

Schlussbericht zum Verbundprojekt Zukunftslabor 2030 (Teil I und II)

Zukunftsszenarien für den Verbraucherschutz auf Basis von Qualitäts- und Sicherheitsinformationen von Lebensmitteln, innovativen Messmethoden und KI (Zukunftslabor 2030) – Teilprojekt D

Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

Förderkennzeichen: 28DK126D20

Berichtszeitraum: 15.10.2021 – 15.07.2025

Inhalt

I.	Kurzdarstellung.....	3
1.	Ursprüngliche Aufgabenstellung, sowie der wissenschaftliche und technische Stand, an den angeknüpft wurde	3
2.	Ablauf des Vorhabens	4
3.	Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	5
II.	Eingehende Darstellung	6
1.	Erzielte Ergebnisse	6
	Durchgeführte Messreihen	6
	Nachweis von Pathogenen	6
	Transkriptomanalyse	8
	Metagenomanalyse.....	10
	ddPCR – Schnellmethode zur Keimzahlbestimmung	11
	Mikrobiomanalyse - 16S rDNA Metabarcoding.....	11
2.	Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises.....	19
3.	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeit.....	19
4.	Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans.....	19
5.	Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.....	20
6.	Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NABF.I.	21
	Publikationen.....	21
	Tagungsbeiträge / Poster	21
7.	Quellenangaben	22

I. Kurzdarstellung

1. Ursprüngliche Aufgabenstellung, sowie der wissenschaftliche und technische Stand, an den angeknüpft wurde

Im Rahmen des Projekts sollte mithilfe von Künstlicher Intelligenz und innovativen Technologien eine kontinuierliche Prognose der Lebensmittelqualität und -sicherheit ermöglicht werden. Dazu sollten die Auswirkungen von Prozess- bzw. Qualitätsänderungen in Echtzeit bewertet werden.

Bei der Bewertung des Frischezustands von Lebensmitteln müssen die gestiegenen Qualitätsansprüche der Verbraucher mit den Bedürfnissen der Lebensmittelhersteller und des Handels in Einklang gebracht werden. Dies ist einer der zentralen Punkte im Spannungsfeld zwischen Lebensmittelsicherheit und Lebensmittelverschwendung. Denn die Frische von Lebensmitteln beeinflusst nicht nur ihre sensorischen Eigenschaften, sondern auch ihre Sicherheit und Haltbarkeit. Gerade bei frischen Waren wie Fleischprodukten können variierende Bedingungen entlang der Lebensmittelkette – von der Herstellung über den Transport bis hin zum Einzelhandel – die Produktqualität beeinflussen, noch bevor die Ware beim Verbraucher ankommt. Diese Beeinflussung hängt dabei sowohl von dynamischen Veränderungen physikochemischer Vorgänge als auch von Veränderungen des Mikrobioms ab. Der aktuelle Status der Produktqualität wird derzeit üblicherweise durch sensorische Tests und Laboranalysen an einzelnen Punkten der Lebensmittelkette erfasst und bewertet. Diese Analysen sind jedoch mit hohem Aufwand und Kosten verbunden. Ein kontinuierliches Monitoring der Veränderungen von Frischeprodukten ist damit nicht zu realisieren.

Für die exemplarische Matrix „vorverpacktes Schweinehackfleisch“ sollten Verderbsprozesse modelliert und zur Erstellung eines digitalen Zwillings herangezogen werden. Neben einer sensorischen Bewertung und Keimzahlbestimmungen werden dazu verschiedene moderne Messverfahren eingesetzt: Fluoreszenzspektrometrie, Peptidmuster, spektroskopische Schnellmethoden, Volatilom-Analysen sowie Next-Generation-Sequencing-(NGS)-basierte Verfahren zur Mikrobiom-, Transkriptom- und Metagenomanalyse. Dieser DZ ist produktspezifisch und soll aufgrund der integrierten Messdaten die verschiedenen dynamischen Veränderungen im Produkt entlang der Lebensmittelkette abbilden können. Dadurch wird die Prognose eines chargenspezifischen Verbrauchsdatums ermöglicht. Dies hat nicht nur eine wirtschaftliche Relevanz für Hersteller und Handel, sondern auch eine ökologische Dimension im Sinne der Nachhaltigkeit. Durch die Demonstration des DZ-Ansatzes in der Praxis soll eine Abschätzung von Aufwand und Nutzen erfolgen. Der Praxistest sollte gleichzeitig der Evaluierung der zu diesem Zweck entwickelten offenen Plattform zum Austausch von Produkt- und Produktionsdaten und -modellen entlang der Lieferkette dienen.

Zu den primären Aufgaben des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) zählten dabei die Erfassung des mikrobiellen Status von Fleisch unter realen bzw. realitätsnahen Bedingungen in der Fleischproduktion mittels NGS sowie die Evaluierung der Vergleichbarkeit der eingesetzten innovativen Messmethoden mit anerkannten amtlichen Untersuchungsverfahren.

Die EU-Gesetzgebung legt in mehreren Verordnungen den Rahmen sowie spezifische Kriterien für die Wahrung von Lebensmittelsicherheit und guter Hygiene fest. Gemäß Art. 14 der VO (EG) Nr. 178/2002 sind Lebensmittel dann nicht sicher, wenn sie gesundheitsschädlich sind oder sich nicht für den Verzehr durch den Menschen eignen. Die VO (EG) Nr. 2073/2005 legt für Lebensmittelunternehmer die mikrobiologischen Kriterien für bestimmte Mikroorganismen fest. Diese sind bei der Durchführung allgemeiner und spezifischer Hygienemaßnahmen gemäß Artikel 4 der VO (EG) Nr. 852/2004 einzuhalten.

Diese Beurteilung des mikrobiologischen Status basiert auf kulturabhängigen Methoden. Dabei werden nicht kultivierbare Arten, die jedoch Einfluss auf die Qualität des Lebensmittels haben können, nicht direkt berücksichtigt. Höll et al. (2019) zeigten, dass *Photobacterium* spp., die mit den genormten

mikrobiologischen Kultivierungsbedingungen nicht berücksichtigt werden, eine signifikante Rolle beim Verderb von MAP-Putenbrust spielen. Ihre Stoffwechselaktivität führt zu typischen Stoffwechselprodukten von Fleischverderbern (Laktat, biogene Amine), die sensorisch relevant sind. Grundsätzlich ist die Datenlage zur Metatranskriptomanalyse in tierischen Lebensmitteln bisher noch als unterrepräsentiert zu bezeichnen. Zum Zeitpunkt des Projektstarts gab es vereinzelt weitere Metatranskriptomanalysestudien in Lebensmitteln, beispielsweise in Käse (De Filippis et al., 2016) und Rindfleisch (Hultman et al., 2020), die sich mit der mikrobiellen Aktivität und den Abbauprozessen befassten.

Durch wissenschaftliche Studien, die auf Amplicon-Sequenzierung basieren, ist bekannt, dass in frischen Fleischprodukten grundsätzlich eine hohe mikrobielle Diversität vorliegt und sich durch im Laufe der Lagerung matrixabhängig bestimmte Gattungen durchsetzen. So kann man der Literatur entnehmen, dass sich z. B. in vakuumverpackten Produkten Milchsäurebakterien durchsetzen, bei aerobem Verderb Pseudomonaden und bei Lagerungen unter modifizierten atmosphärischen Bedingungen hauptsächlich Arten der Gattungen *Brochothrix* und *Carnobacterium* [De Filippis et al 2018].

Rothrock et al. (2013) haben in ihrer Studie gezeigt, dass eine molekulare Quantifizierung von Mikroorganismen, basierend auf dem 16S rDNA-Gen, mittels digitaler PCR (digital droplet PCR, ddPCR) in Geflügelbrustabschwemmungen möglich ist. Diese Methode ist genauer und empfindlicher als die amtliche kulturabhängige Gesamtkeimzahlbestimmung. Für verarbeitete Fleischprodukte gab es zu Beginn des Projekts noch keine Studien. Am LGL gibt es jedoch Erfahrung mit der Etablierung der ddPCR zur quantitativen Bestimmung thermophiler *Campylobacter* spp. in Lebensmitteln (vgl. Govindaswamy et al., 2022).

2. Ablauf des Vorhabens

Das Gesamtprojekt wurde von neun Projektpartnern unter Förderung der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) durchgeführt. Das Konsortium setzte sich aus Vertretern aus dem wissenschaftlichen Bereich (Universität Bayreuth, Technische Hochschule Deggendorf/Technologiecampus Grafenau, Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung), verschiedenen behördlichen Instituten (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL), Max-Rubner-Institut (MRI), Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)) sowie wirtschaftlichen Unternehmen (tsenso GmbH, Benelog GmbH & Co. KG) zusammen. Darüber hinaus wurde das Projekt durch externe Partner aus der Praxis unterstützt, darunter GS1 Germany, die Verbraucherzentrale Bayern, das BAV Institut und ISI Food Protection.

Im Projekt wurden 5 Projektziele verfolgt:

Projektziel 1: Ermittlung von Zukunftsszenarien, wie KI-gestützte Prozesse der Qualitätssicherung in Zukunft ausgestaltet werden könnten.

Projektziel 2: Konzeptstudie zur Anwendbarkeit verschiedener, innovativer Messmethoden zur Prognose der Lebensmittelqualität in der Fertigung und entlang der Lieferkette.

Projektziel 3: Entwicklung einer offenen Plattform zum Austausch von Produkt- und Produktionsdaten und –modellen entlang der Lieferkette zur dynamischen Bewertung und Prognose der Lebensmittelqualität und –sicherheit unter Verwendung der lernenden und selbstaktualisierenden digitalen Zwillinge

Projektziel 4: Erstellung prognosefähiger digitaler Zwillinge auf Einzelprodukt- bzw. Chargenebene mit der Möglichkeit zur Integration geeigneter spektroskopischer, chemischer und mikrobiologischer Messdaten, je nach Lebensmittel und vorhandenen Labor- und Realbedingungen.

Projektziel 5: Demonstration der Funktionalität und des Nutzens der Plattform und der durch digitale Zwillinge gewonnenen dynamischen Qualitäts- und Haltbarkeitsinformationen für LEH und Konsumenten mittels Praxistests. Bewertung der Szenarien mittels der praxisrelevanten KPIs auf Basis der Ergebnisse der Labor- und Praxistests und des Inputs eines Experten-Gremiums inklusive Ableitung möglicher bzw. notwendiger Anpassungen der heutigen betrieblichen Prozesse und des rechtlichen Rahmens. Die abgeleiteten Handlungsempfehlungen sollten in Form eines Whitepapers aufbereitet und verbreitet werden.

