

SYSTÉMY RYCHLÉHO ROZHODOVÁNÍ PRO BEZPEČNOST POTRAVIN

*Ing. Jakub Florián Ph.D., Mgr. Martin Jakubec,
Mgr. Iveta Hynštová, MSc. Robert Kadlec
Výzkumný ústa mlékárenský s.r.o.*

Rapid Decision Systems for Food Safety

Abstrakt

V rámci projektu Ministerstva Vnitřní Systémy rychlého rozhodování pro bezpečnost potravin (VG20102015023) byl vyvinut prototyp přístroje pro automatický záznam impedančních a optických spekter syrového masa a mléka. Cílem projektu bylo vyvinout systém rychlého rozhodování schopného na základě naměřených spekter rozlišit bezpečné a závadné maso a mléko. Prototyp byl použit ke sběru spektrálních dat, která posloužila ke kalibraci predikčního modelu. Jako referenční data byl použit obsah biogenních aminů v maso paralelně stanovován v pravidelných intervalech. V mléku byly počítány počty somatických buněk. Vzorek masa, na kterém probíhalo měření, byl pro urychlení experimentu inokulován bakteriální směsí izolované z kazícího se masa. Robustnost predikčního modelu byla ověřena 10x křížovou validací. R^2 vyšlo 0,978; průměrná relativ. odchylka 5,1 %. Dále byly úspěšně vytvořeny predikční modely k určení kvalitativních znaků masa a mléka na základě spektrálních dat.

Klíčová slova: Bioimpedance, VIS/NIR, kažení masa, počítačové učení

Abstract

As part of the project for the Ministry of the Interior - Rapid Decision Systems for Food Safety (VG20102015023), prototype of the machine for the automated raw meat impedance and optical spectra measuring was developed. The goal of this project was to develop the rapid decision system capable to distinguish safe and spoiled meat and milk based on measured spectral data. Prototype was used for the spectral data collecting, we used for the prediction model calibration. We used the biogenic amines content assayed in regular basis as reference data for meat and number of somatic cells in milk. We accelerated the meat sample spoilage by its inoculating by the bacteria mixture isolated from another spoiled meat. The model validity was confirmed by the 10-fold cross validation with $R^2 = 0,978$ and the average relative deviation = 5,1 %. Spectral data based prediction models for quality features of meat and milk prediction were also developed.

Keywords: Bioimpedance, VIS/NIR, meat spoilage, machine learning

Úvod

Cílem tohoto článku je blíže představit projekt Ministerstva Vnitřní Systémy rychlého rozhodování pro bezpečnost potravin (VG20102015023). Náplní projektu bylo na základě aplikované výzkumné činnosti vyvinout technologie, laboratorní analýzy a predikční modely pro podporu rozhodování krizového managementu a dalších subjektů umožňující rychlé posouzení nezávadnosti skladovaných potravin v případě krizových situací. Hlavními výhodami mechanizace a automatizace je zpracování velkého množství vzorků definovanou rychlostí při eliminaci lidské chyby, zvýšení přesnosti výsledků, snadné programovatelnosti testů, bezpečné a čisté pracovní prostředí. K automatickému měření sledovaných veličin ve stárnoucím maso byl vyvinut prototyp přístroje umožňující automatický sběr dat a příslušný software. Cílem projektu je na základě získaných dat vytvořit predikční model popisující korelaci naměřená spektra - zdravotní závadnost masa. Jako referenční údaje byl použit obsah biogenních aminů v maso, které vznikají činností mikroorganismů. Dále byly v rámci projektu provedeny série měření impedance nebo FTIR syrového nebo UHT mléka a na jejich základě byly odvozeny další predikční modely.

Materiál a metody

Vzorek masa

Jako vzorek masa byl použit plátek syrového vepřového plecka (cca 200 g) zakoupený v obchodním řetězci. Z plátku masa byl odkrojen první vzorek k analýze obsahu biogenních aminů a zbytek masa byl inokulován bakteriální směsí tzv. meat spoilers (viz níže). Z inokulovaného masa je odebrán další vzorek ke stanovení obsahu biogenních aminů a je zahájeno vlastní sběr spektrálních dat.

