Abschlussbericht

Qualitätsüberwachung entlang der Lebensmittel-Prozesskette mittels Biosensoren und Künstlicher Intelligenz

„KI-BioSense“

Zuwendungsempfänger:	GALAB Laboratories GmbH
FKZ:	281A501B19
Laufzeit:	01.01.2020 – 31.06.2024

Projektpartner:

- GALAB Laboratories GmbH
- BAADER
- TecSense GmbH
- Institut für Biomedizinische Optik der Universität zu Lübeck
- Institut für Softwaretechnik und Programmiersprachen der Universität zu Lübeck
- Por-Lab GmbH
- GEA Group AG

Projektskizze im Rahmen der BMEL-Fördermaßnahme: „Digitale Transformation in der Lebensmittelwirtschaft“

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) unter dem Förderkennzeichen 281A501B19 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Inhalt

1 Kurzdarstellung....4
1.1 Aufgabenstellung....4
1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde....5
1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens....5
1.4 Wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde....5
1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen....8
2 Eingehende Darstellung....9
2.1 Darstellung der Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele....9
3 Kurzzusammenfassung....14

1 Kurzdarstellung

1.1 Aufgabenstellung

Insbesondere zur Vermeidung von Lebensmittelabfüllen und zur Qualitätssicherung ist eine durchgängige digitale Abbildung der gesamten Lieferkette, entlang derer nicht-invasiv die Qualität für jedes einzelne Lebensmittel gemessen und protokolliert wird, von zentraler Bedeutung. Im Projekt KI-Biosense wird mithilfe von Distributed-Ledger-Technologien eine derartige durchgängige Digitalisierung der Lieferkette von der Produktion bis hin zum Verkauf von Fischereiprodukten konzipiert und als Demonstrator aufgebaut. Zentrale Überwachungselemente, mit deren Hilfe entlang dieser Lieferkette die Qualität überprüft werden soll, sind Biosensoren als Bestandteil einer intelligenten Lebensmittelverpackung, anhand welcher die Frische des Produktes kontinuierlich ermittelt und mittels optischer Verfahren nicht-invasiv ausgelesen werden kann. Zur Kalibrierung dieser Sensoren und zur Prognose der Frische des Lebensmittels werden insbesondere KI-Methoden verwendet.

Die Überwachung von Lebensmitteln entlang der Lieferkette mit Hilfe von Biosensoren ist grundsätzlich für eine Vielzahl von Lebensmitteln geeignet. Je nach Kategorie der Lebensmittel sind hierfür verschiedene Biosensoren in unterschiedlicher Kombination zu wählen. Im Rahmen des Projekts KI-BioSense wird eine Kombination aus drei Biosensoren am Modellsystem Fisch appliziert, um die aktuelle Frische von Fisch zu ermitteln und die zukünftige Frische (den Verfall) zu prognostizieren. Während es sich bei den ersten beiden Sensoren um am Markt existierende Sensoren zur Bestimmung des Sauerstoffgehalts und der Temperatur in Verpackungen handelt, wird der dritte, neu entwickelte Sensor zur Detektion von Aminen als Abbauprodukte von Fisch als direktes Maß für den Verderb verwendet. Dieser Sensor ist bestens geeignet, direkt den aktuellen Frischezustand von Fisch zu messen und ist zentraler Baustein für eine Digitalisierung der Lieferkette und insbesondere zur Vermeidung von Lebensmittelabfällen. Zur Prognose der Frische über die nächsten Tage ist aber die Kombination aller Sensoren vorteilhaft.

In der Lebensmittelindustrie gibt es einen großen Bedarf, die Haltbarkeit von Lebensmitteln routinemäßig und nicht-invasiv zu bestimmen. Beim Abbau von biologischem Gewebe, so z.B. beim Verderb von tierischen Lebensmitteln, werden Proteinabbauprodukte wie Amine in gasförmiger Phase in die Umgebung abgegeben. Über die Detektion dieser Stoffe lässt sich die Haltbarkeit von Lebensmitteln bestimmen und entsprechend eine eintretende Veränderung der Haltbarkeit (Verderb, Reife, o.ä.) indizieren. Bisher können Amine nur mit einer aufwändigen Laboranalytik nachgewiesen werden.

Am Institut für Biomedizinische Optik der Universität zu Lübeck wurde in Kooperation mit der Firma Porphyrin-Laboratories GmbH eine Polymerfolie entwickelt, die in der Lage ist, Amine mit hoher Sensitivität und Selektivität in der Gasphase über dem Lebensmittel zu detektieren. Ein optisch auslesbarer Aminsensor kann eine schnelle sensitive Beurteilung der Haltbarkeit von Lebensmitteln ermöglichen. Durch die Detektion von Fluoreszenz und Absorption kann der Sensor für vielfältige Einsatzgebiete verwendet werden. So kann er als einfacher Farbindikator auf der Lebensmittelverpackung für den Endverbraucher ablesbar sein, auf der anderen Seite kann der Handel durch optische Messung die (tagesaktuelle) Frische quantitativ beurteilen. Dies kann auch dazu beitragen, dass weniger Lebensmittel zu Zeitpunkten entsorgt werden, zu denen das Ende der Haltbarkeit noch nicht erreicht ist. Fisch- und weitere lebensmittelverarbeitende Betriebe können eine kontinuierliche Kontrolle während des gesamten Produktionsprozesses sicherstellen und eine automatisierte Onlinekontrolle ermöglichen, nicht nur in Stichproben, sondern für jede einzeln verpackte Wareneinheit.

