



Slutrapport

Krav til fødevarekvalitet – kemisk og fysisk dokumentation

Daniel Halling Breiner

21. januar 2025

Proj.nr. 2011306

Version

Init. DBRE/MT/LME

Formål med rapporten

Formålet med nærværende rapport er at afrapportere aktiviteter og resultater udført i SAF-projektet "Krav til fødevarekvalitet – kemisk/fysisk dokumentation" i 2024.

Projektets formål

- Sikre den danske kødindustri adgang til nyeste viden indenfor kemiske og fysiske analysemetoder.
- Udvikle, optimere og validere udvalgte state-of-the-art-analysemetoder med relevans for den danske kødindustri inkl. vedligehold af akkrediterede metoder.
- Minimere kemikalie- og/eller tidsforbrug for kemiske og fysiske analyser fx gennem optimering af prøvemængde.

Projektets hovedaktiviteter

- At hjemtage viden vedr. kemiske og fysiske analysemetoder af relevans for kødindustrien og formidle denne viden til industrien.
- Undersøge mulighederne for at optimere udvalgte metoder, således at niveauet af data/viden til brug ved dokumentation i såvel forsknings- som produktionsøjemed øges.
- At optimere og validere udvalgte analysemetoder med relevans for den danske kødindustri inkl. vedligehold af akkrediterede metoder.

Projektets baggrund

Kravene til dokumentation af fødevarekvalitet fra markeder og myndigheder skærpes. For at være på forkant med udviklingen er det nødvendigt at have indsigt i den nyeste viden på området, foruden at opretholde en praktisk tilgang til mere komplicerede analysemetoder baseret på nyere teknologier. Der gennemføres dagligt kemiske og fysiske analyser såvel på virksomhederne som i DMRI's laboratorium.

En af de mest interessante problemstillinger og en af de primære begrænsninger for validiteten af et kemisk eller fysisk analyseresultat er, hvorvidt analysen er udført på en repræsentativ prøve. Kød og kødprodukter er naturligt yderst inhomogene, og traditionelt håndteres dette problem ved at udtage en forholdsvis stor mængde prøvemateriale, som derefter homogeniseres. Efterfølgende analyseres en mindre delmængde af det homogeniserede prøvemateriale. Dette er et fuldt accepteret og anvendt koncept, men en ofte overset konsekvens er, at den analyserede (homogeniserede) prøve fundamentalt afskille sig fra det faktiske produkt, og at potentiel værdifuld information om den naturlige variation af de relevante parametre hermed går tabt.

Resultater og observationer fra metodeoptimering og kvalitetsmålinger

Optimering af kollagen-analyse

Kemikaliereduktion

Med afsæt i ønsket om at reducere forbruget af kemikalier i laboratoriet blev analysen til kvantificering af kollagen i kød og kødprodukter fundet oplagt som case. Kollagen er et protein, der bl.a. findes i svær, sener, brusk og bindevæv i grise. Kollagen er dermed til stede i forskellige udskæringer og kødprodukter, hvorfor det er relevant, at det kemiske laboratorium på DMRI har en robust analysemetode til kollagen. Kollagen er hovedsageligt sammensat af tre forskellige aminosyrer: prolin, hydroxyprolin og glycin. Hydroxyprolin er kendetegnende for kollagen, og analyser, der har til formål at bestemme kollagenindhold, beror ofte på kvantificering af hydroxyprolin.

Den nu forhenværende analyse af kollagen blev udført på apparatet "QuikChem 8000 FIA+", der netop er kendetegnet ved at bruge en del kemikalier til at skylle og rense systemet med og til at føre prøven igennem apparatet. Dertil er QuikChem ikke egnet til håndtering af få prøver ad gangen, og derfor ikke så fleksibel.

I forhold til at opnå et let skifte til andet instrument/metode var der ligeledes et ønske at bibeholde så meget som muligt af den anvendte prøveforberedelse inkl. de anvendte kemiske reaktioner, så der ikke skulle udvikles og valideres en ny metode. Det naturlige valg var en metode baseret på måling med spektrofotometer, idet det grundlæggende måleprincip er identisk med QuikChem, hvilket giver muligheden for at bibeholde den oprindelige prøveforberedelse næsten uændret. Dertil kan ønsket om håndtering af færre prøver og et reduceret kemikalieforbrug indfries.

Der blev opnået en markant reduktion i kemikalieforbruget alene ved at skifte fra QuikChem til spektrofotometer. Dertil blev voluminet af reagenser og buffere, der fremstilles til analysen, også reduceret, så mængden passer bedre til antallet af prøver. Den samlede kemikaliereduktion ses i tabel 1.

