

Metabolomics-basierte Herkunftsbestimmung von Spargel (*Asparagus officinalis*) mittels NMR und LC-MS/MS unter Anwendung bioinformatischer Auswertungsverfahren

| | |
|-----------------------------|---|
| Koordinierung: | Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI), Bonn |
| Forschungsstelle(n): | <p>Universität Hamburg Hamburg School of Food Science Institut für Lebensmittelchemie, AK Prof. Fischer Prof. Dr. Markus Fischer/Dipl.-LMChem. Marina Creydt</p> <p>Universität Hamburg Fachbereich Chemie Abteilung für NMR-Spektroskopie Dr. Thomas Hackl/Dipl.-LMChem. Juliane Klare/Anke Bollen</p> <p>Universität Tübingen Lehrstuhl für Angewandte Bioinformatik Prof. Dr. Oliver Kohlbacher</p> <p>Verband der deutschen Fruchtsaft-Industrie e.V. (VdF), Bonn Verband Süddeutscher Spargel- und Erdbeeranbauer e.V., Bruchsal Beratungsdienst Spargel und Erdbeeren e.V., Haßloch Arbeitskreis Spargel Schleswig-Holstein e.V.</p> <p>Projektkoordinator: Dr. Ludger Aldenhoff, Beratungsdienst Spargel und Erdbeeren e.V., Haßloch</p> |
| Laufzeit: | 2015 - 2018 |
| Zuwendungssumme: | € 578.980,-- (Förderung durch BMWi via AiF/FEI) |

Ausgangssituation:

Die geographische Herkunft von Lebensmitteln nimmt einen zunehmenden Stellenwert für die deutschen Konsumenten ein, die für die wertgebenden Eigenschaften von Lebensmitteln aus bestimmten Gebieten bereit sind, einen höheren Preis zu akzeptieren. Folglich können Herkunftskennzeichnungen unmittelbar absatzfördernd wirken und bieten daher einen besonderen Anreiz für potentielle Fälschungen.

Die Problematik der Herkunftsverfälschung ist in der Spargelbranche schon seit längerer Zeit bekannt und umfasst zum einen die Deklaration von ausländischer als deutscher Ware und zum anderen die vorsätzliche

gesetzeswidrige Verwendung geschützter geographischer Herkunftsangaben. Beide Aspekte suggerieren eine vermeintlich höhere Qualität und können mit den derzeit verwendeten Methoden nicht verlässlich nachgewiesen werden. Auf diese Weise werden neben den Verbrauchern massiv die redlichen deutschen Spargelproduzenten durch die resultierenden Umsatzeinbußen und den Verlust von Qualität und Ansehen geschädigt.

Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung und Anwendung einer einfachen und verlässlichen LC-MS/MS-Methode sowie der Aufbau einer standardisierten NMR-Spektren-Datenbank für den objektiven Nachweis der geographischen Herkunft von

Spargel. Die Methoden sollten von Handelslaboratorien und den Qualitätssicherungslaboratorien der Unternehmen mit vertretbaren Kosten sowie einem geringem apparativen und zeitlichen Aufwand in der Routineanalytik angewendet werden können. Zusätzlich sollten geeignete Strategien zur Datenauswertung, zum Aufbau einer zentralen Datenmanagementplattform und zur Verwaltung und Organisation dieser Daten entwickelt werden.

Forschungsergebnis:

Schätzungen zufolge umfasst das pflanzliche Metabolom (Summe an Stoffwechselprodukten) eines Organismus bis zu 25.000 strukturell unterschiedliche chemische Verbindungen. Erfasst werden können Teile des Metaboloms mit diversen analytischen Methoden, wie z.B. der Massenspektrometrie und der Kernresonanzspektroskopie. Diese beiden Analysentechnologien sind zueinander komplementär und unterscheiden sich im erfassbaren Analytspektrum (Art und Anzahl unterscheidbarer Strukturen). Durch die simultane Anwendung zweier spektroskopischer Technologien und damit der Vergrößerung des analytischen Fensters, wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, Unterschiede in sehr ähnlichen Probenpopulationen zu erkennen.

