

Notat

Opdateret pr..
22. december 2010
Projektnr. 1378600
Version 4
NCK/HNH

Kvalitetssikring af hangrisekød

Review af udvalgte metoder til detektion af hangrislugt

Annette Schäfer, Claus Borggaard, Niels Kjærsgaard

Indledning

Elektroniske næser, Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry (SIFT-MS), Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry (PTR-MS), Membrane Inlet Mass Spectrometry (MIMS), immunoassay-baserede metoder som Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) og Time Resolved Fluoroimmunoassay (TR-FIA), eller brugen af insekter til at måle flygtige stoffer, mulighederne er mange. Potentialet for disse teknikker som mulige metoder til måling af indol, skatol og androstenon i relation til hangrislugt bliver gennemgået.

Siden midt i 1990'erne har der været arbejdet på at udvikle elektroniske næser. Fælles for disse instrumenter er at de er et forsøg på en meget primitiv efterligning af den måde, hvorved dyr opfanger lugte.

Hos pattedyr identificeres lugte af et meget stort antal receptorer i næser. Hvert enkelt af disse receptorer er i sig selv ikke særlig specifik. Men da der er en stor mængde receptortyper, vil en duftkombination kunne identificeres ved det signalmønster som de mange millioner lugtfølsomme neuroner sender til hjernen. En lugt identificeres således af hjernen ikke som ved en kemisk analyse hvor de enkelte komponenter identificeres, men som et samlet "fingeraftryk". Så snart de første kunstige næser kom på markedet i 1990'erne blev de forsøgt brugt til at bestemme hangrislugt.

Brugen af massespektrometri giver en høj sikkerhed, idet identifikationen er specifik for de stoffer, der måles på. Før en masse måles i spektrometret sker en ionisering. Denne ionisering nedbryder stoffets molekylar-ion til mindre masseenheder afhængig af ioniseringens styrke. Alle disse masser danner et karakteristisk mønster, nærmest ligesom et fingeraftryk, som kan bruges til en entydig identifikation af et flygtigt organisk stof. Stoffer med samme kemiske egenskaber kan resultere i ens masser ved ioniseringen, karakteristisk for organiske syrer er masse 62. Identifikationen sikres derfor både ved de masser, der dannes, men også ved det forhold, der er masserne imellem. Ved analytiske dokumentationsmetoder anvendes ofte separation af de analyserede stoffer afhængig af deres polaritet eller flygtighed forud for analyse i massespektrometret ved hjælp af væske- eller gaskromatografi, herved opnås en yderligere dimension i identifikationen. Denne separation er tidskrævende afhængig af antallet af stoffer, der skal separeres, men kan næppe komme under 10 minutter pr. analyse og er derfor ikke hensigtsmæssig på en slagtelinje. I det sidste årti er flere og flere online massespektrometre kommet på markedet. Disse leverer nærmest et måleresultat løbende, mens der måles. Dette er fordelene, ulempen er at separationen af stofferne ikke er eksisterende, så afhængig af den indledende ionisering kan identifikationen være mere eller mindre specifik på enkeltstofniveau eller på strukturelt

set ens kemiske forbindelser, f.eks. organiske syrer. Vi har valgt at se nærmere på tre online massespektrometriske metoder: MIMS, PTR-MS og SIFT-MS.

Trænede insekter er afprøvet til detektion af indol, skatol og androstenon. Insekterne belønnes med foder når de har en positiv genkendelse af den indlærte lugt. Forsøg har vist at parasitiske hvepse kan genkende indol, skatol og androstenon i gasfasen ved lave niveauer både enkeltvis eller i en blanding med alle tre stoffer.

Immunoassays, som f.eks. ELISA og TR-FIA, er en biokemisk teknik, som hovedsageligt anvendes i immunologien til at detektere tilstedeværelsen af et antistof eller et antigen i en prøve. Metoden anvendes som et diagnostisk værktøj i medicin- og plantepatologien, men også til kvalitetskontrol i forskellige industrier.

Analysemetoder

Elektroniske Næser

Ved en kunstig næse benytter man sensorer der er i stand til at binde flygtige stoffer på dets overflade. Når fremmede stoffer bindes til sensorens ydre, ændres en eller flere registrerbare egenskaber ved den. Ved en kunstig næse er der ikke millioner af receptorer som i levende dyr. Her vil man ofte nøjes med fra 5 til 30 forskellige sensorer. Reaktionsmønstret som fremkommer ved at lade et duftstof passere hen over sensorerne kan så genkendes ved at sammenligne med mønstre fremkommet i tidligere forsøg.

Sensor-typer

MOS, metal oxide semiconductors: Disse består af halvledermaterialer som ændrer modstand, når fremmede molekyler sætter sig på deres overflader. Ved at operere den samme MOS-sensor ved forskellige temperaturer (typisk flere hundrede grader celsius) opnår man forskellig respons til forskellige lugtmolekyler.