Tabel 1. Kemikalieforbrug pr. "analysegang" ved hhv. QuikChem og spektrofotometer

Reagens	QuikChem mL/analyse	Spektrofotometer mL/analyse
Citronsyre/acetatbuffer	1000	100
Iltningsreagens	300	50
Farvereagens	283	47
Carriervæske	5000	-
1 N HCl-opløsning	500	-
5% Deconex-opløsning	500	-
50% Ethanol	Variabelt	-

Der blev indkørt en kontrolstandard på spektrofotometeret, som indeholdt 1,57 g/100g kollagen, med en variationskoefficient på 3,3%. Dette er flot, idet usikkerhedsbudgettet på QuikChem til sammenligning er cirka 10%. Målingerne for kontrolstandarden på spektrofotometer ligger desuden indenfor godkendelsesgrænserne for analyse på QuikChem.

Læs mere om metodeoptimering i rapporten, der kan tilgås på [denne hjemmeside](#).

Optimering af analyse for totalprotein (Kjeldahl) Indholdet af protein i en given fødevarer analyseres ofte med Kjeldahlmetoden, der er baseret på nedbrydning af prøven ved kogning i koncentreret svovlsyre ved 420°C i 90 minutter, hvorved nitrogen i proteinerne omdannes til ammonium, der går videre i analysen.

Kogningen skal foregå med et overskud af svovlsyre, men det har vist sig muligt at reducere fra de gængse 20 mL til 12 mL ved behandling af laboratoriets kontrolstandard (kogt kød på dåse som fx Jaka Bov) uden at påvirke analyseresultatet. Den reducerede mængde svovlsyre medfører endvidere reducerede mængder af reagenser i den videre analyse.

Proteinanalyse med Dumas-metoden – test af forskellige råvarer og produkter Rapid Exceed-instrument til hurtige kvantitative analyser (ved Dumas-metoden) af proteinindholdet i fx kød, kødprodukter og animalske sidestrømme er indkørt i det kemiske laboratorium og efterfølgende valideret.

Norma & Frode Jacobsens Fond takkes for donation til indkøb af Rapid Exceed-instrumentet.

I Dumas-metoden indgår der ikke kemikalier; derimod destrueres prøven under forbrænding ved 800-900°C ved tilstedeværelse af ren ilt. De dannede gasser bliver ledt igennem forskellige filtre, hvorved vand og kuldioxid bliver bundet til filtrene, og nitrogenoxid bliver omdannet til nitrogen, N₂, der så bliver ledt til detektoren. Mængden af N₂ omregnes til proteinkoncentration.

Blandt de testede animalske råvarer/produkter er bl.a. forædlede kødprodukter (gris):

- Wienerpølse
- Hybridpølse (med 12-28% vegetabiliske råvarer og 42-58% grisekød)
- Laboratoriets kontrolstandard (baseret på kogt kødprodukt på dåse som fx Luncheon meat eller Jaka Bov)

Sidestrømme (gris):

- Plucks: lunge, lever, nyre,
- Afdryppet væske opsamlet fra optøning af frossen lever
- Testikelvæv
- Helblod

Analysen fungerede fint på alle råvarer/produkter, så længe disse var godt homogeniseret inden analysen. Læs mere i notatet: Måling af proteinind-

holdet i forskellige prøvematricer på Rapid Exceed (tilgås på [denne hjemmeside](#)).

Validering af Dumas-metoden

Validering af proteinanalyse med Dumas-metoden på Rapid Exceed blev foretaget på udvalgt kontrolstandard, der blev analyseret i alt 106 gange over en periode på 7 måneder. Der blev efterfølgende sammenlignet med resultater fra 45 tidligere gennemførte analyser af samme kontrolstandard på Kjelttec 8420 (Kjeldahlmetoden).

Valideringsresultaterne kort:

- Den gennemsnitlige genfinding for Rapid Exceed blev udregnet til 101%. Den acceptable grænse for genfinding er 95-105%.
- Analysen vurderes robust, idet der ikke blev påvist bias ved variation af prøvemængde.
- Analysens usikkerhed er bestemt til:
 - Dobbelbestemmelse $\pm 3,3\%$ (relativt)
 - Enkelbestemmelse $\pm 3,4\%$ (relativt)
- Selektivitet: Vær OBS på, at Dumasmetoden giver falsk positivt signal fra nitrit og nitrat, hvilket Kjeldahlmetoden ikke gør.

Vurdering af metodens selektivitet: Prøvematerialets sammensætning skal kendes, inden der omregnes fra nitrogenkoncentration til proteinkoncentration, især ved tilstedeværelsen af uorganiske nitrogenforbindelser i prøven, som vil påvirke resultatet.

Vurdering af analysens robusthed. Der blev varieret på prøvemængde over forskellige dage. Der blev ikke umiddelbart observeret bias ved variation af prøvemængde.

Baseret på de gennemførte analyser og opnåede resultater er valideringen af proteinanalysen på Rapid Exceed godkendt.