Zu Beginn des Projektes wurde zunächst ein verlässliches System für die Akquirierung authentischer Referenzproben aufgebaut. Basierend auf einem entsprechend ausgearbeiteten Probenerfassungsplan wurden insgesamt über vier Ernteperioden (2015-2018) ca. 300 authentische und dokumentierte Spargelproben unter definierten Bedingungen aus relevanten Anbauländern, d.h. Deutschland, Niederlande, Polen, Griechenland, Spanien und Peru, genommen. Mehrere Ernteperioden waren notwendig, um mögliche Jahresabhängigkeiten bzgl. der Zusammensetzung des Metaboloms erkennen zu können.

Anhand dieser Proben erfolgte zunächst die Entwicklung der nicht-gerichteten (non-targeted) massenspektrometrischen und kernresonanzspektroskopischen Methoden. Ziel war es hierbei, hochauflösende molekulare Fingerprinting-Methoden zu erarbeiten, mit

denen möglichst viele charakteristische Verbindungen gleichzeitig in einem Analyselauf detektiert werden können. Je mehr Moleküle dadurch erfasst werden, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, standort-spezifische Markersubstanzen zu identifizieren. Diese Schritte umfassten insbesondere die Aufarbeitung und Homogenisierung der Proben mittels Messermühle und Gefriertrocknung, die Extraktionsverfahren sowie bei den massenspektrometrischen Arbeiten die flüssigkeitschromatographische Trennung und die Optimierung der Ionisierungsbedingungen. Bislang lagen auf dem Gebiet der pflanzlichen non-targeted Metabolomanalyse diesbezüglich kaum Kenntnisse vor, die als Orientierung herangezogen werden konnten, so dass entsprechend umfangreiche Methodenentwicklungen und davon abgeleitete Bewertungen vorgenommen werden mussten. Derartige Handlungsstränge wurden sowohl für die Klasse der unpolaren als auch für die der polaren Fraktionen entwickelt. Beruhend auf diesen umfangreichen Arbeiten konnten insgesamt ca. 5.000 chemische Verbindungen in einer Spargelprobe erfasst werden.

Durch komplementäre multivariate Verfahren zur Datenreduktion und -visualisierung, wie der Hauptkomponentenanalyse, der Partial-Least-Square-Diskriminanzanalyse und der Klassifizierung mittels Random-Forest-Algorithmus bzw. Support-Vector-Machine gelang die Erstellung von Klassifizierungsmodellen zur Vorhersage des Herkunftslandes mit Genauigkeiten von über 90 % sowohl für die massenspektrometrischen als auch die kernresonanzspektroskopischen Analysen. Darüber hinaus wurde zur Identifikation potenzieller Markersubstanzen ermittelt, welche Metabolite bzw. Spektrenbereiche den größten Einfluss auf die Klassifikation, also auf die Zuordnung, haben. Die meisten dieser standortbeschreibenden chemischen Verbindungen wurden mit pflanzlichen Stressfaktoren, wie z.B. Temperatur-, Wasser- oder Nährstoffmangel, in Verbindung gebracht. Einige von ihnen stammten jedoch auch aus anthropogenen Quellen (Wasch- und Reinigungsmittel) und waren daher für einen authentischen Nachweis der Herkunft ungeeignet. Diese Verbindungen wurden von den weiteren Bewertungsverfahren ausgeschlossen. Bereits 16 der identifizierten Analyten reichten für eine Klassifizierung der

Spargelproben entsprechend ihrer Herkunftsländer aus. Durch die Identifizierung der Substanzen können diese z.B. auch auf einfachen Triple-Quadrupol-Massenspektrometern analysiert werden, die üblicherweise in Handelslaboren vorhanden sind, so dass der Transfer in die Wirtschaft gewährleistet wird.

