 4,80							
F-004	7	± 1		14,9	± 0,9		35,4	± 2,8		50,3	± 3,3		0,59	± 0,03		82,36	± 8,20							
F-005	9	± 2		10,6	± 1,0		31,7	± 2,2		42,4	± 2,4		0,64	± 0,05		94,45	± 6,94							
F-006	6	± 1		10,0	± 0,8		26,8	± 3,0		36,8	± 3,3		0,56	± 0,04		84,28	± 4,86							
F-007	5	± 0		15,2	± 0,8		35,2	± 2,8		50,4	± 3,4		0,52	± 0,03		72,04	± 4,34							
F-008	7	± 1		16,0	± 1,0		35,0	± 3,1		51,0	± 3,5		0,48	± 0,02		82,96	± 5,84							
F-009	6	± 1		16,7	± 1,5		34,5	± 3,1		51,2	± 4,3		0,52	± 0,02		77,36	± 5,83							
F-010	5	± 1		17,3	± 1,7		35,1	± 3,8		52,4	± 4,7		0,40	± 0,04		63,31	± 9,79							
F-011	5	± 0		16,3	± 1,4		41,5	± 6,9		57,8	± 7,2		0,41	± 0,04		68,75	± 3,99							
F-012	6	± 1		17,8	± 1,0		35,0	± 2,5		52,8	± 3,1		0,42	± 0,02		73,15	± 5,98							
F-013	6	± 1		14,5	± 1,1		35,9	± 3,4		50,5	± 4,2		0,48	± 0,03		78,86	± 6,15							
F-014	8	± 1		12,5	± 0,6		32,8	± 2,0		45,3	± 2,3		0,54	± 0,03		92,53	± 4,19							
F-015	7	± 1		15,5	± 1,1		36,1	± 1,9		51,6	± 2,5		0,53	± 0,02		83,96	± 5,32							
F-016	6	± 1		15,1	± 0,7		36,7	± 2,7		50,8	± 3,0		0,47	± 0,03		79,13	± 6,75							
F	6,5	± 1,4	a	15,1	± 2,4	a	34,7	± 4,3	a	49,8	± 5,9	a	0,50	± 0,07	a	79,98	± 9,81	a						
FB-001	6	± 1		17,9	± 1,2		37,6	± 5,1		55,6	± 6,1		0,44	± 0,02		76,00	± 9,47							
FB-002	5	± 1		17,4	± 0,9		37,3	± 1,9		54,7	± 2,3		0,45	± 0,03		67,98	± 6,62							
FB-003	5	± 1		16,0	± 1,3		39,8	± 4,7		55,8	± 5,6		0,45	± 0,01		66,89	± 14,78							
FB	5,4	± 1,2	a	17,1	± 1,4	a	38,2	± 4,1	a	55,3	± 4,8	a	0,45	± 0,02	a	70,29	± 11,24	ab						
O-001	7	± 2		14,5	± 1,2		36,6	± 3,1		51,1	± 3,7		0,52	± 0,03		83,68	± 11,06							
O-002	6	± 1		14,9	± 1,3		38,8	± 2,5		53,6	± 3,4		0,50	± 0,03		112,62	± 2,87							

Abschlussbericht 2024 – OekoEiSpec (FKz: 2819OE055)

Probe	Höhe Eiklar [mm]			Gewicht Eigelb [g]			Gewicht Eiklar [g]			Gewicht Ei ohne Schale (g)			Yolk Index			Haug Unit		
	m	std		m	std		m	std		m	std		m	std		m	std	
O-003	6	±	1	17,1	±	0,9	35,6	±	3,2	52,9	±	3,6	0,46	±	0,02	76,37	±	6,73
O-004	8	±	1	11,0	±	0,4	30,5	±	2,5	41,5	±	2,5	0,56	±	0,04	90,37	±	6,65
O-005	8	±	2	14,3	±	1,0	35,7	±	2,7	50,0	±	3,1	0,57	±	0,03	90,43	±	9,11
O-006	6	±	1	17,1	±	0,9	41,0	±	3,9	58,0	±	4,3	0,52	±	0,03	70,73	±	8,57
O-007	6	±	1	16,6	±	1,1	33,4	±	1,9	50,0	±	2,5	0,48	±	0,02	77,64	±	7,50
O-008	5	±	1	15,9	±	1,3	34,7	±	2,6	50,6	±	3,2	0,50	±	0,04	65,70	±	9,22
O-009	8	±	1	11,4	±	0,6	30,1	±	1,8	41,5	±	2,0	0,55	±	0,05	91,36	±	7,28
O-010	6	±	1	16,7	±	1,7	36,5	±	1,5	53,2	±	3,0	0,52	±	0,05	74,97	±	7,68
O-011	6	±	1	13,7	±	0,9	35,2	±	2,3	48,9	±	2,8	0,53	±	0,03	77,51	±	7,76
O-012	5	±	1	10,1	±	1,0	29,5	±	2,5	39,7	±	3,1	0,42	±	0,02	71,57	±	4,60
O-013	5	±	1	17,2	±	1,4	33,2	±	3,3	50,4	±	3,8	0,45	±	0,04	69,68	±	13,19
O-014	6	±	1	17,7	±	1,3	31,4	±	2,6	49,1	±	2,7	0,41	±	0,02	79,36	±	4,92
O-015	8	±	1	15,2	±	0,6	37,1	±	3,2	52,3	±	3,3	0,51	±	0,03	87,44	±	6,10
O-016	7	±	1	12,6	±	0,8	32,4	±	2,0	45,1	±	2,6	0,52	±	0,04	84,92	±	7,48
O-017	7	±	1	15,2	±	1,1	33,3	±	3,0	48,6	±	3,6	0,47	±	0,01	82,86	±	5,22
O	6,4	±	1,5	14,8	±	2,5	34,4	±	4,0	49,2	±	5,6	0,50	±	0,06	79,35	±	10,72

5. Diskussion

Innerhalb dieses Projekts konnte eine valide $^1\text{H-NMR}$ -Methode für die Analyse von Eigelbextrakten entwickelt werden. Die berechnete relative Standardabweichung für die Messpräzision liegt bei jeder Messung im Bereich von $\pm 2\%$. Im Vergleich, in der Literatur wurde eine Messunsicherheit bei $^1\text{H-NMR}$ mit $1,5\%$ beschrieben [38]. Die relative Standardabweichung aller Integrale liegt unter 5% . Verglichen mit der $^1\text{H-NMR}$ -Aufarbeitungsmethode von Rindfleisch mit Messung in $90\% \text{H}_2\text{O} + 10\% \text{D}_2\text{O}$ von Bischof, et al. (2021) [39], die eine Reproduzierbarkeit mit einer relativen Standardabweichung von $4,34\%$ bis $7,50\%$ aufweist, ist die relative Standardabweichung bei dieser Ei-Aufarbeitungsmethode mit $0,40\%$ bis $4,80\%$ deutlich geringer. Die Ei-Aufarbeitungsmethode diente als Grundlage für die Entwicklung der Datenbank und der statistischen Modelle.

Die Ergebnisse des Lagertest zeigen, dass die Lagerung bis 28 Tage unter den getesteten Bedingungen keine Auswirkung auf die Eigelbextrakte und ihre $^1\text{H-NMR}$ -Spektren hat. Somit können die Proben nach Ankunft am DIL erst einige Tage in der Kühlung gelagert werden, bevor sie für die Probenaufarbeitung verwendet werden. Weiterhin zeigt sich, dass nach der ausgewählten Gefrier Trocknung ebenfalls keine mit $^1\text{H-NMR}$ -detektierbaren Veränderungen im Inhaltsstoffprofil festzustellen sind. Johnson, et al. (2018) [40] publizierten, dass sich das Metabolom im Ei über eine Lagerzeit von 12 Wochen bei 23°C verändert und identifizierte Cholin als Biomarker für das Alter des Eis. In einer weiteren Veröffentlichung 2020 zeigten sie, dass bei einer Lagerung über 12 Wochen bei 5°C die Veränderung im Metabolom, der Cholin-Gehalt, aus der vorherigen Publikation nicht mehr reproduzierbar ist [41]. Cholin zeigt im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die gleichen Signale bei 4.25 , 3.60 und 3.22 ppm, wie der hier gemessene Standard L- α -Phosphatidylcholin [42], da die Signale von dem gleichen Anteil der chemischen Struktur hervorgerufen wird.

