

Afd. Eiwitchemie 1983-11-11

RAPPORT 83.85

Onderwerp: Het β -hydroxyboterzuur
 gehalte in eieren en
 eiprodukten.

Bijlagen: 2.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (2x), direktie VKA, afd.
 Eiwitchemie (14x), afd. Normalisatie (Humme), Projekt-
 beheer, Projektleider (Elenbaas).

Projekt: Onderzoek naar de kwaliteit van pluimvee en eieren.

Onderwerp: Het β -hydroxyboterzuurgehalte in eieren en eiprodukten.

Bijlagen: 2.

Doel:

Het weergeven van de voorlopige resultaten omtrent het β -hydroxyboterzuurgehalte in diverse eieren en eiprodukten. Het aangeven van de mogelijkheden en de beperkingen van een eventuele controle op broedeieren aan de hand van het β -hydroxyboterzuurgehalte.

Samenvatting/Conclusie:

Monsters consumptie-eieren (35), broedeieren (95) en eiprodukten (47), van diverse herkomst, werden onderzocht omtrent het β -HBZ gehalte met behulp van een enzymatische methode. Het β -HBZ gehalte in consumptie- en koelhuisseieren was vrij konstant (gemiddeld 1,3 mg/kg). Het hoogst waargenomen gehalte bedroeg 3,0 mg/kg. Het gemiddelde β -HBZ gehalte in uitgeschouwde broedeieren was aanzienlijk hoger (76 mg/kg). In een drietal monsters broedei werd echter een β -HBZ gehalte gevonden welke overeenkomt met dat van consumptie-eieren. Een te stellen tolerantie voor een maximaal β -HBZ gehalte in eieren en eiprodukten geeft daarom geen garantie voor de afwezigheid van broedei. Wel kan de verwerking van broedei aanzienlijk worden beperkt indien een maximaal gehalte voor β -HBZ in eieren en eiprodukten wordt vastgesteld van 5 mg/kg op eibasis.

Vanwege de grote spreiding van het β -HBZ gehalte in uitgeschouwde broedeieren is het onmogelijk om aan de hand van het β -HBZ gehalte een indicatie te geven omtrent de hoeveelheid broedei welke is verwerkt.

Verantwoordelijk: drs H.L. Elenbaas

Samensteller : W. Haasnoot

Projectleider : drs H.L. Elenbaas

Inleiding:

Ten behoeve van een te houden discussie binnen de werkgroep kwaliteit schouweieren worden in dit verslag de voorlopige resultaten weergegeven omtrent het β -HBZ gehalte in eieren en eiprodukten. De proefopzet wordt weergegeven in bijlage 1. De weergegeven β -HBZ gehalten zijn verkregen met behulp van de enzymatische methode (zie bijlage 2). De resultaten zijn nog niet definitief aangezien deze voor een gedeelte nog moeten worden bevestigd met een gaschromatografische methode.

Resultaten en discussie:

De β -HBZ gehalten in de verschillende soorten eieren en eiprodukten worden weergegeven in de tabellen 1 t/m 11.

In onderstaande tabel worden de gemiddelde β -HBZ gehalten weergegeven alsmede de gevonden spreiding in de gehalten.

Tabel 12: De gemiddelde β -HBZ gehalten, en de spreiding, in de verschillende soorten eieren en eiprodukten.

Produkt	Aantal monsters	Gemiddeld β -HBZ gehalte op eibasis (mg/kg)	Standaardafwijking (mg/kg)	Variatiecoëfficiënt %
consumptie-eieren (legbatterij)	20	1,2	0,40	33
consumptie-eieren (scharrel)	10	1,2	0,39	32
bevruchte onbebroede eieren	5	1,9	0,82	42
koelhuseieren	5	1,6	0,70	44
vloeibare eiprodukten zonder broedei	24*(21)	2,0 (1,4)	1,7 (0,72)	85 (51)
eipoeders zonder broedei	3	0,9	0,59	65
broedei (uitgeschouwd)	30	76	82	108
helder broedei	30	29	40	137
twijfelachtig broedei	28	242	156	64
niet helder broedei	7	98	70	71
vloeibare eiprodukten met broedei	15	29	31	106

* In drie monsters werd een verhoogd β -HBZ gehalte gevonden (5 tot 7,4 mg/kg op eibasis). Vermoedelijk was hieraan broedei toegevoegd. Indien deze monsters niet worden meegerekend wordt een gemiddeld gehalte van 1,4 mg/kg gevonden, met een standaardafwijking van 0,72 en een variatiecoëfficiënt van 51%.