SAW, surface acoustic wave detector: Denne type detektor består af en piezoelektrisk krystal som kan sættes i svingninger med en elektrisk impuls. Når overfladen opsamler lugtmolekyler, ændres svingningstiden for krystallen afhængig af den påførte stofmængde (masse). Overfladen af krystallen kan belægges med forskellige stofgrupper med forskellige affiniteter til forskellige lugtstoffer. Eksempelvis anvendes ofte porphyriner som kan danne komplekse bindinger til en lang række stoffer. En vigtig undergruppe blandt disse sensorer er den såkaldte "Quartz Microbalance". Disse krystaller sættes i svingninger med en frekvens på op til adskillige millioner hertz (MHz). Når molekyler sætter sig på overfladen af krystallen, sænkes dens egen frekvens (resonansfrekvens). Ændringer helt ned til 1Hz kan måles. Dette betyder at krystallen er meget følsom over for stofkoncentrationer i den passerende luftstrøm. SAW teknologien er meget følsom for temperaturændringer og systemerne skal derfor termostateres meget påpasseligt.

CP: Conducting polymers. Plasttyper kan gøres ledende ved at dope plastmaterialet med forskellige materialer. Når plaststoffet adsorberer lugtmolekyler ændres ledningsevnen. Denne ændring indikerer

at der er "noget", der har sat sig på sensorens overflade. Man kan så kombinere forskellige plastmaterialer for derved at opnå forskellig respons på lugtmolekylerne.

Ion Mobility Spectrometers: Disse instrumenter minder mest af alt om simple massespektrometre. De bruges af forsvaret til at måle tilstedeværelsen af potentielle krigsgasser. I udstyret ioniseres molekylerne med en radioaktiv kilde (f.eks. den samme som bruges i røgdetektorer). De nu ladede molekyler accelereres af et elektrisk felt hvorved de får en hastighed, der afhænger af deres masse. Et nyt elektrisk felt afbøjer nu molekylerne på tværs af den oprindelige bevægelsesretning. Et antal detektorer langs bevægelsesretningen måler hvor langt de ioniserede molekyler når, inden de stoppes af en ydre rør-inderflade. Udstyret måler således på en grov måde forholdet mellem ionladning og masse.

For MOS, SAW og CP er den største ulempe at når et antal molekyler er blevet adsorberet på overfladen af sensorerne, skal systemet renses (purging). Dette gøres ved at lede en meget ren og tør luftart hen over sensorerne i et passende tidsrum. Dette betyder at systemet ikke kan bruges under denne "renselses"-proces, som godt kan tage et par minutter. En løsning på dette problem er naturligvis at sætte et antal instrumenter til at arbejde i parallel. For eksempel hvis 12 sensor-arrays sættes i parallel, kan man med en purge-tid på 2 minutter pr. instrument måle på en hangris hver 10. sekund. Et andet problem for MOS, CP og SAW er at sensor-arrays ikke reagerer ens på lugtpåvirkninger og at de er meget vanskelige at kalibrere til samme følsomhed. Dette skyldes at sensorerne ikke er specifikke over for bestemte molekyler, men derimod er følsomme over for næsten alle flygtige stoffer som passerer over dem. Herved kan "nye" molekyler som ikke var til stede ved kalibreringen/oplæringen give helt uforudsigelige påvirkninger af sensorerne.

Ion Mobility Spektrometret lider ikke af purge-problemer, men vil i nogen grad være påvirkelig af at andre molekyler end dem der er interessante kan påvirke målingen.

Alle udstyr gav udslag på tilstedeværelsen af androstenon og skatol i gasfasen over detektorerne. Resultaterne fra artikel 4 (ion mobilitets spektrometer) viste langt de mest overbevisende resultater (for androstenon er opnået $r=0.92$ og gode sammenhænge til sensoriske resultater i øvrigt). Dette er fuldt ud i overensstemmelse med resultater opnået med SIFT-MS fra firmaet SYFT Technologies i New Zealand (se nedenfor).

Proton Transfer Reaction Switchable Reagent Ion Mass Spectrometry (PTR-SRI-MS)

Reaktioner, hvori der anvendes proton-overførsler, kan inducere kemisk ionisering af flygtige stoffer i en prøve, der ønskes analyseret. Prøve-gassen introduceres kontinuert ind i en strøm i instrumentet, hvor den reagerer med H_3O^+ , NO^+ eller O_2^+ ioner, som dannes i en ion-kilde. Flygtige stoffer, der har en proton-affinitet højere end vand ($>166,5$ kcal/mol) ioniseres ved proton-overførsler fra H_3O^+ . Massen analyseres i et massespektrometer og detekteres som ion-tællinger pr. sekund (ion counts/s = cps) ved hjælp af en sekundær elektronforstærker. Resultatet er en profil, svarende til et fingeraftryk, af masserne af de flygtige stoffer i prøven. Det er interessant fordi:

1. det ikke kræver forbehandling af prøven
2. det tillader hurtig måling (typisk < 1 min for at opnå et fuldstændigt massespektrum) og
3. teknikken er meget følsom (ppt niveau)

Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry (SIFT-MS)

Princippet i denne teknik er lig teknikken for PTR-MS. Indtil for ganske nylig anvendte PTR-MS kun en ion, nemlig H_3O^+ , til ioniseringen, men dette er ændret og det er svært at sige, om det ene princip er bedre end det andet.