Eine engmaschige Unterteilung innerhalb der deutschen Anbauggebiete war ebenfalls möglich, allerdings nicht über mehrere Erntejahre hinweg reproduzierbar. Für eine zuverlässige Zuordnung der regionalen Herkunft müssten daher weiterhin regelmäßig aktuelle Referenzproben gezogen und vermessen werden.

Um die Leistungsfähigkeit der neu entwickelten Methoden einschätzen zu können, wurde eine Teilmenge der Proben mittels Stabilisotopenanalyse, die derzeit für derartige Fragestellungen die Standardmethode darstellt, vermessen. Im direkten Vergleich erwies sich die Herkunftsbestimmung mittels den Metabolomics-basierten Verfahren als mindestens ebenbürtig und in Teilen sogar als besser als die Isotopenanalyse. Auch hier ist eine jährliche Probenahme erforderlich, um Varianzen der Ernteperioden berücksichtigen zu können.

Mittels bioinformatischer Methoden wurden die LC-MS- und NMR-Daten in ein gemeinsames Modell integriert und um ein Maß für die Konfidenz der Vorhersagen erweitert, welches die Vorhersage des Herkunftslandes mit 98,5 % - 100 % Genauigkeit ermöglicht. Die entwickelten Methoden sowie die als Grundlage verwendeten Programme und Bibliotheken sind frei und quelloffen verfügbar, so dass der Transfer an andere Forschungsinstitute bzw. eine Umsetzung in die Wirtschaft möglich ist.

Wirtschaftliche Bedeutung:

Spargel wird in Deutschland von rund 2.100 deutschen Betrieben angebaut. Die bewirtschaftete Fläche nahm innerhalb der letzten zehn Jahre konstant zu, so dass Spargel mittlerweile das in Deutschland am häufigsten kultivierte Freilandgemüse ist. Jährlich werden rund 130.000 Tonnen Spargel in Deutschland produziert. Mit dieser Menge zählt Deutschland weltweit zu den vier

größten Spargelerzeugerländern. Der durchschnittliche Preis für weißen Spargel betrug 2017, 6,70 €/kg. Bei qualitativ hochwertigen Erzeugnissen können die Bauern, abhängig von Witterung und Zeitpunkt, Preise von bis zu 18 €/kg erzielen. Im Ausland kann der Spargel in der Regel günstiger produziert werden (2-5 €/kg), so dass allein durch die Änderung der Deklaration des Herkunftslands zum Schaden der deutschen Erzeuger nicht zu rechtfertigende Gewinne erzielt werden können. Durch die Entwicklung schneller und kostengünstiger Nachweisverfahren zur Herkunftskontrolle kann eine umfassende Überprüfung realisiert werden. Auf diese Weise kann der deutsche Spargelmarkt vor Verfälschungen geschützt und insbesondere die kleineren Unternehmen dieser Branche in ihrer Wirtschaftskraft unterstützt werden.

Die entwickelten Methoden zielen auf eine Anwendung in Qualitätssicherungslaboratorien der Produzenten und in Handelslaboren ab. Das Projekt wurde darauf abgestimmt, dass die Umsetzung mit der typischen Laborausstattung erfolgen kann bzw. nur geringfügige Zusatzinvestitionen getätigt werden müssen. Alternativ besteht für die Unternehmen die Möglichkeit, die Analysen an Auftragslaboratorien zu vergeben.

Der beschriebene Ansatz und die entwickelten Methoden können grundsätzlich auch auf weitere Lebensmittel und Fragestellungen übertragen werden. Entsprechende Maßnahmen zur Qualitätssicherung sind sowohl für Lebensmittelproduzenten als auch für Handelsketten von Relevanz.