Het β -HBZ gehalte in de consumptie-eieren was vrij constant (gemiddeld 1,2 mg/kg). De hierbij waargenomen spreiding ligt waarschijnlijk aan de spreiding in de methode, aangezien dit niveau op de benedengrens van de methode ligt. Dit wordt nog nader onderzocht. Het hoogst waargenomen β -HBZ gehalte in consumptie-eieren was 2,4 mg/kg.

In bevruchte, onbebroede eieren en in koelhuisseieren werd een gemiddeld β -HBZ gehalte gevonden van 1,8 mg/kg terwijl de hoogste waarde 3,0 mg/kg was.

In de vloeibare eiproducten, waarin volgens de fabrikant geen broedei was verwerkt, werd in 21 monsters een β -HBZ gehalte gevonden welke overeenkomt met dat van consumptie-eieren. In een drietal monsters werd echter een verhoogd β -HBZ gehalte gevonden, vermoedelijk was hierin broedei verwerkt.

Het β -HBZ gehalte in broedei varieert sterk. In drie monsters, welke door het Spelderholt als 100% helder werden gekwalificeerd, werd een β -HBZ gehalte gevonden dat overeenkomt met dat van consumptie-eieren (1,5 tot 2,1 mg/kg). De gehalten in de overige 27 monsters waren duidelijk hoger (8 tot 338 mg/kg).

Bij het naschouwen van de broedeieren werd gemiddeld 84% van de eieren als helder gekwalificeerd, 15% was twijfelachtig en 1% niet helder. Het gehalte aan β -HBZ in de heldere eieren varieerde van 0,7 tot 143 mg/kg met een gemiddelde van 29 mg/kg. Het gehalte in de als twijfelachtig gekwalificeerde broedeieren varieerde van 10 tot 710 mg/kg met als gemiddelde 242 mg/kg.

In figuur 1 wordt het β -HBZ gehalte in broedeieren uitgezet tegen het daarin aangetroffen percentage twijfelachtige eieren.

Hieruit blijkt dat het meer kritisch schouwen een verlaging van het β -HBZ gehalte kan opleveren. De mediaan van het β -HBZ gehalte in broedeieren werd berekend op 54 mg/kg en die in de door het Spelderholt uitgeschouwde heldere eieren op 42 mg/kg. Er kan geconcludeerd worden dat, indien meer kritisch wordt geschouwd, het gemiddelde β -HBZ gehalte sterk wordt verlaagd maar de mediaan in veel mindere mate. Het verlagen van het β -HBZ gehalte in broedeieren lijkt eveneens mogelijk indien eerder wordt geschouwd. In figuur 2 wordt het β -HBZ gehalte uitgezet tegen de broedtijd. Bij het schouwen na een broedtijd van 7 tot 11 dagen wordt gemiddeld een lager gehalte gevonden indien wordt vergeleken met het schouwen na een broedtijd van 15 tot 18 dagen.

In de vloeibare eiprodukten waarin, volgens opgave van de fabrikant, broedei was verwerkt werd een gemiddeld β -HBZ gehalte gevonden van 29 mg/kg. Het toegevoegde percentage broedei, op eibasis, varieerde van 5 tot 100%. In alle monsters (n=15) werd een verhoogd β -HBZ gehalte gevonden. Het β -HBZ gehalte, uitgedrukt op eibasis, varieerde van 6 tot 120 mg/kg.

Van een viertal eiprodukten werden voor en na pasteuriseren monsters genomen. Het β -HBZ gehalte vertoonde hierin geen significant verschil (zie tabel 12).

Gezien het kleine aantal experimenten zou voor een definitieve conclusie omtrent de invloed van pasteuriseren op het β -HBZ gehalte een meer uitgebreid onderzoek noodzakelijk zijn. Ditzelfde geldt voor het bereiden van ei-poeder.

Conclusie:

Het maximale gehalte aan β -HBZ in consumptie-eieren bedroeg 2,4 mg/kg en in koelhuisseieren 3,0 mg/kg. Rekening houdend met een veiligheidsmarge kan worden aangenomen dat bij een β -HBZ gehalte van 5 mg/kg of hoger, op eibasis, broedeieren aanwezig zijn.