Fordelen ved begge disse teknikker er en blød ioniseringsform, som betyder at der sker en mindre fragmentering af molekylar-ionen, hvilket i sidste ende giver et mere simpelt spektrum med mindre interferens. I den traditionelle massespektrometri anvendes elektronisk ionisering, hvor der sker en massiv fragmentering af et stof. De mange fragmenter interfererer og øger behovet for en forudgående separation vha. kromatografi. Dette problem er altså minimeret med disse to teknikker. Ved ioniseringen med precursor-ionerne dannes produkt-ioner og ideelt set dannes kun en produkt-ion. Men selv med den bløde ioniseringsform kan der dannes flere produkt-ioner. Det hævdes at ioniseringen med H_3O^+ resulterer i flere fragmenter ved PTR-MS end ved SIFT-MS. Forskellige stoffer kan også resultere i den samme produkt-ion, f.eks. giver både propanal og acetone en produkt-ion med m/z 59 ved ionisering med H_3O^+ . Ved at anvende flere precursor-ioner kan skelnes mellem de to stoffer, idet NO^+ reagerer med propanal og giver m/z 57, men med acetone fås m/z 88. Når et stof kan reagere med 2 eller 3 precursor-ioner elimineres faren for falsk positive eller negative resultater.

Reaktionskoefficienten af disse precursor-ioner er afgørende for at konvertere det målte rå signal til en koncentration for hvert stof. Ved PTR-MS anvendes en konstant arbitrær faktor til at konvertere signalet fra cps til en koncentration i f.eks. ppb, mens SIFT-MS anvender de specifikke reaktionskoefficienter for individuelle ion-molekyle reaktioner, hvorved opnås en absolut kvantificering af de flygtige organiske stoffer i en blanding uden brug af kalibreringsstandarder.

Membrane Inlet Mass Spectrometry (MIMS)

Ved MIMS introduceres de flygtige stoffer til massespektrometret via en semipermeabel membran, som sædvanligvis er en tynd, gas permeabel hydrofobisk membran, f.eks. lavet af polydimethylsiloxan. Prøver kan bestå af næsten enhver væske - det være sig vand, luft og endda opløsningsmidler. Der kræves ingen eller minimal prøveforberedelse og metoden er god til at måle små ikke polære molekyler, eftersom disse har en større affinitet til membranen end til prøve-matricen. Stoffer kan til dels introduceres selektivt afhængig af om membranens egenskaber er hydrofob eller hydrofil. Ioniseringsformen er elektronisk og der sker derfor en stor fragmentering af stoffer, hvilket giver stor interferens og mindre selektivitet. Følsomheden er altså ikke kun afhængig af stoffernes flygtighed som ved PTR-MS og SIFT-MS, men også af deres hydrofobicitet.

Biosensing – brugen af trænede insekter

Biosensing til detektion af indol, skatol og androstenon er udført med trænede insekter i form af bier (*Apis Mellifera*) og hvepse (*Microplitis croceipes*). Træningen er udført under klassiske betingelser (assosiativ læring). Træningen er udført med en opløsning af enten indol, skatol eller androstenon eller en blanding af disse (1:1:1) opløst i hexan i koncentrationer fra 0,001 til 20 mg/ml. Belønningen ved korrekt markering gives i form af en sucrose-opløsning. Det positive respons er for bierne en Proboscis (tongue) Extension Reflex (PER), hvilket tolkes som en tunge refleks, der medfører en ekstension af tungen og for hvepsene er reaktionen "head-banging" (J.E. Haugen 2009).

Immunoassays ELISA – Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay

Det overordnede princip ved immunoassays er at der bindes en ukendt mængde af antigen fra prøven, der ønskes undersøgt, til en overflade (f.eks. en polystyrene mikrotitter plade). Denne skylles med et specifikt antistof, som binder sig til antigenet. Antistoffet kan forbindes til f.eks. et enzym eller til magnetiske perler i nanostørrelse og til sidst tilsættes et stof som enzymet eller perlerne kan konvertere til et detekterbart signal. Anvendes fluorescens til detektion, vil belysning af en prøve med en passende bølgelængde få et antigen/antistof kompleks til at fluorescere, hvorved mængden af antigen i prøven kan udledes gennem styrken af fluorescensen. Indholdet af antistoffer eller antigener kan kvantificeres ved hjælp af flere forskellige teknikker, der bl.a. omfatter:

- RIA (radioimmunoassay). Metoden anvender radioaktive signaler, er særdeles sensitiv og har i laboratorier tidligere været anvendt til bestemmelse af androstenon i såvel fedtvæv som i blodserum. På grund af problemerne i forbindelse med radioaktivitet er RIA ikke særligt udbredt mere og kommercielle "tracers" til androstenon er heller ikke længere kommercielt tilgængelige (Claus et. al.). Ikke interessant i forbindelse med screening af fødevarer.
- MIA (magnetic immunoassay). Ved MIA bindes små magnetiske perler i nanostørrelse til enten antistoffet eller antigenet. Kvantificeringen sker her ved hjælp af et magnetometer, der måler ændringen i magnetfeltet. Metoden giver en del udfordringer med at håndtere den relativt store magnetiske baggrundsstøj.
- ELISA/EIA (enzyme linked immunosorbent assay). Ved ELISA linkes antistoffet til et enzym, der efterfølgende gøres sporbart, f.eks. flouriserende, hvorved indholdet kan kvantificeres. Metoden er meget anvendt og findes også som en "hurtig" metode i form af kommercielt kit.
- TR/FIA (time resolved flouroimmunoassay). Samme princip som flouriserende ELISA, men den flouriserende egenskab sker ikke ved hjælp af enzymer, men ved hjælp af lanthanide ioner, som Eu^{3+} .