Směsná kultura meat spoilers

K urychlení vlastního experimentu byl izolován bakterie v největší míře se podílející na kažení masa. Jako zdroj bakterií bylo použito maso ze spotřebního řetězce, které bylo bez předchozí inokulace ponecháno 2 dny volně na vzduchu při laboratorní teplotě, poté dáno do mikrotentového sáčku a bez utěsnění ponecháno týden v ledničce. Sterilní mikrobiální špachtlí byl setřen povrch masa a špachtle ponořena do kapalné půdy Tryptic Soy (TS) a následně kultivována 1 den při laboratorní teplotě. Poté bylo provedeno přepasážování do čistě půdy a další jednodenní kultivace. Ze směsné kultury byl odebrán vzorek k identifikaci mikrobů a zbytek byl pravidelným pasážováním udržován ve vitální formě pro pozdější experimenty.

Identifikace mikroorganismů ve směsné kultuře meat spoilers

Identifikace bakterií byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie. Ionizace vzorku byla provedena laserovým zábleskem s asistencí matice (metoda MALDI). Jako ma-

tice byla použita směs kyseliny skořicové a trifluoroctové rozpuštěné ve směsi voda-acetonitril (1:1). Pomocí křížového roztěru na pevnou půdu agar-TS byly od sebe odděleny jednotlivé bakterie a vybrané kolonie byly ručně přeneseny na MALDI terčík pomocí párátko a zakápnuty 1 ul MALDI maticí. Po zaschnutí matice byla měřena MS spektra a bakterie identifikovány pomocí software Bruker Daltonik MALDI Biotyper.

Inokulace vzorku masa

Postupným ředěním (1:10) bylo nakultivováno 800 ml bakteriální suspenze meat spoilers. Protože bakterie produkují při svém růstu biogenní aminy, byly bakterie dvojnásobným odstředěním (5000 RPM, 15 minut) převedeny do PBS pufru. Poté byl celý plátek masa na 10 minut ponořen do bakteriální suspenze za mírného míchání. Nakonec byl plátek masa osušen ubrousky.

Stanovení obsahu biogenních aminů ve vzorcích masa

Ke stanovení obsahu biogenních aminů byla použita vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) s kolonou typu reverzní fáze. Postup analýzy vycházel z článku D. Smělý (2003). 10 g rozemletého masa bylo 3x extrahováno 15 ml 5% kys. trichloroctové (TCA) pomocí homogenizéru (Dragonlab D-160, 3. rychlostní stupeň, 2 minuty, poté oddělení extraktu centrifugací - 3000 RPM, 10 minut). Spojené extrakty byly přefiltrovány přes 0,22 μm PTFE membránu a doplněny 5% TCA do 50 ml. Jako vnitřní standard byl použit 1,7-diaminoheptan, který byl v množství 0,5 mg přidán při prvním kole extrakce. Extrakt byl derivován smícháním 60 μl extraktu + 985 μl 0,4M boritanového pufru pH 9,5 + 5 μl 14% NaOH + 30 ul derivačního činidla (6 mg o-ftaldialdehydu + 111 μl methanolu + 4,4 μl 2-merkathanolu + 1 ml 4M boritanového pufru pH 9,5; skladovat ve tmě). Po 2 minutách je 90 μl směsi injektováno na kolonu. Vlastní HPLC separace byla provedena na sestavě HP 1050, koloně Eclipse XD8-C8 (5 μm) a předkoloně Intersil WP300 (C18, 5 μm). Jako mobilní fáze byl použit gradient roztoku A (60 % 0,1M octanového pufru pH 5,8 + 40 % acetonitrilu) a B (23 % 0,1M octanového pufru pH 5,8 + 77 % acetonitrilu): 0 min = 0 % B, 10 min. = 0 % B, 15 min = 54 % B, 20 min = 68 % B, 27 min = 100 % B, 30 min = STOP). Před každým nástřikem byla kolona ekvilibrována 100% A po dobu 10 minut. Detekce byla provedena fluorescenčním modulem HP 1046A při vlnových délkách 330 \rightarrow 440 nm. Množství biogenních aminů bylo kvantifikováno porovnáním odezvy standardů a přepočítány na mg na 1 kg masa.

Měření spektrálních dat

V průběhu kažení masa byla měřena impedanční a optická spektra. Sběr spektrálních dat byl prováděn automaticky pomocí prototypů vyvinutých v rámci projektu. Základním kamenem měřicího systému byl tříosý manipulátor zajišťující pohyb hlavy nesoucí měřicí prvky.