Das Projekt wurde in drei Arbeitspakete (AP1: Innovative Messmethode, AP2: Digitale Lebensmittel, AP3: Zukunftslabor) aufgeteilt, die von den neun Projektpartnern gemeinsam bearbeitet wurden. Das erste Arbeitspaket befasste sich mit der Infrastruktur und der Validierung der angewandten Methoden. Hierzu wurden zunächst drei Pilot-Lagerungsexperimente bei 2 °C durchgeführt, um den grundlegenden Ablauf der Lagerungsexperimente hinsichtlich des Probenverkehrs, der konstanten Probenlagerung und der Bearbeitung der Proben mit der jeweiligen Methode zu testen. Anschließend erfolgten mehrere Messreihen, in denen die Kernparameter Temperatur und Verpackungsatmosphäre variiert wurden. Diese dienten der Erstellung von KI-Prognosemodellen. Darüber hinaus erfolgten weitere Experimente zur Überprüfung der Methodenübertragbarkeit auf eine andere Matrix und auf exemplarische Anwendungsbeispiele. Zur Validierung der Modelle für das dritte Arbeitspaket wurden Praxistests mit Proben aus der Industrie unter Realbedingungen durchgeführt.

Der analytische Schwerpunkt des LGL lag auf NGS-basierten Analysen. Mithilfe dieser Analysen soll ermittelt werden, welchen Einfluss Umwelt-, Matrix- und Prozessfaktoren auf die Diversität und Zusammensetzung mikrobieller Populationen in Lebensmitteln haben. Mithilfe der Amplikon-Sequenzierung (Metabarcoding) wurde die Zusammensetzung des Mikrobioms in allen am LGL untersuchten Proben analysiert. In Zusammenarbeit mit dem BfR sollte mittels Metagenomik sowohl die Mikrobiom-Zusammensetzung als auch die vorhandene Genausstattung des Mikrobioms abgebildet werden. Mithilfe von Transkriptom-Analysen sollten die zum Zeitpunkt der Untersuchung aktiven Stoffwechselwege analysiert werden, um Rückschlüsse auf gerade ablaufende Veränderungen der Produktmatrix ziehen zu können. Es sollte erarbeitet werden, welchen Mehrwert Metagenom- und Transkriptom-Daten für die Korrelation mit Risiko- oder Qualitätskriterien von Lebensmitteln bieten. Außerdem war geplant, die digitale PCR (dPCR) als kultivierungsunabhängige Methode zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl zu etablieren.

Der Fokus der Experimente lag auf der Matrix Schweinehackfleisch. Dabei wurden verschiedene Parameter wie Lagertemperatur, Atmosphäre, Herstellerabhängigkeit und Unterbrechungen der Kühlkette zur Generierung des DZ untersucht. Anschließend wurde dieser DZ anhand von Praxistests evaluiert.

Die Übertragbarkeit der im Rahmen des Projekts eingesetzten Methoden auf weitere Matrices wurde anhand von Putengeschnetzeln demonstriert.

3. Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen der Transkriptomanalyse wurden die RNA-Extraktion und die Sequenzierung als Services an externe Dienstleister vergeben. Die ersten drei Proben wurden in einem Pilotlauf von der Firma IMG Laboratories GmbH bearbeitet. Nachdem der Service bei dieser Firma eingestellt wurde, wurde die Firma Novogene GmbH mit zwei weiteren Transkriptom-Sequenzierläufen und, in Abstimmung mit dem Projektpartner BfR, einer Metagenomsequenzierung beauftragt.

Das Expertengremium, bestehend aus EDEKA Südbayern, GS1, TÜV Südbayern, dem Lebensmittelverband e. V., dem IFS-Akkreditierungspartner und der FLMR, unterstützte das Forschungsvorhaben durch die Bereitstellung von Sachverstand im Bereich des Verbraucherschutzes und des Produktschut-

zes sowie durch die Bereitstellung von Proben mehrerer Händler (Truthahn AG, Schiller Fleisch, Tönnies und Wilhelm Brandenburg/REWE) für die durchgeführten Praxistests oder Validierungsmessreihen. Die wissenschaftliche Auswertung der Ergebnisse erfolgte im Rahmen einer Abschlussarbeit in Zusammenarbeit mit der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf (HSWT).

II. Eingehende Darstellung

1. Erzielte Ergebnisse

Durchgeführte Messreihen

Für die Generierung der Daten für den DZ für Schweinehackfleisch wurden Analysen unter verschiedenen Schutzgasatmosphären und Temperaturen durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Hersteller sowie oxidative Prozesse durch das vorherige Abhängen des Fleisches und Kühlkettenunterbrechungen berücksichtigt. Zur Demonstration der grundsätzlichen Anwendbarkeit der hier eingesetzten Methodik auf weitere Matrices wurde Putenfleisch als exemplarische Matrix gewählt.

Im Rahmen von insgesamt sechs Praxistests wurde die Funktionalität der validierten Methoden und Prognosemodelle untersucht. **Tabelle 1** gibt einen Überblick über die verschiedenen Versuchsmessreihen. Die untersuchten Parameter umfassen die Lagerungstemperatur, die Dauer des Fleischabhängens nach der Schlachtung, die Lagerungsdauer des Hackfleisches, die untersuchte Schutzgasatmosphäre (Modified Atmosphere Packaging, kurz MAP), die Probenahmetage nach der Hackfleischproduktion, die Dauer der Kühlkettenunterbrechung während der Lagerung, die Matrix und den Hersteller der Proben.

Insgesamt wurden 464 Proben aus 3 Piloten und 28 Messreihen am LGL untersucht.

Nachweis von Pathogenen

Am LGL wurden von 311 Proben (Proben aller Piloten und Messreihen) die Pathogenitätsfaktoren von Listerien, EHEC und Salmonellen bestimmt. 48 der 311 Proben fielen hier positiv aus. STEC-positiv waren 15 Proben, wobei 11 stx2-positiv waren, zwei stx1-positiv waren und drei beide Gene aufwiesen. In 32 Proben konnten Listerien nachgewiesen werden. 18 davon gehörten zur Spezies *Listeria innocua* (apathogen für den Menschen), fünf zur Spezies *Listeria monocytogenes* (pathogen) und acht zur Spezies *Listeria welshimeri* (apathogen für den Menschen). In einer Probe konnten sowohl STEC (stx1) als auch *Listeria monocytogenes* nachgewiesen werden. Bei allen Proben lag die Keimzahl unter der erlaubten Keimzahlbelastung. (Salmonellen und EHEC: nicht nachweisbar in 25g; Listerien: < 100 KbE/g).

Transkriptomanalyse

Zur Etablierung der Transkriptomanalyse wurde zunächst die RNA-Extraktionsmethode anhand einer Reinkultur des Stammes *Listeria innocua* DSM 20649 optimiert (siehe **Tabelle 2**). Hierfür wurde unter anderem die Lysezeit auf 60 Minuten optimiert. Des Weiteren konnte durch die Zugabe des RNA-Stabilisators „RNAprotect Bacteria Reagent“ (Fa. Qiagen) und die Erhöhung der Lyse-Temperatur von Raumtemperatur auf 37 °C eine zusätzliche Optimierung erzielt werden. Anschließend erfolgten Extraktionsversuche mit dem gleichen Bakterienstamm in Hackfleischproben als Matrix, um den Einfluss der Matrix während der Extraktion zu untersuchen und die Methode entsprechend anzupassen. In diesem Zusammenhang wurde die Zeit für die Bakterienisolierung aus dem Fleisch auf 60 Minuten optimiert. Daraufhin erfolgte die Extraktion von RNA aus realen Proben (Versuchsmessreihe V10, 6 h Kühlkettenunterbrechung, Lagerungstag d13) mit unterschiedlichen Mengen an Fleisch (1 g oder 2 g). Die Quantifizierung der RNA sowie die Bestimmung ihrer Integrität wurden mittels des Fragment Analyzers (Fa. Agilent Technologies) durchgeführt.

Tabelle 2: Ergebnisse der RNA-Extraktionsversuche. Aufgeführt sind die Optimierungsschritte und die Messergebnisse die mittels des Bioanalyzers (Fa. Agilent Technologies) ermittelt wurden. Dabei handelt es sich um die RNA-Konzentration, das Verhältnis der 23S rRNA-Menge zur 16S rRNA-Menge und dem RNA Integritätsfaktor (RIN).

Optimierungsschritte	RNA conc. [ng/μL]	rRNA Ratio 23S/16S	RIN
1. RNA Extraktion	5	4.6	N/A
RNA Stabilisator, Lyse 20 min	12	1.6	9.4
Lyse 60 min, Raumtemperatur (RT)	175	1.8	9.7
Lyse 60 min, 37°C	150	2	9.6
Hackfleischmatrix, 5 min Isolierung bei RT	10.2	1.35	7.9
60 min Isolierung bei RT	44	1.8	8.9
V10, 6h Kühlkettenunterbrechung, d13, 1g	30.4	1.05	7
V10, 6h Kühlkettenunterbrechung, d13, 2g	28.2	0.99	7

Aufgrund der Matrixbeschaffenheit war der Workflow aufwändig und es ergaben sich Änderungen in der personellen Situation, weshalb sowohl die RNA-Extraktion als auch die Transkriptom-Sequenzierungen an einen externen Dienstleister übergeben wurden. Die Metatranskriptom-Analyse wurde dabei von zwei externen Laboren durchgeführt: zunächst von der IMG Laboratories GmbH (Planegg) und nach deren Einstellung der Dienstleistung von der Novogene AG (Martinsried).

Vorbereitend wurden am LGL aus einer durch die bakterielle Zellzahl bedingt großen Menge an schockgefrorenem Hackfleisch die Bakterien für die Versuchsmessreihen aufkonzentriert und an den Dienstleister für die mRNA-Sequenzierung geschickt. Zunächst wurde bei IMG eine Pilotsequenzierung (3 Proben) durchgeführt. Nachdem dieser Dienstleistungsservice eingestellt wurde, erfolgte eine weitere Pilotsequenzierung (5 Proben) bei Novogene. Diese Piloten dienten sowohl dem externen Labor als auch dem LGL dazu, eine passende Vorgehensweise für die Proben zu etablieren, was die Entfernung der eukaryontischen mRNA, der pro- und eukaryontischen ribosomalen RNA sowie die benötigte Sequenziertiefe betrifft.

Die *raw reads* und *mapping rates* der untersuchten Proben sowie die jeweils sequenzierten Gigabasenpaare sind in **Tabelle 3** aufgeführt.

Tabelle 3: Ausgewählte QC-Werte der Transkriptomanalysen bei den externen Dienstleistern IMG M und Novogene. Die ersten drei Proben wurden von der Firma IMG M sequenziert. Die fünf Proben der Messreihe V15 wurden im ersten Sequenzierlauf bei Novogene analysiert, die übrigen zwölf Proben im zweiten Sequenzierlauf.