Hot iron

En teknik udviklet til hurtig detektion af uønsket aroma under tilberedning. Instrumentet er en 115 volt pistol-grip elektrisk loddekolbe med kontinuert varmeopbygning (dvs. ingen trykkontakt). Kontakt mellem den opvarmede spids og en fedtprøve, specifikt subkutant fedt på en svineslagtekrop, frigiver aromaer svarende til de, der frigives under tilberedning af svinekød. Den kontinuerlige varme brænder fuldstændigt og hurtigt alle rester væk, hvilket er ensbetydende med eliminering af behovet for rengøring og vask af instrumentet imellem prøver (L. Jarmoluk 1970).

Artikler omhandlende måling og detektion af hangriselugt

Artikel 1-4 – Elektroniske næser

Hvordan er fedtprøverne forbehandlet i de 4 forsøg?

I alle tilfælde er fedtprøver blevet anbragt i glasbeholdere som er termostateret til mellem 35 og 150 grader celsius over en periode på mellem 30 sekunder og 2 minutter for at opnå ligevægt mellem prøven og headspace. Herefter er der udtaget en prøve af headspace med en lufttæt sprøjte og indholdet er efterfølgende injiceret i luftstrømmen, der føres over sensorerne i de elektroniske næser.

Sensortyper der er benyttet i arbejder der ligger til grund for de fire artikler:

I artikel 1 benyttes et sensorsystem med MOS sensorer.

I artikel 2 benyttes et CP baseret sensorsystem.

Til artikel 3 er benyttet et SAW baseret sensorsystem.

Til artiklen 4 er benyttet et ion mobilitets spektrometer.

I artikel 4 (Natale et al) er benyttet en sensortype bestående af en SAW resonator påført en porphyrin metal forbindelse. På spikede fedtprøver (fedtprøver som kunstigt er tilført op til 10ppm androstenon) opnås en følsomhed over for androstenon på 0.035 ppm pr. hertz i koncentrationsområdet mellem 0 og 2 ppm og 0.1 ppm pr. hertz mellem 2 og 10 ppm i prøven. Dette vil sige at resonansfrekvensen ændres med én hertz for hver gang androstenon koncentrationen i prøven stiger 0.035ppm.

Fra forsøgsresultaterne i artikel 4 ses det imidlertid at reproducerbarheden ligger tæt på 20 hertz svarende til 0.7 ppm i prøver med androstenon under 2 ppm. For prøver mellem 2 og 10 ppm er reproducerbarheden på 40 hertz svarende til en usikkerhed på 4 ppm.

Det skal endvidere understreges at den samlede måletid (prøveforberedelse, måling og rensning af sensoren) er på 30 minutter. Den Italiensk udviklede metode er blevet evalueret af Frauenhofer IME i 2009.

Artikel 5-10 – Online massespektrometriske metoder (SIFT-MS, PTR-MS og MIMS)

Indol, skatol og androstenon er målt i forskellige matricer, f.eks. spyt, udåndingsluft, urin, blod, fedt, staldluft og smør. I relation til hangriselugt er stofferne målt i spæk, fedt, urin og blod. I det følgende er referencer til diverse matricer gennemgået idet der er fokuseret på en af de tre online måleteknikker i kombination med stofferne indol eller skatol (ingen er fundet med androstenon). Der er meget få referencer med denne kombination. Forskellige flygtige stoffer måles i udåndingsluft med diagnose, screening og måling af sygdomme for øje. Indol og skatol er målt i ånde og statisk oral luft med SIFT-MS på tre forsøgspersoner (Ross 2008). Følsomheden var i området 2-4 cps per ppbv. Den estimerede detektionsgrænse, LOD, i en 10 sekunder måleperiode blev beregnet til 0,17 og 0,13 ppbv for indol og skatol. Kvantificeringsgrænsen, LOQ, blev på tilsvarende vis bestemt til 0,8 og 0,7 ppbv. Lavere værdier kan opnås ved en længere måleperiode end de 10 sekunder (Ross 2008). SYFT Technologies, som fremstiller udstyret, har flere applikationer, der omhandler måling af indol og skatol med SIFT-MS. SIFT-MS er anvendt til måling af bl.a. disse to stoffer fra forskellige prøver af New Zealandsk oksekød. 20 g prøve blev inkuberet mindst en time ved 60°C før måling med SIFT-MS. Resultatet er at indol og skatol kan måles med koncentrationer på nogle få ppbv til ca. 20 ppbv i headspace fra kød af kvæg fodret med græs eller kraftfoder (Syft Technologies (1+2)). PTR-MS er anvendt til at måle emissioner af flygtige organiske stoffer fra mikroorganismene E.coli, Shigella flexneri, Salmonella enterica og Candida tropicalis. I kulturerne med E. coli er målt på signalet 118, som med stor sikkerhed kan tilskrives tilstedeværelsen af indol. Indholdet steg efter 3-4 timers inkubation til 400 ppbv efterfulgt af et langsomt fald gennem den resterende inkubation på 24 timer til ca. 200 ppbv (Bunge, Araghypour 2008). Emission af lugtstoffer fra intensiv svineproduktion er målt med PTR-MS (Feilberg 2010). Med PTR-MS'en opnås en detektionsgrænse for indol på 0,04 ppbv og for skatol 0,02 ppbv. Stofferne er målt i luften med koncentrationer på 0,04-0,3 ppbv for indol og 0,08-0,9 ppbv for skatol. Undersøgelsen er under publicering (Feilberg 2010). MIMS er anvendt til måling af flygtige stoffer i forbindelse med staldlugt, f.eks. er indol og skatol målt i ventilationsluft i svinestalde før og efter passage af to forskellige biologiske biofiltre (Feilberg 2010). Indol blev målt på m/z 117 og skatol på m/z 130 i et