Eine wesentliche Herausforderung neben der Erstellung eines derartigen Sensors ist die informatorische Ermittlung einer Korrespondenz zwischen optischer Ausprägung des Sensors und der Klassifikation der Frische. Dazu werden Machine-Learning-Techniken angewendet. Mittels Laboranalysen werden entsprechende Trainingsdaten ermittelt, aufbereitet und mittels Deep-Learning-Ansätzen zum Training von entsprechenden Netzen verwendet.

Biosensoren sind ideal, um die Frische und damit die Qualität von Lebensmitteln zu quantifizieren, die dann über die Sensortechnik in digitale Daten überführt wird. Zur Prognose der Frische sind aber neben dem eigentlichen Aminsensor weitere Sensoren hilfreich, mittels derer die Historie des Produktes über die Lieferkette hinweg rekonstruiert und somit insgesamt die zukünftige Frische prognostiziert wird. Die Prognose wird wieder auf Basis entsprechender Machine-Learning-Techniken realisiert.

Der gesamte Ansatz kann aber nur funktionieren, wenn die historischen Daten kontinuierlich entlang der Lieferkette fälschungssicher festgehalten werden. Gerade hierfür wird ein Konzept auf Basis von Distributed-Ledger-Technologien erarbeitet und als Demonstrator umgesetzt.

Insgesamt wird auf diese Weise eine leistungsfähige und insbesondere auch unter Kostengesichtspunkten tragfähige Lösung zur Vermeidung von Lebensmittelabfällen erarbeitet.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das hauptsächliche Geschäftsgebiet von GALAB ist die Analytik von Lebensmitteln, Bedarfsgegenständen und Umweltproben. In diesem Rahmen besitzt GALAB einerseits weitreichende Kompetenzen in der chemischen Analytik vielfältiger Analyten und Matrices sowie andererseits die nötigen Analysegeräte, um eine selektive und sensible Referenzanalytik für Amine in Fisch zu erforschen und etablieren.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Für die Umsetzung der Ziele wurde ein interdisziplinärer Ansatz gewählt, in dessen Rahmen GALAB für die Erforschung und Anwendung der Referenzanalytik, mithilfe derer die Sensorwerte überprüft und die Machine Learning Software angelernt werden soll, verantwortlich war. Die Arbeitspakete bei GALAB unterteilten sich in:

1) Etablierung der Referenzanalytik zur Bestimmung der Fischqualität
2) Erhebung der Messdaten am Modellsystem Fisch

1.4 Wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde

Für den Parameter Sauerstoff O_2 gibt es bereits ein optisches nicht-invasives System, das die erforderliche Überwachung der Lebensmittel ermöglicht.

80 % der verderblichen Lebensmittel wir Fisch, Fleisch, Käse, Brot und Gemüse werden unter Schutzatmosphäre verpackt. Diese enthält keinen Sauerstoff, verlangsamt damit die Alterung der Lebensmittel und ermöglicht so die garantierte Haltbarkeit. Eine 100 %ige Kontrolle dieser Schutzatmosphäre, ohne Zerstörung der Verpackung, war bisher nicht möglich. Das vom Projektpartner TecSense GmbH entwickelte Sensorsystem TecPac kontrolliert direkt an der Verpackungsmaschine berührungslos die Schutzatmosphäre innerhalb aller Verpackungen und deren Temperatur und gibt die Messwerte digital an beliebige Kontrolleinrichtungen weiter.

Das Mess-System kann sowohl in Termoformer-, Traysealer- als auch Flow Wrap-Maschinen eingebaut werden. Es gibt dazu für Stichprobenkontrollen ein Handgerät, das nach denselben Prinzipien arbeitet und eine Kontrolle entlang der Verteilungskette erlaubt.

Bei der Analytik von Aminen bzw. biogenen Aminen in der Lebensmittelchemie/ Qualitätskontrolle/ Lebensmittelüberwachung handelt es sich in der Regel um sehr aufwändige Verfahren mit hohem apparativem Aufwand, klassisch mittels HPLC bzw. Gaschromatographie in Kombination mit Massenspektroskopie. Solche Techniken erfordern auch eine aufwändige und zeitintensive Probenvorbereitung. Des Weiteren ist für die Bedienung der komplexen Geräte geschultes Personal erforderlich. Diese insgesamt kostenaufwändige Bestimmung des Lebensmittelzustandes führt dazu, dass in der Produktion von Lebensmitteln eine überwachende Lebensmittelkontrolle nur stichprobenartig erfolgen kann. Insbesondere die lebensmittelverarbeitende Industrie sucht dringend nach zeit- und kostengünstigen Verfahren, bei denen eine aussagekräftige Kontrolle der Haltbarkeit des verpackten Produkts bei jeder einzelnen Verpackung erfolgen kann (‚Schnelltest').

