

Projectnr.: 71.988.01
Authenticiteit & Identiteit

Projectleider: R. Frankhuizen

Rapport 2006.013

november 2006

Screenings- en identificatietechnieken voor watervasthoudende eiwitten in vlees- en visproducten

D.M.A.M. Luykx, G.A. Kleter, D. Starmans, M. Groot, L.W.D. van Raamsdonk en R. Frankhuizen

Business Unit: Analyse & Ontwikkeling
Cluster: Authenticiteit & Identiteit

RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Tel: 0317-475422
Fax: 0317-417717
Internet: www.rikilt.wur.nl

Copyright 2006, RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid.

Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid is het niet toegestaan:

- a) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b) dit door RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid uitgebracht rapport, c.q. de naam van het rapport of RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c) de naam van RIKILT - Instituut voor Voedselveiligheid te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

VERZENDLIJST

Voedsel en Waren Autoriteit, Den Haag (prof. dr. E.G. Schouten, drs. A. Jelsma, dhr. G.A. Lam)
Voedsel en Waren Autoriteit, Regio Oost (dr. ir. W. de Wit, dhr. H.J. Keukens, dhr. J.A.M. Geertsen, dr. K.M. Jonker, ing. J.C.M.M. van der Akker)
Voedsel en Waren Autoriteit, Regio Zuidwest (drs. B. van der Linden)
Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, Directie VD (mw. mr. A. Oppers, drs. A.J. Smolders, dhr. E. Klein, MA)
Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, Directie I & H (ing. W.J.C. Huisman)
Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, Directie IZ (drs. J.A.M. van Sluisveld, mw. drs. S. Beumer)
Algemene Inspectiedienst, Kerkrade (drs. E.M.J. van Houten, dhr. C.J.A.M. van der Meijs, mr. J.A.H. Urlings, ing. A.R.M. Pruijn, drs. A. Ottevanger, dhr. A.G. Boogmans)

INHOUDSOPGAVE	blz.
SAMENVATTING	3
AFKORTINGEN	4
1 INLEIDING	5
2 WATERVASTHOUDENDE EIWITTEN/EIWITHYDROLYSATEN	7
2.1 Eiwit(hydrolysaten)	7
2.2 Tumbleren	7
2.3 Injecteren	8
3 SCREENINGS- EN IDENTIFICATIE METHODEN	9
3.1 Histologie	9
3.2 PCR	9
3.3 Immunoassay	10
3.4 Hydroxyproline bepaling	11
3.4.1 EU bepalingsmethode volgens ISO 3496:1994 (E)	11
3.4.2 Enzymatische analyse	11
3.4.3 Nabij infrarood transmissie spectroscopie	12
3.4.4 HPLC	12
3.5 Crosslinks en specifieke peptiden	12
3.5.1 Crosslinks	12
3.5.1.1. HPLC	13
3.5.1.2. ELISA	13
3.5.2 Specifieke peptiden	13
3.6 Massaspectrometrie	13
3.6.1 ESI-MS	14
3.6.2 MALDI-TOF MS	14
3.7 NMR/MRI	15
3.8 Gaschromatografie	16
4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	17
5 REFERENTIES	19
 BIJLAGEN	
Bijlage 1	Inspecties (2000-2005)
Bijlage 2	Wetgeving

SAMENVATTING

Bij verschillende inspecties binnen de EU bleek de afgelopen 5 jaar dat er op grote schaal water en watervasthoudende stoffen worden toegevoegd aan vlees en vis, en producten die daarvan worden bereid. Deze watervasthoudende stoffen kunnen eiwitten/eiwithydrolysaten zijn afkomstig van o.a. bepaalde dierlijke bijproducten, melk en soja. Deze toevoegingen zijn niet toegestaan bij vers vlees en verse visproducten maar wel toegestaan bij een vleesproduct, vleesbereiding of verwerkt visproduct indien de additieven op de verpakking vermeld worden. Deze vermelding bleek echter regelmatig te ontbreken of onjuist te zijn. Bij het gebruik van niet gedeclareerde en/of niet toegestane soortvreemde eiwitten als watervasthoudende stof kan een mogelijk gevaar voor de voedselveiligheid en/of volksgezondheid niet worden uitgesloten. Daarnaast kan het gebruik van runder- en varkenseiwitten vanuit ethische en godsdienstige overwegingen ongewenst zijn en roepen deze praktijken binnen de EU in het kader van eerlijkheid in de handel steeds meer weerstand op. Voor het waarborgen van veilige vlees- en vis(producten), correcte etikettering en een juiste controle van pluimveevlees in het kader van EU-regelgeving zijn goede screenings- en identificatiemethoden voor toegevoegde eiwitten/eiwithydrolysaten noodzakelijk. Daartoe is een inventariserend literatuuronderzoek uitgevoerd naar de geschiktheid van een reeks analysetechnieken hiervoor. Hieruit bleek dat histologisch onderzoek goed toepast zou kunnen worden voor het screenen en mogelijk typeren van toegevoegde eiwitten/hydrolysaten, gaschromatografie voor het screenen en mogelijk bepalen van de herkomst van toegevoegde collageen eiwitten/hydrolysaten en massaspectrometrie (met name LC-MS/MS en LC MALDI TOF TOF) voor het identificeren van toegevoegde eiwitten/hydrolysaten in het algemeen. Het verdient de aanbeveling om deze technieken praktisch te toetsen op hun geschiktheid.

AFKORTINGEN

BSE	Bovine spongiforme encephalopathie
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ESI	Electrospray ionisation
FSA	Food standards agency
GC	Gaschromatografie
HPLC	High performance liquid chromatography
LC-MS	Liquid chromatography-massaspectromie
MALDI TOF	Matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight
MRI	Magnetic resonance imaging
MS	Massaspectrometrie
NMR	Nuclear magnetic resonance
PCR	Polymerase chain reaction
RIA	Radio Immunosorbent assay

1 INLEIDING

Uit verschillende inspecties/onderzoeken die er binnen de EU door verscheidene Europese instanties zijn uitgevoerd bleek dat er de afgelopen 5 jaar op grote schaal water en watervasthoudende stoffen zijn toegevoegd aan vlees en vis, en producten die daarvan worden bereid (Bijlage 1) [1]. De vlees- en visindustrie stellen dat het toevoegen gebeurt om de smaak van de producten te verbeteren en het product malser en sappiger te maken. In feite kan men door die toevoegingen het product ook goedkoper aanbieden aan de consument. Bij de verschillende inspecties werden percentages toegevoegd water tot 60% gemeten en werd er regelmatig minder vlees/vis aangetroffen in het product dan was vermeld op de verpakking. Om grote hoeveelheden water in het product vast te houden kunnen onder andere eiwitten/eiwithydrolysaten als watervasthoudende middelen worden gebruikt (Hoofdstuk 2). Deze eiwitten/hydrolysaten werden regelmatig aangetroffen tijdens de inspecties en kunnen afkomstig zijn van o.a. melk, soja en bepaalde dierlijke bijproducten (o.a. van rund, varken, kip etc.) zoals collageen (EG verordening 853/2004 houdende vaststelling van specifieke hygiënevoorschriften voor levensmiddelen van dierlijke oorsprong), maar ook bloed. Collageen omvat vezelachtige eiwitten die men aantreft in bindweefsels zoals huiden, botten, pezen, kraakbeen, hoornvlies, bloedvaten en tanden. De laatste trend is bloed afkomstig van varkens- en rundslachterijen te “processen” en terug te voeren in vlees en vleesproducten. Dit gebeurt volgens de industrie om het vlees te kleuren, de smaak te verbeteren, en het vleeseiwitgehalte te verhogen. Bijkomend effect is dat hierdoor 10 tot 30% extra water kan worden gebonden.

Het is verboden om water en eiwit(hydrolysaten) toe te voegen aan producten die op de markt als vers vlees of vers visproduct worden aangeboden (Bijlage 2). De toevoegingen zijn daarentegen wel toegestaan indien het een vleesproduct, vleesbereiding of verwerkt visproduct betreft. In dit geval dienen de additieven echter wel op de ingrediëntenlijst geplaatst te worden. De aanwezigheid van toegevoegde eiwitten en de diersoort waar deze eiwitten hun herkomst vinden dienen ook te worden vermeld op het etiket. De naam waaronder het voedingsmiddel wordt verkocht mag namelijk niet misleidend zijn voor de consument. Tijdens de inspecties/onderzoeken binnen de EU bleek desondanks dat vermelding van de bovengenoemde additieven op de ingrediëntenlijst en/of het etiket vaak ontbrak of onjuist was (Bijlage 1). Dit wordt bevestigd door VWA die de juistheid van etiketten controleert en bij afwijkingen kan optreden. Uit een VWA rapport van april 2005 blijkt namelijk dat de hoeveelheid water en additieven in pluimveevlees niet altijd juist worden vermeld op de verpakking [2]. De VWA eist daarom correcte etikettering.

Door de afwezigheid van vermelding op het etiket van soortvreemde eiwitten (Bijlage 1) kan een consument die allergisch is voor een soortspecifiek eiwit een risico lopen indien hij/zij onwetend een vlees- of visproduct koopt waaraan dit specifieke eiwit is toegevoegd. Dit betekent bijvoorbeeld dat een consument die allergisch is voor varkensvlees een risico loopt indien hij/zij een kipproduct koopt waaraan varkenseiwitten zijn toegevoegd. Ditzelfde geldt voor iemand die allergisch is voor melk en onwetend paling koopt waarin melkeiwitten zijn verwerkt. Bij het gebruik van watervasthoudende eiwitten/eiwithydrolysaten geproduceerd uit bepaalde dierlijke bijproducten zijn ook andere potentiële gevaren voor de voedselveiligheid en/of volksgezondheid niet uit te sluiten. Met name het gebruik van rundermateriaal als bron voor eiwit(hydrolysaten) vereist een goede ketenbewaking zodat de herkomst van de runderen altijd bekend is (EG Verordening 2074/2005). Op deze manier is een potentiële kans op verspreiding van BSE uit te sluiten. Veilig rundermateriaal is ook sterk afhankelijk van de slachtprocedure [3]. De Scientific Steering Committee van de Europese Commissie stelt dat op basis van de huidige kennis het gebruik van koeienhuiden voor de productie van collageen en gehydrolyseerde eiwitten geen BSE risico met zich meebrengt mits besmetting via potentieel geïnfecteerde materialen (hersenen, ruggenmerg, bloed) wordt vermeden [4, 5].