Měřicí systém byl schopen postupně měřit parametry více vzorků uložených do čtvercové mřížky. Velikost mřížky a tedy i počet vzorků bylo možné v rozsahu působnosti manipulátoru prakticky libovolně měnit podle potřeby měření. K polohování byly použity 3 krokové motory. K řízení manipulátoru byla použita kombinace 3 driverů krokových motorů typu M542 (Leadshine Technology) a USB kontrolér PERFORMAX 4CX (Arcus). Vzhledem k proměnné výšce vzorku bylo nutné detekovat kontakt měřících elektrod s masem. Proto byl navržen systém využívající kapacitní detektor založený na mikrokontrolerech rodiny PIC18 s periferií CHARGE TIME MEASUREMENT UNIT (CTMU), který zaznamená dotyk měřící elektrody měřeného povrchu a tím dokáže přesně a opakovatelně regulovat zapíchnutí elektrody. Impedanční spektra byla měřena pomocí spektrometru vyvinutém pro potřebu projektu. Impedanční spektroskop je založen na obvodě AD5933, který je přímo určen k impedanční spektroskopii. Obvod obsahuje nastavitelný harmonický generátor na principu přímé číslicové syntézy. Vytvořený harmonický signál projde měřenou impedancí a pomocí signálového procesoru, také obsaženého v AD5933, se vypočte reálná a imaginární složka impedance. Vzhledem k tomu, že měření ovlivňují vnitřní obvody a také přípojné vodiče, je nutné provést kalibraci. Kalibrace se provádí pomocí série známých rezistorů. Přístroj je řízen mikrokontrolérem PIC32MX460F512L který zajišťuje komunikaci s PC přes USB a také funguje jako dočasný zásobník naměřených dat. Přístroj je schopen provádět měření impedance od 10 Ω do 10 M Ω v rozsahu frekvencí 0,2 - 100 kHz. Měření impedance bylo realizováno dvojicí pozlacených vpičovských elektrod s hloubkou průniku 1 cm a vzdáleností elektrod 0,5 cm. Ovládání spektrometru a sběr dat bylo realizováno softwarem vlastní výroby. Optická data byla měřena v modu reflektance, tj. změna spektrálního složení světelného paprsku po odrazu od povrchu masa. Samotné měření bylo realizováno přenosným spektrometrem AvaSpec-ULS2048, jako světelný zdroj byl použit SL1 Stellar net Tungsten Halogen. Optická dráha byla realizována dvojicí svazků optických vláken namířených těsně nad povrch masa. Měření probíhalo v rozsahu 400-1100 nm, tj. rozsah viditelného světla s mírným přesahem do NIR. Jako referenční spektrum byla použita reflektance od povrchu optického zrcadla. Optický spektrometr byl ovládán softwarem výrobce. Ovládací software manipulátoru kromě ovládání posunu měřicí hlavy zastával funkci řídicí vrstvy pro ovládací programy obou spektrometrů - řízení i sběr spektrálních dat. Spektrální data byla měřena v 20ti minutových intervalech.

Statistické vyhodnocení dat

Data byla shromážděna a předpřipravena v tabulkovém procesoru Libre Office Calc a statistickém prostředí R. Predikční model byl vytvořen a validován pomocí rozšiřujícího balíčku Caret prostředí R. Každé změřené spektrum bylo standardizováno algoritmem NSV a vyhlazeno pomocí Savitzky-Golay filtru. Standardizované hodnoty

všech spekter byly použity jako prediktory pro Sparse Partial Least Squares model. Jako výslednice pro jednotlivé případy byly použity indexy biogenních aminů. Z výsledného modelu byla získána matice udávající důležitost proměnných. Z původní množiny dat byly odfiltrovány proměnné s důležitostí menší než 60 %. Po odstranění odlehlých případů byla data použita ke kalibraci finálního modelu (Sparse Partial Least Squares model, křížová validace).

Predikce kvalitativních znaků hovězího masa

U 11 vzorků hovězí panenky byly stanoveny následující parametry: obsah sušiny, tuku, bílkovin, celkového dusíku, pigmentu a popelky; dále remise světla střížná síla. U každého vzorku byly změřena impedanční spektra (1-100 kHz) a vytvořen predikční model pro každou z výše zmíněných vlastností masa.