Proben ID	Raw Reads	Gb	Clean Reads	Clean Bases	no host reads	no host bases	mapping rate	
							Total Reads	Total mapped
V16_7d_d15	8.150.029	2,45	8.019.015	2,41	125.176	0,04	54.568	18.301
V16_7d_d17	10.265.835	3,08	10.107.684	3,03	424.724	0,13	199.372	69.973
V18_6h_d13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
V15_SHL1_d08	102.081.630	30,62	92.802.326	27,84	11.062.805	3,32	11.062.805	8.525.595
V15_SHL1_d10	31.329.531	9,40	30.269.008	9,08	30.177.986	9,05	30.177.986	26.772.386
V15_SHL1_d13	52.865.547	15,86	49.925.952	14,98	25.281.691	7,58	25.281.691	23.548.875
V15_SHL2_d14	81.856.108	24,56	75.417.176	22,63	16.234.480	4,87	16.234.480	14.437.397
V15_SHL2_d16	77.304.188	23,19	71.941.165	21,58	11.863.882	3,56	11.863.882	10.463.299
V17_12h d08	20.000.004	6,00	19.616.324	5,88	12.029.075	3,61	12.029.075	11.193.935
V17_12h d10	20.000.004	6,00	19.639.555	5,89	16.105.353	4,83	16.105.353	15.378.843
V17_12h d13	20.000.004	6,00	19.780.535	5,93	17.686.368	5,31	18.072.181	16.708.942
V17_12h d15	20.000.004	6,00	19.754.186	5,93	17.840.326	5,35	14.132.414	12.770.311
V17_12h d17	20.000.004	6,00	19.665.551	5,9	18.771.083	5,63	17.686.368	17.010.003
V19_12h d08	20.000.004	6,00	19.229.454	5,77	18.072.181	5,42	17.840.326	16.778.826
V19_12h d10	17.467.573	5,24	16.172.892	4,85	14.132.414	4,24	18.771.083	17.797.783
V19_12h d13	20.000.004	6,00	19.764.742	5,93	19.201.564	5,76	19.201.564	18.114.233
V19_12h d15	20.000.004	6,00	19.653.587	5,9	18.558.379	5,57	18.558.379	17.344.329
V19_12h d17	20.000.004	6,00	19.599.936	5,88	18.170.934	5,45	18.170.934	16.968.197
V23_6h d09	20.000.004	6,00	19.408.480	5,82	15.534.982	4,66	15.534.982	14.611.607
V23_6h d12	20.000.004	6,00	19.196.865	5,76	17.385.031	5,22	17.385.031	15.949.992

Ursprünglich war im Verlängerungsantrag die Metatranskriptomsequenzierung von weiteren 26 Proben in einem dritten Sequenzierlauf vorgesehen. Die Ergebnisse der Pilotsequenzierungen zeigten jedoch, dass eine Erhöhung der Sequenziertiefe dringend notwendig war, um Veränderungen im Transkriptom zu erfassen. Daher wurde die Probenanzahl zugunsten einer stark erhöhten Sequenziertiefe auf 12 Proben reduziert.

Die vorliegende Auswertung basiert auf einer Analyse von sechs Gigabasen (Gb) pro Probe. **Abbildung 1** zeigt die Zuordnung der Transkripte zu den sie kodierenden Taxa. Es ist zu erkennen, dass sich die Messreihe V19 von den beiden anderen abgrenzt und eine Veränderung des Mikrobioms in den Messreihen mit der Zeit erfolgt. V23 (der erste Praxistest) ähnelt V17 und weist eine höhere Diversität als V19 auf. Im Vergleich mit den Daten der 16S-Amplikonsequenzierung zeigt sich eine ähnliche Zusammensetzung des Mikrobioms. In der funktionellen Zuordnung der Transkripte (siehe **Abbildung 2**) ist, wie erwartet, der größte Anteil der Transkription (**Abbildung 2**, Gruppe K) und Translation (**Abbildung 2**, Gruppe J) zuzuordnen. Daneben sind auch der Kohlenhydrat- (**Abbildung 2**, Gruppe G), Aminosäure- (**Abbildung 2**, Gruppe E) und Lipid-Transport bzw. -Metabolismus abgedeckt.

Die abschließende Auswertung der Daten befindet sich aufgrund des hohen bioinformatischen Aufwands und der komplexen Interpretation derzeit noch in Bearbeitung.

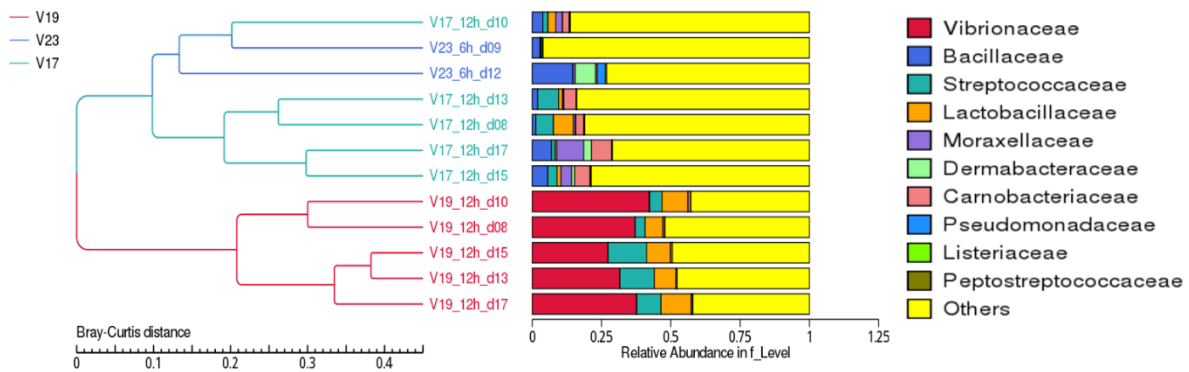


Abbildung 1: Cluster-Analyse der Proben des dritten Sequenzierungslaufs bei Novogene anhand der relativen taxonomischen Häufigkeit auf Familienebene

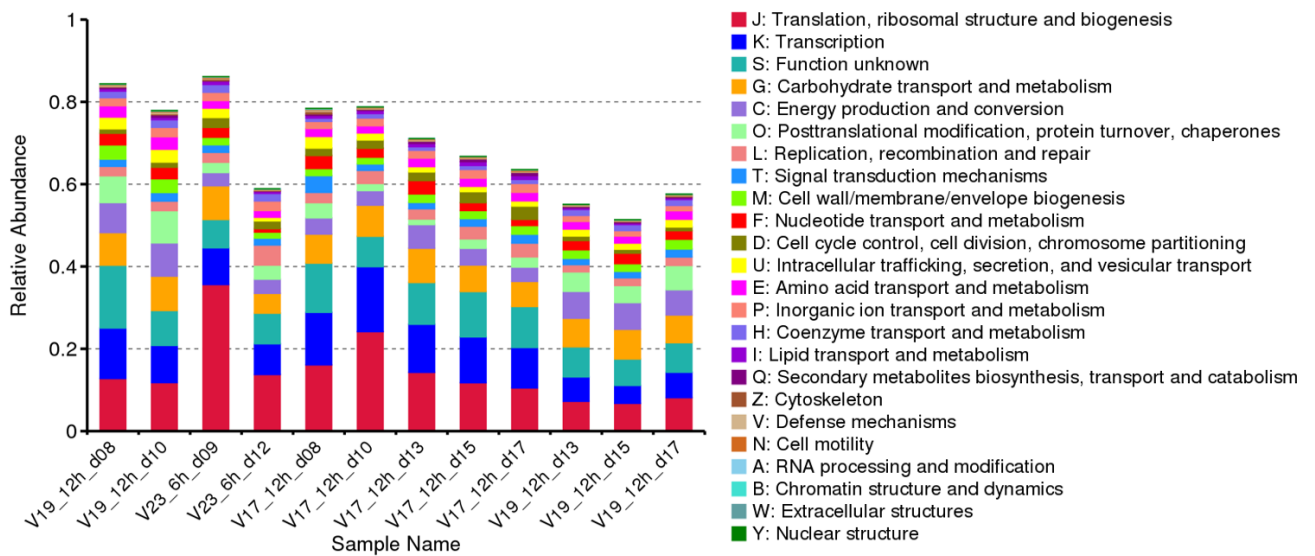


Abbildung 2: Die relative Häufigkeit der Annotationen der aktiven Gene aus dem dritten Sequenzierungslauf bei Novogene wurde ermittelt. Die Daten wurden mit der KEGG-Datenbank annotiert. Die relative Häufigkeit der Annotationen der aktiven Gene aus dem dritten Sequenzierungslauf bei Novogene wurde ermittelt. Die Daten wurden mit der KEGG-Datenbank annotiert.

Metagenomanalyse

Am BfR wurden Metagenomanalysen einzelner Projektstage durchgeführt. Die geringen Keimzahlen an verschiedenen Probenahmetagen wirkten sich negativ auf die erzielbare Sequenzierertiefe aus.

Daher wurden ergänzend zu den am BfR durchgeführten Metagenomanalysen vier Proben für eine externe Metagenomsequenzierung durch Novogene ausgewählt, von denen das Metatranskriptom als Dienstleistung sequenziert wurde. Als erhöhte Sequenzierertiefe konnten dabei 100 Gigabasen pro Probe beauftragt werden.

Um diese hohe Sequenzierertiefe zu erreichen, wurden bei der externen Sequenzierung keine Einzelproben analysiert, sondern ein Probenpool verschiedener Versuchstage, wodurch der gesamte Verderbsprozess abgedeckt wurde. Bei den Proben handelte es sich um gepoolte DNA-Proben aus den Versuchsreihen V17 und V19 (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Ausgewählte QC Werte der Metagenomsequenzierung bei Novogene. Die ersten drei Proben wurden von der Firma IMGGM sequenziert. Die fünf Proben der Messreihe V15 wurden im ersten Sequenzierlauf bei Novogene analysiert, die übrigen zwölf Proben im zweite Sequenzierlauf bei Novogene

Probenpool	Raw Reads	Gb	Clean Reads	clean bases	no host reads	no host bases	Total Reads
A_V17 0h	316.997.078	101,82	338.600.000	101,58	33.566.667	10,07	33.566.667
B_V17 12h	359.957.502	107,98	359.066.667	107,72	88.133.333	26,44	88.133.333
C_V19 0h	351.285.071	105,38	350.433.333	105,13	133.200.000	39,96	133.200.000
D_V19 12h	386.766.202	116,02	386.000.000	115,80	214.400.000	64,32	214.400.000

ddPCR – Schnellmethode zur Keimzahlbestimmung

Die absolute Keimzahlbestimmung mittels Droplet Digital PCR (ddPCR), die als innovative Schnellmethode zur traditionellen Gesamtkeimzahlbestimmung mittels kultureller Verfahren am LGL etabliert werden sollte, konnte nicht auf Hackfleisch als Matrix angewendet werden. Während der Validierung der Methode an den Proben der Pilotstudie musste festgestellt werden, dass neben der bakteriellen DNA auch die Anzahl der Kopien der mitochondrialen eukaryontischen DNA der Matrix – in diesem Fall Schweinehackfleisch – mitgemessen wurde. Eukaryontische Muskelzellen können bis zu 1.000 Kopien der 16S-rDNA je Zelle enthalten (Teletchea et al., 2005). Bereits geringe Anteile von tierischer DNA verfälschten die Keimzahlbestimmung mittels ddPCR, insbesondere bei niedrigen Keimzahlen. Daher konnte die ddPCR als Schnellmethode für die Matrix Hackfleisch nicht, wie ursprünglich geplant, angewendet werden. An einer anderen Matrix, bei der durch Abschwemmungen die Bakterienpopulation vom Produkt abgeschwemmt werden kann, könnte die Methode jedoch zum Einsatz kommen, wie die Vorversuche an Puten- und Hühnerbrust-Abschwemmungen gezeigt haben.