Het toevoegen van soortvreemde eiwitten aan vlees- en visproducten zonder correcte etikettering is ook bezwaarlijk vanwege ethische en godsdienstige gronden. Moslims eten geen varkensvlees ('Halal' voeding) en wensen daarom ook geen varkenseiwitten in bijvoorbeeld kip. Hindoes daarentegen wensen

geen rundermateriaal aan te treffen. Ondanks dat het niet verboden is om water en eiwit(hydrolysaten) toe te voegen ontstaat er binnen de EU steeds meer weerstand tegen deze praktijken. Met name consumentenorganisaties en Food Standard Agencies in Europa willen deze praktijken verbieden of beperkingen opleggen (mondeling medegedeeld) [1]. Volgens deze instanties wordt de consument teveel misleid, blijven allergie gevaren bestaan, is er sprake van oneerlijkheid in handel binnen de EU en is er oneerlijke (prijs)concurrentie met biologische vleesproducten.

Het RIKILT voert in Nederland analyses uit ter controle van de uitvoeringsbepalingen voor de vaststelling van handelsnormen voor pluimveevlees (EG verordening nr. 1072/2000 tot wijziging van verordening (EEG) nr. 1538/91 houdende uitvoeringsbepalingen van verordening (EEG) nr. 1906/90 van de raad tot vaststelling van handelsnormen voor vlees van pluimvee). Dit gebeurt in opdracht van de AID m.b.t. de binnenlandse productie, en in opdracht van de VWA m.b.t. de importcontrole. Deze analyses betreffen bepalingen van de percentages vocht (NEN-ISO 1442) en stikstof (NEN-ISO 937) in pluimveevlees waarna de verhouding water/eiwit wordt bepaald. Het RIKILT is recent tevens aangewezen als National Reference Laboratory (NRL) voor de controle van het watergehalte in pluimveevlees (EG verordening 433/2006 tot wijziging van verordening (EEG) nr. 1538/91 t.a.v. de referentielaboratoria voor de controle op het watergehalte in vlees van pluimvee). De voorgeschreven bepaling voor het watergehalte is geschikt voor het opsporen van toegevoegd water maar schiet tekort in het geval er ook eiwit is toegevoegd. Bij de controle op de binnenlandse productie in 2005 zijn door het RIKILT, op basis van de voorgeschreven analysemethoden, geen afwijkende water/eiwit verhoudingen gevonden. Toch sluit dit de aanwezigheid van toegevoegd water en eiwit niet uit mede gezien het feit dat in Nederland water en watervasthoudende stoffen worden toegevoegd aan pluimveevlees [2]. Deze ingrediënten kunnen echter alleen worden gedetecteerd indien niet alleen de water/eiwit verhouding wordt bepaald maar ook het gehalte aan waterbindend eiwit(hydrolysaat). De VWA voerde hiervoor in het verleden bij inspecties op pluimveevlees de hydroxyproline bepaling uit (Hoofdstuk 3.4).

Uit bovenstaande blijkt dat voor het waarborgen van veilige vlees- en visproducten, juiste etikettering en controle van het watergehalte in pluimveevlees goede screenings- en identificatiemethoden voor watervasthoudende eiwitten en/of eiwithydrolysaten noodzakelijk zijn. Daartoe is een inventariserend literatuuronderzoek uitgevoerd naar de geschiktheid van een reeks technieken hiervoor. De resultaten staan vermeld in Hoofdstuk 3. Ter ondersteuning van dit hoofdstuk wordt in Hoofdstuk 2 nadere toelichting gegeven over watervasthoudende eiwitten/hydrolysaten en de technieken die worden gebruikt om water en eiwit(hydrolysaten) in het vlees- of visproduct te brengen.

2 WATERVASTHOUDENDE EIWITTEN/EIWITHYDROLYSATEN

2.1 Eiwit(hydrolysat)en

Eiwithydrolysat)en zijn mengsels van polypeptiden, peptiden en aminozuren. Ze worden verkregen door peptide bindingen in eiwitten te verbreken zodat peptiden met verschillende groottes en aminozuren worden gevormd. Die peptide bindingen zijn te verbreken met behulp van proteases, via een hittebehandeling of zuurbehandeling, of een combinatie van behandelingen. De eigenschappen van de te verkrijgen hydrolysat)en zijn afhankelijk van het originele eiwit, en de manier en mate van hydrolyse. Afhankelijk van het doel waarvoor de hydrolysat)en uiteindelijk gaan dienen wordt een bepaald type hydrolyse gekozen. Voor bijvoorbeeld babyvoeding en sportvoeding heeft hydrolyse via een protease de voorkeur omdat bij een zuurbehandeling de aminozuren cysteïne en methionine oxideren, serine en threonine afbreken, en glutamine en asparagine worden omgezet in glutaminezuur en asparaginezuur [6]. Op deze manier verkrijgt men hydrolysat)en met een mindere eiwitkwaliteit en lagere biologische waarde. Men wil hier juist eiwithydrolysat)en gebruiken vanwege de hoge voedingswaarde (beter verteerbaar, minder allergen), en functionele (o.a. beter oplosbaar, stabiel) en biologische eigenschappen (o.a. regulering immuunsysteem, maagdarmsfuncties, bloeddruk).

Voor het binden van water in vlees en vis worden andere eisen gesteld aan de eiwithydrolysat)en. De oorspronkelijke eiwitten kunnen dan afkomstig zijn van onder andere rund- en varkensbijproducten, caseïne (melkeiwit) en soja. In het geval van de dierlijke bijproducten (verkregen bij het slachten van het dier) wordt veelal gebruik gemaakt van collageen. Collageen omvat vezelachtige eiwitten die men aantreft in bindweefsels zoals huiden, botten, pezen, kraakbeen, hoornvlies, bloedvaten en tanden. Het eiwit bestaat uit drie helices waarvan elke helix uit ca. 1000 aminozuren bestaat [7]. De aminozuursequentie van collageen is zeer specifiek met om de drie aminozuren een glycine (35%). Andere voorname aminozuren zijn alanine (11%) en proline (12%). Daarnaast bevat collageen als één van de weinige eiwitten zowel hydroxyproline (9%) als hydroxylysine (enkele %) [8]. Aromatische, heterocyclische en zwavel bevatende aminozuren zijn over het algemeen afwezig [9]. Voor het verkrijgen van eiwithydrolysat)en uit dierlijke bijproducten zoals runderhuiden wordt over het algemeen een zuurbehandeling (pH 1-2), alkalische behandeling (pH > 11), en/of hittebehandeling (140 °C, 3.6 bar, 30 min.) toegepast [4].

Naast collageen eiwitten zijn er ook collageenvrije eiwitten uit dierlijke bijproducten te gebruiken voor het binden van water in vlees en vis. Deze eiwitten kunnen gewonnen worden uit varkens- en runderbloed. Na toevoeging van citraat om klontervorming tegen te gaan wordt het bloed gecentrifugeerd zodat uiteindelijk twee fracties ontstaan: plasma en rode bloedcellen met hemoglobine [10]. Het plasma wordt gepasteuriseerd, geconcentreerd en nadien bevroren of gedroogd. Uit hemoglobine wordt globine afgescheiden waardoor een hoog viskeus eiwit ontstaat. Zowel het plasma als globine vertonen een hoge waterbinding capaciteit.

2.2 Tumblen

Het tumblen wordt volgens de industrie toegepast om de malsheid en het waterbindend vermogen van vlees te verbeteren [11-14]. Bij dit batch proces wordt vlees in een cilindervormige trommel geplaatst waarin zich een roerwerk bevindt bestaande uit een verticale as met daaraan loodrecht bevestigd enkele mengarmen [15]. Nadat water en additieven zijn toegevoegd wordt het vlees vervolgens bij een temperatuur van ca. 5 °C rondgedraaid (gemasseerd). De duur en snelheid van het ronddraaien is afhankelijk van het type vlees maar varieert tussen de 15 minuten en 24 uur (kipfilet 1-1,5 uur; gekookte ham 12-18 uur) [11, 13, 14, 16]. Door de mechanische behandeling worden de spieren versoepeld, spiercellen doorbroken en celmembranen beter doorlaatbaar. Het waterbindend vermogen van vlees is voor 65% afhankelijk van de myofibrillaire eiwitten. Door het tumblen worden deze eiwitten

gemobiliseerd. Dit eiwit kan tussen de cellen door beter zwellen, aan het spieroppervlak beter water binden en een kleefeffect tot stand brengen tussen de spieren onderling. Toegevoegde ingrediënten worden op deze manier geabsorbeerd. Een vacuüm trekken tijdens het tumblen vergemakkelijkt de opname. Met tumblen kan echter maar een beperkte hoeveelheid water worden opgenomen door het vlees. Daarnaast is het een langdurig proces omdat het water in het vlees moet diffunderen. Vanwege dit langdurige proces neemt de kans op vleesbederf toe. De vleesproducten zien er na het tumblen waterig en opgezwollen uit.

2.3 Injecteren

Bij dit proces worden water en additieven via een injectienaald in vlees of vis gebracht. Dit proces vindt normaliter plaats op de productielijn. De injectie systemen kunnen variëren van kleine pilot-plant injectoren met 1 naald tot grotere injectoren met meerdere naalden [17, 18]. Het te kiezen injectie systeem is afhankelijk van welk type vlees/vis en welk deel van het vlees behandeld moet worden. Stukken rundvlees en pluimveevlees met zwak bindweefsel worden normaliter geïnjecteerd in plaats van getumbeld omdat dit vlees kan breken in een tumble apparaat. Tijdens het injecteren wordt de vleesstructuur aangetast. Met injecteren kunnen binnen een paar seconden grote hoeveelheden water aan vlees of vis worden toegevoegd. Om het water in het product te behouden zijn watervasthoudende stoffen zoals eiwitten/eiwithydrolysaten noodzakelijk. Deze worden dan ook samen met het water toegevoegd. Uiteindelijk wordt er een hogere productopbrengst en malser en sappiger product verkregen. Na het proces is het vlees- of visproduct druipnat en is soms blaarvorming waar te nemen [16].

