



Årsrapport 2023

Krav til fødevarekvalitet – kemisk/fysisk dokumentation

Nicolai Bork

12. april 2024
Proj.nr. 2010426
Version: 1
Init. NCB/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 2023.

Projektets formål og mål

Formålet med projektet er at vedligeholde anvendte analysemetoder og akkrediteringen af disse metoder, hjemtage nyeste viden indenfor området og specifikt at give kødproducerende virksomheder viden om og mulighed for at dokumentere fysiske og kemiske egenskaber af råvarer, ingredienser og produkter.

Projektets mål:

- Relevante analysemetoder til fysisk og kemisk karakterisering af proteiner identificeres, og metodernes implementerbarhed vurderes.
- Udvalgte analysemetoder opsættes og indkøres i laboratorium.
- Ny generel viden med relevans for dokumentation af kvalitet i kødindustrien indsamles og rapporteres.

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 projekter. Der skal løbende foretages en vurdering af de anvendte metoder inkl. prøveforberedelsen i forhold til, om analysen kan gennemføres hurtigere, billigere, bedre og/eller nemmere. Det er endvidere en løbende opgave at opretholde akkrediteringen af analyser i DMRI's kemiske laboratorium. Der er et stigende ønske om at nedsætte forbruget af protein fra animalske kilder og erstatte dette med protein fra andre kilder som fx planter. En forudsætning for succesfuldt at anvende andre proteinkilder i fx kødreducerede produkter er, at deres fysiske og kemiske egenskaber er veldokumenterede. Metoder til brug for udarbejdelse af denne dokumentation skal derfor være tilgængelige.

Gennemførte aktiviteter

Herunder beskrives de gennemførte aktiviteter samt de effekter og resultater, de har afstedkommet.

Hurtigmetode til analyse af protein

Proteinanalyse ved Dumasmetoden

Måling af protein har i mere end 100 år været en af de mest fundamentale parametre til optimering og dokumentation af kødprodukters kvalitet. Selvom der forefindes adskillige analysemetoder, benyttes i praksis kun tre metoder: Kjeldahl, Dumas og nær-infrarød spektroskopi, hvoraf førstnævnte har været anvendt på DMRI's kemiske laboratorium i flere årtier.

Kjeldahl er den ældste og sandsynligvis mest udbredte og bredest anerkendte metode. Metoden involverer destruktion af prøven i kogende, koncentreret svovlsyre, hvorved kvælstoffet i proteinerne omdannes til ammonium (NH_4^+), som efterfølgende bestemmes ved pH-titrering.

Dumasmetoden har i de seneste år vundet mere og mere indpas i adskillige industrier. I modsætning til Kjeldahlmetoden er metoden baseret på termisk oxidation af prøven i en atmosfære af rent oxygen, hvorved kvælstof i prøven omdannes til en række nitrøse gasser (NO_x og NO_y). Efter nogle oprensningstrin bestemmes kvælstofmængden ved en termisk konduktivitetssensor, som, i lighed med Kjeldahlmetoden, korreleres til proteinmængden via kendte omregningsfaktorer.

Fordelen ved Dumas i forhold til Kjeldahl er, at de forholdsvis store mængder af kemikalier og den tilhørende sikkerhedsrisiko og affaldsproblematik undgås, og at metoden i de fleste moderne instrumenter er fuldstændigt automatiseret og meget hurtig. Ulempen kan være, at mange instrumenter kun kan håndtere forholdsvist små prøvemængder, hvilket kan være et problem for inhomogene prøvetyper.

Med bevilling fra Norma og Frode Jacobsens Fond er der indkøbt et nyt analyseinstrument baseret på Dumasmetoden – en RapidMaxN fra den tyske producent Elementar. Denne producent og model har bred anerkendelse og anvendes indenfor en række relaterede industrier, såsom bryggerier, mejerier og pharma.