Mikrobiomanalyse - 16S rDNA Metabarcoding

Zur Ermittlung der Mikrobiomzusammensetzung der Lagerexperimente führte das LGL eine Amplicon-Sequenzierung der V3-V4-Region der 16S-rDNA durch. Mit dieser Methode kann die relative Häufigkeit der im Hackfleisch vorhandenen Mikroorganismen ermittelt werden, unabhängig davon, ob eine Kultivierung der Organismen möglich ist oder nicht. Die grafische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Online-Tool NAMCO der Technischen Universität München (TUM) <https://exbio.wzw.tum.de/namco/>. Im Folgenden werden die Ergebnisse der in diesem Projekt untersuchten Parameter präsentiert.

Die drei Pilotversuche dienten der Etablierung und Optimierung der Methode. In diesem Zusammenhang wurde unter anderem untersucht, ob ein DNase-Verdau bei der Isolierung der Bakterienzellen aus der Hackfleischmatrix zur Entfernung der Host-DNA und der DNA bereits toter Bakterien notwendig ist. Dabei konnte eine Reduktion der kontaminierenden DNA um ca. 70 % erzielt werden.

Temperaturabhängigkeit

Insgesamt wurden im Projektzeitraum drei verschiedene Lagerungstemperaturen untersucht. Neben der standardisierten Lagerungstemperatur von 2 °C wurden die beiden höheren Temperaturen von 10 °C und 14 °C untersucht. Für jede Temperatur wurden drei unabhängige Lagerungsexperimente durchgeführt. Abbildung 3 zeigt die Mikrobiomzusammensetzung auf Familienebene bei der jeweiligen Lagerungstemperatur. Bei einer Lagerungstemperatur von 2 °C dominieren je nach Messreihe die Familien *Pseudomonadaceae*, *Listeriaceae*, *Leuconostocaceae* und *Lactobacillaceae* in unterschiedlichen Anteilen das Mikrobiom und verdrängen die Familie *Moraxellaceae*. Bei einer Temperatur von 10 °C setzen sich neben den bereits genannten Familien die *Enterobacteriaceae* und *Moraxellaceae* prozentual durch. Bei 14 °C besteht das Mikrobiom dann überwiegend aus *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Listeriaceae* und *Enterobacteriaceae*. Milchsäurebakterien werden hier komplett verdrängt. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass mit steigender Temperatur die Dominanz von

Enterobacteriaceae und *Pseudomonaceae* zunimmt. Bei 2 °C hingegen dominieren Milchsäurebakterien.

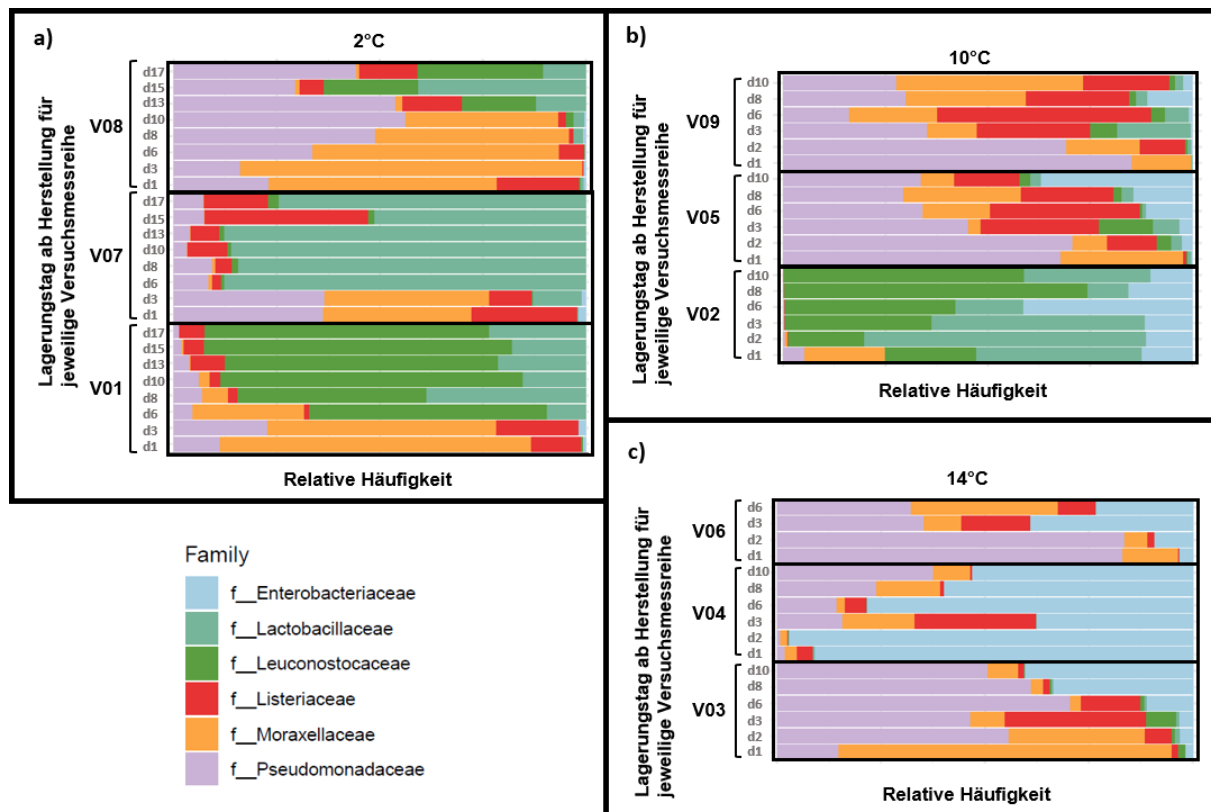


Abbildung 3: Der Einfluss der Temperatur auf die relative Zusammensetzung des Mikrobioms während einer Lagerung über mehrere Tage. (a) Relative Mikrobiomzusammensetzung über die Zeit bei 2 °C, (b) relative Mikrobiomzusammensetzung über die Zeit bei 10 °C, (c) relative Mikrobiomzusammensetzung über die Zeit bei 14 °C. Bei jeder Temperatur sind drei Versuchsmessreihen übereinander dargestellt. Für jede Messreihe ist der zeitliche Verlauf in Tagen (d) von unten nach oben zu sehen. Die Bakterien sind auf Familienebene zusammengefasst.

Einfluss der Atmosphäre

Da die MAP-Verpackung die Haltbarkeit und Qualität von Lebensmitteln beeinflusst, wurden im Projektzeitraum zwei unterschiedliche Gasgemische untersucht. Zum einen eine sauerstoffreiche mit 70 % Sauerstoff und 30 % Kohlendioxid und zum anderen eine stickstoffreiche mit 70 % Stickstoff und 30 % Kohlendioxid. Die Lagerungsexperimente bei den unterschiedlichen Temperaturen wurden jeweils unter diesen beiden MAP-Verpackungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Gattungen *Brochothrix*, *Leuconostoc* und *Pseudomonas* unter der sauerstoffreichen Atmosphäre ein besseres Wachstum aufweisen. Außerdem lässt sich sagen, dass sich die Gattung *Lactobacillus* kompetitiv ohne Sauerstoff in der Atmosphäre verhält, was sich durch ihr fakultativ anaerobes Verhalten begründen lässt.

Kühlkettenunterbrechungsexperimente

Im Rahmen des Projekts wurde eine Kühlkettenunterbrechung von 6 bzw. 12 Stunden bei 14 °C als möglicher Praxisfall für die Anwendung des digitalen Zwillings simuliert und eine mögliche Veränderung im Vergleich zu einer konstanten Lagerung bei 2 °C untersucht. Bei einer Unterbrechung von 6 h lässt sich eine Tendenz zur Beschleunigung der Veränderung des Mikrobioms erkennen. Die Diversi-

tät nimmt bereits früher ab und die dominierenden Bakterien setzen sich prozentual durch. Verlängert man die Dauer auf 12 Stunden, ist dieser Effekt deutlicher zu sehen (siehe **Abbildung 4**). Bereits einen Tag nach der Kühlkettenunterbrechung ist hier eine deutliche Veränderung im Mikrobiom erkennbar.

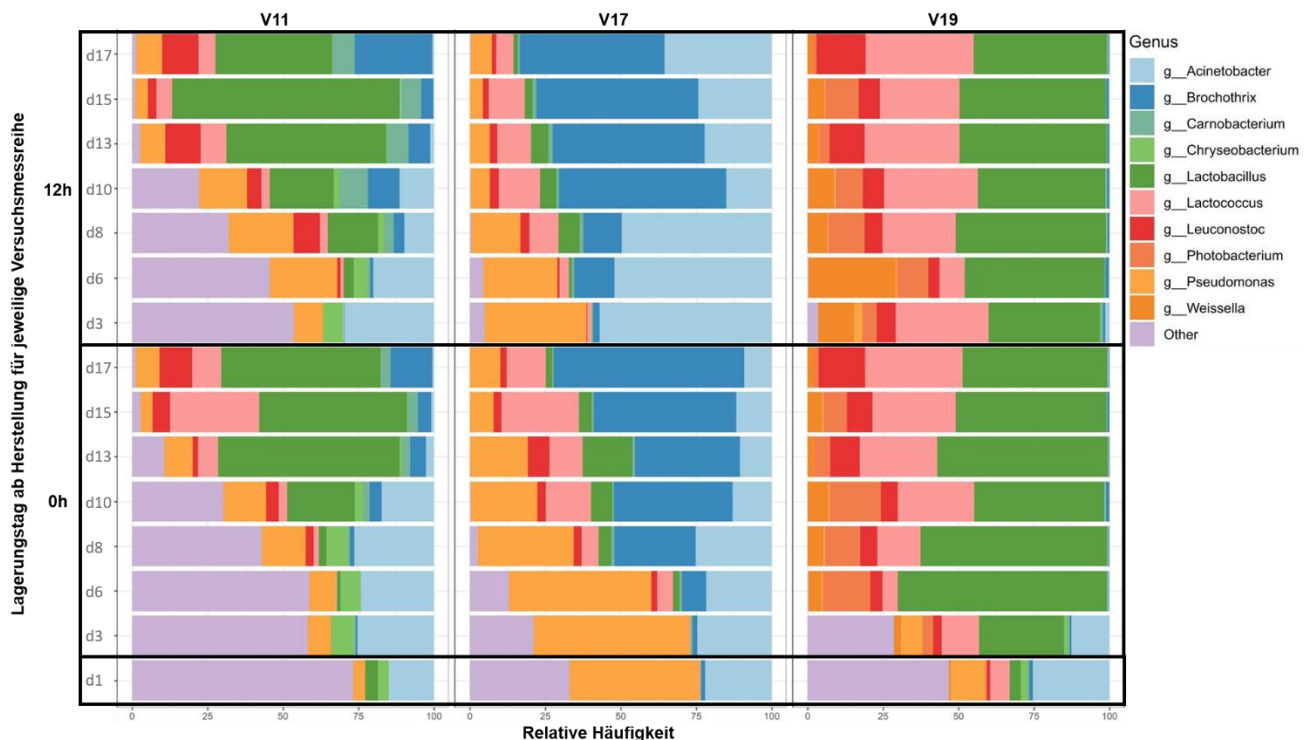


Abbildung 4: Relative Mikrobiomzusammensetzung der Versuchsmessreihen V11 (links), V17 (Mitte) und V19 (rechts) mit einer Kühlkettenunterbrechung von **12h** am 2. Lagerungstag bei 14°C. Auf der y-Achse ist der zeitliche Verlauf dargestellt. Der unterste Block zeigt die **Ausgangssituation** (d1) vor der Kühlkettenunterbrechung, der mittlere Block die zeitliche Veränderung des Mikrobioms ohne Kühlkettenunterbrechung bzw. **0h** bei 14°C und der oberste Block die zeitliche Veränderung des Mikrobioms nach einer Kühlkettenunterbrechung von **12h** bei 14°C. Die Bakterien sind auf Gattungsebene (g) dargestellt.