3 SCREENINGS- EN IDENTIFICATIE METHODEN

3.1 Histologie

Histologisch onderzoek is microscopisch onderzoek aan weefsels: het geeft informatie over de morfologie van cellen en organen door middel van het kleuren van o.a. specifieke celsystemen, vetten, eiwitten, koolhydraten, antigenen, receptoren, enzymen, metalen en pigmenten. Aangezien ziekteprocessen, voeding, dierbehandelingsmiddelen en milieutoxinen hun weerslag hebben op het functioneren en de morfologie van weefsels kan dit via histologisch onderzoek achterhaald worden. Voor de Consumentenbond doet de afdeling histologie binnen het RIKILT soms onderzoek naar de samenstelling van vlees(waren): ingrediënten (vlees, bindweefsel, klierweefsel, zenuwweefsel etc.), kwaliteit (versheid) en toevoegingen zoals zetmeel, kruiden of watervasthoudende stoffen. Er wordt dan gebruik gemaakt van formaline gefixeerd weefsel, wat ingebed wordt in paraffine. Vervolgens worden coupes gesneden en gekleurd met heamtoxyline-eosine en zonodig met andere kleuringen (bijvoorbeeld Gram voor bacteriën, Weigert van Giesson voor bindweefsel, etc.). Normaal vlees heeft een vezelstructuur met perifeer gelegen kernen. Indien water is toegevoegd aan het vlees zijn bredere stroken in het spierweefsel te zien waarin eiwitneerslag zichtbaar is (waarschijnlijk watervasthoudende stoffen in de vorm van hydrolysaat). Dit soort eiwitneerslag is soms ook te zien in de spiervezels. Als vlees wordt ingevroren dan vormen zich ijskristallen in de vezels. Na ontdooien zijn de overblijfselen van deze kristallen te zien als gaatjes in het spierweefsel. In dit soort gaten kunnen de eiwitten ook te zien zijn. In combinatie met immunoassays zouden de eiwitten tevens te typeren zijn. Histologisch onderzoek is relatief snel en eenvoudig toepasbaar. Nadeel is wel dat deze methode nog niet is gevalideerd voor bovenstaande toepassing. Middels onderzoek aan diverse soorten vlees (vers, ingevroren en ontdooid, getumbled, met en zonder eiwit(hydrolysaat)) zou eenvoudig een overzicht verkregen kunnen worden wat de verschillende bewerkingen voor histologische effecten geven. Als deze semi-kwantitatieve methode is gevalideerd zou deze toepasbaar zijn bij de controle op gebruik van watervasthoudende eiwitten/eiwit(hydrolysat)en in vlees en vis.

3.2 PCR

Vaak bevatten monsters te kleine hoeveelheden DNA om geanalyseerd te kunnen worden. Dankzij de Polymerase Chain Reaction (PCR)-techniek kan het DNA in een monster vermenigvuldigd worden. PCR bestaat in het algemeen uit 3 temperatuurstappen (1 cyclus) die 30-40 keer worden herhaald in een PCR apparaat [19]. Dit apparaat is een heel nauwkeurig verwarmings- en koelingsapparaat met daarin het reactiemengsel bestaande uit het DNA-monster en de ingrediënten die noodzakelijk zijn voor de reactie. Deze ingrediënten zijn losse nucleotiden (A's, T's C's en G's), korte enkelstrengs DNA moleculen (de zogenaamde primers) en het enzym *Thermus aquaticus* polymerase (Taq polymerase). Bij de eerste temperatuurstap (94-96 °C) vindt denaturatie van DNA plaats waarbij elke dubbele streng DNA zich splitst in twee enkelstrengs DNA ketens. Bij de tweede stap (45-65 °C) hechten primers aan de enkelstrengs DNA ketens. Bij de derde stap (72 °C) wordt uiteindelijk m.b.v. de nucleotiden en het polymerase de primer verlengd en wordt een nieuwe DNA keten verkregen. De hoeveelheid DNA groeit exponentieel per cyclus die doorlopen wordt. Het gehele proces kan qua tijdsduur variëren van 10-30 minuten (rapid cycle PCR) tot enkele uren.

Voor het gebruik van PCR moet men de exacte nucleotide sequentie van beide uiteinden van het op te sporen DNA weten. Elke PCR strategie zal dus afhankelijk zijn van de primers die geselecteerd worden en de kennis van de moleculaire structuur en DNA sequenties die gebruikt worden. PCR is ook afhankelijk van de kwaliteit en zuiverheid van het DNA. Het DNA kan namelijk beschadigd zijn door blootstelling aan warmte, lage pH, nucleases welke hydrolyse veroorzaken en enzymatische degradatie.

De kwaliteit van DNA dat geïsoleerd is uit verwerkte voedingsmiddelen en bepaalde agrarische matrices is meestal laag en de beschikbare specifieke sequenties voor het hechten van de primers kunnen kort zijn [20]. Daarnaast kunnen verschillende verontreinigingen in de voedingsmatrices de DNA zuiverheid aantasten.

PCR werd en wordt regelmatig toegepast voor het kunnen traceren van soortvreemd DNA in verschillende vlees- en visproducten (Bijlage 1). Op deze manier kan men indirect de aanwezigheid van soortvreemde eiwitten aantonen. De gevoeligheid van de PCR-methode is zeer belangrijk. De PCR-methode die de Britse FSA heeft toegepast tijdens een inspectie in 2001 was naar eigen zeggen waarschijnlijk niet gevoelig genoeg om runder- en varkens DNA te kunnen detecteren in kippenvlees. Het feit dat een jaar later de Ierse FSA met gebruik van een gevoeliger PCR-methode in tal van pluimveevleesproducten runder- en varkens-DNA detecteerde bevestigde dit vermoeden. Op dit moment zou men het gebruik van PCR in twijfel kunnen trekken. Eiwitleveranciers zouden namelijk preparaten kunnen leveren zonder sporen DNA [21, 22]. Het DNA zou af te breken zijn via een nieuwe technologie waardoor de PCR-analyse altijd een negatief resultaat zal geven.

3.3 Immunoassay

Immunoassays maken gebruik van het feit dat men antilichamen kan maken die zeer specifiek bepaalde stoffen kunnen herkennen en binden. Deze antilichamen worden over het algemeen aangemaakt in proefdieren na injectie met een bepaalde component/doelstof (antigen). Bij de Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) wordt het antilichaam geadsorbeerd op een vaste drager. Het antigen in oplossing wordt vervolgens over de vaste drager geleid zodat het kan binden met het antilichaam. Omdat een dergelijke binding niet waarneembaar is wordt er een zogenaamde tracer voor detectie gebruikt. De tracer is het betreffende antigen geconjugeerd aan een enzym en zal, wanneer hij tegelijkertijd met het te analyseren monster met antigen wordt toegevoegd, concurreren om bindingsplaatsen op het antilichaam. De binding van de tracer aan het antilichaam kan vervolgens via toevoegen van een bepaald substraat spectrofotometrisch worden aangetoond. De enzymatische omzetting van het substraat is namelijk een kleurreactie. Indirect meet men zo de aanwezigheid van het antigen in het te analyseren monster.

Immunoassays hebben als voordeel dat er snel gescreend kan worden op bepaalde componenten. Daarnaast zijn immunoassays over het algemeen gevoelig en eenvoudig uit te voeren. Een van de beperkingen is echter dat het antilichaam zich soms ook aan andere stoffen bindt [23]. Vaak gaat het hierbij om stoffen met structurele verwantschap met de te onderzoeken stof. Dit noemt men kruisreactiviteit. De mate van kruisreactiviteit in een commercieel verkrijgbare immunoassay wordt gewoonlijk vermeld in de bijsluiting. Men kan zowel zeer specifieke immunoassays als ook groepspecifieke assays commercieel verkrijgen. Beide typen kunnen bruikbaar zijn afhankelijk van het doel waarvoor ze gebruikt dienen te worden. Behalve de kruisreactiviteit heeft de immunoassay ook andere beperkingen zoals het feit dat de matrix effect heeft op de assay en de analyse semi-kwantitatief is.

Een immunoassay kan gebruikt worden om voedingsproducten te screenen op de aanwezigheid van bepaalde eiwitten [23-25]. De geschiktheid van een immunoassay voor het detecteren van watervasthoudende eiwitten in vlees- en visproducten is echter afhankelijk van de grootte van de te detecteren moleculen. De watervasthoudende eiwitten kunnen grotendeels gehydrolyseerd zijn waardoor het mogelijk is dat de moleculen te klein zijn en het antilichaam niet kan binden. Daarnaast kan de mate waarin het eiwit gedenatureerd is effect hebben op de assay.

3.4 Hydroxyproline bepaling

Bij een aantal inspecties is gebruik gemaakt van de hydroxyproline bepaling om de hoeveelheid toegevoegd eiwit(hydrolysaat) in pluimveevlees te bepalen (Bijlage 1). De hoeveelheid van dit specifieke aminozuur is namelijk een maat voor de hoeveelheid collageen dat gebruikt kan worden als bron voor (gehydrolyseerde) eiwitten (Hoofdstuk 2). Collageen bevat ca. 9% hydroxyproline [8]. Vlees zelf bevat ook hydroxyproline; voor magere kippenborst is dat gehalte 0.08% [26]. Tijdens verschillende inspecties werden echter veel hogere hydroxyproline gehalten gemeten (bijv. 0.44%) (Bijlage 1). De kanttekening dient hier gemaakt te worden dat hydroxyproline niet uitsluitend in collageen voorkomt, maar bijvoorbeeld ook in hydroxyproline-rijke glycoproteïnen uit planten. Een voorbeeld hiervan zijn arabinogalactan eiwitten die ook in plantaardige voedingsingrediënten zoals arabisch gom en arabinogalactan kunnen voorkomen.

3.4.1 EU bepalingsmethode volgens ISO 3496:1994 (E)

Voordat het hydroxyproline gehalte gemeten kan worden dient het vleesmonster eerst voorbereid te worden. Het monster wordt daartoe in blokjes gesneden en vacuüm verpakt, alvorens het wordt verhit bij 70 °C gedurende 30 minuten. Na afkoeling wordt het monster gemalen en gehomogeniseerd in een vleesmolen. De vleesmatrix wordt vervolgens verder geopend op moleculaire schaal door het monster te hydrolyseren onder zure condities. Hierbij worden individuele aminozuren vrijgemaakt voor verdere analyse. De hoeveelheid hydroxyproline in het hydrolysaat wordt specifiek geoxideerd door toegevoegd chloramine-T. Het hierbij gevormde pyrrool wordt gekleurd met p-dimethyl aminobenzaldehyde. De kleurintensiteit van het reactieproduct van beide stoffen is een maat voor de aanwezige hoeveelheid hydroxyproline in het originele monster. De kleurintensiteit wordt gemeten met behulp van een spectrofotometer bij een golflengte van 558 nm.

Afgezien van de voorbereidingsstappen is de hydroxyproline bepaling een relatief snelle en eenvoudige methode voor het screenen op de aanwezigheid van eiwit(hydrolysat) afkomstig van collageen. De methode screent echter niet op (gehydrolyseerde) eiwitten van andere bronnen dan collageen die ook gebruikt kunnen worden als watervasthoudende stof. Daarnaast is de methode niet dierspecifiek. Een andere beperking van de methode is dat na het behandelen van de monstmatrix het hydrolysaat al gekleurd kan zijn. Om de kleurintensiteit van het gekleurde reactieproduct toch te kunnen waarnemen dient hiervoor gecorrigeerd te worden middels een (goede) blanco meting. Ook is het mogelijk om het hydrolysaat op te schonen d.m.v. een extra filtratiestap en eventueel in combinatie met gebruik van tinchloride tijdens de hydrolyse. Deze stappen kunnen worden toegepast voordat de kleuring wordt uitgevoerd.