Da der ud over homogenisering ikke foretages yderligere prøveforberedelse forud for analyse på Rapid Exceed, blev der ikke udført analyser med tilsatte komponenter (spiking) i forbindelse med validering af metoden.

Læs mere i valideringsrapport: Proteinanalyse med Dumas-metoden (tilgås på [denne hjemmeside](#)).

FoodScan Meat Analyser

FoodScan 2 Meat Analyser

Af særlig interesse for kødindustrien har Foss med seneste version af måleapparatet, "FoodScan 2 Meat Analyser", udvidet de analyseparametre, der kan måles, så disse nu omfatter fedt, vand, protein, kollagen, salt, aske, mættet fedt, farve (L, a, b), natrium og vandaktivitet. I tillæg kan udstyret beregne indholdet af kulhydrat og energi. Det tager samlet under ½ minut at foretage målingen for alle parametrene. Læs mere [her](#).

Med økonomisk støtte fra Norma & Frode Jacobsens Fond indkøbte det kemiske laboratorium på DMRI en FoodScan 2 Meat Analyser med henblik på at kunne screene råvarer/produkter i diverse brancheprojekter.

Indledningsvist blev kødprodukter analyseret på FoodScan 2 Meat Analyser samt med klassiske kemiske analyser og med videometerfarvemålinger (indkøring er udført i samarbejde med projektet Hypersort, der er finansieret af Innovationsfonden). Den endelige dataanalyse pågår, men foreløbige resultater viser, at FoodScan 2 Meat Analyser til fulde fungerer efter hensigten til screening af indholdsstoffer og derfor muliggør markant kortere analysetider.

Aminosyreanalyse

Analysemæssigt kan aminosyrer give problemer. Dels er aminosyrer relativt set små molekyler, dels reagerer mange af aminosyrerne kemisk ret ens. Det kan give udfordringer, når man gerne vil lave en analyse, som kan måle koncentrationen på mange aminosyrer i én og samme kørsel.

En løsning er at derivatisere aminosyrerne – altså kemisk påsætte et større molekyle – og dernæst analysere prøven på en LC-MS/MS.

Vi har undersøgt muligheden for at derivatisere med 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamat (AQC). Fordelen herved er, at dels reagerer AQC med både primære og sekundære aminogrupper i aminosyrerne, og dels er de derivatiserede molekyler stabile, så der kan analyseres i større batches.

En anden fordel er, at Leucin og Isoleucin ved passende valg af kolonne og eluenter kan separeres under optimale forhold. Det er to aminosyrer, som ellers normalt kan være vanskelige at separere på en LC-MS/MS, fordi deres molarmasse er identisk.

Det lykkedes at derivatisere og positivt identificere samtlige hjemkøbte aminosyrer. Analysen er dog endnu ikke valideret, idet det skal afklares, hvordan forskellige prøvematrixer påvirker derivatiseringen.

Size Exclusion Chromatography (SEC)

Size Exclusion Chromatography (SEC) er en kvalitativ metode til en HPLC-analyse (High Performance Liquid Chromatography), hvor en blanding af proteiner og/eller peptider adskilles på en kolonne og detekteres optisk med enten Diode Array Detector (DAD) eller Refractive Index Detector (RID). Kolonnen er designet, så logaritmen til analytternes størrelse og retentionstid er inverst proportionale altså, jo større (tungere) molekylerne er, jo hurtigere bevæger de sig igennem kolonnen. Analyseresultatet angives i en procentvis fordeling af molekylestørrelsen, og det interessante er ofte at sammenligne SEC-resultatet før og efter en given procedure for at vurdere, hvorvidt molekylestørrelsen er blevet ændret under proceduren.

Metoden har været under udvikling i laboratoriet i et stykke tid og har blandt andet været benyttet til fx at undersøge enzymatisk hydrolyse, hvor

enzymet bidrager til at nedbryde svært omsættelig biomasse til mere tilgængelige peptider og aminosyrer.

Resultatet af analysen er en størrelsesfordeling mellem molekylestørrelser. I tabellen herunder ses størrelsesfordelingen ved starten af en enzymatisk hydrolyse. Efter enzymet har gjort sin virkning, er hydrolyseproduktet blevet centrifugeret, og supernatanten blevet analyseret.

Man kan tydeligt se, hvordan enzymet har klippet de store molekyler > 30 kDa til mindre molekyler < 2 kDa.

Tabel 2. Resultater fra SEC-analyse før og efter enzymatisk hydrolyse af griseblod.

Prøve	Areal%	Størrelse (kDa)
Start	3,4	59,8
Start	2,0	46,4
Start	94,6	30,2

Supernatant	2,0	2,0
Supernatant	20,2	1,4
Supernatant	9,6	0,6
Supernatant	24,0	0,5
Supernatant	44,3	0,1

Efter endt udviklingsarbejde er erfaringer og viden blevet samlet i en analyseforskrift.