Handelsproben

Um den Einfluss der Ausgangspopulationen im Hackfleisch auf den Verderb zu untersuchen, wurde während der Validierungsphase der Messmethoden industrielles Hackfleisch von zwei externen Fleischproduzenten analysiert. Sowohl die Proben des Projektpartners MRI als auch die Handelsproben der beiden Fleischproduzenten wiesen die Gattungen *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* und *Brochothrix* auf, entweder als dominierende Gattungen oder in unterschiedlichen Zusammensetzungen. Bei den Industrieproben konnte zusätzlich die Gattung *Weissella* nachgewiesen werden. Außerdem ließ sich eine hohe Chargenvarianz zwischen den Schlachthöfen und auch innerhalb eines Schlachthofs feststellen. Dies begründet die erhöhte Anzahl der durchgeführten Lagerungsexperimente.

Methodenübertragung auf eine andere Matrix

Um die Methodenübertragbarkeit auf eine alternative Fleischmatrix zu untersuchen, wurde ein Lagerungsexperiment mit Putengeschnetzeltem bei 2 °C unter sauerstoffreicher Atmosphäre durchgeführt. Im Rahmen der Untersuchung wurden Putengeschnetzeltes vom Projektpartner MRI sowie Putengeschnetzeltes eines industriellen Herstellers analysiert. Die Methode wurde dahingehend modifiziert,

dass der erste Zentrifugationsschritt zur Abtrennung der Fleischmatrix zeitlich verlängert wurde und das Putengeschnetzelte am Bearbeitungstag mittels eines Häckslers homogenisiert wurde. Dadurch wurde eine Probenhomogenität erreicht. Die zeitliche Veränderung der relativen Mikrobiomzusammensetzung von einer hohen Diversität am Lagerungstag 1 (d01) zu einer relativ dominierenden Gattung war bei dieser Matrix erneut zu beobachten. Bei den dominierenden Gattungen handelt es sich um die psychrotoleranten Bakteriengattungen *Brochothrix*, *Carnobacterium* und *Leuconostoc*, wobei die Gattung *Pseudomonas* bei beiden Matrices abnimmt. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Methode auf andere Matrices übertragbar ist.

Einfluss chemischer Oxidation

Im Rahmen des Projekts wurde zudem der Einfluss der chemischen Oxidation auf den Verderb von Fleisch vor der Weiterverarbeitung zu Hackfleisch untersucht. Dabei wurde der mikrobiell unabhängige Einfluss der chemischen Oxidation auf den Verderb des Fleisches analysiert. Im Rahmen der Versuchsmessreihen wurde die relative mikrobielle Zusammensetzung des standardisiert gelagerten Fleisches nach einem Tag der verlängerten Lagerung von sieben Tagen bei 2 °C gegenübergestellt. Am LGL wurde nur eine Versuchsmessreihe untersucht, da diese Analyse nicht im Vordergrund des Projekts stand. Unter beiden Ausgangssituationen nahmen die Gattungen *Photobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* und *Brochothrix* relativ zu. Im frisch verarbeiteten Fleisch (1 Tag Lagerung) konnte sich vor allem die Gattung *Lactobacillus* durchsetzen. Im Fleisch, das sieben Tage gelagert wurde, konnte zusätzlich die Gattung *Acinetobacter* nachgewiesen werden.

Praxistest

Zur Validierung der Fusionsmodelle des von einem Projektpartner bearbeiteten digitalen Zwillings anhand von Daten aus der Industrie wurden insgesamt fünf Praxistests durchgeführt. Beim Pilotpraxistest und den ersten beiden Praxistests (V23–V25) handelte es sich um Proben, die eine MAP von 90 % O₂ und 10 % CO₂ aufweisen sollten. Von diesen Proben wurde einmal ein Lagerungsexperiment bei konstant 2 °C durchgeführt und dazu parallel Proben untersucht, bei denen am zweiten Lagerungstag eine Kühlkettenunterbrechung von sechs Stunden bei 14 °C stattfand. Bei den weiteren drei Praxistests (V26–V28) wurden Proben, die in einer MAP von 70 % O₂ und 30 % CO₂ wie in den Messreihen der Hauptstudie verpackt waren, entsprechend der anderen Praxistests untersucht. Zusätzlich wurden Packungen mit der höheren Sauerstoffkonzentration von 90 % bei konstant 2 °C analysiert. Die Proben aller Praxistests wurden am Produktionstag, einen Tag vor dem Verbrauchsdatum, am Tag des Verbrauchsdatums und zwei Tage nach dem Verbrauchsdatum bearbeitet. Um die Produktionschargenvarianz abzudecken, wurden für jeden Probenahmetag drei Packungen untersucht: eine am Anfang, eine in der Mitte und eine am Ende der Produktionscharge. Aus organisatorischen Gründen wurden die Proben für das LGL am jeweiligen Analysetag bei –80 °C am MRI eingefroren und dann gebündelt auf Trockeneis ans LGL transportiert. Aufgrund des Einfrierprozesses konnten die mikrobiologischen Vergleichsuntersuchungen mit amtlichen Methoden am LGL nicht durchgeführt werden, da sich die Mikrobiota verändert und somit keine standardisierte mikrobiologische Untersuchung mehr möglich ist. Die Erhebung dieser Vergleichsdaten wurde daher vom MRI übernommen. Zu Beginn des Projekts, in den Pilotstudien und in den ersten neun Messreihen der Hauptstudie, wurden parallel zum MRI mikrobiologische Daten erhoben und mit denen des MRIs verglichen. Da es nur marginale Unterschiede gab, sind die Daten des MRI für diese Vergleichsuntersuchung ausreichend und verwendbar. Die Packungsvarianz einer Charge während der Produktion ist exemplarisch an der Messreihe V23 (Pilotpraxistest) in Abbildung 5 dargestellt. Die drei Packungen weisen zu einem Zeitpunkt eine sehr ähn-

liche mikrobielle relative Zusammensetzung auf, die sich aber über die Zeit unterschiedlich schnell entwickelt. Eine statistische Varianz wurde im Projektzeitraum noch nicht ermittelt; dies wird aber nach Projektende bei der detaillierten Auswertung erfolgen.

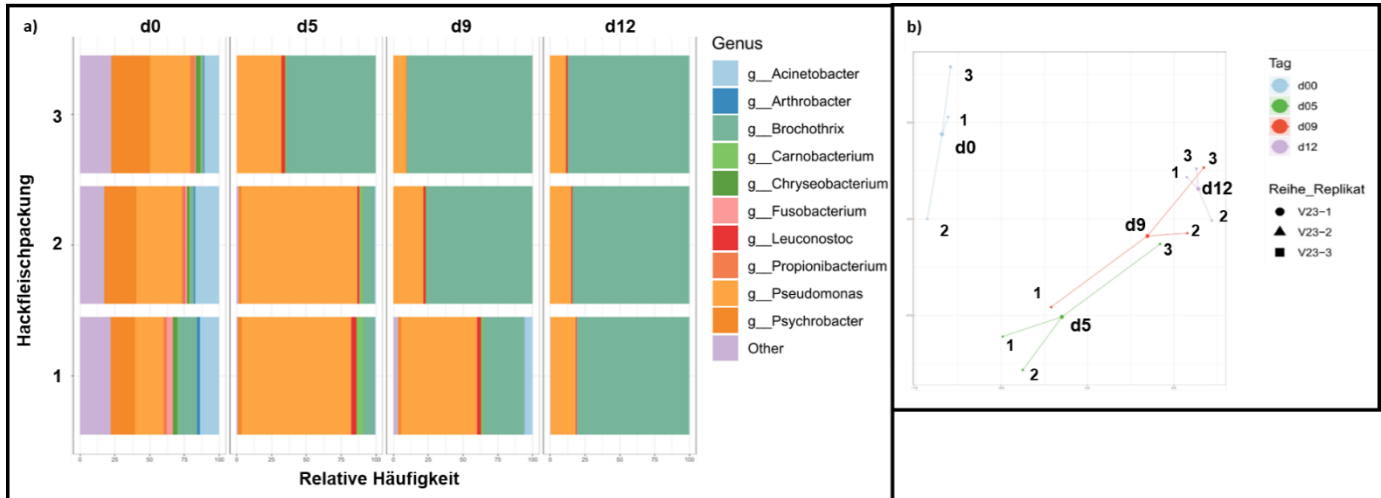


Abbildung 5: Exemplarische Packungsvarianz anhand der zeitlichen Veränderung der relativen Mikrobiomzusammensetzung der Versuchsmessreihe V23. **a)** Relative Veränderungen der Mikrobiomzusammensetzung auf Gattungsebene (g). Der zeitliche Verlauf von links nach rechts: **d0** Produktionstag, **d5** die Hälfte der Zeit bis zum Verbrauchsdatum, **d9** ein Tag vorm Verbrauchsdatum und **d12** zwei Tage nach dem Verbrauchsdatum. Auf der y-Achse sind die von der Produktionszeit her unterschiedlich genommen Hackfleischpackungen aufgetragen. Unten die Packungen zum Anfang der Produktionscharge, in der Mitte während der laufenden Produktion und unten die Packungen zum Ende einer Produktionscharge. **b)** NMDS Plot der die Varianz der relativen Mikrobiomzusammensetzungen der verschiedenen Packungen zueinander und über die Zeit zeigt. Die Farbe markiert den Lagerungstag und die Zahlen 1 (Start Produktionscharge), 2 (Mitte der Produktion) und 3 (Ende der Produktionscharge) den jeweiligen Zeitpunkt während der Produktion.