De bovenstaande kleurreactie voor de hydroxyproline bepaling wordt in de klinische chemie ook toegepast als indicator voor botafbraak omdat de botmatrix collageen bevat en collageenaafbraakproducten vrijkomen bij botafbraak. Een bekende kant-en-klaar assay voor hydroxyproline wordt bijvoorbeeld door Organon-Teknika onder de handelsnaam Hypronosticon TM op de markt gebracht.

3.4.2 Enzymatische analyse

Bovenstaande methode heeft als potentieel nadeel dat de gevormde kleurstof na verloop van tijd geoxideerd kan worden. Bovendien kan de vorming van andere gekleurde verbindingen de gevoeligheid voor hydroxyproline beïnvloeden. Drawert en Barton [27] vonden een alternatieve hydroxyproline bepaling waarbij enzymen uit de bacteriën *Alcaligenes* sp. en *Pseudomonas ovalis* worden gebruikt. De vrijkomende protonen bij deze enzymatisch gekatalyzeerde reacties dienen via phenazine methosulfaat (PMS) overgebracht te worden naar jodiumnitrotetrazolium chloride (JNTC), waarna het gevormde formazan spectrofotometrisch bij 492 nm gedetecteerd kan worden:

L-hydroxyproline	↔	D-allo-hydroxyproline
D-allo-hydroxyproline	→	4-hydroxy-1-pyrrolin-2-carbonzuur + 2 H ⁺
PMS + 2 H ⁺	→	PMS _{gereduceerd}
PMS _{gereduceerd} + JNTC	→	PMS + Formazan

Deze enzymatische methode is echter relatief duur en matrixeffecten zijn niet uit te sluiten.

3.4.3 Nabij infrarood transmissie spectroscopie

Voor on-line fabriekscontrole van vleesproducten kan nabij infrarood transmissie spectroscopie (NIT) gebruikt worden voor het bepalen van vocht, vet, eiwit en hydroxyproline [28]. Bij deze techniek wordt een monster beschenen met een sterke lichtbron. Het deel van het licht dat door het monster schijnt wordt opgevangen door een zeer gevoelige detector die in staat is om zowel de hoeveelheid licht als ook de specifieke golflengte van het licht te meten. Zo wordt snel in discrete stappen van enkele tienden van nanometers per keer de intensiteit gemeten van het licht bij een golflengte tussen 800 en 1100 nm. Het resultaat is een grafiek van de intensiteit van het licht als functie van de golflengte, het absorptiespectrum. Niet al het licht dat wordt ingestraald komt bij de detector. Afhankelijk van de moleculen dat het licht op zijn weg door het monster tegenkomt, worden karakteristieke delen van het licht bij specifieke golflengten geabsorbeerd.

Door opgenomen absorptiespectra van veel monsters met bekende samenstelling (bepaald met een externe referentiemethode) met elkaar te vergelijken, kunnen gebieden in de spectra worden aangewezen die veel veranderen als gevolg van de samenstelling. Met behulp van de multivariabele data analyse kunnen deze spectra dienen als ijking voor het bepalen van de samenstelling van onbekende monsters.

De methode is succesvol gebruikt voor het bepalen van vocht, vet en eiwit in rund- en varkensvlees. Echter voor het bepalen van de hoeveelheid hydroxyproline bleek zowel de reproduceerbaarheid als herhaalbaarheid van de methode niet toereikend [28].

3.4.4 HPLC

Eiwithydrolysaten van vleesproducten kunnen tevens worden geanalyseerd met behulp van High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Het monster wordt bij HPLC meegevoerd in een vloeibare fase (loopmiddel) langs een stationaire fase, welke is geplaatst in een kolom. De interactie tussen de te analyseren moleculen en de stationaire fase zorgt voor verschillen in verblijftijdspreading op de kolom waardoor scheiding bewerkstelligd wordt. De interactie is over het algemeen gebaseerd op molecuulgrootte, ionogene interactie of van der Waals interactie (hydrofobe en hydrofiele interactie). Voor de hydroxyproline bepaling door middel van HPLC wordt gebruik gemaakt van de secundaire amines aanwezig in hydroxyproline en proline [29]. Deze chemische handvaten worden gederivatiseerd met de fluorescente marker 7-chloro-4-nitro-benzofurazan (NBD) waarna ze gescheiden kunnen worden met behulp van een apolaire HPLC kolom (reversed phase). Hydroxyproline-NBD en proline-NBD kunnen vervolgens gedetecteerd worden via een fluorescentiedetector (excitatie bij 465 nm, emissie bij 535 nm).

De HPLC methode is eenvoudig en relatief snel. Een juiste minimale concentratie fluorescente marker is daarentegen cruciaal voor een goede meting.

3.5 Crosslinks en specifieke peptiden

3.5.1 Crosslinks

Collageen moleculen bevatten specifieke "triple helix" structuren (Hoofdstuk 2). Deze helices zijn onderling verbonden door dwarsverbindingen die door "cross-linking" aminozuren gevormd worden. Deze "crosslinks" ontstaan na enzymatische vorming van reactieve aldehyden uit de zijketens van hydroxylysine of lysine residuen, die met andere aminozuur residuen uit naburige eiwitketens verder reageren en zo een covalente binding vormen. Hierdoor ontstaat een netwerk van crosslinks die de

collageenmoleculen aan elkaar binden en het weefsel stevigheid verlenen. Een tweetal van deze crosslinks zijn pyridinoline en deoxypyridinoline, die door de reactie van de zijketens van drie (hydroxy)lysine residuen gevormd worden. Deze crosslinks zijn stabiel bij zure hydrolyse en vertonen intrinsieke fluorescentie.

Een punt van aandacht kan de stabiliteit van de pyridinoline crosslinks zijn tijdens de productie van gelatine dat als afgeleid product van collageen ook als watervasthoudende stof toegepast kan worden. Voor de gelatine bereiding kunnen zowel zure (gelatine A) als basische condities (gelatine B) worden aangewend. Acil et al. isoleerden pyridinoline standaarden uit gelatine [30]. Cole en Roberts vermelden echter dat pyridinoline crosslinks in gelatine A voorkomen, maar labiel zijn bij een basische behandeling van collageen tijdens de gelatine B productie [31]. Tevens dient vermeld te worden dat de crosslinks niet tegen UV licht bestand zijn en onder invloed daarvan in de huid fotochemische reacties ondergaan [32]. In de klinische chemie wordt een assay voor deze crosslinks toegepast als indicator voor collageenaafbraak tijdens bot- en kraakbeenaandoeningen (bijvoorbeeld osteoporose). De ratio deoxypyridinoline/ pyridinoline kan tevens uitsluitsel geven over de herkomst van de weefsels (ratio is relatief hoog in het geval van bot). Zowel HPLC als ELISA assays zijn voor de bepaling van de crosslinks beschreven.

3.5.1.1. HPLC

Voor HPLC dient het eiwit eerst via zure hydrolyse te worden behandeld. Na hydrolyse kunnen collageen crosslinks zoals pyridinoline en deoxypyridinoline desgewenst van andere aminozuren worden voorgescheiden door chromatografie op cellulose, waarbij de crosslinks gebonden zullen blijven (bijvoorbeeld via vaste fase extractie). Met water kunnen de crosslinks vervolgens worden geëluëerd. Pyridinoline en deoxypyridinoline kunnen vervolgens worden gescheiden via reversed-phase HPLC (C18-kolom) of sterke kationenuitwisselings-chromatografie in combinatie met fluorescentie detectie [33, 34]. Electrochemische detectie is hierbij ook een optie. Standaarden voor pyridinoline zijn commercieel verkrijgbaar (Quidel, Ajinomoto).

3.5.1.2. ELISA

Op de markt zijn tevens ELISA's en Radio Immunosorbent Assays (RIA) verkrijgbaar. Dit zijn kits voor klinisch-chemische toepassing op humaan collageen. De antilichamen kunnen hierbij gericht zijn tegen zowel de pyridinoline crosslink zelf (Quidel's Metra-Pyd ELISA) als tegen de verschillende peptiden die door de crosslink bij elkaar gehouden worden (bijvoorbeeld Orion's ICTP RIA, Nordic Bioscience Crosslaps ELISA, Osteomark's NTX ELISA). Voor wat betreft het laatste dient de kanttekening te worden geplaatst dat de epitopen die herkend worden van kit tot kit kunnen verschillen, afhankelijk van de protease waarmee ze uit de collageenketens zijn vrijgemaakt. Tevens zijn deze kits vrij kostbaar. Ze bieden daarentegen het voordeel dat relatief weinig voorbereiding van de monsters nodig is. Tevens zouden ze de gecrosslinkte peptiden kunnen blijven herkennen als de pyridinoline crosslink zelf chemisch veranderd is door bijvoorbeeld een alkalische behandeling of oxidatie. Recente literatuur vermeldt experimentele assays tegen gecrosslinkte peptiden uit dierlijk collageen [35, 36].

3.5.2 Specifieke peptiden

Recente literatuur vermeldt ook de klinisch-chemische meting van dipeptiden die als afbraakproducten van collageen ontstaan, zoals bijvoorbeeld het dipeptide proline-hydroxyproline, zonder dat een voorafgaande hydrolyse nodig is. Dit zou een gevoeliger parameter voor collageen kunnen zijn dan hydroxyproline. Zowel HPLC als GC bepalingen zijn hierbij mogelijk [37].

3.6 Massaspectrometrie

Massaspectrometrie (MS) is een techniek waarmee een molecuul geïdentificeerd kan worden aan de hand van de molecuulmassa en het patroon van massa's van molecuulfragmenten (peptiden en aminozuren) die vervaardigd kunnen worden. Bij MS aan peptiden en eiwitten worden zwakke ionisatie technieken gebruikt om intacte gasfase ionen te verkrijgen. De Matrix-Assisted Laser Desorption

Ionisation (MALDI) en ElectroSpray Ionisation (ESI) ionisatie technieken worden op dit moment veelal toegepast bij het analyseren van biomoleculen [38-41]. Na ionisatie worden de ionen gescheiden op basis van hun massa/ladingsverhouding (m/z) waarna detectie volgt. In een MS-spectrum wordt de intensiteit van iedere m/z weergegeven.