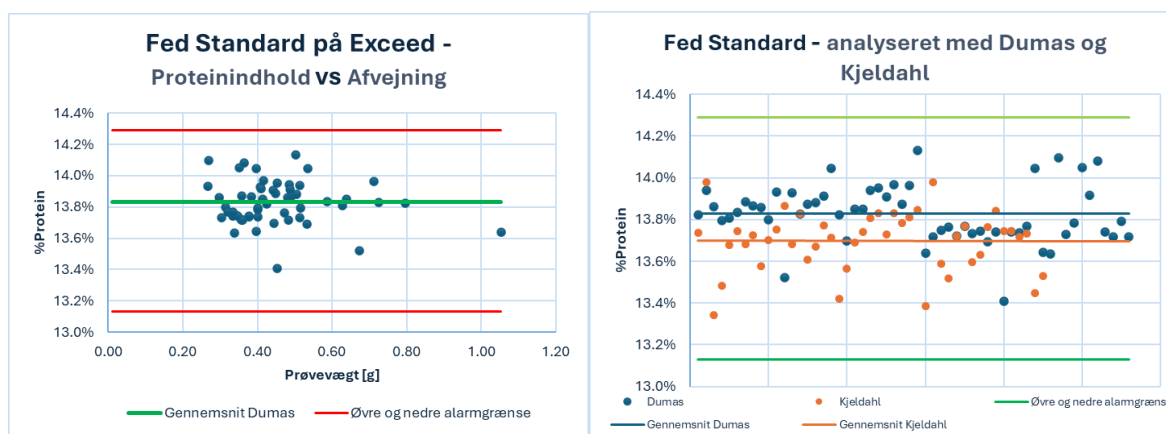


Figur 1. Venstre: Kjeldahlinstrument med tilhørende destruktionsudstyr, reagenser og affaldsbeholdere. Højre: Dumasinstrument med tilhørende gasflaske.

Indkøring af Dumasmetoden

Efter installation blev en række forskellige prøver analyseret på instrumentet, heriblandt referencestandarder, kødstandarder, kødprøver, blod og blodprodukter samt vandige prøver.

Baseret på erfaringer fra analyse af de forskellige matricer samt producentens vejledning og dokumentation [1] blev en analyseforskrift og tilhørende valideringsrapport udarbejdet. Analyseforskriften og valideringsrapporten er udarbejdet i overensstemmelse med de generelle kvalitetsstandarder gældende i laboratoriet, og metoden er således forberedt til eventuel akkreditering. I figur 2 sammenfattes resultaterne fra valideringsstudiet.



Figur 2. Venstre: 56 prøver med forskellig vægt fra samme materiale analyseret med Dumasmetoden på Rapid Max N Exceed, gennemsnit og øvre og nedre analysegrænser angivet. Højre: Sammenligning af referencemateriale målt på Exceed- og Kjeldahlinstrumenterne.

I figur 2, venstre kan det ses, at Dumasanalysen er robust overfor variationer i prøvemængder fra ca. 0,25 til 1,10 gram, idet måleværdierne fordeler sig tilfældigt omkring referenceværdien (grøn linje) og indenfor det normale usikkerhedsinterval (røde linjer).

I figur 2, højre kan det ses, at Dumas- og Kjeldahlmetoderne konsistent måler ens over en længere prøveserie, hvilket bekræfter, at de er kompatible. For yderligere data henvises til valideringsrapporten på projekthjemmesiden.

Den nuværende vurdering af instrumentet er derfor, at det er meget velegnet til brug i både DMRI's kemiske laboratorium og på kødindustriens laboratorier generelt. Dertil vurderes det, at instrumentet i de fleste tilfælde kan erstatte et Kjeldahl-baseret instrument uden at kompromittere analysekvalitet eller datahistorik. Samtidig kan betydelige driftsmæssige og sikkerhedsmæssige fordele realiseres.

Baggrund

Analyse af aminosyrer

En af de ernæringsmæssige fordele ved indtagelse af animalsk protein er, at kosten derved indeholder en god sammensætning af aminosyrer, heriblandt de essentielle aminosyrer, som kroppen ikke selv kan danne ud fra andre aminosyrer. Der findes 20 forskellige aminosyrer, hvoraf de 9 er essentielle, og som vi skal have gennem kosten. Der er foretaget en gennemgang af analysemetoder til påvisning og kvantificering af aminosyrer.

Næst efter analyse af totalprotein er analyse af totalaminosyrer og frie aminosyrer et af de primære værktøjer til forskning og udvikling indenfor proteinholdige fødevarer. Frie aminosyrer er aminosyrer, der ikke er kemisk bundne, men eksisterer som særskilte kemiske enheder i matricen (modsat aminosyrer i peptider eller proteiner). Analyserne adskiller sig i prøveforberedelsen, men benytter sig af samme detektionsmekanisme.