Vytvoření predikčních modelů pro kvalitu mléka

Na vzorcích syrového či UHT mléka byly provedeny níže uvedené série spektrálních a referenčních měření na jejich základě byly sestaveny predikční modely:

- Stanovení průměrného FTIR spektra syrového mléka. Z obří databáze FTIR ($649-3991\text{ cm}^{-1}$) spekter bylo určeno "průměrné spektrum" syrového mléka. Má-li mléko spektrum výrazně odlišné, je podezření na nežádoucí manipulaci s mlékem (např. ředění).
- Predikce obsahu somatických buněk v mléce. U 38 vzorků mléka s 5 různými koncentracemi somatických buněk (zjištěno přímým počítáním pod mikroskopem) byla změřena impedanční spektra (1-100 kHz) a sestaven predikční model.
- Predikce doby skladování syrového nebo UHT mléka v různých podmínkách. Byla měřena impedanční spektra (1-100 kHz) v pravidelných časových intervalech u následujících 3 vzorků: UHT mléko při 5°C a v nesterilní nádobě (simulace skladování v porušeném obalu); syrové a UHT mléko při pokojové teplotě za sterilních podmínek.

Výsledky a diskuze

Identifikace mikroorganismů ve směsné kultuře meat spoilers

Z povrchu zkaženého masa byl proveden stěr a bakteriální vzorek byl kultivován v TS bujónu. Poté byl proveden křížový roztěr na TS-agar plotnu a jednotlivé kolonie přeneseny na kovovou destičku a zakápnuty maticí obsahující kyselinu skořicovou. Takto připravený vzorek byl analyzován pomocí MS-MALDI.

V tab. 1 jsou shrnuty kmeny identifikované MS MALDI analýzou. Nejčastější výskyt měli bakterie *Hafnia alvei*, poté *Lactococcus lactis* a *Serratia proteamaculans*. U posledních dvou jmenovaných není pro nízké Z-score jisté správné zařazení do druhu. Všechny tři uvedené bakteriální druhy se běžně vyskytují ve zkaženém mase. *Hafnia* a *Serratia* se navíc vykytují i v mase chráněném

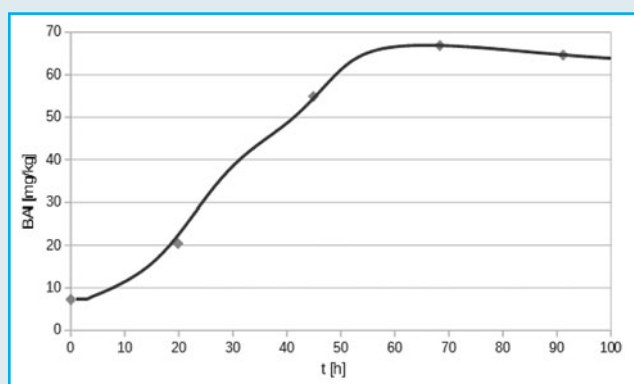
Tab. 1 Bakteriální kmeny identifikované MS MALDI analýzou

kmen	n nálezů	průměrné Z- score
<i>Hafnia alvei</i>	18	2,45
<i>Lactococcus lactis</i>	8	2,21
<i>Serratia proteamaculans</i>	8	2,14
<i>Serratia grimesii</i>	3	2,35
<i>Vagococcus fluvialis</i>	2	2,33
<i>Kluyvera intermedia</i>	1	2,04
<i>Pseudomonas fragi</i>	1	1,85
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	2,10

modifikovanou atmosférou nebo vakuovým balením (Casaburi 2015).

Obsah biogenních aminů ve vzorcích masa

Plátek vepřového plecka zakoupeného v běžném obchodě byl inokulováno výše zmíněnou bakteriální směsí. 1x denně byl z masa odříznut 15 g vzorek a metodou RP-HPLC stanoven obsah biogenních aminů. První vzorek byl odebrán bezprostředně po inokulaci. V průběhu experimentu bylo maso skladováno při laboratorní teplotě a průběžně byla skenována impedanční a optická spektra. Obsah biogenních aminů byl přepočítán na mg/kg masa. Stanovené hodnoty rostly až do třetího dne, pak se růst pozastavil. Wortenberg et.al. (1982) navrhli pro posuzování kvality masa index biogenních aminů (BAI), tj. součet obsahu putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu (v mg/kg). Hernandez-Jover et.al. (1996) použili stejný index a navrhli následné limity: do 5 mg/kg pro kvalitní maso; 5-20 mg/kg pro vyhovující maso, ale již vykazující počáteční znaky kažení; 20-50mg/kg pro nekvalitní maso; a nad 50 mg/kg pro zdravotně závadné maso.