3.6.1 ESI-MS

Bij ESI-MS wordt het monster opgelost in een vluchtig oplosmiddel. De oplossing wordt vervolgens via een dunne metalen capillair (naald) naar de massaspectrometer geleid [42]. Doordat er een hoge elektrische potentiaal (2-5 kV) tussen de capillair en ingang van de massaspectrometer is gezet worden kleine geladen druppeltjes gevormd tijdens het verlaten van de capillair. Door verdamping van het oplosmiddel worden de geladen druppeltjes steeds kleiner totdat uiteindelijk de te analyseren moleculen geladen geraken. De gevormde meerwaardig geladen ionen komen uiteindelijk in het hoge vacuüm van de massaspectrometer terecht waar ze worden gescheiden op basis van de m/z ratio [43]. Met ESI kunnen negatieve of positieve ionen verkregen worden. Eiwitten en peptiden worden meestal als positieve ionen geanalyseerd.

Doordat er meerwaardig geladen ionen worden gevormd bij ESI, kan er aan grote moleculen MS gedaan worden met relatief eenvoudige massa-analysatoren met een beperkt massa bereik. De meest gebruikelijke massa-analysatoren zijn een tripel quadropool, quadropool-TOF en ion-trap. ESI biedt een makkelijke en directe koppeling met scheidingstechnieken zoals HPLC (LC-MS). Op deze manier kunnen eiwitten en/of peptiden in een complex monster worden voorgescheiden. De uiteindelijke MS spectra kunnen desondanks behoorlijk complex zijn vanwege de aanwezigheid van meerwaardig geladen peptide/eiwit ionen. Software is noodzakelijk om de bijbehorende molecuulmassa van het betreffende eiwit of peptide te berekenen (= deconvolutie). Bij ESI-MS is het achtergrond signaal in de MS spectra erg laag en de ontwikkeling van nano-LC-MS heeft geleid tot nog betere signaal-ruis verhoudingen [44]. De nadelen bij nano-LC-MS zijn echter relatief snel verstoppingen in de te gebruiken LC capillair en een instabiele spray. Via ESI-MS kan uiteindelijk zeer nauwkeurig de molecuulmassa worden bepaald (0.01-0.001%). Daarnaast is het een kwantitatieve methode die echter wel gevoelig is voor zouten.

Omdat het zeer moeilijk is om aan de hand van alleen de molecuulmassa een eiwit toe te kennen, kan een LC-MS peptide patroon uitkomst bieden. Daartoe wordt het eiwitmonster eerst in peptide-brokstukken geknipt (digesteren) waarna het peptidemengsel via LC-MS wordt geanalyseerd. In het uiteindelijke LC-MS peptide patroon kan vervolgens gericht gezocht worden naar al bekende peptiden met een specifieke massa en retentietijd (targeted LC-MS). Indien men bijvoorbeeld wil weten of een bepaald vlees- of visproduct collageen eiwithydrolysaten bevat kan in het te verkrijgen peptide patroon gericht gezocht worden naar specifieke collageen peptiden. Indien men (nog onbekende) eiwitten/hydrolysaten in het algemeen wil identificeren in vlees of vis zullen de reeds verkregen peptiden gefragmenteerd dienen te worden (MS/MS) waarna de aminozuursequentie kan worden achterhaald (untargeted LC-MS/MS).

3.6.2 MALDI-TOF MS

Bij MALDI-MS worden eiwitten en/of peptiden samen met een UV absorberende substantie (de matrix) op een vlakke metalen plaat gebracht [41]. Na drogen en uitkristalliseren wordt het monster in het hoogvacuüm van de ionenbron van de MALDI massaspectrometer geplaatst. Daarna worden de biomoleculen met behulp van een laser geïoniseerd naar de gasfase. Via MALDI worden over het algemeen enkelvoudig geladen ionen gevormd [45]. MALDI wordt vaak gecombineerd met een vluchttijd 'Time of Flight' massaspectrometer (TOF-MS). De geïoniseerde biomoleculen worden hierbij versneld en een veldvrije buis ingejaagd, met de detector aan het andere eind. In deze buis worden de moleculen gescheiden op basis van hun massa. Kleine moleculen bereiken de detector sneller dan grote moleculen.

MALDI-TOF MS wordt in het algemeen gebruikt voor de detectie en karakterisering van eiwitten, peptiden, oligosacchariden en oligonucleotiden, met molecuulmassa's tussen de 400 en 400000 Da. Het staat beschreven als een eenvoudige, accurate (0.01%) en gevoelige methode waarbij detectie van 10^{-15}

tot 10^{-18} mol van een component in een zuiver preparaat mogelijk zou moeten zijn. Met MALDI-MS kunnen veel monsters binnen korte tijd geanalyseerd worden (ca. 100 monsters per uur) en de techniek is relatief ongevoelig voor zouten. MALDI-MS aan mengsels van eiwitten en peptiden kan uiteindelijk resulteren in complexe spectra waardoor het traceren van een bepaald ongewenst eiwit in een monster zeer moeilijk is. Een voorscheiding met bijvoorbeeld LC is dan gewenst. Het nadeel van MALDI-MS is echter dat een directe koppeling met LC zoals bij ESI-MS nog niet mogelijk is. Bij het analyseren van eiwitmonsters heeft MALDI-MS tevens als beperking dat het een semi-kwantitatieve methode is aangezien het detectiesignaal niet altijd evenredig toeneemt met de eiwitconcentratie. Ook ioniseren niet alle eiwitten even goed. Met name eiwitten die in kleine hoeveelheden aanwezig zijn in een eiwitmengsel en/of die een relatief hoge molecuulmassa hebben (> 25 kDa) ioniseren over het algemeen slechter. Daardoor is het moeilijk om kleine hoeveelheden van een relatief groot eiwit in een eiwitmengsel te detecteren. Om bovenstaande beperkingen te omzeilen en omdat het zeer moeilijk is om aan de hand van alleen de eiwitmolecuulmassa een eiwit te identificeren, kan een peptide fingerprint uitkomst bieden. Daartoe wordt het eiwitmonster eerst gedigesteerd waarna van het peptidemengsel een MALDI-TOF MS-spectrum verkregen kan worden (peptide fingerprint). Op basis van de verkregen fingerprint kan via een zoekprocedure in een database het eiwit geïdentificeerd worden. Hoe nauwkeuriger men de m/z van de peptiden weet te bepalen, des te betrouwbaarder is de identificatie. Op deze manier zou MALDI TOF MS een geschikte techniek kunnen zijn voor het snel en eenvoudig screenen van watervasthoudende eiwitten/eiwithydrolysaten in vlees- en visproducten. De laatste ontwikkelingen op MALDI MS gebied tonen de mogelijkheid tot LC MALDI TOF TOF [46]. Hoewel de LC hierbij nog steeds niet direct gekoppeld is aan de MALDI, is de overgang van LC naar MALDI wel volledig geautomatiseerd. Daarnaast kunnen via TOF TOF (=MS/MS) de peptiden worden gefragmenteerd zodat uiteindelijk de aminozuursequentie van een eiwit kan worden verkregen. Het toepassen van LC MALDI TOF TOF zou op deze manier kunnen bijdragen aan de identificatie van watervasthoudende eiwitten en/of eiwithydrolysaten in het algemeen in vlees en vis.

3.7 NMR/MRI

Sommige elementaire deeltjes zoals protonen gedragen zich als een soort tollende minimagneetjes. Deze eigenschap heet spin welke in een magneetveld kan worden gericht. Met pulsen radiostraling kan de richting van een spin heel precies worden gedraaid. Deze procedure brengt de spin aan het tollen om de richting van het externe magnetische veld (resonantie). Dat leidt tot een signaal dat informatie over materie en processen daarin oplevert. Het mechanisme hierachter is de basis voor Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopie en Magnetic Resonance Imaging (MRI). De geproduceerde signalen zijn doorgaans zwak, reden waarom krachtige magneetvelden nodig zijn om nog zoveel mogelijk spins in dezelfde toestand te krijgen. Beperkingen van NMR en MRI zijn de dure apparatuur en relatief lage gevoeligheid [47]. Daar staat tegenover dat het sterke technieken zijn voor de structuuropheldering van een scala aan (voedings)componenten en dat er gemeten kan worden onder natieve omstandigheden. Daarnaast zijn het technieken waarbij de monstervoorbewerking eenvoudig en snel is en de metingen goed reproduceerbaar zijn.

Veel organismen bestaan voor een groot deel uit water en het activeren van protonen levert allerhande informatie op over de directe omgeving van die protonen. Nu is het signaal van één proton uitermate zwak. Een organisme bevat wel heel veel protonen, maar ook samen wordt nog een zwak signaal verkregen. Het wordt sterker wanneer de spin van de protonen in dezelfde richting staat. Dat is te bereiken met behulp van een sterk uitwendig magneetveld. MRI-scanners combineren zo'n sterk magneetveld met een gepulste radiobron en zeer gevoelige detectieapparatuur om signalen te registreren en tot 2D- of 3D-beelden te reconstrueren.

Vaste stof NMR en/of MRI zouden op basis van bovenstaande informatie geschikt kunnen zijn voor het screenen op watervasthoudende eiwitten/eiwithydrolysaten in vlees- en visproducten. NMR spectra van de voedingsproducten kunnen namelijk fungeren als 'fingerprints' waardoor afwijkingen (= toevoegde eiwitten) kunnen worden waargenomen. Hiervoor kan relatief eenvoudige en dus goedkope NMR apparatuur gebruikt worden waarmee spectra snel kunnen worden gemeten. Met MRI is het mogelijk

om water en watervasthoudende stoffen die zijn toegevoegd aan het product in beeld te brengen. Deze techniek is eerder al gebruikt om de water verdeling in getumbled vlees in aan- en afwezigheid van watervasthoudende stof te bestuderen [14]. MRI-scans zijn echter duur en nemen relatief meer tijd in beslag.

3.8 Gaschromatografie

Gaschromatografie (GC) is een vorm van chromatografie, een techniek waarmee (bio)chemische stoffen in een mengsel van elkaar gescheiden kunnen worden. Bij chromatografische scheidingen worden componenten in een mengsel verdeeld over twee fasen waarvan de één stationair en de ander mobiel is. De stationaire fase wordt hierbij in een kolom geplaatst waarlangs de mobiele fase zich verplaatst. Indien de mobiele fase een gas is, spreekt men van GC.

Met behulp van een EZ:Faast GC kolom is het mogelijk om een zeer snelle en volledige analyse van aminozuren in bloed, plasma en urine uit te voeren [48]. Via deze nieuwe GC methode kunnen meer dan 50 alifatische en aromatische aminozuren, dipeptiden en amines binnen iets meer dan 15 minuten worden geanalyseerd. De meeste vloeistofchromatografie analyses kosten vaak meer tijd. De tijdswinst zit onder meer in de monstervoorbereiding. In het geval van de nieuwe GC analyse wordt er vooraf twee keer aan het te bestuderen monster een stof toegevoegd om deze te derivatiseren. Aangezien de meeste matrix componenten worden verwijderd tijdens de monstervoorbereiding zijn de te analyseren monsters zuiver en is er een goede reproduceerbaarheid van de meting.