Am Beispiel von Fisch werden im Folgenden die komplexen Vorgänge, die beim Verderb von Lebensmitteln auftreten, exemplarisch dargestellt: Zur Einschätzung der Haltbarkeit von Fisch können die Gehalte an flüchtigem Basenstickstoff (TVB-N), Trimethylamin (TMA), Trimethylaminoxid (TMAO) und Dimethylamin (DMA) verwendet werden. Dabei erlauben die Konzentrationen an TMAO und DAM vor allem Aussagen zu den ersten Tagen der Lagerzeit, da TMAO zuerst enzymatisch zu DMA abgebaut wird. Die Gehalte an TMA und damit auch an TVB-N steigen dagegen erst bei fortgeschrittener Lagerzeit deutlich an und werden üblicherweise zur Bestimmung des mikrobiellen Verderbs eingesetzt. Allerdings können auch Fische, die einen niedrigen TVB-N-Wert haben, verdorben (z.B. aufgrund ungewöhnlicher Mikrobiome) und Fische mit hohen TVB-N-Werten noch genusstauglich sein (abhängig von Fischart, Fanggebiet, hohen biologisch bedingten Nullwerten). Generell ist dabei auch zu bedenken, dass Seefisch deutlich mehr TMAO enthält als Süßwasserfisch. Insgesamt kann über den Gehalt an flüchtigen Aminen (TVB-N) im Fisch dessen Haltbarkeit indiziert werden, was eine wichtige Grundlage für die Tauglichkeit eines aminselektiven Sensors darstellt. Das Institut für Biomedizinische Optik der Universität zu Lübeck hat zusammen mit der Porphyrin-Laboratories GmbH eine Polymerfolie entwickelt, die in der Lage ist, Amine mit hoher Sensitivität und Selektivität in der Gasphase zu detektieren. Bei dieser Sensorfolie handelt es sich um ein an Kieselgel kovalent gebundenes Phophorporphyrin, welches in ein für Amine permeables Polymer suspendiert ist. Gemessene Absorptions- und Fluoreszenzspektren zeigen eine deutliche Änderung der Sensorfolie nach der Reaktion mit den Aminen. Bereits Spuren von Aminen führen zu einem Farbumschlag des in der Sensorfolie suspendierten Farbstoffes von grün nach rot. Dieser Farbumschlag kann sowohl mit bloßem Auge als auch messtechnisch wahrgenommen werden und kann sich z.B. für den Einsatz im Bereich intelligenter Lebensmittelverpackungen eignen. In einer intelligenten Lebensmittelverpackung kann durch die Sensorfolie die Haltbarkeit des Lebensmittels bzw. die Einhaltung der Kühlkette vom Anwender (Handel, Verbraucher) direkt abgelesen werden (grün = frisch, rot = nicht mehr frisch – erste Anzeichen von Verderb). Dieser Ansatz besticht durch den einfachen, mobilen Nachweis für Amine ohne eine aufwändige Laboranalytik und befindet sich zurzeit in der Patentierung durch die Universität zu Lübeck und die Porphyrin-Laboratories GmbH.

Die bedeutendsten Vorteile sind:

1. Es werden direkt die beim Verderb entstehenden Substanzen, Amine und biogene Amine, detektiert ohne den Umweg z.B. mittels einer pH-Messung

2. Die Detektion findet in der Gasphase statt. Die Sensorsubstanz muss also nicht zwangläufig mit dem Lebensmittel in Berührung kommen, was die Flexibilität bei der Wahl der Verpackungsarten vergrößert.
3. Die Detektion der Amine und biogenen Amine ist sehr sensitiv und selektiv. Das integrative Verhalten des Sensors ermöglicht es sogar, Spuren der schwerflüchtigen biogenen Amine zu erfassen (z.B. Cadaverin und Putrescin).
4. Der Sensor reagiert mit dem Amin in einer irreversiblen Reaktion, sodass ein „Zurückfärben“ nicht möglich ist. Dadurch sind etwaige Manipulationen seitens des Anwenders erschwert.
5. Im Vergleich zu anderen Farbstoffindikatoren sind die verwendeten Porphyrine nicht toxisch oder kanzerogen. Die Änderungen in Absorption und Fluoreszenz des Sensors sind weitaus ausgeprägter als bei bisher erforschten Farbstoffindikatoren. Vor allem bei der Fluoreszenz kommt es zur Ausbildung neuer Fluoreszenzmaxima. Der mit dem Auge erkennbare Farbumschlag der Absorption erfolgt „verbraucherfreundlich“ von grün nach rot.

Wenngleich die Tauglichkeit des Ansatzes grundsätzlich nachgewiesen wurde, bleiben folgende Herausforderungen:

1. Die Kalibrierung für die jeweilige Fischsorte
2. Die Interpretation der ermittelten Aminbelastung – im Kontext des Maschinellen-Lernens
3. Der Aufbau einer Demonstrator-Sensorhardware, zur nicht-invasiven Bestimmung der Aminbelastung

KI-Machine-Learning

Insbesondere durch die Verfügbarkeit leistungsfähiger Hardware sind in den letzten Jahren enorme Fortschritte im Bereich des Machine-Learnings (ML) erzielt worden. Frei verfügbare Machine-Learning-Frameworks wie Google TensorFlow oder Facebook Torch erlauben das Training von entsprechenden Netzen, die grundsätzlich zur Klassifikation angewendet werden können.

Im Rahmen des Projektes KI-BioSense werden ML-Techniken für zwei unterschiedliche Ziele verwendet werden. Zum einen geht es darum, für die über den Aminsensor gemessenen Spektren (vgl. Abbildung 2) den Frischezustand zu ermitteln, wozu zunächst eine Frischeklassifikation definiert werden muss. Darüber hinaus werden die analytisch gewonnenen Werte für Amine, Spektren und Frische als Basis für die ML-Ansätze verwendet, um eine Korrelation zwischen gemessenem Fluoreszenz-Spektrum und Frische trainieren zu können.

Zur Prognose der Frische über einen zukünftigen Zeithorizont werden ebenfalls ML-Ansätze verwendet, da auch dieses Problem grundsätzlich als Klassifikationsproblem verstanden werden kann. Da hierbei davon auszugehen ist, dass die Lagerhistorie sowie weitere Faktoren einen erheblichen Einfluss auf die Vorhersagegüte haben werden, sind insbesondere die Kombination von Eingangsgrößen und die Verwendung von multimodalen Lernverfahren vielversprechend (vgl. Abbildung 1).