Betrachtet man die mikrobielle Ausgangssituation aller Praxistests in **Abbildung 6**, so sind sowohl zwischen den Chargen als auch innerhalb einer Produktionscharge mikrobielle Unterschiede erkennbar. Selbst einen Tag vor dem Verbrauchsdatum sind noch Unterschiede innerhalb der Charge erkennbar, während die Unterschiede zwischen den Chargen deutlich größer sind. Dies zeigt erneut, dass eine hohe Datenmenge erforderlich ist, um Schlüsselindikatoren zu bestimmen und einen robusten digitalen Zwilling zu etablieren, der die hohe Varianz abdecken kann. Neben der Packungsvarianz wurde auch das Verhalten des Mikrobioms hinsichtlich der unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen in der Produktion und in den vom MRI verpackten Packungen untersucht. Das Ergebnis ist in **Abbildung 7** zu sehen. Der geringere Anteil von 70 % O₂, der dem Gasmengenanteil der Hauptstudien entspricht, weist höhere Abweichungen im Mikrobiom zwischen den Chargen auf. Die Varianz zwischen den einzelnen Packungen der gleichen Charge bei einer Sauerstoffkonzentration von 90 % ist hingegen kaum ersichtlich, was auf eine gute Anwendbarkeit des digitalen Zwilling in der Industrie hindeutet. Außerdem begünstigt der höhere Sauerstoffanteil das Wachstum aerob lebender Gattungen wie *Pseudomonas*.

Abschließend wird das im Projekt gewählte Szenario der Kühlkettenunterbrechung von der Produktion bis zum Konsumenten erläutert. In **Abbildung 8** sind die Ergebnisse der Praxistests mit einer erhöhten Sauerstoffkonzentration von ca. 90 % dargestellt. Wir erkennen eine hohe Varianz zwischen den Packungen einer Charge und dass die Gattungen *Brochothrix*, *Leuconostoc*, *Acinetobacter* und *Pseudomo-*

nas das Mikrobiom am Tag vor dem Verbrauchsdatum bestimmen. Vergleicht man die Mikrobiomzusammensetzung ohne und mit der sechsständigen Kühlkettenunterbrechung bei 14 °C, so zeigt sich keine eindeutige Tendenz hinsichtlich einer schnelleren Entwicklung des Mikrobioms.

Ein Vergleich mit den Experimenten unter einer niedrigeren Sauerstoffkonzentration von 70 % (Abbildung 9) zeigt, dass wir auch hier eine hohe Varianz zwischen den Packungen finden, jedoch eine meist eindeutige Tendenz der KKU, d. h. eine schnelle Entwicklung des Mikrobioms hin zu den Verderbsmikroorganismen. Dies ist einerseits an der verminderten Diversität der Mikrobiomzusammensetzung (Abbildung 9a) und andererseits an der geringeren Streuung der Daten mit Kühlkettenunterbrechung im NMDS-Plot in Abbildung 9b zu erkennen. Werden die Packungen zu jedem Zeitpunkt gemittelt, ist ein Trend der mikrobiellen Zusammensetzung über die Lagerungsdauer zu sehen (Abbildung 10). Dabei ist eine schnelle relative Abnahme der Gattung *Pseudomonas* und eine schnelle relative Zunahme der Gattung *Brochothrix* in den Packungen mit der sechsständigen KKU zu beobachten. Außerdem führt die KKU in diesem Experiment zu einem höheren Anteil der Gattungen *Leuconostoc* und *Carnobacterium*.

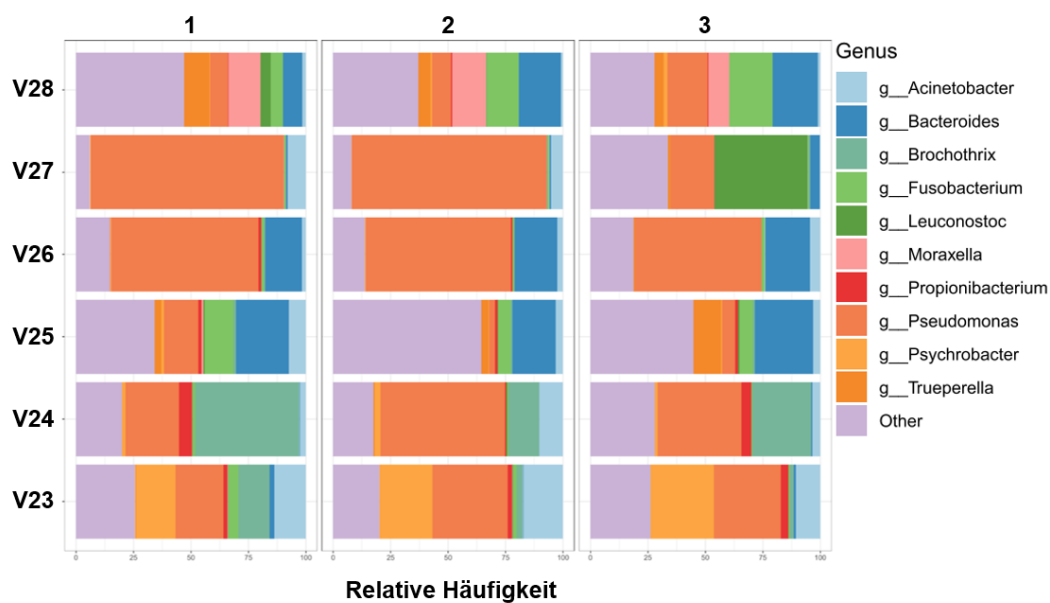


Abbildung 6: Packungsvarianz anhand der relativen Mikrobiomzusammensetzung der Praxistests V23 bis V28 am Produktionstag, der Ausgangssituation. Die relative Veränderung der Mikrobiomzusammensetzung ist auf Gattungsebene dargestellt. Von links nach rechts sind die Hackfleischpackungen aus den verschiedenen Produktionszeitpunkten aufgetragen. Links sind die Packungen zu Beginn der Produktionscharge, in der Mitte während der laufenden Produktion und rechts die Packungen zum Ende einer Produktionscharge zu sehen.

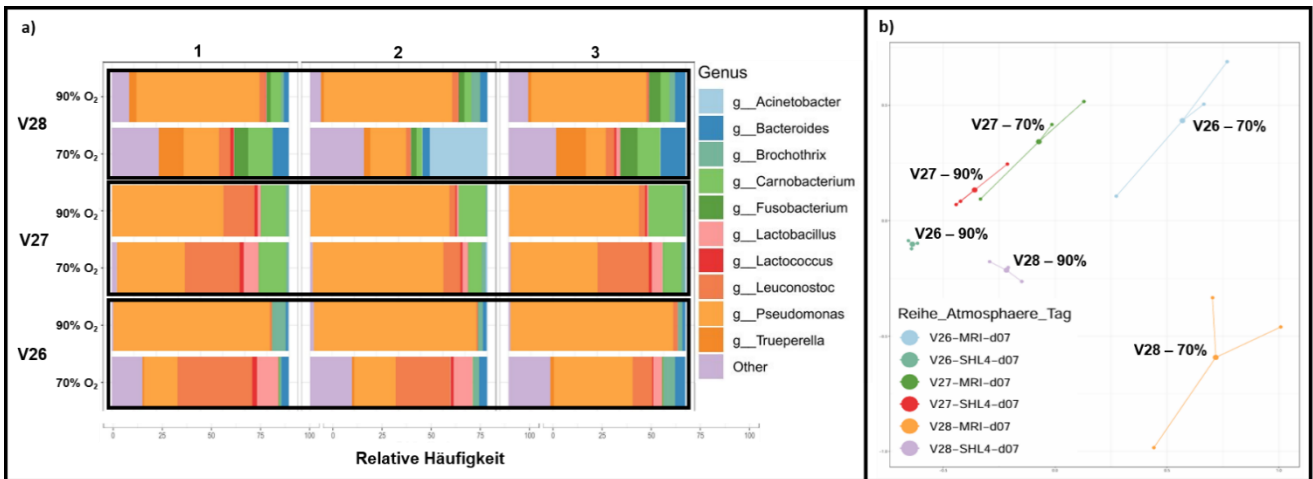


Abbildung 7: Abhängigkeit der relativen Mikrobiomzusammensetzung der Praxistests V26 bis V28 von der Sauerstoffkonzentration einen Tag vor dem Verbrauchsdatum. **a)** Die Relative Veränderungen der Mikrobiomzusammensetzungen ist auf Gattungsebene (g) dargestellt. Von links nach rechts sind die von der Produktionszeit her unterschiedlich genommene Hackfleischpackungen aufgetragen. Links die Packungen zum Anfang der Produktionscharge, in der Mitte während der laufenden Produktion und rechts die Packungen zum Ende einer Produktionscharge. Für jede Versuchsmessreihe ist unten die Zusammensetzung bei 70 % und oben bei 90 % sauerstoffreicher MAP zu sehen. **b)** NMDS Plot der die Varianz der relativen Mikrobiomzusammensetzungen der verschiedenen Packungen abhängig von der Sauerstoffkonzentration (70 % oder 90 %) zeigt. Die Farbe markiert den Praxistest und die zugehörige Sauerstoffkonzentration.

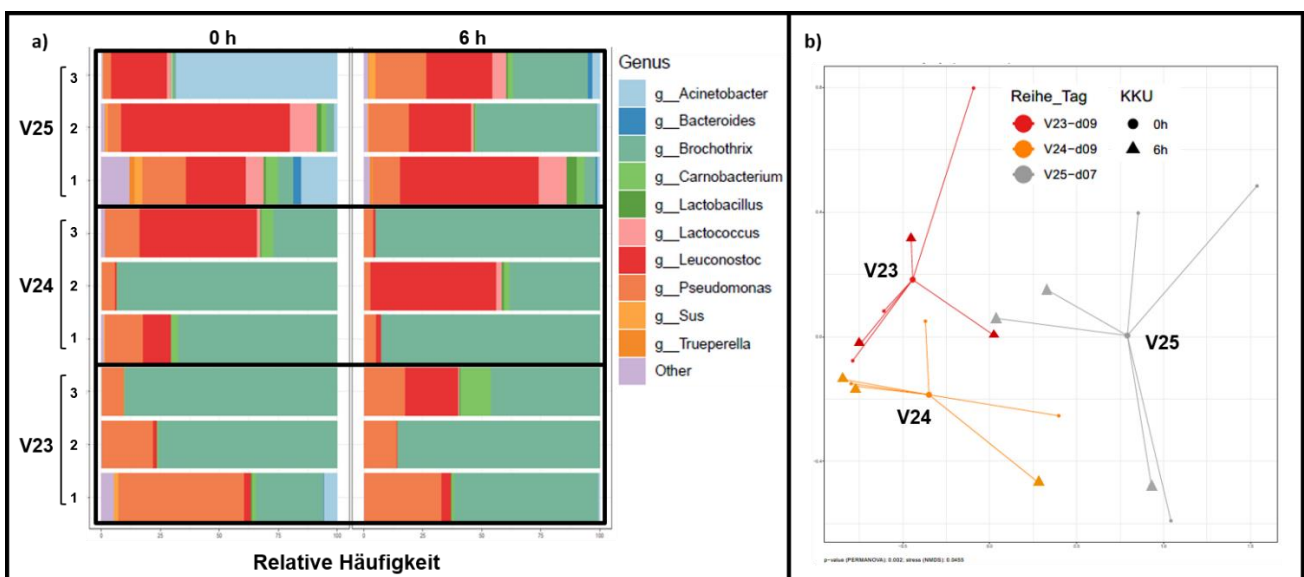


Abbildung 8: Einfluss einer Kühlkettenunterbrechung (KKU) von 6h bei 14°C auf die Packungsvarianz, dargestellt anhand der relativen Mikrobiomzusammensetzung der Praxistests V23 bis V25 einen Tag vor dem Verbrauchsdatum bei einer Sauerstoffkonzentration von 90 %. **a)** Die Relative Veränderungen der Mikrobiomzusammensetzungen ist auf Gattungsebene (g) zu sehen. Für jede Versuchsmessreihe ist von unten nach oben die von der Produktionszeit her unterschiedlich genommene Hackfleischpackungen aufgetragen. Unten die Packungen zum Anfang der Produktionscharge, in der Mitte während der laufenden Produktion und oben die Packungen zum Ende einer Produktionscharge. **b)** NMDS Plot der die Varianz der relativen Mikrobiomzusammensetzungen der verschiedenen Packungen abhängig von der KKU zeigt. Die Farbe markiert den Praxistest und die Form der Datenpunkte, ob eine KKU stattgefunden hat oder nicht.