5.1 Auswirkung des Alters der Legehennen auf den Eigelbextrakt

Innerhalb der Haltungform Bodenhaltung wurde eine Legehennenherde über ihren Lebenszyklus begleitet. Die non-targeted Auswertung und statistische Analyse zeigt hierzu, dass sich die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Eigelbextrakte voneinander unterscheiden. Das bedeutet, dass sich die Zusammensetzung des Eigelbs mit dem Alter der Legehennen verändern. Dies kann zum einen an den alterungsbedingten Veränderungen im Stoffwechsel der Legehennen liegen, zum anderen aber auch an dem häufig dem Alter angepasste Futter der Legehennen. Entsprechend war die Entscheidung, die Legehennen in mehreren Altersstufen zu unterteilen und für jede Stufe Proben zu beziehen, zielführend und ausschlaggebend für die Modelle hinsichtlich weiterer Einflussfaktoren wie Haltungform oder Rasse.

In der Literatur wurde die Auswirkung des Alters der Legehennen auf das Fettsäuremuster bereits untersucht. Diese Untersuchungen zeigten, dass das Alter der Legehennen eine Auswirkung auf die Zusammensetzung der Fettsäuren des Eigelbs haben kann. Generell konnten signifikante Unterschiede in der Summe der gesättigten, einfach ungesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Eiern von Legehennen unterschiedlichen Alters festgestellt werden [43-46]. Nielsen (1998) [47] berichteten, dass in dem Eigelb von 21-Wochen-alten Legehennen der Gehalt von den Fettsäuren C16, C16-1, C18-2, C18-3(n3), C18-3(n6), C18-4, C20-4, C20-5, C22-4, C22-5(n3), C22-5(n6), C22-6 signifikant unterschiedlich zu dem im Eigelb von 57-Wochen-alten Legehennen ist. Oliveira, et al. (2010) [48] zeigten, dass die Fettsäuren C14, C16, C20, C17-1, C18-2, C20-4, C20-5, C22-5 und C22-6 signifikant unterschiedlich im Eigelb von 22-Wochen-alten Legehennen und 54-Wochen-alten Legehennen der Rasse Dekalb sind. Baykalir, et al. (2020) [46] konnten lediglich signifikante Unterschiede in den Gehalten von C17 und C24-1 zwischen den Eigelben von 30- und 60-Wochen-alten Legehennen feststellen. Nowaczewski, et al. (2021) [43] beobachteten signifikante Unterschiede in den Gehalten von C14, C16, C16-1, C18, C18-1 und C20-5 in den Eigelben von 44- und 60-Wochen-alten Legehennen. Kowalska, et al. (2021) [44] zeigten signifikante Unterschiede in den Gehalten von C16, C16-1, C18-1, C20-1, C20-2 und C24 in Eiern von Legehennen im Alter von 19, 29 und 39 Wochen. Zita, et al. (2022) [45] beobachteten Unterschiede in den Gehalten von C16, C17-1, C18, C18-1, C18-2, C18-3(n3), C18-3(n6), C20-2, C20-3, C20-4 und C24 in den Eigelben von Legehennen im Alter von 28-30 und 78-80 Wochen. Die Literatur zeigt, dass sich das Alter der Legehennen auf das Fettsäuremuster im Eigelb auswirkt, diese Auswirkungen aber vom Alter und von der Rasse der Legehennen abhängig sind. Somit bestätigen die Ergebnisse der targeted Analysen der Literatur die Ergebnisse des non-targeted Ansatzes in diesem Projekt. Daraus ließ sich schließen, dass für eine gute, repräsentative Stichprobe von Eiern auch der Einflussfaktor Alter der Legehennen berücksichtigt werden sollte.

5.2 Auswirkung der Haltungform der Legehennen auf den Eigelbextrakt

Der Unterschied zwischen Eiern von Legehennen aus ökologischer Haltung und aus konventioneller Haltung wurde auch von Ackermann, et al. (2019) [3] mittels ¹H-NMR Spektroskopie betrachtet. Die Autoren untersuchten 344 behördlich gesammelte Proben und berechneten ein LDA-Modell mit einer Modellgenauigkeit von 93 %. Somit zeigten die Autoren, dass anhand der ¹H-NMR-Spektren des Eigelbextraktes eine Trennung der Proben in die beiden Haltungsformen (ökologisch vs. konventionell) möglich ist. Ebenso entwickelten Hajjar, et al. (2021) [49] und Lösel, et al. (2023) [50] basierend auf ¹H-NMR bzw. LC-MS-Ansätzen statistische Modelle zur Klassifikation von Eiern hinsichtlich ökologischer oder konventioneller Haltungform der Legehennen. Hajjar, et al. (2021) [49] zeigten ein LDA-Modell mit einer Modellgenauigkeit von 100 %, wobei dieses auf 34 Proben basiert, die teilweise aus örtlichen

Supermärkten erworben wurden, und somit die Authentizität der Eier nicht zwingend gegeben ist. Lösel, et al. (2023) [50] zeigten ein Random Forest Modell, basierend auf 270 behördlich gesammelten Proben, die ebenfalls von Ackermann, et al. (2019) [3] untersucht wurden, mit einer Modellgenauigkeit von 96,3 %. Im Vergleich dazu, zeigt das in diesem Projekt berechnete LDA-Modell basierend auf mehr als 4.000 Eiern eine höhere Modellgenauigkeit von 99,9 %. Innerhalb dieses Projekts wurden alle Eier einzeln aufgearbeitet und gemessen, während bspw. Ackermann, et al. (2019) [3] Poolproben aus den Eiern hergestellt und diese gemessen haben. Vergleichend zur Literatur, hebt sich das hier entwickelte LDA-Modell zum einen durch seine authentischen Proben und zum anderen durch die hohe Anzahl an Proben ($n > 4.000$) hervor, wodurch die Wahrscheinlichkeit größer ist, dass diese Stichprobe die Grundgesamtheit der Eier besser abbildet.

Die größten Unterschiede zeigen sich in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren bei 0.9 – 1 ppm und 2.8 – 3.0 ppm. Bei 0.9 – 1 ppm liegen die Signale von ω 3-Fettsäuren, während bei 2.8 – 3.0 ppm die Signale von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Docosahexaensäure und ω 3-Fettsäuren liegen [3]. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Sokołowicz, et al. (2022) [51] und Samman, et al. (2009) [52] überein. Die Autoren zeigten, dass die mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Docosahexaensäure und ω 3-Fettsäuren signifikant unterschiedlich zwischen konventionellen und ökologisch produzierten Eiern sind [52]. Die von Hajjar, et al. (2021) [49] entwickelte $^1\text{H-NMR}$ -Methode basierte auf der Extraktion der Triglyceride, und zeigte, dass konjugierte Linolsäure und Linolensäure als potenzielle Biomarker im Eigelb für ökologische Haltung fungieren können. Des Weiteren zeigten die Autoren statistische Modelle zur Unterscheidung der Herkunft und der Rasse der gleichen Haltungsform, die allerdings auf Proben von zwei verschiedenen Farmen basieren. [49]