Insgesamt besteht die Herausforderung der Anwendung von ML-Techniken in diesem Projekt primär in der Auswahl der geeigneten Ausprägung des Verfahrens (CNN, RNN etc.) mit zugehöriger Parameterentwicklung, sodass zuverlässige Prognosen basierend auf verschiedenen Sensoren möglich sind. Eine weitere Herausforderung dürfte die effiziente Umsetzung der gelernten Netze zur Klassifikation in der Praxis sein, gegebenenfalls zum Beispiel mit Spezialhardware wie FPGAs oder EdgeTPUs, welches aber nicht vordergründig in diesem Projekt untersucht wird.

Distributed Ledger

Eine durchgängige und fälschungssichere Protokollierung des Qualitätszustands entlang der gesamten Lieferkette von Lebensmitteln ist eine große Herausforderung. Die Lieferkette führt typischerweise durch verschiedene Länder, und verschiedene Akteure (Landwirte, Transporteure, Großhandel, Einzelhandel etc.) sind hier beteiligt. Es gibt typischerweise keine zentrale Stelle (Aufsichtsbehörde), die für die fälschungssichere transparente, zentrale Speicherung von Daten verantwortlich sein könnte.

In der Informatik wurden in den letzten Jahren sogenannte Distributed-Ledger-Lösungen erarbeitet, die man vereinfacht als ohne unter zentraler Kontrolle arbeitende verteilte Datenbank ansehen kann, in der Daten nur hinzugefügt aber nicht gelöscht werden können. Grundsätzlich sind derartige Lösungen ideal für Protokollierungen über verschiedenste Jurisdiktionen. Auch führende elektronische Währungen wie Bitcoin verwenden entsprechende Technologien.

Eine zentrale Herausforderung bei der Implementierung derartiger Konzepte ist es, bei an verschiedenen Orten gleichzeitig stattfindenden Transaktionen Einigkeit (Consensus) zu erzielen. Am weitesten verbreitet hierfür ist der sogenannte Proof-Of-Work. Durch die Lösung kombinatorischer Fragestellungen mit entsprechender Rechenleistung wird hier Einigkeit erzielt. Nachteil ist hier allerdings der enorme Stromverbrauch, der z.B. im Jahr 2018 für Bitcoin-Transaktionen auf dem Niveau des Stromverbrauchs ganz Neuseelands lag. Es sollte offensichtlich sein, dass dieser immense Ressourcenverbrauch keine nachhaltige Lösung für die Implementierung derartiger Konzepte sein kann.

In den letzten Jahren sind eine Reihe alternativer Konsensusprotokolle entwickelt worden, wie zum Beispiel Proof-Of-Stake, Byzantine Fault Tolerance etc. Auch die klassische Implementierung als Blockchain ist nicht die einzige Lösung, sondern Implementierungen als gerichtete, azyklische Graphen (DAGs) erscheinen vielversprechend. Je nach Anwendung (Transaktionsvolumen, Datenvolumen, notwendige Transparenz/Geheimhaltung) sind unterschiedliche Lösungen sinnvoll und insbesondere ist die Entwicklung hier keinesfalls abgeschlossen.

Für die Protokollierung im jeweiligen Abschnitt der Lieferkette ist eine Interaktion mit dem Distributed-Ledger notwendig. Hierfür sind entsprechende Protokolle zu entwickeln. Je nach verwendeter Distributed-Ledger-Infrastruktur können entsprechende Routinen direkt als sogenannte Smart Contracts fälschungssicher und transparent mit in die Blockchain integriert werden, wie zum Beispiel bei Ethereum. Bei Verwendung des Open-Source-Frameworks Hyper-Ledger Fabric, als Beispiel, werden stattdessen die entsprechenden Routinen zum Ansprechen der Blockchain als eigene Applikationen entwickelt. Hier gilt es, zwischen Transparenz und Ausführungsort und Kosten abzuwägen.

Im Rahmen des Projektes wird es neben der Entwicklung entsprechender Schnittstellen und Kommunikationsprotokolle eine zentrale Aufgabe sein, ein geeignetes Distributed-Ledger-Framework auszuwählen und als Demonstrator eine komplette Protokollierung der Lieferkette zu realisieren. Hierbei ist insbesondere die Abschätzung der typischen Kosten für die Protokollierung ein wesentliches Entscheidungsmerkmal, um auch eine wirtschaftlich tragfähige Lösung zu erhalten.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Das Projekt wurde nur im Rahmen der Projektpartner durchgeführt.

2 Eingehende Darstellung

2.1 Darstellung der Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Für die Überprüfung des Aminsensors und die Bereitstellung von Verderbsdaten für das Machine Learning bedurfte es einer Referenzanalytik, welche den Verderbszustand der Fischproben objektiv abbilden kann. Diese Referenzanalytik musste im ersten Schritt definiert und bei GALAB etabliert werden (AP 1), um sie im zweiten Schritt auf die Projektproben anzuwenden (AP 2). Einerseits sollte dadurch die Funktion des Aminsensors überprüft werden und andererseits sollten dem Machine Learning-Algorithmus genauere Informationen zur Korrelation von Sensorresponse und Verderbszustand der korrespondierenden Probe zur Verfügung gestellt werden.

AP 1 (KI-BioSense AP 1.3): Etablierung der Referenzanalytik zur Bestimmung der Fischqualität

Zu Beginn des Projekts wurden die zwei Parameter *Total volatile basic nitrogen* (TVB-N) sowie einzelne biogene und volatile Amine als Indikatoren für die Frische der zu untersuchenden Fische ausgewählt.