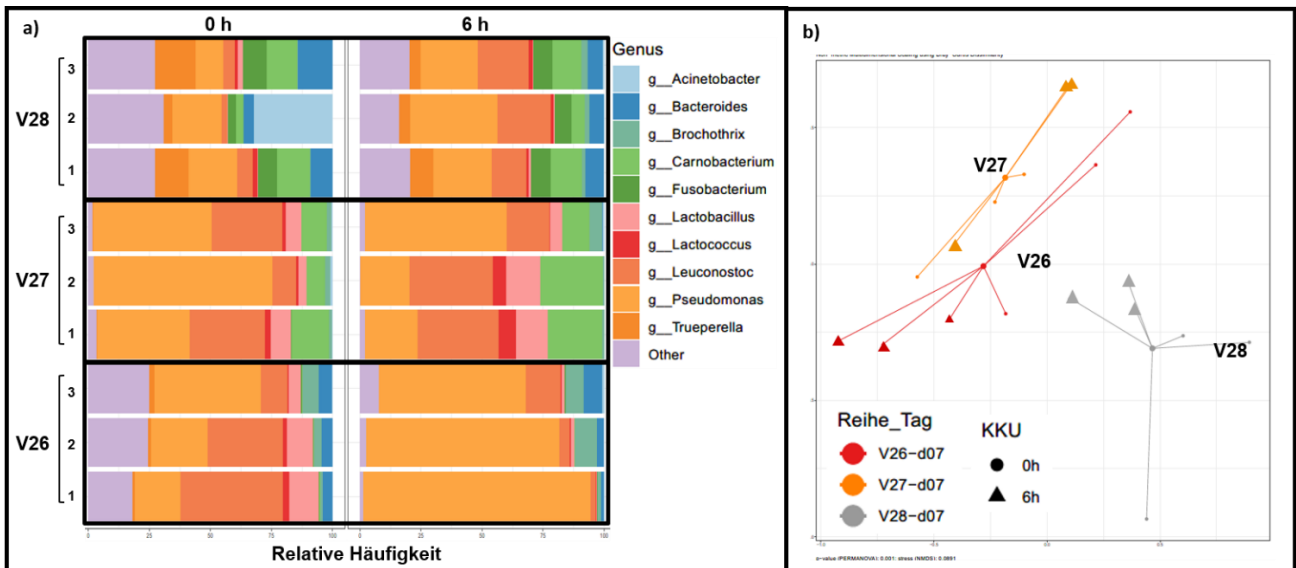


Abbildung 9: Einfluss einer Kühlkettenunterbrechung (KKU) von 6h bei 14 °C auf die Packungsvarianz, dargestellt anhand der relativen Mikrobiomzusammensetzung der Praxistests V26 bis V28 einen Tag vor dem Verbrauchsdatum bei einer Sauerstoffkonzentration von 70 %. **a)** Die Relative Veränderungen der Mikrobiomzusammensetzungen ist auf Gattungsebene (g) zu sehen. Für jede Versuchsmessreihe ist von unten nach oben die von der Produktionszeit her unterschiedlich genommene Hackfleischpackungen aufgetragen. Unten die Packungen zum Anfang der Produktionscharge, in der Mitte während der laufenden Produktion und oben die Packungen zum Ende einer Produktionscharge. **b)** NMDS Plot der die Varianz der relativen Mikrobiom-Zusammensetzungen der verschiedenen Packungen abhängig von der KKU zeigt. Die Farbe markiert den Praxistest und die Form der Datenpunkte, ob eine KKU stattgefunden hat oder nicht.

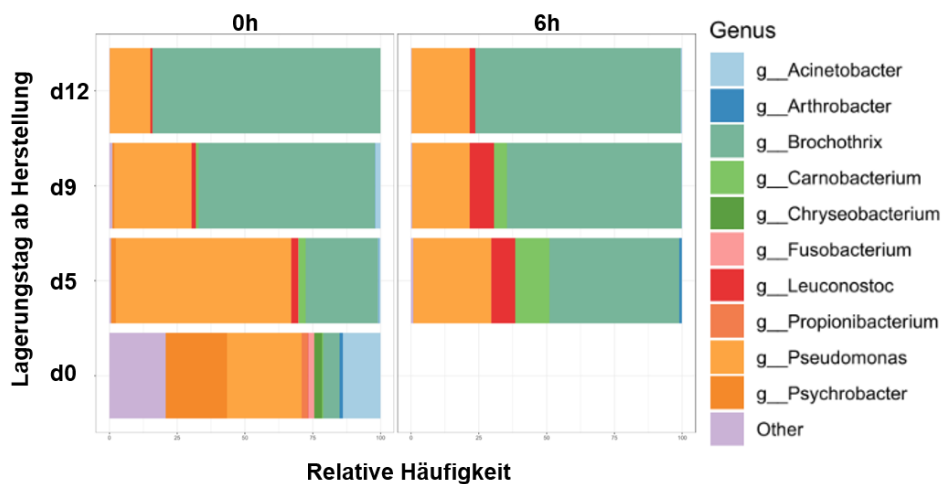


Abbildung 10: Einfluss einer Kühlkettenunterbrechung (KKU) von 6h bei 14°C auf die gemittelten relativen Mikrobiomzusammensetzung des Praxistests V23 bei einer Sauerstoffkonzentration von 90%. Die Relative Veränderungen der Mikrobiomzusammensetzungen sind auf Gattungsebene (g) zu sehen. Links ist die relative Mikrobiomzusammensetzung ohne KKU und rechts mit einer KKU von 6h dargestellt. Die y-Achse zeigt den zeitlichen Verlauf der Lagerung von unten nach oben an.

2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personalkosten: Die Mittel für das Personal der TA-Stelle wurden aufgrund des krankheitsbedingten Ausfalls umgewidmet. In der Projektverlängerung wurde die Stelle der wissenschaftlichen Mitarbeiterin von 70 % auf 100 % erhöht, da sie sowohl die Laborarbeiten als auch die Datenauswertung durchführte.

Sonstige allgemeine Verwaltungsausgaben: Die Materialien zur Vorbereitung und Sequenzierung der DNA für die Amplicon-Sequenzierung sind kostenintensiv. Im Rahmen des Projekts wurden mehr Proben bearbeitet als ursprünglich geplant. Außerdem wurden für die Transkriptomanalyse vermehrt Reagenzien benötigt, die ein RNase-freies Arbeiten ermöglichen. Die veranschlagten Kosten für Publikationen konnten im Projektzeitraum nicht verausgabt werden und das Konsortium erhielt eine Verlängerung bis zum 15.10.2025.

Gegenstände: Während des Projekts wurden zwei größere Geräte angeschafft. Zum einen wurde ein MagicPrep NGS-System angeschafft. Hierbei handelt es sich um ein Tecan-Library-Preparationsgerät, das die Library-Präparationen im Projekt übernehmen und einen schnelleren Durchsatz ermöglichen sollte. Da die für das Projekt angeschafften Transportboxen des MRIs die benötigte Lagerungstemperatur von 2 °C nicht präzise genug halten konnten, wurde zusätzlich ein Pharmaziekühlschrank zum exakten Einstellen der Lagerungstemperatur beschafft.

Vergabe von Aufträgen: Da die Transkriptomanalyse nach anfänglichen Versuchen, die einen sehr hohen Aufwand erforderten, an einen externen Dienstleister ausgelagert wurde, fielen höhere Auftragskosten als ursprünglich geplant an. Die genauen Ausgaben werden inklusive der entstehenden Publikationskosten im zahlenmäßigen Verwendungsnachweis dargelegt, der dem Projektträger bis zum 15.10.2025 vorgelegt wird.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeit

Die durchgeführten Arbeiten sowie die dafür aufgewandten Ressourcen waren notwendig und angemessen, da sie der detailliert dargelegten Planung im Projektantrag entsprachen.

Einige Arbeitspakete, wie beispielsweise die Validierung der Fusionsmodelle und innovativen Messmethoden (Arbeitspaket 1.7), konnten im angepassten Zeitrahmen und Umfang bearbeitet werden. Diese Anpassungen waren aufgrund der personellen Rahmenbedingungen während der Projektlaufzeit notwendig. Die Erreichbarkeit der Projektziele wurde innerhalb des Projektes angepasst.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Der Fokus des Teilprojekts D lag auf der Methodenentwicklung sowie deren wissenschaftlich-technologischem Nutzen.

Die Ergebnisse wurden auf mehreren wissenschaftlichen Tagungen präsentiert und werden in verschiedene wissenschaftliche Publikationen einfließen. Zudem erfolgte die wissenschaftliche Verwertung der Ergebnisse im Rahmen einer Abschlussarbeit in Zusammenarbeit mit der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf (HSWT).

Aufgrund der interdisziplinären Ausrichtung der Projektpartner und eingebundenen Experten wurde ein Netzwerk aufgebaut, das eine nachhaltige Verwertung und Weiterführung der Projektergebnisse, inklusive einer potenziellen Verwertung für die amtliche Lebensmittelkontrolle, ermöglicht.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Im Bereich der Qualitätssicherung und Haltbarkeit von Lebensmitteln ist eine Vielzahl neuer Arbeiten zum Einsatz von KI und digitalen Zwillingen sowie zur Nutzung von Echtzeitmessungen qualitätsrelevanter Parameter zu verzeichnen. So entwickelten Douaki et al. (2025) aktuell ein batterie- und dehnbare Verpackungssystem mit integriertem Gassensor und NFC-Aktivierung. Bei Fischpackungen misst es die Frische und löst bei Verderb eine kontrollierte Freisetzung von Antioxidantien aus, wodurch sich die Haltbarkeit um bis zu 14 Tage verlängert. Im Bereich der digitalen Lebensmittelzwillinge sind exemplarisch die Arbeiten von Kucha und Olaniyi (2025) zu nennen. Sie sehen im Hyperspectral Imaging ein Potenzial für die Erstellung digitaler Zwillinge im Zusammenhang mit der Vorhersage der Fleischkonsistenz. Auch die Entwicklung grundlegender Konzepte zum Einsatz von digitalen Zwillingen im Bereich der Qualitätssicherung und -vorhersage von Lebensmitteln schreitet voran (Purlis, 2024; Sanfiya und Braun, 2025).