Generell wurden in den vergangenen Jahren mehrere Studien veröffentlicht, die auf Basis verschiedener Methoden wie NIR-Spektroskopie [18, 53], Raman-Spektroskopie [54], LC-MS/MS [50, 55] und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie [49, 56] eine Unterscheidung der Haltungsform von Legehennen anhand des Eigelbs ermöglichen. Neben den oben genannten Veröffentlichungen zur Unterscheidung von Eiern von Legehennen aus ökologischer und konventioneller Haltung, gibt es weitere Veröffentlichungen, die den Unterschied von 2 bis 4 verschiedenen Haltungsformen betrachten. Chin, et al. (2023) [55] analysierte 357 behördlich gesammelte Eier aus Käfig-, Boden- und Freilandhaltung mit LC-MS/MS und berechneten zwei statistische Modelle zur Vorhersage dieser drei Haltungsformen, deren Klassenvorhersagegenauigkeit zwischen 80 – 97% bzw. 77 – 96% je Klasse liegen. Puertas, et al. zeigten in zwei Veröffentlichungen statistische Modelle basierend auf den UV-Vis-NIR-Messungen von 84 bzw. 48 Proben aus ökologischer, Freiland-, Boden- und Käfighaltung, die in lokalen Supermärkten erworben wurden [18, 53]. Die Autoren berechneten Modelle mit einer Modellgenauigkeit von 100 %. Kopec, et al. (2022) [54] untersuchten 40 Eier (Beschaffungsart unbekannt) aus Käfig-, Boden-,

Freiland- und ökologischer Haltung mittels Raman-Spektroskopie und entwickelten ein statistisches Modell mit einer Spezifität und Sensivität je Haltungsform zwischen 0,9 und 1,0. Cardoso, et al. (2022) [56] analysierten 81 Eier aus Boden- und Freilandhaltung, die teilweise gekauft oder vom Produzenten bezogen wurden, mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und entwickelten ein statistisches Modell mit einer Modellgenauigkeit von 93,8 %. Im Vergleich dazu, zeigte das hier entwickelte LDA-Modell für alle vier Haltungsformen eine Modellgenauigkeit von 97,1 %. Dieses Modell basiert im Vergleich zur genannten Literatur auf einer größeren Anzahl an authentischen Proben ($n > 4.000$) und erlaubt die Annahme, dass diese deutlich größere Stichprobe repräsentativer als die Stichproben aus der Literatur ist. Durch diese größere Stichprobe ist auch die Wahrscheinlichkeit höher, dass die Variationen innerhalb einer Klasse repräsentativer dargestellt werden, und somit die Modellgenauigkeit geringer ausfallen kann, als bei Modellen mit kleineren Stichproben.

Somit spiegelt sich die jeweilige Haltungsform der Legehennen im Eigelbextrakt wider. Marelli, et al. (2021) [57] zeigten anhand von Eiern aus den vier verschiedenen Haltungsformen signifikante Unterschiede im Gehalt der mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Die Gehalte von Docosahexaensäure wiesen keine Unterschiede zwischen den Haltungsformen auf [57]. Islam, et al. (2021) [58] berichteten über signifikant höhere Gehalte von Docosahexaensäure in Eiern aus Freilandhaltung gegenüber Eiern aus „konventioneller“ Stallhaltung, aber keine Unterschiede in den gesamten mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Zusätzlich konnte ein doppelt hoher Gehalt an $\omega 3$ -Fettsäuren in den Freiland-Eiern festgestellt werden [58]. Dalle Zotte, et al. (2021) [59] berichteten, dass der Ölsäuregehalt signifikant niedriger und der Gehalt an Dihomogammalinolensäure signifikant höher bei Eiern aus ökologischer Haltung im Vergleich zu Boden- und Käfighaltung ist. Ebenfalls konnten die Autoren signifikante Unterschiede in dem Gehalt der gesättigten Fettsäuren zwischen den Eiern aus Boden- und Käfighaltung beobachten. Sokołowicz, et al. (2018) [60] berichteten, dass sich der Gehalt an mehrfach gesättigten Fettsäuren zwischen den drei betrachteten Haltungsformen Bodenhaltung, Freilandhaltung und ökologische Haltung bei allen drei Genotypen (Green leg Partridge, Rhode Island Red und Hy-line Brown) signifikant unterscheidet, wobei der höchste Gehalt in Eiern aus Bodenhaltung und der geringste Gehalt in Eiern aus Freilandhaltung beobachtet wurde. Diese Unterschiede sind innerhalb der drei Genotypen unterschiedlich stark ausgeprägt, was bedeutet, dass der Genotyp ebenfalls einen Einfluss auf das Eigelb hat [60]. Bei den einfach ungesättigten Fettsäuren und gesättigten Fettsäuren sind nur bei je zwei Genotypen signifikante Unterschiede durch die Haltungsform erkennbar.

Die Ergebnisse zur Einordnung von gekauften Proben zeigten, dass bei Anwendung des LDA-Modells zur Vorhersage von ökologischer und konventioneller Haltung bei 83,3 % der Proben die Vorhersage des Modells mit dem Eistempel übereinstimmt, während bei dem LDA-Modell zur Vorhersage aller vier

Haltungsformen 56,7 % der Proben eine Übereinstimmung zwischen Vorhersage und Eistempel aufwiesen. Die geringe Übereinstimmung zwischen Modellvorhersage und Eistempel kann mehrere Gründe haben. Zum einen kann es daran liegen, dass die statistischen Modelle auf Basis der in diesem Projekt gesammelten Proben berechnet wurden. Dies bedeutet, dass die Modelle auf die vier ausgewählten Rassen beschränkt sind. Es kann sein, dass die käuflich erworbenen Proben von Legehennen einer anderen, hier nicht erfassten Rasse, stammen, der Eigelbextrakt somit eine rassebedingte veränderte Inhaltsstoffzusammensetzung aufweist und damit nicht in das berechnete Modell passt. Ebenso kann ein anders zusammengesetztes Futter für die Legehennen ebenfalls eine Auswirkung auf die Zusammensetzung des Eigelbextraktes haben, weshalb die Vorhersage durch das Modell ein falsches Ergebnis liefert. Zum anderen kann es ebenfalls daran liegen, dass die Eistempel nicht die korrekte Haltungsform der Legehennen beschreiben, und die Modellvorhersage deshalb nicht mit dem Eistempel übereinstimmt.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich mehrere Schlussfolgerungen ziehen: Zum einen wäre es sinnvoll, dass hier entwickelte Modell zur Vorhersage der Haltungsform von Legehennen mit weiteren authentischen Proben auszubauen, um eine noch sicherere Vorhersage der Haltungsform zu ermöglichen. Zum anderen zeigen die Ergebnisse, dass sich im Supermarkt erworbene, nicht authentische Proben nicht eignen, um ein statistisches Modell für die Authentizität der Haltungsform von Legehennen zu entwickeln. Außerdem konnte innerhalb dieses Projekts die Erkenntnis gewonnen werden, dass für die Entwicklung eines Authentifizierungsmodell für die Haltungsform auch weitere Einflussfaktoren auf das Ei (z.B. Rasse und Alter der Legehennen) berücksichtigt werden sollten, da sie sich auf das Metabolom des Eies auswirken.

5.3 Auswirkung der Rasse von Legehennen auf den Eigelbextrakt

Bei der Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Eigelbextrakte von verschiedenen Rassen zeigte sich, dass sich die Eigelbextrakte von Eier der verschiedenen Rassen Sandys und Lohmann Brown von den Weißlegerrassen (LSL und Dekalb) unterscheiden. Ein Modell zur Klassifizierung von LSL und Dekalb getrennt war leider nicht möglich. Dies könnte zum einen daran liegen, dass in der Realität auch Herden mit gemischten Rassen gehalten werden, wenn die geforderte Rasse nicht mit der gewünschten Anzahl an Legehennen zur Verfügung steht. Das bedeutet, dass die hier untersuchten Eier von nicht-reinrassigen Legehennenherden stammen könnten oder beide Hybridherden genetisch eng verwandt sind. Zum anderen wäre es auch möglich, dass sich die Eigelbextrakte der beiden Rassen LSL und Dekalb zu ähnlich sind, um statistisch differenziert werden zu können.