Bei TVB-N handelt es sich um einen Summenparameter, der alle flüchtigen Stickstoffbasen (Ammoniak, Trimethylamin, Dimethylamin, uvm.) enthält. Dieser Summenparameter ist relevant für die Einschätzung des Verderbszustand von marinen Fischen, weil die in Fischen in großen Mengen vorkommende Verbindung Trimethylamin-*N*-oxid während der Lagerung aufgrund mikrobiellen und enzymatischen Verdaus zu Trimethylamin und Dimethylamin abgebaut wird (Abbildung 1). Außerdem entstehen aus Stickstoffhaltigen Verbindungen (z.B. Proteine, Aminosäuren) weitere flüchtige Basenstickstoffe wie z.B. Ammoniak, die von diesem Summenparameter erfasst werden. Für die quantitative Bestimmung des gesamten flüchtigen Basenstickstoffs existiert bereits eine amtliche Untersuchungsmethode nach § 64 LFGB. Diese Methode war zu Beginn des Projekts noch nicht bei GALAB etabliert und validiert. Folglich wurde diese Analyse eingeführt und erfolgreich validiert, so dass sie im Folgenden für die Analyse von Proben im Rahmen des Projekts KI-BioSense eingesetzt wurde (siehe AP 2).

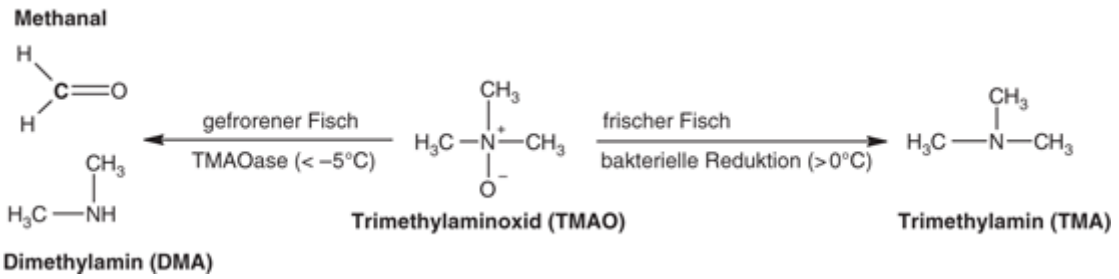

Abbildung 1: Abbau von Trimethylaminoxid zu Trimethylamin und Dimethylamin.

Für die gezielte Analyse von Verderbs-assoziierten Stickstoffbasen wurden zehn biogene Amine (Agmatin, Cadaverin, Ethanolamin, Histamin, Isopentylamin, Isopropanolamin, Phenylethylamin, Putrescin, Tryptamine und Tyramin), vier volatile Amine (Trimethylamin, Dimethylamin, Triethylamin, Diethylamin) und Trimethylamin-*N*-oxid als Markersubstanzen ausgewählt. Da nicht alle Analyten flüchtig sind und somit eine gaschromatographische Methode nicht umsetzbar war, wurde zunächst eine HPLC-Methode mittels *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC) entwickelt. Mit einer Poroshell 120 HILIC-Z (Agilent Technologies

Deutschland GmbH, Waldbronn, Deutschland) wurde innerhalb einer Laufzeit von 14 Minuten eine ausreichende Trennung erreicht. Mit Hilfe der anschließenden Detektion durch einen Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)-Detektor wurden außerdem alle Analyten selektiv detektiert (Abbildung 2). Im Anschluss wurde eine schnelle Extraktionsmethode auf Grundlage einer Flüssigextraktion mit 0.6 M Trichloressigsäure entwickelt. Dafür wurden die Proben mit Trichloressigsäure versetzt, mehrere Minuten lang kräftig geschüttelt, anschließend zentrifugiert und der Überstand wurde im Laufmittel der HPLC-Methode verdünnt. Die Quantifizierung erfolgt gegen eine externe Standardkalibrierung.