Publikationen (Auswahl):

1. FEI-Schlussbericht 2018.
2. Creydt, M. & Fischer, M.: Die Food-Profiling Toolbox. Zukunftsweisende Ansätze zur Sicherung der Authentizität und Qualität von Lebensmitteln. Food Lab. 2, 42-46 (2019).
3. Creydt, M. & Fischer, M.: Plant Metabolomics - Maximierung des Elektrosprayionisationsprozesses für LC-MS non-targeted Analysen. Chrom. Food 4, 24-26 (2018).
4. Creydt, M. & Fischer, M.: Quo Vadis – Omics-Technologien in der Lebensmittelanalytik, Strategien zur Sicherung der

- Lebensmittelauthentizität. GIT (89), 14-18 (2018).
5. Creydt, M., Arndt, M., Hudzik, D. & Fischer, M.: Plant Metabolomics: Evaluation of Different Extraction Parameters for Non-targeted UPLC-ESI-QTOF-Mass Spectrometry at the Example of White *Asparagus officinalis*. J. Agric. Food Chem. 66 (48), 12876-12887 (2018).
 6. Creydt, M., Hudzik, D., Rurik, M., Kohlbacher, O. & Fischer, M.: Food Authentication: Small Molecule Profiling as a Tool for the Geographic Discrimination of German White Asparagus. J. Agric. Food Chem. 66 (50), 13328-13339 (2018).
 7. Creydt, M. & Fischer, M.: Quo Vadis – Omics-Technologien in der Lebensmittelanalytik - Strategien zur Sicherung der Lebensmittelauthentizität. LVT 12, 36-38 (2018).
 8. Creydt, M. & Fischer, M.: Herkunft von Bleichspargel, Spargel- & Erdbeer-Profi. Rhein. Landwirtschaftsverlag 2, 10-11 (2017).
 9. Creydt, M. & Fischer, M.: Food Profiling oder welche Waffen existieren gegen Food? Lebensmittelkontr. 4, 9 (2017).
 10. Creydt, M. & Fischer, M.: Lebensmitteluntersuchungen von Morgen. Rundsch. Fleischhyg. Lebensmittelüberw. 9, 306-308 (2018).
 11. Creydt, M. & Fischer, M.: Plant Metabolomics – Maximierung des Elektrosprayionisationsprozesses für LC-MS non-targeted Analysen. Chrom. Food 4, 24-26 (2018).
 12. Creydt, M. & Fischer, M.: Plant Metabolomics: Maximizing Metabolome Coverage by Optimizing Mobile Phase Additives for Non-Targeted Mass Spectrometry in Positive and Negative Electrospray Ionization Mode. Anal. Chem. 89 (19), 10474-10486 (2017).

Weiteres Informationsmaterial:

Universität Hamburg
Hamburg School of Food Science
Institut für Lebensmittelchemie,
AK Prof. Fischer
Grindelallee 117, 20146 Hamburg
Tel.: +49 40 42838-4379
Fax: +49 40 42838-4342
E-Mail: markus.fischer@chemie.uni-hamburg.de

Universität Hamburg
Fachbereich Chemie
Abteilung für NMR-Spektroskopie
Martin-Luther-King-Platz 6, 20146 Hamburg
Tel.: +49 40 42838-2804
Fax: +49 40 42838-7929
E-Mail: hackl@chemie.uni-hamburg.de

Universität Tübingen
Lehrstuhl für Angewandte Bioinformatik
Sand 14, 72076 Tübingen
Tel.: +49 7071 29-70456
Fax: +49 7071 29-5152
E-Mail: oliver.kohlbacher@uni-tuebingen.de

Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)
Godesberger Allee 125, 53175 Bonn
Tel.: +49 228 3079699-0
Fax: +49 228 3079699-9
E-Mail: fei@fei-bonn.de

... ein Projekt der **Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)**

gefördert durch/via



Das o. g. IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI), Godesberger Allee 125, 53175 Bonn, wird/wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.