Goto, et al. (2019) [61] führten einen Metabolomics-Ansatz basierend auf GC-MS/MS anhand von Eigelbextrakten der beiden Rassen Rhode Island Red und Australorp und fanden keine

Markersubstanzen, die sich signifikant zwischen den Rassen unterscheidet. Hejdysz, et al. (2024) [62] zeigten, dass es signifikante Unterschiede im Fettsäuremuster, sowie in der Summe der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren als auch im Cholesterolgehalt der Eier zwischen den 14 untersuchten Rassen gibt. Anhand der Proben von den Genotypen Z-11, R-11 und Hy-line Brown zeigten Sokołowicz, et al. (2018) [60], dass sich die Summe der ungesättigten Fettsäuren aber nicht der Cholesterolgehalt zwischen den Rassen unterscheidet. Hajjar, et al. (2021) [49] berichteten, dass die Unterscheidung der Eier von zwei verschiedenen Hybridrassen (nicht näher beschrieben; weiß vs. braun) anhand dem ^1H -NMR-Spektren-Bereich zwischen 1.2 und 1.35 ppm, in dem unter anderem die Signale von gesättigten Fettsäuren liegen, möglich ist. Die Signale in diesem ppm-Bereich zeigten auch in diesen Projektergebnissen signifikant unterschiedlich große Integrale zwischen den Proben der Weißlegerrassen und der Rasse Lohmann Brown. González Ariza, et al. (2021) [63] beschrieben, dass sich die Eigelbproben der Rassen Utrerana und Leghorn in den Gehalten der Fettsäuren C16, C16-1 und C20-3(n6) signifikant unterscheiden. Franco, et al. (2020) [64] untersuchten Eier der Rassen Mos und Isa Brown und fanden signifikant unterschiedliche Gehalte in der Fettsäuren C14, C16, C16-1, C18, C18-1, C18-3(n6), C20-3(n6), C22-5 und C22-6. Die Literatur zeigt, dass die Eigelbextrakte und ihre Zusammensetzung abhängig von der Rasse der Legehennen sind.

Das entwickelte LDA-Modell für die Klassifizierung der Rasse wurde bei gekauften Proben angewandt. Es konnten mehr als 94 % der Proben entsprechend ihrer Eischalenfarbe durch das LDA-Modell richtig zugeordnet werden. Zum einen spricht dies dafür, dass die gekauften Proben zufällig von den gleichen Rassen abstammen, wie die Proben für die Modellentwicklung. Dagegen spricht allerdings die relativ schlechte Klassifizierung der gekauften Proben zur jeweiligen Haltungform. Zum anderen kann es sein, dass die Unterschiede im Eigelbextrakt von Eiern verschiedener Eischalen deutlich stärker ausgeprägt sind als die Haltungformunterschiede, und somit eine Übertragbarkeit auf unspezifizierte Proben einfacher möglich ist. Die Eischalenfarbe kann allerdings auch vom Gesundheitsstatus der Legehennen abhängen.

5.4 Auswirkung der Haltungform auf die physikalischen Parameter

Es zeigen sich beispielsweise im Eigewicht signifikante Unterschiede zwischen den Eiern aus den verschiedenen Haltungformen. Sokołowicz, et al. (2018) [60] zeigten, dass sich die Eigewichte zwischen den drei betrachteten Haltungformen nicht unterscheiden, sondern lediglich zwischen verschiedenen Genotypen. Alig, et al. zeigten hingegen, dass die Eier von Hennen in Freilandhaltung signifikant schwerer und Eier aus „Käfig-freier“ Haltung (7,4 m² große Boxen mit 60 Hennen) leichter waren als Eier aus Käfighaltung [65, 66]. Mayer, et al. (2023) [67] konnten keinen signifikanten Unterschied im Eigewicht zwischen Eiern aus Käfig- und „Nicht-Käfig-Haltung“ (2 m² große Boxen mit 14 Hennen) nachweisen. Weiter berichtete Nielsen (1998) [47], dass sich das Eigewicht um 19 g bei

Eiern von jungen Legehennen (21 Wochen) und älteren Legehennen (56 Wochen) unterscheidet. Islam, et al. (2021) [58] zeigten, dass sich das Eigewicht von Eiern aus konventioneller Haltung signifikant von Eiern aus ökologischer Haltung unterschied. Dies entspricht den Beobachtungen innerhalb dieses Projekts. Die Luftkammerhöhe unterscheidet sich bei den Eiern aus ökologischer Haltung zu denen aus konventioneller Haltung. Diese Beobachtung könnte möglicherweise daran liegen, dass die Eier aus ökologischer Haltung meist einen längeren Transportweg benötigen und somit ca. 1-2 Tage älter sind, als die konventionellen Eier, die aus dem Standort Lohne abgeholt werden können. Der Roche-Wert unterscheidet sich zwischen den Eiern aus verschiedener Haltungsformen. Die Proben aus ökologischer Haltung weisen eine große Schwankung im Roche-Wert auf (5-11) mit einem Mittelwert von 7,8, während die Eier aus Kleingruppenhaltung in zwei Gruppen mit Roche-Wert 3 (Fütterung ohne Farbzusatz) und 13-14 eingeteilt werden können. Somit lässt sich die Beobachtung des Roche-Werts bei den Kleingruppenhaltungseier auf die Fütterung zurückführen. Sokołowicz, et al. (2018) [60] zeigten, dass der Roche-Wert bei Bodenhaltungseiern am niedrigsten und bei ökologischen produzierten Eiern am höchsten ist. Alig, et al. (2023) [65] berichteten von signifikant höheren Roche-Werten bei Eiern aus Freilandhaltung im Vergleich zur Käfighaltung. Allerdings berichteten die Autoren auch, dass sie bei allen Legehennen in der Fütterung auf Pigmente verzichtet haben, was die deutlich geringeren Roche-Werte der Eier erklärt. Franco, et al. (2020) [64] zeigten, dass sich der Roche-Wert des Eigelbs signifikant zwischen den zwei betrachteten Rassen Mos und Isa Brown unterscheidet.

Der Yolk Index zeigt minimale, aber signifikante Unterschiede zwischen den Proben verschiedener Haltungsformen. Die Betrachtung des Mittelwerts zeigte, dass lediglich die Proben von aufgestellten Freiland-Legehennen einen niedrigeren Index aufweisen. Dies kann allerdings auch an der verhältnismäßig geringen Probenanzahl liegen. Bei Betrachtung der Haugh Unit zeigt sich, dass diese sich signifikant zwischen den Eiern aus Kleingruppenhaltung zu Eiern aus Boden- und Freilandhaltung unterscheidet. Diese Beobachtung wird von Lordelo, et al. (2017) [68] bestätigt. Die Haugh Unit kann zwischen verschiedenen Genotypen und Haltungsform der Legehennen variieren [51, 60, 64, 69, 70]. Die Haugh Unit wird verwendet, um die Eier einer Güteklasse zuordnen zu können. 13 Proben zeigten einen Haugh Unit-Wert zwischen 60 – 72 und entsprechen somit Güteklasse A, alle weiteren Ei-Proben wiesen einen Haugh Unit-Wert > 72 und fallen somit in die Güteklasse A+.

Die physikalischen Parameter zeigen signifikante Unterschiede, die allerdings nicht unmittelbar mit der Haltungsform in Verbindungen stehen, sondern auch von sämtlichen weiteren Einflussfaktoren, wie Alter, Futter, Alter des Eis, etc. abhängig sind.