In een drietal monsters broedei werden β -HBZ gehalten gevonden welke overeenkomen met die van consumptie-eieren. Een β -HBZ gehalte kleiner dan 5 mg/kg geeft dus geen garantie voor de afwezigheid van broedei. Vanwege de grote spreiding van het β -HBZ gehalte in uitgeschouwde broedeieren is het onmogelijk om aan de hand van het β -HBZ gehalte een indicatie te geven omtrent de hoeveelheid broedei welke is verwerkt. Door het stellen van een maximaal gehalte voor β -HBZ in eieren en eiprodukten van 5 mg/kg, op eibasis, wordt de verwerking van broedei sterk beperkt. Indien de broederijen, gedwongen door deze maatregel, eerder gaan schouwen lijkt het mogelijk dat de verwerking van broedeieren in eiprodukten voor de humane consumptie weer kan toenemen. Door het controleren van de grondstoffen (hele eieren) bij de ei-productiefabrikanten kan het gebruik van broedeieren eventueel weer worden beperkt.

Een meer uitgebreid onderzoek naar de spreiding van het β -HBZ gehalte in bebroede eieren welke gedurende een korte periode (6-10 dagen) zijn bebroed lijkt noodzakelijk.

Voor het controleren van het β -HBZ gehalte in eieren en eiprodukten zijn twee methoden beschikbaar. De enzymatische- en de gaschromatografische methode zijn geschikt voor het bepalen van β -HBZ tot een benedengrens van 1 mg/kg.

Tabel 1 Het β -HBZ gehalte in consumptie-eieren (legbatterij)

RIKILT- nummer	Spelderholt- nummer	β -HBZ gehalte (mg/kg)
46719	2- 1	1,3
46720	2- 2	0,9
46721	2- 3	1,7
46722	2- 4	1,3
46723	2- 5	0,9
46724	2- 6	1,2
46725	2- 7	1,5
46726	2- 8	1,6
46729	2-11	1,0
46731	2-13	1,2
46732	2-14	1,2
46735	2-17	0,6
46737	2-19	0,9
46738	2-20	0,6
46739	2-21	1,2
46740	2-22	2,3
46741	2-23	1,2
46742	2-24	1,3
46743	2-25	0,8
46748	2-30	1,0
	Gemiddeld	1,18 mg/kg
	Standaardafwijking	0,40
	Variatiecoëfficiënt	33%

Tabel 2 Het β -HBZ gehalte in consumptie-eieren (scharrel)

RIKILT- nummer	Spelderholt- nummer	β -HBZ gehalte (mg/kg)
46727	2- 9	1,0
46728	2-10	0,9
46730	2-12	1,5
46733	2-15	1,1
46734	2-16	0,5
46736	2-18	1,7
46744	2-26	1,4
46745	2-27	1,1
46746	2-28	1,1
46747	2-29	1,8
	Gemiddeld	1,21 mg/kg
	Standaardafwijking	0,39
	Variatiecoëfficiënt	32%

Tabel 3 Het β -HBZ gehalte in bevruchte onbebroede eieren

RIKILT- nummer	Spelderholt- nummer	β -HBZ gehalte (mg/kg)	Opmerking
49463	2-31	1,7	geïnsemineerd
49464	2-32	2,6	scharrel + hanen
49465	2-33	3,0	"
49466	2-34	1,2	"
49467	2-35	1,2	"
	Gemiddeld	1,94 mg/kg	
	Standaardafwijking	0,82	
	Variatiecoëfficiënt	42%	

Tabel 4 Het β -HBZ gehalte in koelhuisseieren

RIKILT- nummer	Spelderholt- nummer	β -HBZ gehalte (mg/kg)	Opmerking
46760	3-22	0,9	
49459	3-44	0,8	import, bevrucht?
49460	3-45	2,0	" "
49461	3-46	2,4	" "
49462	3-47	1,8	" "
	Gemiddeld	1,58 mg/kg	
	Standaardafwijking	0,70	
	Variatiecoëfficiënt	44%	

Tabel 5: De percentages helder, twijfelachtig en niet heldere eieren in broedeieren, zoals beoordeeld door het Spelderholt en het β -HBZ gehalte in broedeieren