De bovengenoemde aminozuur analyse zou mogelijk een goede screeningsanalyse kunnen zijn voor toegevoegde eiwithydrolysaten van collageen in vlees- en visproducten. Collageen bevat namelijk hoge gehalten aan glycine (35%), alanine (11%) en proline (12%) [8]. Daarnaast is de aanwezigheid van het ongebruikelijke hydroxyproline (9%) en hydroxylysine (enkele %) zeer typerend voor collageen. De gehalten van deze 5 aminozuren kunnen met de GC methode in beeld worden gebracht. De verhouding van de verschillende aminozuren kan ook nog iets over de herkomst van het collageen zeggen. Voordat de GC analyse kan worden toegepast voor de vlees- en visproducten dienen de aanwezige eiwitten eerst gehydrolyseerd te worden tot aminozuren. De analysetijd zal hierdoor toenemen.

4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

Uit verschillende inspecties van de afgelopen 5 jaar binnen de EU bleek dat er op grote schaal water en watervasthoudende stoffen worden toegevoegd aan vlees en vis, en producten die daarvan worden bereid (Bijlage 1). Deze watervasthoudende stoffen kunnen eiwitten en/of eiwithydrolysaten zijn afkomstig van o.a. bepaalde dierlijke bijproducten, melk en soja. Deze toevoegingen zijn niet toegestaan bij vers vlees en verse visproducten maar wel toegestaan bij een vleesproduct, vleesbereiding of verwerkt visproduct indien de additieven op de verpakking vermeld worden. De etikettering bleek echter regelmatig niet correct te zijn. Bij het gebruik van niet gedeclareerde en/of niet toegestane soortvreemde eiwitten als watervasthoudende stof kunnen mogelijke gevaren voor de voedselveiligheid en/of volksgezondheid niet worden uitgesloten. Hierbij kan gedacht worden aan allergie gevaren en risicovol rundermateriaal als bron voor eiwit(hydrolysaten). Daarnaast kan het gebruik van runder- en varkenseiwitten vanuit ethische en godsdienstige overwegingen ongewenst zijn en roepen deze praktijken binnen de EU in het kader van eerlijkheid in de handel steeds meer weerstand op. Voor het waarborgen van veilige vlees- en visproducten en juiste etikettering zijn goede screenings- en identificatiemethoden voor eiwitten en/of eiwithydrolysaten noodzakelijk. Een geschikte methode zou daarnaast zeer welkom zijn bij de controle van het watergehalte in pluimveevlees. In dit rapport zijn daartoe verschillende mogelijke technieken beschreven (Tabel 1). Geconcludeerd kan worden dat technieken als PCR en immunoassays hun beperkingen hebben. Geschikte manieren voor screenen zouden bewerkstelligd kunnen worden via histologisch onderzoek, de hydroxyproline bepaling, het aantonen van specifieke crosslinks en peptiden, MS, NMR/MRI of GC. Hierbij dient vermeld te worden dat via de hydroxyproline bepaling, het aantonen van specifieke crosslinks en peptiden, en GC alleen de aanwezigheid van collageen eiwit(hydrolysaten) aan te tonen is. Mogelijk dat m.b.v. GC ook nog de herkomst van de collageen eiwitten/hydrolysaten bepaald kan worden. Voor zowel screening als eiwitidentificatie (incl. herkomst eiwitmateriaal) lijkt MS de meest geschikte techniek, met in het bijzonder LC-MS/MS en LC MALDI TOF TOF.

Gezien deze informatie zouden met name histologisch onderzoek, GC en MS-technieken nu praktisch getoetst moeten worden voor het screenen en/of identificeren van eiwit(hydrolysaten) in vlees- en visproducten. Dit zou tevens goed aansluiten bij enkele eiwitdetectie projecten binnen het RIKILT waarbij LC-MS(/MS) al succesvol wordt toegepast voor het screenen en identificeren van specifieke eiwitten in voedingsmiddelen en diervoeders. Samenwerkingsverbanden die hiervoor zijn opgezet met partners binnen en buiten Wageningen UR met betrekking tot eiwitidentificatie technieken zouden hierbij zeer waardevol kunnen zijn. Daarnaast is er ervaring met histologisch onderzoek binnen het RIKILT.

Tabel 1: Overzicht geschiktheid screenings- en identificatiemethoden voor eiwit(hydrolysaten) afkomstig van al dan niet collageen: geschikt (+), beperkt geschikt (+/-), niet geschikt (-).

Techniek	Screening		Identificatie/ herkomst eiwit
	Collageen eiwitten	Alle eiwitten	
Histologisch	+	+	-
PCR	-	-	+/-*
Immunoassay	+/-	+/-	+/-
Hydroxyproline	+	-	-
Crosslinks/peptiden	+	-	-
MS			
- LC-ESI MS(/MS)	+	+	+
- MALDI-TOF (TOF) MS	+	+	+
NMR/MRI	-	+	-
GC	+	-	+/-**

* Via PCR kan herkomst toegevoegd eiwitmateriaal achterhaald worden indien nog DNA aanwezig is

** Via GC kan mogelijk de herkomst van de collageen eiwitten worden bepaald

5 REFERENTIES

- [1] Commission Staff Working Document concerning the ban on the use of water retention agents in poultry meat, SEC (2004) 1130
- [2] http://www2.vwa.nl/CDL/files/15/1004/10915%20Rapport_kip_toegevoegd_water.pdf
- [3] Troeger K. (2004) Overview of current and alternative slaughter practices. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 8 (4), 275-281
- [4] E.C. (European Commission), 1998. The Scientific Steering Committee. Report and scientific opinion on the safety of hydrolysed proteins produced from bovine hides. Adopted by the Scientific Steering Committee at its meeting of 22-23 October 1998
- [5] E.C. (European Commission), 2001. The Scientific Steering Committee. Opinion and report on the safety with respect to TSE risks of collagen produced from ruminant hides. Adopted by the Scientific Steering Committee at its meeting of 10-11 May 2001
- [6] Bucci L.R. and Unlu L. (2000) Protein and amino acid supplements in exercise and sport. In: *Energy-yielding macronutrients and energy metabolism in sports nutrition*. Eds: Wolinsky I., Driskell J.A., Boca Raton, FL: CRC Press, p. 191-212
- [7] Neklyudov A.D. (2003) *Applied Biochemistry and Microbiology* 39 (3), 229-238
- [8] White A., Handler Ph. and Smith E., *Principles of Biochemistry*, New York: McGraw and Hill, 1978. Translated under the title *Osnovy biokhimii*, Moscow: Mir, 1981, vol. 3, pp. 1467-1499
- [9] Marggrand K. (1987) *Fleischerei* 1, 55-58
- [10] <http://groups.msn.com/meatconsulting/hulpstoffen.msnw>
- [11] Pietrasik Z. and Shand P.J. (2004) Effect of blade tenderization and tumbling time on the processing characteristics and tenderness of injected cooked roast beef. *Meat Science* 66, 871-879
- [12] Pietrasik Z. and Shand P.J. (2003) The effect of quantity and timing of brine addition on water binding and textural characteristics of cooked beef rolls. *Meat Science* 65, 771-778
- [13] <http://www.alp.admin.ch/en/fleisch/fleischtechnologie.php>
- [14] Dolata W., Piotrowska E., Wajdzik J. and Tritt-Goc J. (2004) The use of the MRI technique in the evaluation of water distribution in tumbled porcine muscle. *Meat Science* 67, 25-31
- [15] <http://www.raps.be/pages/Vakinfo3.htm>
- [16] <http://news.bbc.co.uk/2/hi/programmes/panorama/3043893.stm>
- [17] Sheard P.R. and Tali S. (2004) Injection of salt, tripolyphosphate and bicarbonate marinade solutions to improve the yield and tenderness of cooked pork loin. *Meat Science* 68, 305-311
- [18] <http://www.foodproductdesign.com/archive/1996/0796AP.html>
- [19] Marmiroli N., Peano C. and Maestri E. (2003) Advanced PCR techniques in identifying food components. In: *Food Authenticity and traceability*. Ed: Lees M., Boca Raton, Boston, New York, Washington DC. FL: CRC Press, p. 3-33
- [20] Ahmed F.E. (2002) Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology* 20, 215-223
- [21] *The Guardian*, 21-05-2003
- [22] <http://news.bbc.co.uk/2/hi/programmes/panorama/3047159.stm>
- [23] Haasnoot W., Olieman, K., Cazemier, G. and Verheijen R. (2001) Direct biosensor immunoassays for the detection of nonmilk proteins in milk powder. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5201-5206
- [24] Fukal L. and Kas J. (1989) The advantages of immunoassays in food analysis. *Trends Anal. Chem.* 8, 112-116
- [25] Hitchcock C.H.S. (1988) *Immunoassays for veterinary and food analysis – 1* (Eds Morris B.A., Clifford M.N., Jackman R.) Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London, New York, p. 3