5.5 Fazit

Insgesamt betrachtet konnte innerhalb dieses Projekts erfolgreich ein statistisches Modell entwickelt werden, dass die Haltungsform der Legehennen anhand der Eigelbsextraktes statistisch vorhersagen

kann. Bei der Betrachtung von ökologischer und konventioneller Haltung konnte eine Modellgenauigkeit von 99,9% erzielt werden. Die Klassifizierung der vier Haltungsformen Kleingruppe-, Boden-, Freiland- und ökologischer Haltung ist mit einem LDA-Modell mit einer Genauigkeit von 97,1 % möglich. Diese entwickelten Modelle basieren auf einer Sammlung von über 4.000 authentischen Eiprobe und sind somit nach unserem besten Wissen die statistischen Modelle mit der größten Probenanzahl, die bereits veröffentlicht wurden. Die Vorhersage der Haltungsform von gekauften Proben stellte sich als problematisch dar, was beispielsweise an Eiern einer unbekannt Rasse liegen könnte. Im Projektverlauf zeigte sich ebenfalls, dass die Faktoren wie Rasse und Alter der Legehennen einen großen Einfluss auf den Eigelbextrakt und somit auf die Modellentwicklung haben. Im Zuge dieser Untersuchungen konnte ebenfalls ein LDA-Modell zur Klassifizierung der Rassen (Weißleger, Sandys und Lohmann Braun) mit einer Modellgenauigkeit von 98,4% entwickelt werden.

5.6 Ausblick

Die entwickelten LDA-Modelle basieren auf einer großen Probenanzahl, die innerhalb der vergangenen vier Jahre gesammelt wurden. Um diese entwickelten Modelle nutzen zu können, wird es notwendig sein, diese Modelle fortlaufend mit neuen authentischen Proben zu erweitern, damit die Modelle ihre Aktualität beibehalten. Werden diese Modelle nicht in den nächsten Jahren gepflegt, könnte es sein, dass in ein paar Jahren durch die Veränderungen von Legehennenherden, Futterzusammensetzung, Wetterbedingungen, Haltungsform-Auflagen, etc. die Modelle veraltet sind und keine korrekten Vorhersagen mehr treffen können. Ebenso verbessert eine Erweiterung mit weiteren authentischen Proben z.B. auch weiterer Rassen die Modelle und somit die Absicherung der Authentizität der Haltungsform.

Des Weiteren wäre es interessant verschiedene statistische Modellberechnungen, wie z.B. Partial Least Square Diskriminanzanalyse, Support Vector Machine, quadratische Diskriminanzanalyse, etc. durchzuführen, um ggf. eine Modellvariante zu finden, die noch bessere Modelle und Modellvorhersagen ermöglichen. Diese weiteren Auswertungen könnten ebenfalls Informationen über potenzielle Biomarker herausstellen, die bisher mit den angewandten Methoden nicht entdeckt wurden. Dies wurde in einer internationalen Veröffentlichung (Bischof, G., Januschewski, E., & Juadjur, A. (2024). Authentication of Laying Hen Housing Systems Based on Egg Yolk Using ¹H NMR Spectroscopy and Machine Learning. *Foods*, 13(7), 1098) dargestellt.

Weiterhin wären weitere Versuche hinsichtlich der Fütterung von Legehennen und dessen Auswirkung auf den Eigelbextrakt und die Einordnung in die Haltungsform interessant und könnte weitere Zusammenhänge zwischen der Fütterung und den Haltungsformen darstellen.

6. Nutzen und Verwertbarkeit

6.1. Wirtschaftliche Erfolgsaussichten

Kurzfristig: Die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten der Ergebnisse wirken sich kurzfristig aus, da dadurch eine Qualitätssicherungsmethode für den Legehennensektor entwickelt wurde, die in der Wirtschaft und Industrie von den Unternehmen genutzt werden kann.

Mittel- und langfristig: Mittel- und langfristig kann diese etablierte Qualitätssicherungsmethode für einen stärkeren Fokus auf die ökologische Haltung von Legehennen sorgen. Durch den analytischen Nachweis der ökologischen Haltung von Legehennen gewinnen diese Produkte eine höhere Wertschätzung bei dem Verbraucher, wodurch es rentabler wird, diese Produkte zu produzieren. Nicht nur der Endverbraucher profitiert von den Projektergebnissen, sondern auch alle nachgeschalteten Verarbeitungsbetriebe, die dadurch sicherstellen können, dass ihre Rohware in qualitativ einwandfreien und ökologisch gesicherten Zustand befindet, was wiederum für Marketingzwecke verwendet werden kann.

Langfristig: Außerdem wurde durch dieses Projekt eine grundlegende Nachweismethode erforscht und entwickelt, wodurch Eier aus ökologischer Haltung von Eiern aus konventioneller Haltung, auch Kleingruppenhaltung, unterschieden werden können. Dadurch wird zum einen gewährleistet, dass der Produzent mit einer vertrauenswürdigen Deklaration werben kann und der Verbraucher auch das gewünschte Produkt erhält. Zum anderen steigt die Wertschätzung der Eiprodukte, besonders der Bio-Eiprodukte, wodurch die ökologisch produzierenden Hersteller einen größeren Marktanteil gewinnen können. Die Kleingruppenhaltung hat eine Auslauffrist für 2025. Somit kann ein Nachweis für diese Haltungsform jetzt entwickelt und später angewendet werden. Auch für die Ei-weiterverarbeitenden Firmen ergibt sich hier die Möglichkeit die Authentizität der Eier überprüfen zu lassen, um beispielsweise mit der Verwendung von ökologischen Eiern werben zu können.

6.2. Wissenschaftliche Erfolgsaussichten

Die Authentizitätsanalytik mittels ^1H -NMR-Spektroskopie ist ein auf statistische Mittel zurückgreifendes und auf der Auswertung von Spektren basierendes Nachweissystem für Lebensmittel pflanzlichen und tierischen Ursprungs, wie bspw. Ei. Die wissenschaftlich-technischen Erfolgsaussichten dieses Projekts sind sehr gut.

Dieses Projekt diente zur Analyse der Authentizität, Identifizierung von Lebensmitteln (Metabolomics) und Erzeugung von Produktqualitäten des Eies über die bereits bekannten Qualitätsparameter hinaus für die Haltung. Durch dieses Projekt wird die stetig zunehmende Wertschätzung von ökologischen Eiern unterstützt. Die Hersteller und Produzenten könnten ihre Eier mit einem Haltungsnachweis (z.B.

Ein entwickeltes Label) deklarieren. Dadurch wird dem (End-)Verbraucher versichert, dass er auch die Eier kauft, deren Haltungsform sie tatsächlich entsprechen.

Kurzfristig: Die Projektergebnisse resultieren in einer zuverlässigen Qualitätssicherungsmethode hinsichtlich der Haltungsform und Rasse für Hühner. Die wissenschaftlichen und technischen Erfolgsaussichten spiegeln sich in der vollendeten Qualitätssicherungsmethode wieder, die so derzeit noch nicht existiert hat.

Mittel- und Langfristig: Mittel- und langfristig soll diese Methode, die auf einer hohen Anzahl an Referenzproben basiert, durch aktuelle Proben auf den neusten Stand gehalten werden. Nur so kann auch noch in 10 Jahren gewährleistet werden, dass die Überprüfung der Qualität einwandfrei funktioniert. Außerdem kann diese Methode Einzug in die Wirtschaft erfahren, in dem Unternehmen ihre Eier mittels NMR-Spektroskopie überprüfen. Um diese Überprüfung auch für den Verbraucher darzustellen, kann ein Label entworfen werden, das auf die Verpackungen gedruckt werden kann.