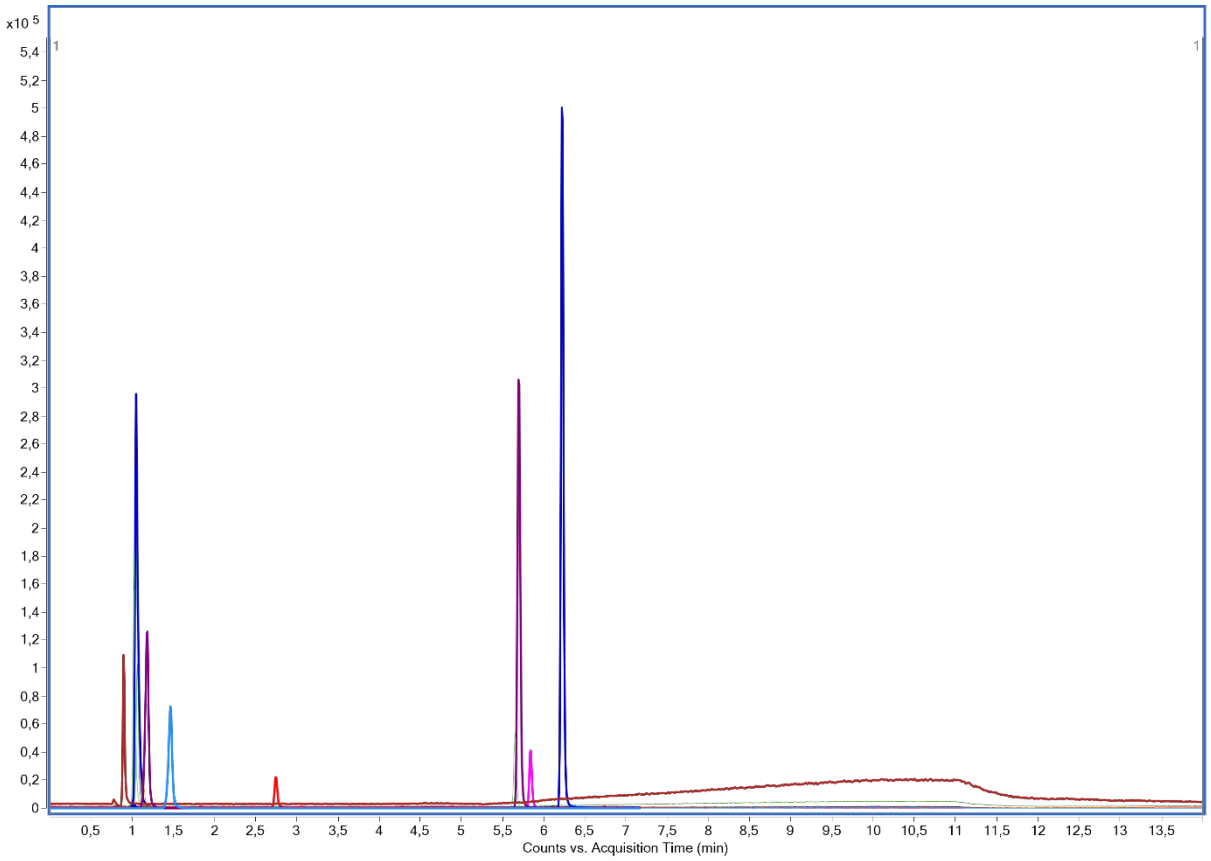

Abbildung 2: Chromatogramm einer Standardlösung der zehn biogenen Amine, vier volatilen Amine und Trimethylamin-N-oxid bei einer Konzentration von 100 ng/mL.

Im Anschluss wurde die erhaltene Methode validiert, um ihre Eignung für die Bestimmung der Verderbsindikatoren in Fisch zu überprüfen. Die Validierung wurde nach der Guideline der U.S. Food and Drug Administration für Bioanalytische Methoden durchgeführt und ergab für alle Analyten außer Dimethylamin zufriedenstellende Ergebnisse (Abbildung 3). Für Dimethylamin wurde aufgrund der niedrigen Wiederfindung beschlossen, dass die Werte im Anschluss an die Messung um die Wiederfindung korrigiert werden, sofern der Gehalt an Dimethylamin gemessen werden muss. Somit wurde eine HILIC-MS/MS-Methode für die Analyse der relevanten Verderbsindikatoren etabliert, die in der Lage ist, Referenzwerte für die Überprüfung des Biosensors und das Machine Learning zu liefern.

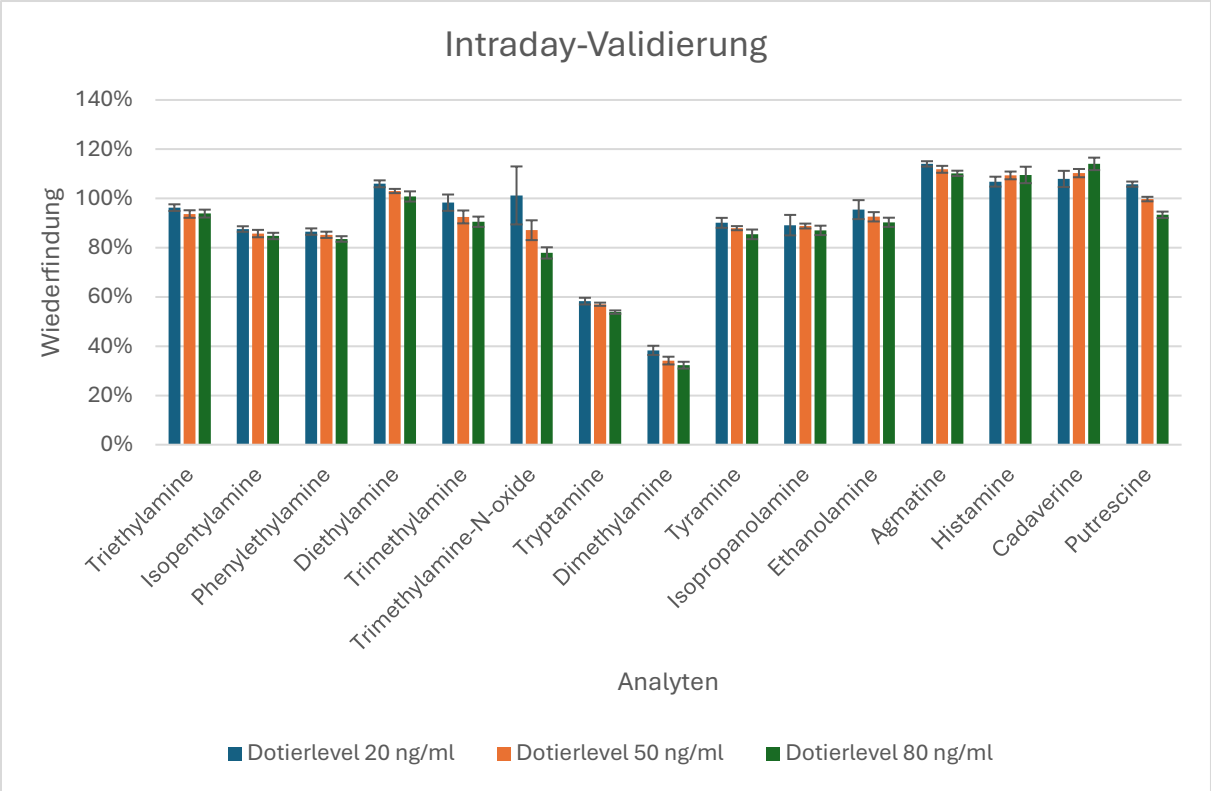

Abbildung 3: Ergebnisse der Intraday-Validierung der HILIC-MS/MS Methode für die Bestimmung von Verderbsindikatoren in Fisch. Abgebildet sind die Ergebnisse von Accuracy & Precision bei drei unterschiedlichen Dotierniveaus: 20 ng/mL, 50 ng/mL, 80 ng/mL.