- [26] Report by the Analytical Methods Committee (2000) Nitrogen factors for chicken meat. *The Analyst* 125, 1359-1366
- [27] Drawert F. en Barton H. (1978) Zur enzymatischen Analyse von Hydroxyprolin II. Vorschlag einer Methode mit bakteriellen Enzymen. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 5, 134-136
- [28] Berg H. en Kolar K. (1991) Rapid method: Evaluation of rapid moisture, fat, protein and hydroxyproline determination in beef and pork using the Infratec Food and Feed Analyzer. *Fleischwirtschaft* 71 (7), 787-789
- [29] Vázquez-Ortíz F.A., Morón-Fuenmayor O.E. and González-Méndez N.F. (2004) Hydroxyproline measurement by HPLC: Improved method of total collagen determination in meat samples. *Journal of liquid chromatography & related technologies* 27 (17), 2771-2780
- [30] Acil Y., Brinckmann J., Notbohm H., Muller P.K. and Batge B. (1996) Changes with age in the urinary excretion of hydroxylysylpyridinoline (HP) and lysylpyridinoline (LP). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 56, 275-283
- [31] Cole C.G.B. and Roberts J.J. (1996) Gelatine fluorescence and its relationship to animal age and gelatine colour. *S. Afr. J. Food Sci. Nutr.* 8, 139-143
- [32] Wondrak G.T., Roberts M.J., Jacobson M.K. and Jacobson E.L. (2004) 3-hydroxypyridine chromophores are endogenous sensitizers of photooxidative stress in human skin cells. *J. Biol. Chem.* 279, 30009-30020
- [33] Bank R.A., Beekman B., Verzijl N., De Roos J.A., Sakkee A.N. and TeKoppele J.M. (1997) Sensitive fluorimetric quantitation of pyridinium and pentosidine cross-links in biological samples in a single high-performance liquid chromatographic run. *J. Chromatogr. B, Biomed. Sci. Appl.* 703, 37-44
- [34] Kleter G.A., Damen J.J., Buijs M.J. and Ten Cate J.M. (1998) Modification of amino acid residues in carious dentin matrix. *J. Dent. Res.* 77, 488-495
- [35] Liesegang A, Sassi M.L., Risteli J., Eicher R., Wanner M. and Riond J.L. (1998) Comparison of bone resorption markers during hypocalcemia in dairy cows. *J. of Dairy Science* 81, 2614-2622
- [36] Liesegang A, Burgi E., Sassi M.L., Risteli J. and Wanner M. (2002) Influence of a vegetarian diet versus a diet with fishmeal on bone in growing pigs. *J. of Veterinary Medicine A Physiology Pathology Clinical Medicine* 49, 230-238
- [37] Husek P., Pohlidal A. and Slabik D. (2002) Rapid screening of urinary proline-hydroxyproline dipeptide in bone turnover studies. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 767, 169-174
- [38] Barber M., Bordoli R.S., Sedgwick R.D., Tyler A.N. and Bycroft B.W. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 632-638
- [39] Morris H.R., Panico M., Barber M., Bordoli R.S., Sedgwick R.D. and Tyler A.N. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 623-631
- [40] Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F. and Whitehouse C.M. (1989) *Science* 246, 64-71
- [41] Hillenkamp F., Karas, M., Beavis R.C. and Chait, B.T. (1991) *Anal. Chem.* 63, 1193A-1203A
- [42] Pitt A.R. (1998) *Nat. Prod. Rep.*, 59-72
- [43] Jonsson A.P. (2001) *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 868-884
- [44] Wilm M. and Mann M. (1996) *Anal. Chem.* 68, 1-8
- [45] Kruger R., Pfenninger A., Fournier I., Gliuckmann M. and Karas M. (2001) *Anal. Chem.* 73, 5812-5821
- [46] <http://docs.appliedbiosystems.com/pebiiodocs/00114272.pdf>
- [47] Le Gall G. and Colquhoun I.J. (2003) NMR spectroscopy in food authentication. In: *Food Authenticity and Traceability*. Ed: Lees M., Boca Raton, Boston, New York, Washington DC. FL: CRC Press, p. 131-155
- [48] <http://www.phenomenex.com/phen/doc/z286.pdf>
- [49] <http://www.food.gov.uk/news/pressreleases/2000/oct/chickwatertest>
- [50] Determination of moisture content. ISO Method 1442.
- [51] Determination of protein content. ISO Method 937.

- [52] <http://www.food.gov.uk/science/surveillance/fsis-2001/20chick>
- [53] http://www.fsai.ie/surveillance/food/Poultry_Labelling_Report.pdf
- [54] <http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2003/mar/waterchicken0303>
- [55] <http://news.bbc.co.uk/2/hi/programmes/panorama/3035139.stm>
- [56] Gezond, nieuwsbrief Consumentenbond, maart 2004, nr. 49, blz. 1-2
- [57] Consumentengids, november 2004, blz. 52-55
- [58] Gezondgids, november 2004, blz. 6-7
- [59] http://www.foodcomm.org.uk/latest_watermeat_apr05.htm
- [60] http://www.vwa.nl/download/rapporten/voedselveiligheid/020621_basistoezicht_vlees.pdf
- [61] Hägele G.H. en Janssen F.W. (1999) Speciesidentificatie in verhitte vleesproducten d.m.v. DNA-hybridisatie met digoxigenine gelabelde probes, CHE01-OT513
- [62] Hägele G.H. en Janssen F.W. (1999) Bevestiging van vleesvreemd eiwit d.m.v. SDS-gelelektroforese gevolgd door blotten en immunochemische detectie, CHE01-OT514
- [63] Aanbeveling van de commissie (2005/175/EG), 1 maart 2005, betreffende een gecoördineerd programma voor 2005 inzake de officiële controle op levensmiddelen
- [64] http://www.nu.nl/news/559819/37/Bevroren_kippenvlees_niet_langer_%27vers%27.html

Bijlage 1. Inspecties (2000-2005)

Vanaf 2000 tot 2006 zijn er binnen Europa verschillende onderzoeken door verschillende instanties uitgevoerd naar de aanwezigheid van water en (soort) watervasthoudende stoffen in vlees en vis(producten). De hieruit verkregen resultaten staan samen met de datum, de betreffende instantie, het type onderzoek, een referentie, het aantal (type) monsters en de gebruikte methoden (voor zover bekend) hieronder vermeld.

Datum	Oktober 2000
Instantie	Britse Food Standards Agency (FSA).
Onderzoek	Bepaling van hoeveelheid water in kippenvlees.
Referentie	[49].
Monsters	532 hele kippen (287 bevroren) en meer dan 1000 kippenonderdelen verzameld in 30 verschillende regio's in Groot-Brittannië. De producten waren ingekocht bij supermarkten, slagerijen en andere detailhandelaren. De hele kippen kwamen oorspronkelijk uit Groot-Brittannië, Frankrijk en Denemarken. De kippenonderdelen kwamen oorspronkelijk uit Groot-Brittannië, Frankrijk en Nederland.
Resultaten	30% van de bevroren hele kippen bevatte meer dan 7% toegevoegd water (EC limiet). 17% van de kippenonderdelen bevatte 2-37% water. De ca. 160 kippenonderdelen met toegevoegd water betroffen 135 kippenborsten en 25 kippenpoten. De meeste kippenonderdelen (ca. 105) waren bevroren. In 17 gevallen was het water niet vermeld. Bij de niet voorverpakte kipproducten (afkomstig van vooral slagerijen) werd er soms meer dan 30% toegevoegd water aangetroffen.
Methoden	De hoeveelheid water werd bepaald met behulp van de chemische test [50, 51].
Datum	December 2001
Instantie	Britse FSA in samenwerking met 22 Britse lokale overheidsinstanties.
Onderzoek	Bepaling van hoeveelheid vlees, toegevoegd water en gehydrolyseerd eiwit in catering kippenborst.
Referentie	[52].
Monsters	68 stuks uit voornamelijk Nederland, maar ook België en Groot-Brittannië. Oorspronkelijk kwamen de meeste kippen uit Brazilië en Thailand.
Resultaten	46% van de monsters bevatte 5-26% minder vlees dan vermeld op de verpakking. Toegevoegd water varieerde van 0-43%. 24% van de monsters bevatte gehydrolyseerd collageen eiwit. 3% van de monsters gaf gehydrolyseerd eiwit aan op etiket. 3% van de monsters was positief bevonden op varkens DNA.
Methoden	Hoeveelheid vlees (%) = vetvrij vlees + vet. Vetvrij vlees (%) = stikstof / stikstof factor x 100. Toegevoegd water = 100 - (vlees gehalte + zout + koolhydraten + andere ingrediënten). De hoeveelheid toegevoegd gehydrolyseerd eiwit afkomstig van collageen werd bepaald via een hydroxyproline bepaling. De herkomst van de toegevoegde ingrediënten werd via PCR bepaald. Deze test bleek niet kwantitatief en niet gevoelig. Hierdoor is het mogelijk dat runder- en varkens-DNA in sommige producten niet werd gedetecteerd.

Datum	Juni 2002
Instantie	Ierse FSA in samenwerking met de Environmental Health Service of the Health Boards, analyselaboratoria van de overheid te Galway en Cork, en de firma Identigen voor DNA onderzoek.
Onderzoek Referentie	Samenstelling en etikettering van kippenborst filets geïmporteerd uit Nederland. [53].
Monsters	30 stuks geïmporteerd uit alleen Nederland. Oorspronkelijk komen de kippen uit Brazilië en Thailand.
Resultaten	54% van de monsters bevatte minder vlees dan vermeld op de verpakking. Toegevoegd water varieerde van 14-43%. 26% van monsters bevatte gehydrolyseerd collageen eiwit dat niet was vermeld op het etiket. 57% van de monsters was positief bevonden op runder en/of varkens DNA. Ook dit was niet vermeld op het etiket. Daar waar collageen eiwithydrolysaten werden gemeten werd ook runder DNA gedetecteerd (soms inclusief varkens DNA).
Methoden	Hoeveelheid vlees (%) = ((% stikstof - % collageen stikstof)/stikstof factor) x 100. Toegevoegd water = 100 - (% vlees + % as + % koolhydraten). De hoeveelheid toegevoegd gehydrolyseerd eiwit afkomstig van collageen werd bepaald via een hydroxyproline bepaling. De herkomst van de toegevoegde ingrediënten werd via de PCR methode bepaald. Dit was een gevoeliger methode dan die gebruikt werd door de Britse FSA in december 2001.
Datum	Maart 2003
Instantie	Britse FSA en 20 Britse lokale overheidsinstanties.
Onderzoek Referentie	Water en dierlijke eiwitten in kip. [54].
Monsters	25 stuks uit voornamelijk Nederland, maar ook België en Groot-Brittannië.
Resultaten	60% van de monsters bevatte 5-25% minder vlees dan vermeld op de verpakking. Toegevoegd water varieerde van 13-56%. 36% van de monsters bevatte gehydrolyseerd collageen eiwit. De meeste fabrikanten gaven nu wel gehydrolyseerd eiwit aan op etiket, maar niet de oorsprong. 72% gebruikte de omschrijving kippenborst of filet terwijl dit niet is toegestaan indien ingrediënten zijn toegevoegd. 44% was positief bevonden op varkens DNA, 4% op varkens en runder DNA. Desondanks was 'Halal' vermeld op het etiket.
Methoden	Onbekend. Er staat wel beschreven dat de meest verfijnde en gevoelige methoden die beschikbaar waren werden gebruikt voor het nauwkeurig kunnen bepalen van de ingrediënten. De herkomst van de toegevoegde ingrediënten werd zeer waarschijnlijk via PCR bepaald.