6.3. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit

Bei einem erfolgreichen Projekt sollen die Projektergebnisse und ihre resultierende Qualitätssicherungsmethode in die Wirtschaft transferiert werden. Hierbei wird den Unternehmen gezeigt, wie die Methode in ihre Qualitätssicherung einzubinden ist und in die Routine übernommen werden kann.

Eine Möglichkeit an die Projektergebnisse anzuschließen, ist, an der entwickelten Methode orientiert, einen Transfer dieser Methode für verschiedenste, bereits verarbeitete Lebensmittelprodukte aus Ei z.B. Vollei zu übertragen und auch dort die Qualität des Produktes zu sichern. Dies würde Produkte der weiteren Lieferkette auch in den ökologischen Fokus stellen und somit die Aufmerksamkeit der Verbraucher auch bei verarbeiteten Produkten auf die ökologischen und nachhaltigen Faktoren des Lebensmittels lenken.

7. Gegenüberstellung ursprünglich geplanter und erreichter Ziele

Tabelle 18. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten und der tatsächlich erreichten Ziele

Ursprünglich geplante Ziele	Erreichte Ziele
<p><u>Gesamtziel:</u> NMR-basiertes Nachweissystem zur Sicherung der Authentizität und Produktqualität von Eiern, um vor allem zunächst auf die Haltungsform schließen zu können.</p>	<p>Es konnten zwei LDA-Modelle entwickelt werden, die die Vorhersage der Haltungsform ökologisch oder konventionell (Modellgenauigkeit: 99,9 %) und Kleingruppe-, Boden-, Freiland- und ökologischer Haltung (Modellgenauigkeit 97,1 %) ermöglichen.</p> <p>Zudem konnte ein LDA-Modell zur Klassifizierung der Rasse der Legehennen (Modellgenauigkeit: 98,4 %) entwickelt werden.</p>
<p><u>Arbeitsziel:</u> Die Beschaffung authentischer Proben kann nicht durch den Besuch im Supermarkt gewährleistet werden, sondern muss durch eine lückenlose Nachverfolgung vom Erzeugerhof bis ins DIL gegeben sein. Da allein die Beschaffung direkt vom Hof bzw. durch den Vertrieb sehr aufwendig ist, und hinzu noch sämtliche Authentizitätsparameter in möglichst gleichen Verhältnissen abgedeckt werden müssen, ist dies als ein wichtiges Arbeitsziel anzusehen. Das Arbeitsziel Beschaffung der authentischen Proben ist die Basis für das gesamte Projekt.</p>	<p>Die Beschaffung von authentischen Proben innerhalb des Projekts war erfolgreich. Sie wurde lediglich unplanmäßig verzögert durch die Covid19-Pandemie, Vogelgrippe und den Ukraine-Krieg und der daraus resultierenden Ressourcenknappheit bzw. -verfügbarkeit.</p> <p>Hinsichtlich des verwendeten Futters und der geografischen Herkunft war die Sammlung von authentischen Proben und Daten daher nur begrenzt möglich, da zum einen das Futter zu stark zwischen den Chargen variierte und zum anderen nicht die Möglichkeit bestand Deutschlandweit an diese Proben und Daten zu kommen.</p>
<p><u>Arbeitsziel:</u> Die Methodenentwicklung und Messung aller Proben sind als zweites Arbeitsziel zu nennen. Die Methode zur Aufarbeitung und Messung der Proben muss reproduzierbar sein, damit die Proben verglichen werden können. Eine Validierung ist demnach unabdingbar.</p>	<p>Innerhalb dieses Projekts konnte eine valide Aufarbeitungs- und Messmethode für die Eier entwickelt werden. Diese Methode dient als Grundlage für den Datenbankaufbau.</p>
<p><u>Arbeitsziel:</u> Das letzte Arbeitsziel bezeichnet die statistische Analyse aller erhobenen Daten. Auf dieser Analyse basiert die Qualitätssicherungsmethode, da nur unter Abgleich der Messergebnisse der authentischen Proben eine unbekannte Probe bzgl. ihrer Authentizität untersucht werden kann.</p>	<p>Die statistische Analyse konnte erfolgreich durchgeführt werden und ermöglichte die Entwicklung aussagekräftiger Modelle basierend auf Lineare Diskriminanzanalyse, um die Haltungsform der Legehennen anhand der Eis vorhersagen zu können.</p>

8. Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Projekts wurde eine ^1H -NMR-Methode entwickelt und validiert, mit der 4.453 authentische Eier von Legehennen aus vier Haltungsformen (Kleingruppe-, Boden-, Freiland- und ökologischer Haltung) und von vier Rassen (Lohmann Selected Leghorn, Dekalb, Lohmann Brown, Sandys) aufgearbeitet und dessen Eigelbextrakte gemessen wurden. Auf Basis dieser ^1H -NMR-Spektren wurden lineare Diskriminanzanalysen (LDA) berechnet, um die Haltungsform von Legehennen anhand des ^1H -NMR-Spektrums des Eigelbextraktes vorhersagen zu können. Das LDA-Modell für die Klassifizierung von Eiern aus konventioneller und ökologischer Haltung zeigt eine Modellgenauigkeit von 99,9 %, während das LDA-Modell zur Klassifizierung von Eiern aus den vier Haltungsformen eine Modellgenauigkeit von 97,1 % aufweist. Zusätzlich konnte ein LDA-Modell für die Vorhersage der Rasse der Legehennen (Lohmann Selected Leghorn + Dekalb, Lohmann Brown, Sandys) mit einer Modellgenauigkeit von 98,4 % berechnet werden. Die entwickelten statistischen Modelle ermöglichen somit die Vorhersage der Haltungsform und der Rasse von Legehennen anhand eines ^1H -NMR-Spektrums eines Eigelbextraktes und dadurch die Sicherstellung der Authentizität der Eier. Um die Anwendung der statistischen Modelle und dessen gute Vorhersagekraft sicherzustellen, müssen diese Modelle mit weiteren authentischen Proben ergänzt werden, da verschiedene Einflüsse wie z.B. das Futter eine Auswirkung auf den Eigelbextrakt und somit auf die Vorhersage der statistischen Modelle haben kann. Die Anwendung der Modelle auf käuflich erworbene, unspezifizierte Eier zeigte, dass viele, teils unbekannte Einflussfaktoren (z.B. Rasse, Futter, etc.) einen Einfluss auf die Vorhersagegenauigkeit der Modelle haben können.