koncentrationsområde på 1-18 ppb med en LOD for indol på 1,2 ppb og skatol 1,1 ppb (Feilberg 2010). Fælles for disse metoder er at indol, skatol og androstenon skal findes på gasform for at kunne måles. For at få alle tre stoffer med kræver det en opvarmning især af hensyn til androstenon.

Artikel 11-12 – Biosensing

I det norske hangriseprojekt arbejdes med både bier og hvepse som potentielle detektorer af hangriselugt. I deres forsøg testes stofferne ned til en koncentration på 0,001 mg/ml for indol, skatol og androstenon i hexan. Insekterne synes at være i stand til at opfatte individuelle hangrisestoffer i blandinger med 1:1:1 af indol, skatol og androstenon. Det vides endnu ikke om insekterne kan lugte hangrisestofferne kvantitativt ved sorteringsgrænserne. Resultaterne forventes publiceret når de foreligger ifølge John-Erik Haugen (mail 21.04.10).

Artikel 13-16 - Immunoassay

ELISA er i udstrakt grad anvendt til måling af androstenon. ELISA-bestemmelsen foretages både i form af en hurtigmetode ved hjælp af et kommercielt testkit og en tilsvarende ELISA-analyse i laboratoriet med længere inkubationstider. Bonneau 2000 korrelerer disse ELISA-bestemmelser af androstenon i smeltet fedt. Standardkurven går fra 0 – 10 µg/g androstenon i spæk. Testkittet er mest følsomt i området fra 0,5-0,6 µg androstenon/g ufortyndet fedt. Ved indhold over 2 µg/g skal fedtet fortyndes før analyse. Sammenligning af hurtigmetoden, ELISA-testkit, med laboratorieversionen af ELISA var ikke entydig. I den ene gentagelse af dobbeltbestemmelsen var der en smule overestimering af indholdet af androstenon ved brug af testkittet, mens den anden bestemmelse var voldsomt overestimeret ved brug af testkittet. Forfatteren konkluderer på den baggrund, at resultatet ikke kan bruges (Bonneau 2000). Testkittet er p.t. ikke kommercielt tilgængeligt, men dette vil muligvis ændres såfremt der måtte komme større efterspørgsel for test af androstenon.

ELISA i laboratorieversionen og TR-FIA har været anvendt til måling af indholdet af androstenon i blodserum. Ved at kunne screene på baggrund af blodprøver (eller serum) i stedet for fedtprøver kan prøveforberedelsen reduceres betragteligt. Resultaterne i Tuomola 1997 og 2002 viser en god sammenhæng i mellem niveauet af androstenon i blodserum og i fedtprøver ($r=0,866$ og $r=0,89$) og det konkluderedes at direkte analyse af serum synes at give en pålidelig *indikation* af androstenonindholdet i fedt. En pålidelig indikation er dog næppe tilstrækkelig til at basere screeningen af slagtekroppene på. Problemet er, at androstenonindholdet i blod er kendt for at have væsentlige, midlertidige fluktuationer.

Artikel 17 – 19 - Hot Iron metoden

Hot Iron-metoden er anvendt og anvendes stadig til bedømmelse/sortering af svinekroppe. Metoden blev udviklet tilbage i 1970 hvor korrelationen mellem smagspanel og bedømmelse med Hot Iron på prøver var 0,37. Dertil skal siges at smagspanelet bestod af 6 dommere og Hot Iron metoden involverede en person med stor erfaring i at bedømme aroma af gris! I artiklen vurderes at en erfaren bedømmer kan evaluere adskillige slagtekroppe pr. minut (Jarmoluk 1970). Metoden er også anvendt til bedømmelse af hangriselugt i fedt og kød i tre grupper af hangrise: 5 måneder gamle (75-80 kg levende vægt), 7 måneder gamle (100-105 kg) og 3 år gamle (250-300 kg). Den sensoriske evaluering vha. Hot Iron-metoden blev foretaget af tre eksperter og intensiteten blev bedømt på en skala fra 1 til 6, hvor 6 udtrykker en høj hangriselugt. Forfatteren konkluderer at brugen af Hot Iron-metoden er egnet til sensorisk detektion af lugt. Metoden er simpel og anvendelig til bestemmelse af hangriselugt på