(Meilenstein 1: Etablierung der Referenzanalytik zur Bestimmung der Fischqualität – erreicht)

AP 2: Erhebung der Messdaten am Modellsystem Fisch

Im Anschluss an die Etablierung der Referenzanalytik sollte diese eingesetzt werden, um die Gehalte der Verderbsindikatoren in den Projektproben auf eine Art und Weise zu ermitteln, die eine Korrelation mit der Sensorresponse erlaubt. Hierbei waren zwei maßgebliche Schwierigkeiten zu eliminieren. Einerseits führt die schnelle Verderblichkeit von Fisch dazu, dass bereits kurze Zeiträume der Lagerung zu erheblichen Unterschieden im Gehalt der Verderbsindikatoren führen können, so dass ein Versand der Proben zwischen GALAB und dem Institut für Biomedizinische Optik der Universität zu Lübeck (BMO) die Ergebnisse hätte stark verfälschen können. Andererseits unterscheiden sich die Gehalte mehrerer Fische teils stark und sogar die Gehalte in unterschiedlichen Teilstücken desselben Fischs weisen häufig hohe Unterschiede auf, so dass zu garantieren war, dass die Proben von dem gleichen Fisch und von möglichst gleichen Stellen stammen. Um derartige Verfälschungen zu vermeiden, wurde ein Probenahmesystem erarbeitet, dass vorsah, dass alle Proben an einem Ort gekauft wurden. Die Proben wurden im Anschluss in der Mitte geteilt und in jeweils eine Box für das BMO und GALAB verpackt. Daraufhin wurden die Proben auf Eis gelagert und vom Ort der Probenvorbereitung jeweils zu GALAB und zu BMO transportiert, wo sie bei einer festgelegten Temperatur für einen festgelegten Zeitraum gelagert und anschließend zeitgleich entnommen und beprobt wurden.

Auf diese Art und Weise wurden mehrere Fische (Kabeljau, Lachs, Thunfisch) auf den Summenparameter TVB-N und die Einzelparameter biogene und volatile Amine sowie TMAO beprobt. Die Ergebnisse sind beispielhaft in Abbildung 4 – Abbildung 6 festgehalten.

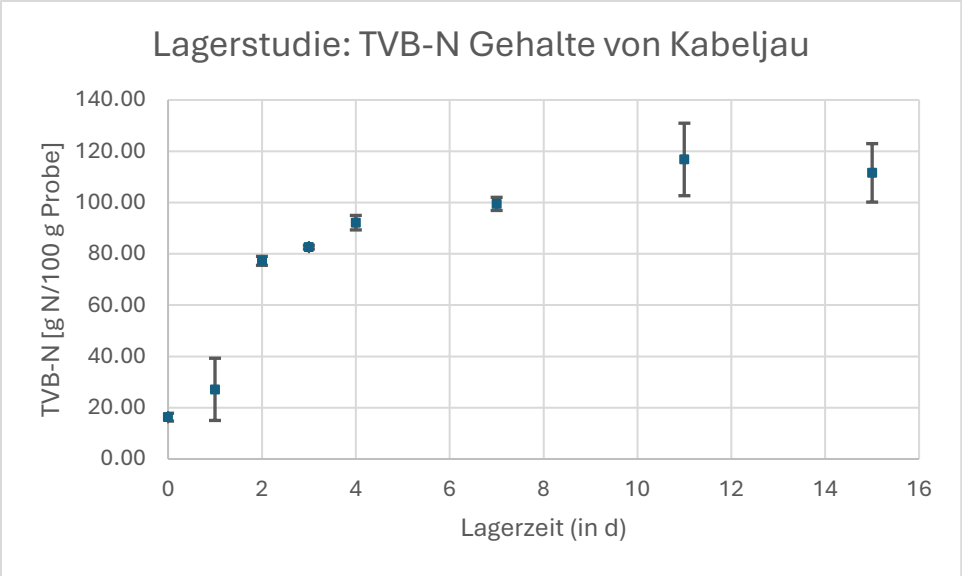

Abbildung 4: TVB-N Gehalte von Kabeljaufilets während einer Lagerzeit von bis zu 15 Tagen bei 4 - 8°C. Die eingetragenen Werte sind in Gramm Stickstoff pro 100 g Probe unter Berücksichtigung der Standardabweichung angegeben.