9. Literaturverzeichnis

- [1] BzFE. Eier: Erzeugung - Hühnererzeugung in Deutschland. Bundeszentrum für Ernährung Stand: 01.04.2019; 14:47 Uhr; <https://www.bzfe.de/inhalt/eier-erzeugung-4126.html>].
- [2] Landwirtschaft BfEu. Versorgungsbilanzen Eier. Stand: 27.02.2024; 13:36 Uhr; Available from: <https://www.bmel-statistik.de/ernaehrung/versorgungsbilanzen/eier>.
- [3] Ackermann SM, Lachenmeier DW, Kuballa T, Schütz B, Spraul M and Bunzel M (2019) NMR-based differentiation of conventionally from organically produced chicken eggs in Germany. Magnetic Resonance in Chemistry. <https://doi.org/10.1002/mrc.4838>.
- [4] Roberts JR (2004) Factors affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens. The Journal of Poultry Science. <https://doi.org/10.2141/jpsa.41.161>.
- [5] Kirunda D and McKee S (2000) Relating quality characteristics of aged eggs and fresh eggs to vitelline membrane strength as determined by a texture analyzer. Poultry Science. <https://doi.org/10.1093/ps/79.8.1189>.
- [6] Samli H, Agha A and Senkoylu N (2005) Effects of storage time and temperature on egg quality in old laying hens. Journal of Applied Poultry Research. <https://doi.org/10.1093/japr/14.3.548>.
- [7] Jacob JP, Miles RD and Mather FB (2000) Egg quality. Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS), University of Florida PS.
- [8] Silversides F and Scott T (2001) Effect of storage and layer age on quality of eggs from two lines of hens. Poultry Science. <https://doi.org/10.1093/ps/80.8.1240>.
- [9] Scott T and Silversides FG (2000) The effect of storage and strain of hen on egg quality. Poultry science. <https://doi.org/10.1093/ps/79.12.1725>.
- [10] Silversides F and Budgell K (2004) The relationships among measures of egg albumen height, pH, and whipping volume. Poultry Science. <https://doi.org/10.1093/ps/83.10.1619>.
- [11] Silversides F and Villeneuve P (1994) Is the Haugh unit correction for egg weight valid for eggs stored at room temperature? Poultry Science. <https://doi.org/10.3382/ps.0730050>.
- [12] Akyurek H and Okur AA (2009) Effect of storage time, temperature and hen age on egg quality in free-range layer hens. Journal of Animal and Veterinary Advances.
- [13] Van Den Brand H, Parmentier H and Kemp B (2004) Effects of housing system (outdoor vs cages) and age of laying hens on egg characteristics. British poultry science. <https://doi.org/10.1080/00071660400014283>.
- [14] Zita L, Tůmová E and Štolc L (2009) Effects of genotype, age and their interaction on egg quality in brown-egg laying hens. Acta Veterinaria Brno. <https://doi.org/10.2754/avb200978010085>.
- [15] Monira K, Salahuddin M and Miah G (2003) Effect of breed and holding period on egg quality characteristics of chicken. International Journal of Poultry Science. <https://doi.org/10.3923/ijps.2003.261.263>.
- [16] Singh R, Cheng K and Silversides F (2009) Production performance and egg quality of four strains of laying hens kept in conventional cages and floor pens. Poultry science. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00237>.
- [17] Batkowska J, Brodacki A and Gryzinska M (2016) Effects of laying hen husbandry system and storage on egg quality. Archiv für Geflügelkunde. <https://doi.org/10.1399/eps.2016.158>.
- [18] Puertas G and Vázquez M (2019) Fraud detection in hen housing system declared on the eggs' label: An accuracy method based on UV-VIS-NIR spectroscopy and chemometrics. Food chemistry. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.106>.
- [19] Marusich W, De Ritter E and Bauernfeind J (1960) Evaluation of carotenoid pigments for coloring egg yolks. Poultry Science.
- [20] Roberson K, Kalbfleisch J, Pan W and Charbeneau R (2005) Effect of corn distiller's dried grains with solubles at various levels on performance of laying hens and egg yolk color. Int. J. Poult. Sci. <https://doi.org/10.3923/ijps.2005.44.51>.
- [21] Fredriksson S, Elwinger K and Pickova J (2006) Fatty acid and carotenoid composition of egg yolk as an effect of microalgae addition to feed formula for laying hens. Food Chemistry. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.018>.

- [22] Botsoglou N, Florou-Paneri P, Botsoglou E, Dots V, Giannenas I, Koidis A and Mitrakos P (2005) The effect of feeding rosemary, oregano, saffron and α -tocopheryl acetate on hen performance and oxidative stability of eggs. *South African Journal of Animal Science*. <https://doi.org/10.4314/sajas.v35i3.4053>.
- [23] Hasin B, Ferdaus A, Islam M, Uddin M and Islam M (2006) Marigold and orange skin as egg yolk color promoting agents. *International Journal of Poultry Science*. <https://doi.org/10.3923/IJPS.2006.979.987>.
- [24] Vignoli A, Ghini V, Meoni G, Licari C, Takis PG, Tenori L, Turano P and Luchinat C (2018) High-throughput metabolomics by 1D NMR. *Angewandte Chemie International Edition*. <https://doi.org/10.1002/anie.201804736>.
- [25] Sobolev AP, Circi S, Capitani D, Ingallina C and Mannina L (2017) Molecular fingerprinting of food authenticity. *Current Opinion in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.08.002>.
- [26] Spraul M, Schütz B, Humpfer E, Mörtter M, Schäfer H, Koswig S and Rinke P (2009) Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control. *Magnetic Resonance in Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/mrc.2528>.
- [27] Spiteri M, Jamin E, Thomas F, Rebours A, Lees M, Rogers KM and Rutledge DN (2015) Fast and global authenticity screening of honey using 1H-NMR profiling. *Food chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.099>.
- [28] Bachmann R, Klockmann S, Haerdter J, Fischer M and Hackl T (2018) 1H NMR Spectroscopy for Determination of the Geographical Origin of Hazelnuts. *Journal of agricultural and food chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03724>.
- [29] de Moura Ribeiro MV, Boralle N, Pezza HR, Pezza L and Toci AT (2017) Authenticity of roasted coffee using 1H NMR spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.004>.
- [30] Haugh RR (1937) The Haugh unit for measuring egg quality. *United States egg and poultry magazine*.
- [31] Sharp PF (1934) The condition of the apparent thick white as an important factor in studying the quality of eggs. *US Egg and Poultry Magazine*.
- [32] Tierschutzbund. Haltungssysteme. 2021; Available from: <https://www.tierschutzbund.de/information/hintergrund/landwirtschaft/legehennen/haltungssysteme-fuer-legehennen/#:~:text=Verbraucherschutzgesichtspunkte%20miteinander%20kombiniert,-.Bodenhaltung,teilen%20sich%20einen%20Quadratmeter%20Boden>.
- [33] He X, Hao D, Liu C, Zhang X, Xu D, Xu X, Wang J and Wu R (2017) Effect of supplemental oregano essential oils in diets on production performance and relatively intestinal parameters of laying hens. *American Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.4236/ajmb.2017.71006>.
- [34] Radwan Nadia L, Hassan R, Qota E and Fayek H (2008) Effect of natural antioxidant on oxidative stability of eggs and productive and reproductive performance of laying hens. *International Journal of Poultry Science*. <https://doi.org/10.3923/ijps.2008.134.150>
- [35] Wanzenböck E, Schreiner M, Zitz U, Bleich B, Figl S, Kneifel W and Schedle K (2018) A combination of wheat bran and vegetable oils as feedstuff in laying hens' diet: impact on egg quality parameters. *Agricultural Sciences*. <https://doi.org/10.4236/as.2018.96047>.
- [36] Abaza I, Ali M and Hassan M (2004) Nutritional and physiological studies on improving the utilization of wheat bran in laying hen diets. *Egyptian Poultry Science Journal*.
- [37] Ousterhout L (1980) Effects of calcium and phosphorus levels on egg weight and egg shell quality in laying hens. *Poultry Science*. <https://doi.org/10.3382/ps.0591480>.
- [38] Malz F and Jancke H (2005) Validation of quantitative NMR. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.01.043>.
- [39] Bischof G, Witte F, Terjung N, Januschewski E, Heinz V, Juadjur A and Gibis M (2021) Analysis of aging type-and aging time-related changes in the polar fraction of metabolome of beef by 1H NMR spectroscopy. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128353>.