slagtelinjen (Stamenkovic 2005). I et andet forsøg med fokus på effekten af fodring til reduktion af hangriselugten er Hot Iron-metoden også anvendt. Her bedømmes nakkefedtet på en skala fra 1 til 4, hvor 4 er rigtig dårlig. Forfatteren vurderer at sættes cut-off værdien på 2 for Hot Iron-metoden, så er der god overensstemmelse mellem målte værdier og de sensoriske bedømmelser (Aluwe 2009).

Artikel 20 - Olfaktometri

Sensoriske korrelationer er foretaget til smagsoplevelsen af skatol og androstenon, hvor der opereres med en grænseværdi for skatolækvivalenter på 0,2-0,25 mg/kg i fedt og for androstenon er grænsen 0,5-1 mg/kg i fedt. Den olfaktometriske oplevelse af samme stoffer, som jo er forbrugerens første erkendelse af hangriselugten under tilberedningen er måske mere sigende for, hvad et evt. onlineudstyr kan håndtere af detektionsgrænser. L.J. van Gemerts samling af lugtgrænseværdier i forskellige medier for disse tre stoffer er angivet i tabellen:

Hangrisestof	GV	Værdi	Medie	Kilde
Androstenon	d	0,0021	Luft [mg/m ³]	Amoore (1977)
	d	0,000000868	Luft [mg/m ³]	Baydar et al. (1992a, 1993)
Skatol	d	0,00035	Luft [mg/m ³]	Punter (1975, 1979)
	d	0,0005	Luft [mg/m ³]	Logtenberg (1978)
Indol	d	0,0071	Luft [mg/m ³]	Punter (1975, 1979)
		0,00004	Luft [mg/m ³]	Etzweiler et al. (1980)
		0,000033	Luft [mg/m ³]	Randebrock (1986)
Skatol		0,05	Syntetisk smør [mg/kg]	Urbach et al. (1970, 1972)
		0,05	Solsikkeolie [mg/kg]	Preininger & Grosch (1994)
Indol		0,02	Syntetisk smør [mg/kg]	Urbach et al. (1970, 1972)

Der opereres med to typer af grænseværdier: den absolutte og forskelsgrænseværdien. Detektions- (d) og genkendelses- (recognition (r)) grænseværdierne er absolutte grænseværdier.

Detektionsgrænseværdien er den laveste koncentration, hvor en lugt kan detekteres uden at kunne genkende lugten. Genkendelsesgrænseværdien er den laveste koncentration, hvor lugten kan identificeres. Forskelsgrænseværdien er den mindste ændring i koncentrationen af stoffet som kan erkendes. Denne fremgår dog ikke af Gemerts samling af grænseværdier. De absolutte grænseværdier kan være fastlagt på forskellig vis og værdierne er derfor kun vejledende, hvilket også vil fremgå af den store spredning, der er i værdierne for samme stof, afhængig af kilden. For de sidste 5 værdier i tabellen fremgår det ikke i kilden, om der er tale om detektions- eller genkendelsesgrænseværdier.

Ovenstående grænseværdier i luft er måske mere sigende for, hvad en onlinemetode skal kunne håndtere i forhold til en forbrugers sensoriske oplevelse under tilberedning.

Konklusioner

For alle tre online massespektrometriske metoder vurderes miljøet på en slagtegang at være barsk, og mest optimalt vil nok være at transportere en delprøve til et isoleret rum. MIMS'en har dog vist sit potentiale i svinestalde, så den kan måske klare miljøet, lige så de i krigszoner anvendte ion mobilitets massespektrometre. Hvis stofferne kan komme på flygtig form vurderes, at alle tre teknikker kan anvendes idet der ikke er mange interfererende stoffer med de samme masser som indol, skatol og androstenon. PTR-MS og SIFT-MS skønnes at give den mest specifikke identifikation og bedste kvantificering pga. den bløde kemiske ionisering med tre precursor-ioner og pga. den anvendte kvantificeringsteknik, som tager individuelle hensyn til reaktionshastighedskonstanten for de enkelte ioner, dog uden at kræve brug af kalibreringsstandarder i forhold til MIMS. Følsomheden synes at ligge i samme område, nemlig ppbv i nogle tilfælde pptv, selvfølgelig med mulighed for at variere afhængig af opsamlingsbetingelser.

Indol, skatol og androstenon skal bringes på flygtig form før måling. Dette er jo muligt idet stofferne kan lugtes i forbindelse med almindelig tilberedning i ovn. Mikrolab, Århus, har f.eks. fremstillet en opvarmet "kuvette" der kan opvarme f.eks. jord eller andre faste prøver til 150-200°C. Denne enhed eller lignende bør også kunne anvendes til opvarmning af spæk. Spørgsmålet er så om der kan findes en passende sammenhæng mellem indholdet af de tre stoffer i headspace i forhold til spækkets indhold, hvilket er forudsætningen for at anvende måleteknikken til en online metode til hangriselugt.