Detektion

Selvom fuld kemisk karakterisering (dvs. sekventering af aminosyrernes rækkefølge) af proteiner og større eller mindre peptider er tilgængelig, benyttes sådanne analyser kun i meget begrænset omfang i fødevarerindustrien. Derimod analyseres den totale mængde af de individuelle aminosyrer i vid udstrækning. Selvom adskillige metoder her er tilgængelige, er det i praksis kun kromatografiske metoder, der benyttes aktivt. Langt hovedparten af metoderne benytter enten HPLC (high-performance liquid chromatography) eller UHPLC (ultra high-performance liquid chromatography) koblet med en passende detektor. Denne kan fx være baseret på ultraviolet lys (UV), fluorescens eller massespektrometri (MS eller MS/MS).

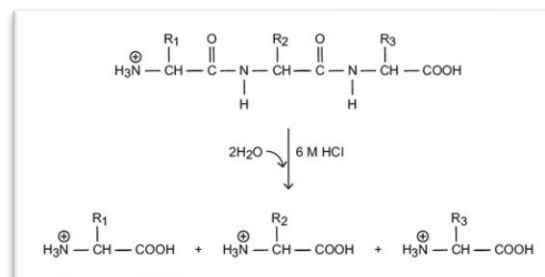
Prøveforberedelse

Prøveforberedelse, frie aminosyrer

Prøveforberedelse til analysen af frie aminosyrer er baseret på at få de frie aminosyrer i opløsning i et passende solvent. Ekstraheringen udføres på homogeniserede prøver og foregår ofte under let opvarmning (30-70°C).

Prøveforberedelse, totale aminosyrer

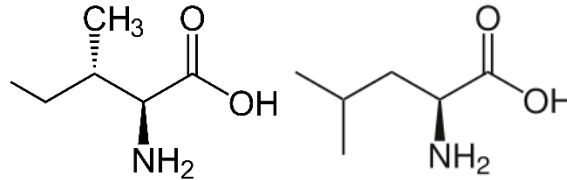
Bundne aminosyrer frigives ved hydrolyse af amidbindingen i et protein eller peptid. Hydrolysen kan katalyseres af syre eller base eller af enzymer, og der findes reagenser, som understøtter alle tre mekanismer. Den mest udbredte variant synes dog at være syrekatalyseret hydrolyse.



Figur 3. Illustration af syrekatalyseret hydrolyse af amidbindinger [2].

Derivatisering

En af de primære udfordringer med aminosyrehydrolyse er, at mange aminosyrer er kemisk meget ens og derfor svære at detektere individuelt, fx leucin og isoleucin.



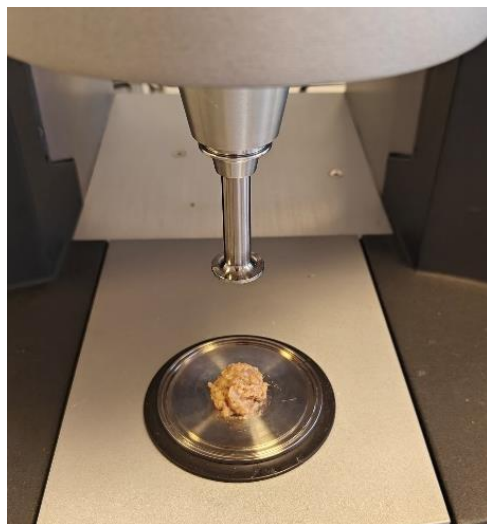
Figur 4. Isoleucin og leucin er kemisk meget ens og derfor svære at adskille.

Til hjælp med dette er derivatisering, dvs. kemisk omdannelse af aminosyren til et lettere detekterbart produkt, en ofte anvendt metode.