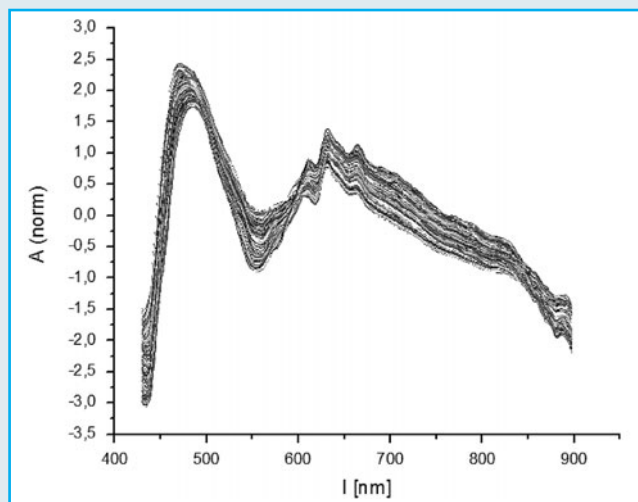
Obr. 1 Vývoj indexu biogenních aminů v čase

Růst indexu biogenních aminů v čase je na obr. 1. První den byl růst pomalý, druhý den se razantně zvýšil, další den růst zeslaboval, až poslední den se již index biogenních aminů neměnil. 24 hodin po inokulaci nebylo maso vhodné ke konzumaci, další den již bylo zdravotně závadné.

Spektrální data a jejich korelace k indexu biogenních aminů.

V průběhu experimentu byla kromě obsahu biogenních aminů stanovována impedanční a optická spektra.

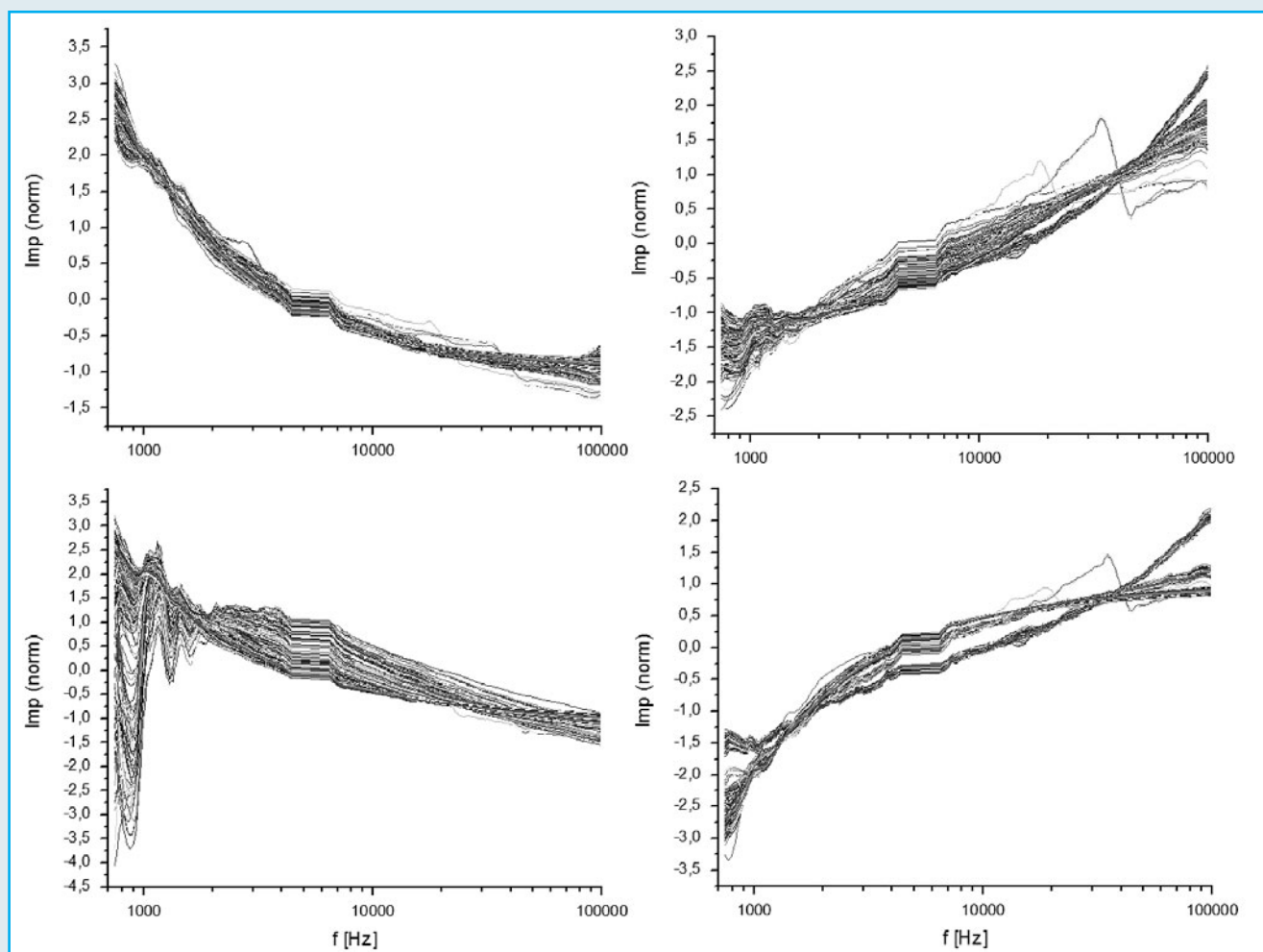
Naměřená spektra jsou na obr. 2A a 2B. Všechny proměnné a případy daného vzorku byly použity jako prediktory pro Sparse Partial Least Squares model. Jako výslednice pro jednotlivé případy byly použity indexy biogenních aminů (obr. 1). Z výsledného modelu byla získána matice udávající důležitost proměnných. Z původní množiny dat byly odfiltrovány proměnné s důležitostí menší než 60 %,