Datum	Mei 2003
Instantie	BBC Panorama in samenwerking met analyselaboratoria van de Britse overheid en de firma Identigen voor DNA onderzoek.
Onderzoek Referentie	Bepaling van hoeveelheid vlees en DNA in kipfilet en kipproducten. [55].
Monsters	Bevroren kipfilets (17 stuks) en kipproducten (14 stuks). De kipfilets waren ingekocht bij verschillende bronnen in Groot-Brittannië. De meeste filets waren geïmporteerd uit Nederland. De kipproducten waren verkregen bij verschillende fast-food restaurants en supermarkten in Groot-Brittannië.
Resultaten	Kipfilets: 53% van de monsters bevatte 4-27% minder vlees dan vermeld op verpakking. 35% werd positief bevonden op runder DNA. Kipproducten: 36% werd positief bevonden op runder DNA en 21% op varkens DNA. De producten die positief werden bevonden op varkens DNA werden tevens positief bevonden op runder DNA.
Methoden	De herkomst van de toegevoegde ingrediënten werd via PCR bepaald.
Datum	Maart 2004
Instantie	Nederlandse Consumentenbond.
Onderzoek Referentie	Runder DNA in gerookte palingfilets. [56].
Monsters	11 verschillende merken gerookte palingfilets.
Resultaten	7 van de 11 palingfilets werden positief bevonden op runder DNA. Bij slechts 1 van die 7 filets stond de toevoeging van rundermateriaal vermeld op het etiket. Het aantreffen van runder DNA doet vermoeden dat de filets zijn geïnjecteerd met een mengsel van water, eiwit en eventueel andere watervasthoudende stoffen om de filets zwaarder te maken (ca. 10%).
Methoden	De herkomst van de toegevoegde ingrediënten werd via PCR bepaald. Deze analyses zijn verricht door Identigen (Ierland).
Datum	November 2004
Instantie	Nederlandse Consumentenbond.
Onderzoek Referentie	Waterbinders in varkensshoarma. [57].
Monsters	Varkensshoarma van 10 aanbieders onderzocht. Van elke aanbieder werden in verschillende winkels 5 verpakkingen ingekocht.
Resultaten	In praktisch alle gevallen werden tussen de spiervezels in het vlees water en losse eiwitten geconstateerd. Deze eiwitten kunnen als watervasthoudende stof worden gebruikt om de boel zwaarder en malser te maken. De meeste ingrediëntenopgaven zwijgen over de toegevoegde eiwitten.
Methoden	Vlees werd m.b.v. histologische technieken onderzocht op watervasthoudende stoffen (RIKILT).

Datum November 2004
Instantie Nederlandse Consumentenbond.
Onderzoek Waterbinders in gerookte zalm.
Referentie [58].
Monsters 24 verschillende merken gerookte zalm.
Resultaten 4 van de 24 merken bleken kaaseiwit te bevatten. Het kaaseiwit is waarschijnlijk onderdeel van een waterbindend mengsel. Dit mengsel wordt opgelost in water, en vervolgens in de filets geïnjecteerd om ze zwaarder te maken. Door het eiwit kan de vis meer water vasthouden. Het kaaseiwit bleek bij 3 van de 4 gevallen niet aangegeven op het etiket.
Methoden SDS-gelelectroforese (aantonen visvreemd eiwit), immunoblotting (voor aantonen en herkomst visvreemd eiwit) en PCR (herkomst toegevoegde ingrediënten).

Datum April 2005
Instantie De Britse Food Commission.
Onderzoek Water in vleesproducten.
Referentie [59].
Monsters Verschillende supermarkt vleesproducten van verschillende merken.
Resultaten De volgende percentages vlees en eiwitten werden aangetroffen in de verschillende vleesproducten; hamproducten, 55-80% vlees en gelatine; kipproducten, 58-80% vlees en melkeiwit; Hot Dogs, minder dan 50% kippenvlees en varkens- en rundercollageen; gebraden lamsvleesproduct, 86% vlees; worstjes, 37-70% vlees; kalkoenproducten, 34-60% vlees en melkeiwit.
Methoden Percentages vlees en aangetroffen eiwitten gebaseerd op de gegevens vermeld in de ingrediëntenlijst.

Datum Juni 2005
Instantie Keuringsdienst van Waren.
Onderzoek Basistoezicht vleesproductenbedrijven. Kwantitatieve ingrediëntendeclaratie.
Referentie [60].
Monsters 101 vleesproducten van 49 industriële bedrijven. De vleesproducten waren gemaakt van kip, kalkoen, lam, varken, rund en paard.
Resultaten 22% van de voorverpakte vleesproducten had een kwantitatieve ingrediëntendeclaratie die misleidende informatie verstreekte over de hoeveelheid vlees. Op 14% van de beoordeelde etiketten op voorverpakte vleesproducten ontbrak ten onrechte de kwantitatieve ingrediëntendeclaratie. 8% van de onderzochte vleesproducten bevatte geen betrouwbare informatie over de verwerkte slachtdiersoort. In 14% van de onderzochte vleesproducten werd vleesvreemd eiwit aangetroffen zonder dat dit uit de lijst van ingrediënten verklaard kon worden. Binnen deze 14% werd soja-eiwit het meest frequent aangetroffen, gevolgd door kippen ei-eiwit en caseïne. Gelet op het aantal afwijkingen met betrekking tot de kwantitatieve en kwalitatieve ingrediëntendeclaratie op vleesproducten werd geconcludeerd dat de consument in onvoldoende mate kan vertrouwen op de juistheid van de informatie die wordt verstrekt.
Methoden De diersoortidentificatie in verhitte vleesproducten werd bepaald d.m.v. DNA hybridisatie met digoxigenine gelabelde probes [61]. De aanwezigheid van vleesvreemd eiwit werd aangetoond d.m.v. SDS-gelelectroforese gevolgd door blotten en immunochemische detectie [62].

Bijlage 2. Wetgeving

Wat betreft de Europese wetgeving op het gebied van toevoegen van water en watervasthoudende stoffen aan vlees wordt duidelijk onderscheid gemaakt tussen aan de ene kant vers vlees, en aan de andere kant vleesbereidingen en -producten. Voor de volledigheid volgen hier eerst de definities daarvan.

Vers vlees: vlees dat vacuüm verpakt is of verpakt is onder een gecontroleerde atmosfeer, en dat geen andere behandeling heeft ondergaan dan koelen of vriezen (Richtlijnen 71/118/EEC en 64/433/EEC, en Verordening (EG) Nr. 853/2004).

Vleesbereidingen: vlees waaraan levensmiddelen, specerijen of additieven zijn toegevoegd of dat een behandeling heeft ondergaan waarbij de interne celstructuur van het vlees en zo ook de kenmerken van vers vlees behouden zijn gebleven (Richtlijnen 94/65/EC en 71/118/EEC, en Verordening (EG) Nr. 853/2004).

Vleesproducten: producten die gemaakt zijn van vlees dat een behandeling heeft ondergaan zodat het uiterlijk niet meer de kenmerken van vers vlees heeft (Richtlijn 77/99/EEC, en Verordening (EG) Nr. 853/2004). Vleesproducten zijn gemaakt via verhitten, conserveren, marinieren of drogen, in combinatie met eventueel roken of rijpen met bepaalde conserveringsmiddelen. Vleesproducten kunnen ook gecombineerd zijn met andere levensmiddelen en specerijen.

Richtlijnen 71/118/EEC (pluimveevlees) en 64/433/EEC (vers vlees) stellen (m.b.t. gezondheidsvraagstukken op het gebied van de productie en het in de handel brengen van vers vlees) dat het op de markt brengen van vers vlees waarbij gebruik is gemaakt van watervasthoudende stoffen verboden is. In dit geval is het dus niet toegestaan gebruik te maken van tumblen, injecteren en andere technieken voor het inbrengen van water en watervasthoudende stoffen. Voor verse visproducten wordt eenzelfde regeling beschreven in Richtlijn 91/493/EEC.

Water en watervasthoudende stoffen zijn echter wel toegestaan in vleesbereidingen en -producten (Richtlijnen 94/65/EC en 77/99/EEC) die vervaardigd zijn uit onbehandeld vlees. Het gebruik daarvan moet echter wel overeenkomstig de door de lidstaten goedgekeurde codes voor goede praktijken of goede productiepraktijken zijn en overeenkomstig de regels die van toepassing zijn op consumentenbescherming. Dit is met inbegrip van de wetgeving over de etikettering van voedingsmiddelen zoals die is vastgesteld door het Europees Parlement en de Raad op 20 maart 2000 (Richtlijn 2000/13/EC betreffende de onderlinge aanpassing van de wetgeving der lidstaten inzake de etikettering en presentatie van levensmiddelen alsmede inzake de daarvoor gemaakte reclame). Deze stelt dat de gebruikte ingrediënten voor vleesbereidingen en -producten op de ingrediëntenlijst vermeld dienen te worden. Dit geldt dus ook voor watervasthoudende stoffen. De aanwezigheid van toegevoegde eiwitten en de diersoort of plantensoort waar deze eiwitten hun herkomst vinden dienen tevens vermeld te worden op het etiket van de vleesbereidingen of -producten. De naam waaronder het voedingsmiddel wordt verkocht mag namelijk niet misleidend zijn voor de consument gelet op de kenmerken van het product, met name de herkomst of samenstelling. Voor verwerkte visproducten (Richtlijn 91/493/EEC) geldt dezelfde regeling als voor de vleesbereidingen en -producten.

Op 1 maart 2005 is er een aanbeveling van de EU commissie opgesteld met betrekking tot bovenstaande [63]. Dit was naar aanleiding van bemonsteringen in bepaalde lidstaten (zie ook Bijlage 1) waaruit bleek dat er een aanzienlijk aantal producten op de markt was gebracht met te grote hoeveelheden toegevoegd water en watervasthoudende eiwithydrolysaten. Het doel van deze aanbeveling is om op Gemeenschapsniveau de correcte tenuitvoerlegging van Richtlijn 71/118/EEC te controleren met betrekking tot het gebruik van watervasthoudende stoffen in gekoeld en bevroren pluimveevlees (kippenborst) en het gebruik daarvan in bevroren pluimveevleesbereidingen (kippenborst), om de consumentenbescherming te bevorderen en een correcte etikettering te controleren. Hiertoe moeten bevoegde autoriteiten van de lidstaten een opgenomen analyseprotocol volgen dat een procedure

beschrijft voor het bepalen van het gehalte aan kip of toegevoegd water en aan eiwitten op basis van collageen. De procedure omvat de bepaling van het gehalte aan eiwitstikstof, vocht, vet, as en hydroxyproline.

Volgens een nieuwsbericht van juli 2005 stelt de Europees Commissaris van Landbouw dat pluimveevlees dat bevroren is geweest niet meer aangeprezen zou mogen worden als 'vers vlees' [64]. Dit zou betekenen dat men aan dit pluimveevlees dan wel water en watervasthoudende stoffen zou mogen toevoegen (met inbegrip van de etiketteringsplicht). Wat de directe gevolgen zullen zijn is onduidelijk. Het zou bijvoorbeeld effect kunnen hebben op de importcontrole van verse kip.