Reologiske målinger af farsvarer

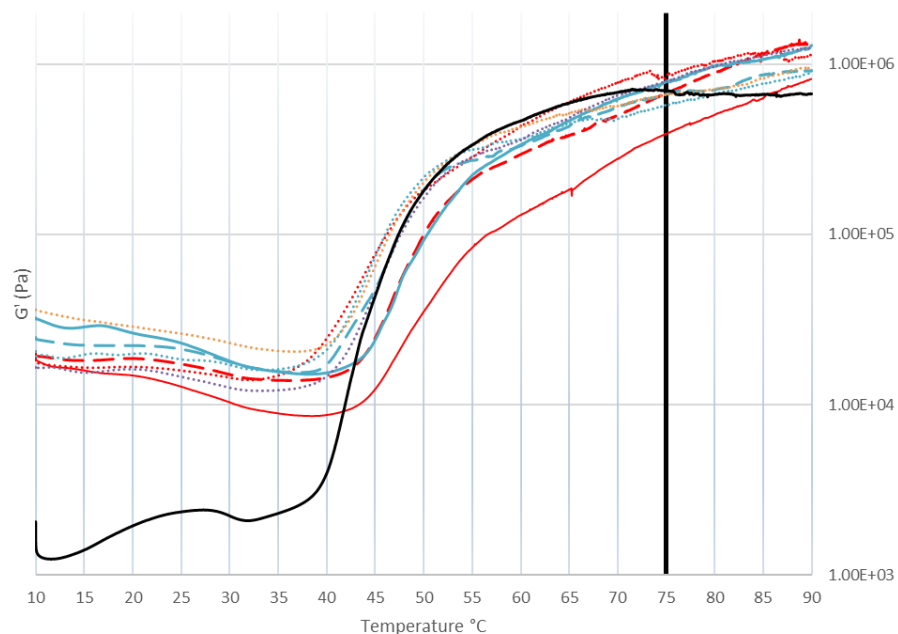
En af de primære udfordringer for udvikling af produkter med varierende mængde af tilsat planteprotein (hybridprodukt, oftest baseret på farsvare) er teksturen og udbyttet i det færdige produkt. Kan de kvalitetsparametre forudsiges i farsen ved anvendelse af reologi (fx ved at måle ændring i farsens fasthed under opvarmning)?

I et screeningsforsøg blev en række forskellige farsvarer målt reologisk, og der blev fundet markante forskelle i de målte reologiske egenskaber over en simuleret tilberedningsproces.



Figur 5. Prøve forberedt til reologisk måling.

Figur 6 viser et eksempel på en reologisk måling, G' (storage modulus, et udtryk for elasticitet) udført på farsvarer med planteproteiner tilsat i forskellige mængder/typer. Den sorte kurve er referenceprøven (standard bindefars). Produkterne blev under målingen opvarmet til en kerntemperatur på 75°C (sort lodret linje), hvor G' blev evalueret.



Figur 6. Udvikling af den reologiske parameter G' (storage modulus, et udtryk for elasticitet) som funktion af farsens temperatur.

Hybridfarserne i dette lille screeningsforsøg udviste meget forskellig udvikling under opvarmning sammenlignet med den rene kødreferens (sort kurve), mens der ikke blev målt store forskelle mellem de 7 forskellige hybridblandinger. Dog ses det også, at elasticiteten stadig blev ændret efter 75°C, hvor referencefarsen var stabil. Det svarer til opnåede erfaringer fra fremstilling af hybridpølser, at de kræver højere temperaturer, før de er stabile.

Der skal udføres yderligere forsøg for at korrelere de reologiske målinger til fx sensorik og konsistens, så man under produktudvikling eller proceskontrol ved, hvilke reologiske værdier en given fars skal opfylde ved en given temperatur.

Laboratoriets akkreditering

Det kemiske laboratorium ved Teknologisk Institut har opretholdt DANAK-akkrediteringen.

Præstationsprøvnings

Laboratoriet har deltaget i den årlige præstationsprøvning udbudt af [FAPAS](#) af analyser for protein, vand, fedt og salt. Resultaterne er vist herunder, hvor det bemærkes, at en z-værdi mellem +2 og -2 anses for værende tilfredsstillende. Det konkluderes herved, at laboratoriets analyser er meget tæt på referenceværdien for referencematerialet, og at præstationsprøvningen dermed ikke giver anledning til bekymring om analysernes kvalitet eller anledning til revidering af metoderne.

Analyt	Z-score (antal standardafvigelser fra nominal værdi)
Vand	0,3
Fedt	0,3
Protein	0,4
Salt	0,0
Aske (ikke akkrediteret)	-0,9

Validering af hangrisemetoden (LDTD-MS-MS)

Et sammenligningsstudium af hangriseanalysen er blevet udført i samarbejde med et referencelaboratorium. I alt blev otte fedtprøver analyseret for indholdet af skatol og androstenon. Der blev opnået en korrelationskoefficient for de målte koncentrationer af begge stoffer på ca. 0,99, hvilket er meget tilfredsstillende.

Formidling

- Et webinar om metoder til detektion af hangriselugt
- Nyhedsbrev
- Ved konferencen Fremtidens Fødevareproduktion (Teknologisk Institut) blev flere analysemetoder præsenteret.

Referencer

1. <https://www.elementar.com/en/products/nitrogen-and-protein-analyzers/rapid-max-n-exceed>
2. <https://www.waters.com/nextgen/us/en/education/primers/comprehensive-guide-to-hydrolysis-and-analysis-of-amino-acids/introduction-to-hydrolysis.html>