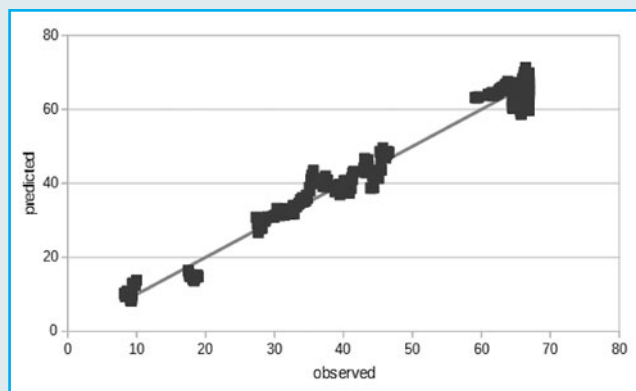
Obr. 2A Vyhlazené a normalizované reflektanční optické spektrum.

což vyřadilo přibližně polovinu proměnných. Došlo k úplné eliminaci hodnot úhlu fázového posunu a reálné složky impedance. Zbýlé proměnné byly znovu standardizovány a byly odstraněny odlehlé případy. Takto upravená množina dat byla použita ke kalibraci finálního modelu (Sparse Partial Least Squares model, křížová validace). Výsledek validace je shrnut na obr. 3. R^2 vyšlo 0,978, průměrná relativ. odchylka 5,1 %.

Měření impedance masa je založeno na ději zvaném bioimpedance. Odpor biologické tkáně závisí jak na jejím vnitřním uspořádání, tak na frekvenci procházejícího signálu. Při průchodu elektrického proudu tkání dochází k interakci s intracelulární kapalinou, extracelulární kapalinou a buněčnou membránou. Intra a extracelulární kapaliny mají charakter elektrolytu, zatímco elektrické vlastnosti buněčné membrány závisí na frekvenci elektrického proudu. Při nízkých frekvencích má membrána charakter izolantu, elektrický proud obtéká buňky a interaguje pouze s extracelulární kapalinou. Při vyšších frekvencích proniká elektrický proud skrz buňky a interaguje tak se všemi třemi zmíněnými komponentami. Zatímco intra a extracelulární kapaliny kladou procházejícímu proudu pouze ohmický odpor, u buněčné membrány s dielektrickými vlastnostmi se projevuje i kapacitní efekt. Elektrická impedance je



Obr. 2B Vyhlazená a normalizovaná spektra. Pořadí spekter je (zleva doprava): absolutní impedance, úhel fázového posunu, reálná a imaginární složka impedance.