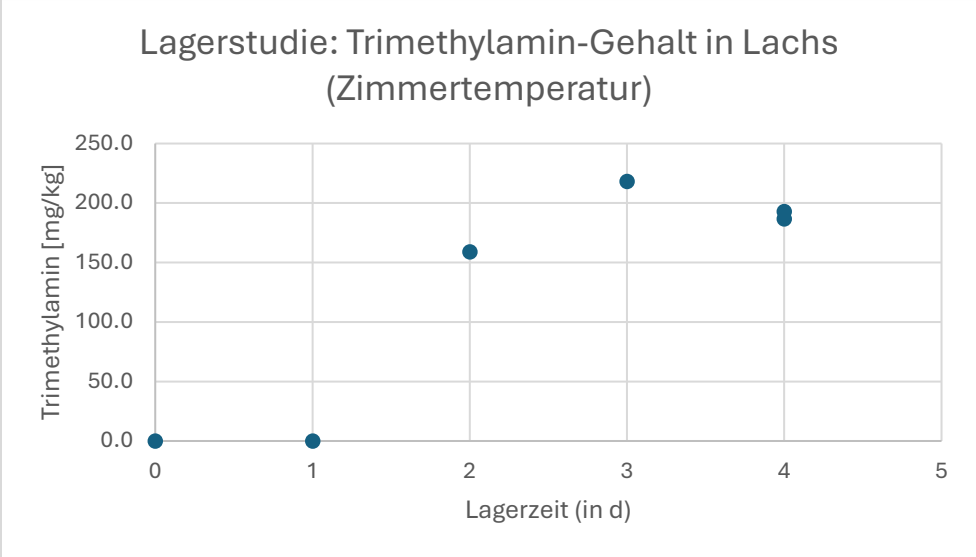

Abbildung 5: Trimethylamin Gehalte von Lachsfilets während einer Lagerzeit von bis zu 4 Tagen bei Zimmertemperatur.

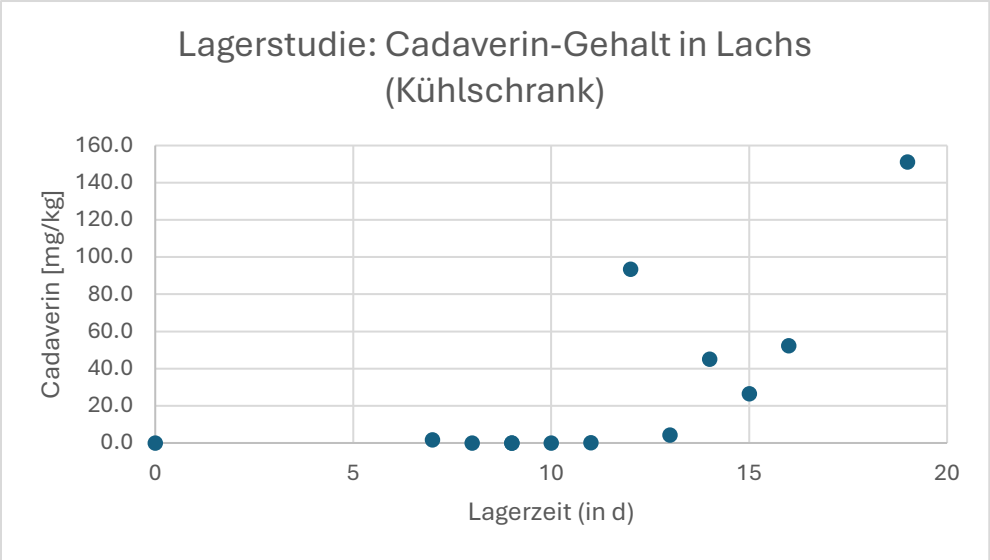

Abbildung 6: Cadaverin Gehalte von Lachsfilets während einer Lagerung von bis zu 19 Tagen bei- 4 - 8°C.

Mit Hilfe der in AP 1 entwickelten und etablierten Methoden wurden folglich die Gehalte unterschiedlicher Verderbsindikatoren ermittelt und dem BMO zur Korrelation mit der Sensorresponse, sowie dem Institut für Softwaretechnik und Programmiersprachen der Universität zu Lübeck für das Trainieren des Machine Learning-Algorithmus zur Verfügung gestellt.

(Meilenstein 2: Erhebung der Messdaten am Modellsystem Fisch – erreicht)

3 Kurzzusammenfassung

Die Vermeidung von Lebensmittelabfällen ist eine der Stellschrauben für eine nachhaltigere Lebensweise und eine effizientere Nutzung der landwirtschaftlichen Erzeugnisse. Allerdings sind die handelnden Personen entlang der Lebensmittelkette zur Beurteilung der Lebensmittelfrische auf ungenaue und leicht missverständliche Ressourcen, wie das Mindesthaltbarkeitsdatum oder die sensorische Einordnung von Lebensmittelverderb, angewiesen.

Ziel dieses Projekts war die Entwicklung eines Biosensors zur Anzeige der Aminkonzentration in der Gasphase. Dieser erlaubt Aufschlüsse über den Frischezustand von Fischen und eventuell anderen Lebensmitteln, die mit Hilfe von Machine Learning-Algorithmen ausgewertet, extrapoliert und mit kostengünstigen Geräten von den beteiligten Unternehmen, beziehungsweise visuell von den Endverbrauchern beurteilt werden können. Ein unerlässlicher Teil dieses Projekts war dabei die Durchführung einer Referenzanalytik, um die Sensorresponse objektiv einordnen zu können.

Es gelang die Entwicklung einer neuen HILIC-MS/MS-Analysemethode mit einfacher Probenaufarbeitung, die einen hohen Probendurchsatz erlaubt. Außerdem wurde diese Methode, sowie eine weitere Methode aus der Sammlung amtlicher Untersuchungsmethoden bei GALAB validiert und etabliert. Anschließend wurden Projektproben auf die vorher festgelegten chemischen Verderbsindikatoren untersucht und die Ergebnisse den Projektpartnern zur Verfügung gestellt.