Biosensing af indol, skatol og androstenon ved hjælp af insekter lyder som en kompleks opgave. Hvordan vil hygiejnekravene til slagtegangen kunne harmonere med brugen af insekter? Der er mange uafklarede spørgsmål: hvor lang levetid har insekterne? (max ½ år?), de skal trænes og hvor lang tid ad gangen kan de lugte? Hvordan korrelerer deres lugtesans med vores lugt- og smagssans for disse stoffer? Den nedre koncentration hvor insekterne testes svarer omregnet til ca. 1 mg/kg, hvilket trods alt er tæt på den sensoriske grænseværdi for androstenon på 0,5-1 mg/kg i fedt. Det er uklart hvordan insekterne præsenteres for lugten.

ELISA-testkit kræver stadig en del oparbejdning og inkuberingstid før aflæsning. Metoden analyserer kun for androstenon og ikke skatol. Testkittet til en hurtigbestemmelse for androstenon er p.t. ikke kommercielt tilgængeligt.

Hot Iron-metoden er så simpel at den er nem at håne og måske overse. Det er meget svært fra litteraturen at bedømme kapaciteten og håndteringen af metoden i praksis på en slagtelinje. Det er svært at forestille sig at dommere kan uddannes, så det vil give en ensartet sortering og med viden om, hvor hurtigt en dommer trættes rent olfaktometrisk er det også svært at forestille sig, hvordan 400 slagtekroppe i timen kan bedømmes vha. denne metode. Til gengæld kan Hot Iron-metoden måske bruges til opvarmning med henblik på at få indol, skatol og androstenon på flygtig form. Opvarmningen sker på et lille afgrænset område af slagtekroppen og opsamling til en online MS-måling er værd at overveje.

Arbejdsgruppens indstilling

Der foreligger 2 typer af instrumenter som er værd at sætse på som kandidater til et online målesystem til detektion af hangriselugt:

1. Tre online MS-systemer er interessante:
 - a. SIFT-MS-systemet fra SYFT Technologies (<http://www.syft.com/>), virksomheden bag dette system ser ud til at være fortrolig med hangrise-problemstillingen fra den New Zealandske slagteindustri.
 - b. PTR-MS systemet fra Ionicon Analytik (<http://www.ptrms.com/>). Dette system anvendes til måling af flygtige stoffer fra ventilationsluft fra svinestalde ved Århus Universitet og har på tilsvarende vis demonstreret evnen til at måle indol og skatol.
 - c. MIMS som findes i TI's afdeling i Århus. Udstyret har tidligere været anvendt til måling på staldluft.

Systemerne har den nødvendige specificitet til at kunne kvantificere lave mængder af skatol og indol samt formentligt også androstenon. SIFT-MS og PTR-MS vil give de mest specifikke målinger.

2. Ion mobilitets detektor M90-D1-C Chemical Warfare Agent Detector <http://www.environics.fi/> bør testes idet den er robust nok til at blive brugt i felten af mange landes militær.
3. Der skal igangsættes en litteratursøgning (specielt i DMRI arkiver fra 1980'erne og 1990'erne) af sammenhængen mellem skatol/androstenon i svinespæk og forekomsten af disse stoffer i headspace over en opvarmet prøve af samme spæk. Hvis der ikke foreligger tilstrækkelig dokumentation, bør der staks indledes laboratorieforsøg der kan klarlægge dette forhold.

Referencer

1. Application of a multi-gas-sensor device in the meat industry for boar-taint detection. Bourrounet et al. In Sensors and Actuators B 26-27 (1995) 250-254.
2. The Measurement of the Responses to Different Odour Intensities of 'Boar Taint' Using a Sensory Panel and an Electronic Nose. Annor-Frempong et al., Meat Science Vol. 50, No.2, 139-151, 1998.
3. Thickness shear mode resonator sensors for the detection of androstenone in pork fat. Natale et al. Sensors and Actuators B 91 (2003) 169-174.
4. Application of an electronic nose for measurements of boar taint in entire male pigs. Vestergaard et al., Meat Science 74 (2006) 564-577.
5. Sub-parts per billion detection of trace volatile chemicals in human breath using Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry. Ross. In BMC Research Notes 2008, 1:41 www.biomedcentral.com
6. Discrimination of Beef Samples using SIFT-MS (1). Syft Technologies.
7. SIFT-MS Analysis of meat samples from carne technologies (2). Syft Technologies.
8. On-Line monitoring of volatile metabolites in the dynamic headspace of microbial cultures by PTR-MS. Bunge, Araghypour et al. In Appl. Environ. Microbiol. Online 1. February 2008.
9. Evaluation of Biological Air Filters for Livestock Ventilation Air by Membrane Inlet Mass Spectrometry. Feilberg et al. In Journal of Environmental Quality 39:1-12 2010.
10. A. Feilberg, D. Liu, A.P.S. Adamsen, M.J. Hansen, K.E.N. Jonassen, Odorant emission from intensive pig production measured by online PTR-MS 2010.