- [40] Johnson AE, Sidwick KL, Pirgozliev VR, Edge A and Thompson DF (2018) Metabonomic profiling of chicken eggs during storage using high-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01031>.
- [41] Johnson AE, Sidwick KL, Pirgozliev VR, Edge A and Thompson DF (2020) The effect of storage temperature on the metabolic profiles derived from chicken eggs. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106930>.
- [42] https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_67-48-1_1HNMR.htm (2021)
https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_67-48-1_1HNMR.htm.
- [43] Nowaczewski S, et al. (2021) Effect of laying hens age and housing system on physicochemical characteristics of eggs. *Annals of Animal Science*. <https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0068>.
- [44] Kowalska E, Kucharska-Gaca J, Kuźniacka J, Lewko L, Gornowicz E, Biesek J and Adamski M (2021) Egg quality depending on the diet with different sources of protein and age of the hens. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82313-1>.
- [45] Zita L, Okrouhlá M, Krunt O, Kraus A, Stádník L, Čítek J and Stupka R (2022) Changes in fatty acids profile, health indices, and physical characteristics of organic eggs from laying hens at the beginning of the first and second laying cycles. *Animals*. <https://doi.org/10.3390/ani12010125>.
- [46] Baykalir Y, Simsek UG and Yilmaz O (2020) Age-related changes in egg yolk composition between conventional and organic table eggs. *Agricultural and Food Science*. <https://doi.org/10.23986/afsci.91704>.
- [47] Nielsen H (1998) Hen age and fatty acid composition of egg yolk lipid. *British Poultry Science*. <https://doi.org/10.1080/00071669889394>.
- [48] Oliveira D, Baião N, Cançado S, Grimaldi R, Souza M, Lara L and Lana A (2010) Effects of lipid sources in the diet of laying hens on the fatty acid profiles of egg yolks. *Poultry science*. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00522>.
- [49] Hajjar G, Haddad L, Rizk T, Akoka S and Bejjani J (2021) High-resolution 1H NMR profiling of triacylglycerols as a tool for authentication of food from animal origin: Application to hen egg matrix. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130056>.
- [50] Lösel H, Brockelt J, Gärber F, Teipel J, Kuballa T, Seifert S and Fischer M (2023) Comparative Analysis of LC-ESI-IM-qToF-MS and FT-NIR Spectroscopy Approaches for the Authentication of Organic and Conventional Eggs. *Metabolites*. <https://doi.org/10.3390/metabo13080882>.
- [51] Sokołowicz Z, Dykiel M, Augustyńska-Prejsnar A and Krawczyk J (2022) The effect of storage duration on some quality traits and composition of eggs from different housing systems. *Annals of Animal Science*. <https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0035>.
- [52] Samman S, Kung FP, Carter LM, Foster MJ, Ahmad ZI, Phuyal JL and Petocz P (2009) Fatty acid composition of certified organic, conventional and omega-3 eggs. *Food chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.046>.
- [53] Puertas G, Cazón P and Vázquez M (2023) A quick method for fraud detection in egg labels based on egg centrifugation plasma. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134507>.
- [54] Kopec M and Abramczyk H (2022) Analysis of eggs depending on the hens' breeding systems by raman spectroscopy. *Food Control*. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109178>.
- [55] Chin S-T, et al. (2023) Targeted lipidomics coupled with machine learning for authenticating the provenance of chicken eggs. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135366>.
- [56] Cardoso PHS, de Oliveira ES, Lião LM and Oliveira GdAR (2022) 1H NMR as a simple methodology for differentiating barn and free-range chicken eggs. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133720>.
- [57] Marelli SP, Madeddu M, Mangiagalli MG, Cerolini S and Zaniboni L (2021) Egg Production Systems, Open Space Allowance and Their Effects on Physical Parameters and Fatty Acid Profile in Commercial Eggs. *Animals*. <https://doi.org/10.3390/ani11020265>.

- [58] Islam Z, Sultan A, Khan S, Alhidary IA, Abdelrahman MM and Khan RU (2021) Impact of varying housing systems on egg quality characteristics, fatty acid profile, and cholesterol content of Rhode Island Red× Fyoumi laying hens. *Tropical Animal Health and Production*. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02913-x>.
- [59] Dalle Zotte A, Cullere M, Pellattiero E, Sartori A, Marangon A and Bondesan V (2021) Is the farming method (cage, barn, organic) a relevant factor for marketed egg quality traits? *Livestock Science*. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104453>.
- [60] Sokołowicz Z, Krawczyk J and Dykiel M (2018) Effect of alternative housing system and hen genotype on egg quality characteristics. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i8.1753>.
- [61] Goto T, Mori H, Shiota S and Tomonaga S (2019) Metabolomics approach reveals the effects of breed and feed on the composition of chicken eggs. *Metabolites*. <https://doi.org/10.3390/metabo9100224>.
- [62] Hejdysz M, et al. (2024) Influence of the genotype of the hen (*Gallus gallus domesticus*) on main parameters of egg quality, chemical composition of the eggs under uniform environmental conditions. *Poultry Science*. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103165>.
- [63] González Ariza A, Navas González FJ, Arando Arbulu A, Delgado Bermejo JV and Camacho Vallejo ME (2021) Hen breed and variety factors as a source of variability for the chemical composition of eggs. *Journal of Food Composition and Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103673>.
- [64] Franco D, Rois D, Arias A, Justo JR, Marti-Quijal FJ, Khubber S, Barba FJ, López-Pedrouso M and Manuel Lorenzo J (2020) Effect of breed and diet type on the freshness and quality of the eggs: A comparison between Mos (indigenous Galician breed) and Isa brown hens. *Foods*. <https://doi.org/10.3390/foods9030342>.
- [65] Alig BN, Malheiros RD and Anderson KE (2023) Evaluation of physical egg quality parameters of commercial brown laying hens housed in five production systems. *Animals*. <https://doi.org/10.3390/ani13040716>.
- [66] Alig BN, Malheiros RD and Anderson KE (2023) The Effect of Housing Environment on Physical Egg Quality of White Egg Layers. *Poultry*. <https://doi.org/10.3390/poultry2020018>.
- [67] Mayer JK, Schneider AF, Lovatto FS and Gewehr CE (2023) Performance, physical egg quality, and economic index of laying hens under different rearing systems. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. <https://doi.org/10.1590/S1519>.
- [68] Lordelo M, Fernandes E, Bessa R and Alves S (2017) Quality of eggs from different laying hen production systems, from indigenous breeds and specialty eggs. *Poultry Science*. <https://doi.org/10.3382/ps/pew409>.
- [69] Küçükylmaz K, Bozkurt M, Herken EN, Çınar M, Çatlı AU, Bintaş E and Çöven F (2012) Effects of rearing systems on performance, egg characteristics and immune response in two layer hen genotype. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11382>.
- [70] Adeoye AA, Oyeleye OO, Olorunsola RA, Udoh JE and Olacepo AD (2023) Table egg quality and nutritional composition assessments of different breeds and ages of laying hens. *Slovak Journal of Animal Science*. <https://doi.org/10.36547/sjas.792>.

10. Übersicht aller Veröffentlichungen

Forschungsartikel in peer-reviewed Zeitschriften

Bischof, G., Januschewski, E., & Juadjur, A. (2024). Authentication of Laying Hen Housing Systems Based on Egg Yolk Using ^1H NMR Spectroscopy and Machine Learning. *Foods*, 13(7), 1098.

Vorträge

Juadjur, A., Bischof, G. (2023). (NMR)-Authentizitätsanalytik von ökologisch produzierten Produkten. 27. *Bioland-Geflügeltagung 2023*.

Juadjur, A. (2023). Projektvorstellung ÖkoEiSpec. 4. *BÖL-Veranstaltung zum Austausch über die Forschungsprojekte in der ökologischen Geflügelwirtschaft 2023*.

Posterbeiträge

Bischof, G., Januschewski, E., Heinz, V., Gibis, M., & Juadjur, A. (2022). Analyse des Einflusses der Haltungform von Legehennen auf das Metabolom des Eigelbs mittels ^1H NMR-Spektroskopie. *Lebensmittelchemie* 76, S2-200-S2-200.

Bischof, G., Deerberg, F., & Juadjur, A. (2023). Authentizitätsnachweis im Ökobereich. Analyse des Einflusses der Haltungform von Legehennen auf das Metabolom des Eigelbsmittels ^1H -NMR-Spektroskopie. 16. *Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau*, 184 P01-5.

11. Anhang

Erfolgskontrollbericht

Praxismerkblatt