Obr. 3 Naměřené a predikované hodnoty indexu biogenních aminů kazícího se masa.

komplexní veličina, kde její reálná část je tvořena čistě ohmickou interakcí a imaginární část kapacitním efektem měřeného obvodu. Spektrální analýza bioimpedance nám tedy může poskytnout obrázek o integritě membrány a stavu extra a intracelulárních kapalin (Damez 2007). Proto reálná složka impedance závisí na obsahu vody v masě, zatímco imaginární složka impedance závisí na integritě buněčných membrán a tím na kvalitě masa. To vysvětluje nízkou korelaci hodnot reálné složky impedance s indexem biogenních aminů.

NIR/VIS hyperspektrální analýza je široce využívaná neinvazivní metoda detekce kažení masa. Jedná se o kombinaci klasické spektroskopie a počítačového vidění. Výsledkem analýzy je sada spekter, která nesou informace o chemických vlastnostech snímaného povrchu. Použitím technik extrakce rysů a počítačového učení je možné vytvořit predikční modely schopné rozlišit čerstvé a závadné maso. Při optimalizaci predikčního modelu mělo 81,5 % dat důležitost proměnné nad 60 %. To dokazuje dobrou korelaci optických dat k indexu biogenních aminů.

Predikce kvalitativních znaků hovězího masa

U 11 vzorků hovězí panenky byly stanoveny následující parametry: obsah sušiny, tuku, bílkovin, celkového dusíku, pigmentu a popele; dále remise světla střížná síla. U každého vzorku byly změřena impedanční spektra (1-100 kHz) a vytvořen predikční model pro každou z výše zmíněných vlastností masa.

Parametr	R ²	RMSE
Sušina	0,614	1,216
Tuk	0,653	1,182
Bílkoviny	0,661	0,313
Celk. dusík	0,636	0,053
Pigment	0,739	0,364
Popel	0,445	0,031
Vaznost vody	0,856	1,898
pH	0,508	0,201
Světelná remise	0,694	0,844
Střížná síla	0,579	2,41

V tabulce jsou uvedeny koeficienty R² a RMSE coby ukazatele robustnosti predikčního modelu. Nejlepší korelaci měl model predikující vaznost vody.

Vytvoření predikčních modelů pro kvalitu mléka

Na vzorcích syrového či UHT mléka byly provedeny níže uvedené série spektrálních a referenčních měření na jejich základě byly sestaveny predikční modely:

- Stanovení průměrného FTIR spektra syrového mléka.
- Predikce obsahu somatických buněk v mléce.

Při použití úhlu fázového posunu coby prediktoru vycházeli hodnoty validace modelu R² = 0,893 a RMSE = 70,32.

- Predikce doby skladování syrového nebo UHT mléka v různých podmínkách. Byla měřena impedanční spektra (1-100 kHz) v pravidelných časových intervalech u následujících 3 vzorků: UHT mléko při 5 °C a v nesterilní nádobě (simulace skladování v porušeném obalu); syrové a UHT mléko při pokojové teplotě za sterilních podmínek. Hodnoty validací modelů jsou shrnuty v tabulce:

	UHT nesteril.	UHT 22°C	syrové 22°C
R ²	0,886	0,966	0,867
RMSE	19,56	1,65	3,27

Závěr

V rámci projektu bylo syrové vepřové maso inokulováno bakteriální směsí, ve které dominoval kmen *Hafnia alvei* a ponecháno při laboratorní teplotě. V průběhu takto urychleného kažení masa byl monitorován obsah biogenních aminů coby referenční ukazatel (ne)čerstvosti masa a měřena impedanční a optická spektra coby snadno měřitelné prediktory. Za použití statických metod byla prokázána korelace spektrálních dat a obsahu biogenních aminů a dále byl vytvořen predikční model. Robustnost predikčního modelu byla ověřena 10x křížovou validací. R² vyšlo 0,978, průměrná relativ. odchylka 5,1 %. Byly úspěšně vytvořeny predikční modely k určení kvalitativních znaků vepřového masa na základě spektrálních dat. Dále byly vyvinuty a ověřeny predikční modely schopné určit ze spektrálních dat kvalitativní znaky hovězího masa (vaznost vody, sušina, bílkoviny,...) a mléka (predikce doby nestandardního skladování, nežádoucí manipulace a obsahu somatických buněk). R² predikčních modelů kvality hovězího masa vycházelo 0,61-0,86; u predikčních modelů mléka vycházelo 0,87-0,97.

Tento projekt vznikl za podpory Ministerstva vnitra, Program bezpečnostního výzkumu České republiky v letech 2010-2015 (BV II/2-VS).

Použitá literatura k dispozici u autorů.

*Přijato do tisku:
Lektorováno:*