In den vergangenen Jahren hat die Oxford-Nanopore-Technologie (ONT) einen bedeutenden Innovationsschub im Bereich des NGS-basierten Metabarcodings bewirkt. Dabei werden komplette Nukleotidstränge durch Nanoporen, die sich in einer elektrisch geladenen Membran befinden, geschleust. Je nach Nukleotidbase verändert sich beim Durchtritt durch eine solche Pore der angelegte Strom, sodass die Nukleotidbase identifiziert werden kann. Trotz anfänglicher Herausforderungen hinsichtlich der Sequenzgenauigkeit konnten durch kontinuierliche Verbesserungen der Chemie, der Basecalling-Algorithmen und der bioinformatischen Auswertungsprozesse erhebliche Fortschritte erzielt werden. Die Kombination aus hoher Flexibilität, long-read-fähiger Datenerzeugung und dem Potenzial für kosteneffiziente Analysen macht die Oxford-Nanopore-Sequenzierung zu einer zukunftsweisenden Technologie im Metabarcoding und somit in der Mikrobiomanalyse von Lebensmitteln.

In den letzten Jahren gab es zwei neue Mikrobiom- bzw. Metagenomstudien zu frischen Fleischprodukten, die für das Vorhaben relevant sind. Zum einen zeigten Poirier et al. (2023) in vergleichenden Omics-Analysen mit den Matrices Geflügel- und Schweinefleisch, dass das anfängliche Mikrobiom das Verderbsgeschehen signifikant beeinflusst, wobei die Prozessparameter, wie die Art der Verpackung oder die Zugabe von Pökelsalz, eine Rolle spielen. Anhand der detektierten Stoffwechselprodukte konnten zudem Zusammenhänge zwischen dem Vorkommen bestimmter Arten abgeleitet werden. So zeigte sich beispielsweise, dass bestimmte Prozessierungen von Schweinefleisch (wie das Entbeinen und Entfetten) zur Vermehrung von Lebensmittelverderbern wie *Dellagليا algida* führen, die während der Lagerung dominant werden. Die Produktion flüchtiger organischer Verbindungen, die zum Verderb führen, konnte bestimmten Spezies zugeschrieben werden. So zeigte sich eine neue Rolle von Vibrionaceae bei der Isopropanolproduktion und von *Lactilactobacillus fuchensis* und *Lactococcus piscium* bei der Methanthiol-/Disulfid-Produktion.

In der Arbeitsgruppe von Michael Gänzle an der University of Alberta (Kanada) wurde zudem die mikrobielle Dynamik in einem Fleischverarbeitungsbetrieb mithilfe kulturunabhängiger (Metagenom- und Metabarcoding-) und kulturabhängiger Methoden untersucht, um die Vielfalt, Verbreitung, Persistenz und Biofilmbildung von Verderbnis erzeugenden Mikroorganismen aufzudecken [Xu et al., 2025]. Dabei konnten Erkenntnisse über die beteiligten Spezies und deren Persistenz bei der Biofilmbildung gewonnen werden, die die Entwicklung der Fleischqualität entscheidend beeinflussen können. Neben den bekannten Verderbnis-assoziierten Spezies wie Pseudomonaden, *Enterobacteriaceae*, *Carnobacterium* spp. oder *Serratia proteamaculans* wurden auch 74 bislang unbekannte Taxa in den Biofilmen nachgewiesen.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NABF.I.

Publikationen

Wenning et al. (2025) Waste reduction of highly perishably raw meat - Innovative approaches augmented by AI to assess food shelf life (in Vorbereitung für Einreichung bei Journal of Consumer Protection and Food Safety)

Wimmer C., Hanifi N., Roth K., Wenning M., Pavlovic M., Bretschneider N., Huber I., Busch U. (2023). „Zukunftslabor 2030“ – Analyse von Fleischverderb am aktuellen Beispiel von Hackfleisch. Lebensmittelchemie Supplement-Band 3 (2023) | S3-031

Busch U., Wimmer C., Wenning M., Pavlovic M., Huber I. Forschungsprojekt Zukunftslabor 2030 – Zukunftsszenarien für den Verbraucherschutz auf Basis von Qualitäts- und Sicherheitsinformationen von Lebensmitteln, innovativen Messmethoden und KI. In: Dellert-Ritter, M. (Hrsg.). chrom+food FORUM - Ausgabe 09.2022. S. 62-63. 2022

Tagungsbeiträge / Poster

Wenning M. (2025) Mettigel meets KI – Vorhersage des Frischezustands von Hackfleisch entlang der Lebensmittelkette. Vortrag auf dem Fachseminar für Fachpersonal der sächsischen Lebensmittelüberwachungsbehörden, 14.05.2025, Neukirchen/Pleiße

Wenning M., Brzezinski-Hofmann K., Brunner M., Peukert M., Mühling M., Schmidt H., Böckelmann S. (2024) Analytik, Künstliche Intelligenz und Digitaler Zwilling - Herausforderungen und Chancen am Beispiel von vorverpacktem Schweinehackfleisch. Tagungsbericht - Überregulierung im Lebensmittelrecht?, Vortrag mit publiziertem Tagungsbandbeitrag bei 23. Bayreuther Herbstsymposium der Forschungsstelle für Deutsches und Europäisches Lebensmittelrecht - FLMR; Universität Bayreuth: 17.-18. Oktober 2024

Wenning M., Brüggemann D., Ganas P., Zeh G., Lipps N., Schmidt H., Brzezinski-Hofmann K., Böckelmann S., Brunner M. (2025) KI in der Lebensmittelsicherheit – Chancen und Herausforderungen bei der Vorhersage des Frischezustands von Hackfleisch entlang der Lebensmittelkette. Vortrag auf der 65. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz der DVG, 23. - 26.09.2024, Garmisch-Partenkirchen.

Wimmer C., Hanifi N., Pavlovic M., Bretschneider N., Wenning M., Huber I., Busch U. Analyse von Fleischverderb im Projekt „Zukunftslabor 2030“. In: Rackwitz R, Truyen U (Hrsg). Vortrag mit publiziertem Tagungsbandbeitrag bei 12. Leipziger Tierärztekongress – Tagungsband 4. S. 99-101. Leipzig (2024)
Wimmer C., Hanifi N., Pavlovic M., Bretschneider N., Wenning M., Huber I., Busch U. Das Zukunftslabor 2030 unter Einsatz von Next Generation Sequencing (NGS), Vortrag Analytica 2024, Forum Biotechnologie

Wenning M., Wimmer C., Hanifi, N., Pavlovic M., Bretschneider N., Huber I., Busch U. (2024) Einsatz digitaler Zwillinge zur Vorhersage des Frischezustands von Hackfleisch entlang der Lebensmittelkette, Poster auf der 64. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz der DVG, 24. - 27.09.2024, Garmisch-Partenkirchen

Wimmer C., Hanifi N., Wenning M., Pavlovic M., Bretschneider N., Huber I., Busch U. (2024). Vorstellung Projekt Digitaler Zwilling. Vortrag beim 2. Hamburger Dialog gegen Lebensmittelverschwendung.

Wimmer C., Hanifi N., Roth K., Wenning M., Pavlovic M., Bretschneider N., Huber I., Busch U. „Zukunftslabor 2030“ – Analyse von Fleischverderb am aktuellen Beispiel von Hackfleisch. Vortrag bei den 51. Lebensmittelchemietagen Bonn (2023)

Wenning M., Wimmer C., Hanifi N., Pavlovic M., Bretschneider N., Huber I., Busch U. (2022) Analyse von Fleischverderb im Projekt „Zukunftslabor 2030“. Vortrag auf dem 4. LGL-Kongress Lebensmittelsicherheit und Tiergesundheit, 25. - 27. 10.2022, Erlangen

7. Quellenangaben

- [1] De Filippis, F., Parente, E., & Ercolini, D. (2018). Recent past, present, and future of the food microbiome. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9(1), 589-608.
- [2] Douaki, Ali, et al. "Battery-Free, Stretchable, and Autonomous Smart Packaging." *Advanced Science* 12.22 (2025): 2417539
- [3] Govindaswamy, J., Zeller-Péronnet, V., Pavlovic, M., Wirtz, D., Murr, L., Thäringen, D., ... & Huber, I. (2022). Digital droplet-PCR for quantification of viable *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken meat rinses. *Applied Sciences*, 12(11), 5315.
- [4] Höll, L., Hilgarth, M., Geissler, A. J., Behr, J., & Vogel, R. F. (2019). Prediction of in situ metabolism of photobacteria in modified atmosphere packaged poultry meat using metatranscriptomic data. *Microbiological research*, 222, 52-59.
- [5] Hultman, J., Johansson, P., & Björkroth, J. (2020). Longitudinal metatranscriptomic analysis of a meat spoilage microbiome detects abundant continued fermentation and environmental stress responses during shelf life and beyond. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(24), e01575-20.
- [6] Kucha, C., & Olaniyi, E. O. (2024). Applications of hyperspectral imaging in meat tenderness detection: current research and potential for digital twin technology. *Food Bioscience*, 103754
- [7] Poirier, S., Coeuret, G., Champomier-Vergès, M. C., Desmonts, M. H., Werner, D., Feuer, C., & ANR Redlosses Consortium Group. (2023). Holistic integration of omics data reveals the drivers that shape the ecology of microbial meat spoilage scenarios. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1286661.
- [8] Purlis, E. (2024). Digital twin methodology in food processing: Basic concepts and applications. *Current Nutrition Reports*, 13(4), 914-920.
- [9] Rothrock, M. J., Hiatt, K. L., Kiepper, B. H., Ingram, K., & Hinton, A. (2013). Quantification of zoonotic bacterial pathogens within commercial poultry processing water samples using droplet digital PCR. *Advances in Microbiology*, 3(05), 403.
- [10] Sanfiya, S., & Sabitha Banu, A. (2025). Digital Twins & Industry 5.0 On Food Management. In *Food and Industry 5.0: Transforming the Food System for a Sustainable Future* (pp. 87-105). Cham: Springer Nature Switzerland
- [11] Xu, Z. S., Pham, V. D., Yang, X., & Gänzle, M. G. (2025). High-throughput analysis of microbiomes in a meat processing facility: are food processing facilities an establishment niche for persisting bacterial communities? *Microbiome*, 13(1), 25.