11. J.E. Haugen, Nofima Foods, Detection of Boar Taint – Need for harmonised methods and rapid methods, ICOMST 2009 Copenhagen
12. K. Lundström, K.R. Matthews, J.E. Haugen, Pig meat quality from entire males, *Animal* (2009), 3:11 pp 1497-1507
13. An international study on the importance of androstenone and skatole for boar taint: I. Presentation of the programme and measurement of boar taint compounds with different analytical procedures. Bonneau, Kempster, Claus, Claudi-Magnussen, Diestre, Tornberg, Walstra, Chevillon, Weiler og Cook. In *Meat Science* 54 (2000) 251-259.
14. Monitoring androstenone levels in boars by direct immunochemical analysis of serum samples. Tuomola et. al. In *Meat Science* 61 (2002) 193-197.
15. Time-Resolved Fluoroimmunoassay for the Measurement of Androstenone in Porcine and Fat Samples. Tuomola et al. *Journal of Agricultural Food Chemistry* (1997) 3529-3524.
16. An improved microtitre enzyme immunoassay to measure the boar taint steroid 5 α -androst-16-en-3-one in blood plasma of pigs. Claus et. al. In *Meat Science* 80 (2008) 934-938.
17. L. Jarmoluk, A.H. Martin, H.T. Fredeen, Detection of taint (sex odor) in pork, *Can. J. Anim. Sci.* 50; 750-752 (Dec 1970)
18. T. Stamenkovic, b. Devic, Determination of boar taint in fat and meat, *Biotechnology in Animal Husbandry* 21 (5-6) p 227-230, 2005
19. M. Aluwé, S. Millet, G. Nijs, F.A.M. Tuyttens, K. Verheyden, G.F. De Brabander, D.L. De Brabander, M.J. Van Oeckel, Absence of an effect of dietary fibre or clinoptilolite on boar taint in entire male pigs fed practical diets, *Meat Science* 82 (2009) 346-352.
20. L.J. van Gemert, *Odour Thresholds, Compilations of odour and flavour threshold values in air, water and other media* (edition 2003)

Bilag 1. Oversigt over måleteknologier

Metoder	Forbehandling af prøve	Måling – responstid (regenerering af sensorer)	Sensitivitet, LOD (ppb, ppt)	Selektivitet (god – dårlig)	Indol (kan males J/N)	Skatol (kan males J/N)	Androstenon (kan males J/N)	Pris, anskaffelse	Omkostninger, drift	Robust (R), Mobilt (M)	Samlet vurdering på en skala fra 1 til 4 1 – velegnet, ingen forbehandling, hurtig responstid, høj følsomhed, optimal selektivitet. 2 – god... 3 – dårlig... 4 – ikke muligt, krævende forbehandling, lang måletid, dårlig følsomhed, ingen selektivitet
Elektronisk næse ⁶	nej ₁	Ca. 2 min	Afhængig af specifik teknologi	dårlig	J	J	J ³	Dyr ⁵	Dyr ⁵	M	4 – kræver gasflaske til rensning eller indgangsluft skal filtreres, ikke robust og driftssikkert (DK udgaver)
Ion Mobility Spectrometer ⁶	nej ₁	< 10 sek		god	J?	J?	?				2
SIFT-MS ⁶	nej ₁	< 10 sek	0,1 ppb ²	god	J	J	J ³	Dyr	Mellem	R?,M	1 – SYFT Technologies, New Zealand har meldt fra. Deres økonomi er tvivlsom.
PTR-SRI-MS ⁶	nej ₁	< 10 sek	0,001 ppb ²	god	J	J	J ³	Dyr	Mellem	R,M	1 – muligvis gasflaske
MIMS ⁶	nej ₁	< 10 sek	1 ppb	middel	J	J	N	Mellem	Billig	R,M	2 – vurderes at være billigere i drift grundet lettere vedligeholdelse.
Biosensing vha insekter	nej ₁	< 10 sek	1000 ppb	god?	J?	J?	? ³	Billig	Dyr	M	4 – problem med hygiejne, kort levetid, sårbart m. levende væsner, høje omkostninger til træning.
Hot Iron ⁶	nej ₁	30-60 sek	Olfaktometrisk grænse ?	dårlig	J?	J?	J? ³	Billig	Dyr	R,M	1 høje omkostninger til træning af "sniffer", høje lønomkostninger, egnet til midlertidig løsning
Immunoassay	ja	3-4 timer	1000 ppb ²	god	N	N	J	Dyr	Billigere	-	4

¹ Dog opvarmning af prøve for flygtiggørelse af stoffer.

² Generelle niveauer for andre stoffer. Kendes ikke specifikt for indol, skatol og androstenon.

³ Under forudsætning af at androstenon kan flygtiggøres.

⁴ Sensitiviteten svarer til den sensoriske grænse, som er lavere end sorteringsgrænsen på de 0,25 ppm for skatolækvivalenten.

⁵ Behov for flere udstyr i parallel af hensyn til en responstid, der er hurtig nok.

⁶ Forbehandling af prøve i form af opvarmning for at få ASI stofferne flygtiggjort.