Obs	RIKILTNR	SPELDERHOK	BROEDTIJD	% HELDER	% TWIJFELACHTIG	% NIET HELDER	B-HBZ
1	43551.0000	1.0000	18.0000	83.3000	36.7000	0.0000	338.0000
4	43554.0000	2.0000	10.0000	82.8000	17.2000	0.0000	13.7000
8	43558.0000	3.0000	18.0000	80.0000	20.0000	0.0000	53.9000
11	43571.0000	4.0000	18.0000	85.7000	13.3000	0.0000	78.2000
14	43574.0000	5.0000	11.0000	86.7000	13.3000	0.0000	8.0000
17	43577.0000	6.0000	15.0000	73.3000	26.7000	0.0000	130.5000
20	43580.0000	7.0000	9.0000	93.3000	6.7000	0.0000	16.7000
23	43583.0000	8.0000	8.0000	76.7000	20.0000	3.3000	14.8000
27	43587.0000	9.0000	18.0000	76.7000	23.3000	0.0000	26.6000
30	43590.0000	10.0000	17.0000	86.7000	13.3000	0.0000	23.5000
33	43593.0000	11.0000	17.0000	70.0000	16.7000	13.3000	225.9000
37	43597.0000	12.0000	17.0000	24.1000	72.4000	3.4000	44.6000
41	43601.0000	13.0000	17.0000	96.7000	3.3000	0.0000	46.9000
44	43604.0000	14.0000	17.0000	89.7000	10.3000	0.0000	68.5000
47	43607.0000	15.0000	7.0000	100.0000	0.0000	0.0000	2.1000
49	43609.0000	16.0000	7.0000	100.0000	0.0000	0.0000	1.7000
51	43611.0000	17.0000	18.0000	96.7000	3.3000	0.0000	53.3000
54	43614.0000	18.0000	18.0000	76.7000	23.3000	0.0000	265.5000
57	44505.0000	19.0000	18.0000	83.3000	13.3000	3.3000	165.6000
61	44510.0000	20.0000	18.0000	96.4000	3.6000	0.0000	63.5000
64	44513.0000	21.0000	18.0000	96.7000	3.3000	0.0000	46.6000
67	44515.0000	22.0000	18.0000	90.0000	10.0000	0.0000	84.8000
70	44519.0000	23.0000	15.0000	93.3000	6.7000	0.0000	39.2000
73	44522.0000	24.0000	15.0000	100.0000	0.0000	0.0000	1.5000
76	44525.0000	25.0000	15.0000	96.7000	3.3000	0.0000	40.0000
79	44528.0000	26.0000	18.0000	76.7000	23.3000	0.0000	159.3000
82	44531.0000	27.0000	16.0000	72.8000	17.2000	0.0000	38.3000
85	44535.0000	28.0000	15.0000	83.3000	16.7000	0.0000	68.4000
89	44538.0000	29.0000	17.0000	96.7000	3.3000	0.0000	29.9000
92	44541.0000	30.0000	17.0000	73.3000	26.7000	0.0000	125.5000
MEAN			15.36667	83.97667	14.90667	0.77667	75.83333
STDEV			3.614943	15.301604	14.380469	2.573966	82.033817
N			30	30	30	30	30

Tabel 6: Het β -HBZ gehalte in heldere broedeieren

OBS	R1K1L1TK	SPELDERHKK	BROEDTIJD	B-HBZ
2	43562.0000	1.0000	18.0000	1.1000
5	43565.0000	2.0000	10.0000	4.0000
9	43569.0000	3.0000	18.0000	15.7000
12	43572.0000	4.0000	18.0000	7.0000
15	43575.0000	5.0000	11.0000	9.7000
18	43578.0000	6.0000	15.0000	21.7000
21	43581.0000	7.0000	9.0000	1.5000
24	43584.0000	8.0000	8.0000	6.8000
28	43588.0000	9.0000	18.0000	0.7000
31	43591.0000	10.0000	17.0000	12.1000
34	43594.0000	11.0000	17.0000	37.0000
38	43598.0000	12.0000	17.0000	22.7000
42	43602.0000	13.0000	17.0000	4.8000
45	43605.0000	14.0000	17.0000	1.5000
48	43608.0000	15.0000	7.0000	2.0000
50	43610.0000	16.0000	7.0000	1.5000
52	43612.0000	17.0000	18.0000	2.8000
55	43615.0000	18.0000	18.0000	1.9000
58	44507.0000	19.0000	18.0000	142.9000
62	44511.0000	20.0000	18.0000	69.4000
65	44514.0000	21.0000	18.0000	72.6000
68	44517.0000	22.0000	18.0000	75.4000
71	44520.0000	23.0000	15.0000	24.5000
74	44523.0000	24.0000	15.0000	3.7000
77	44526.0000	25.0000	15.0000	8.4000
80	44529.0000	26.0000	18.0000	143.2000
83	44532.0000	27.0000	16.0000	58.4000
87	44536.0000	28.0000	16.0000	66.8000
90	44539.0000	29.0000	17.0000	1.9000
93	44542.0000	30.0000	17.0000	58.1000
MEAN			15.36667	24.14
STDV			3.614943	39.10
N			30	30

Tabel 7: Het β -HBZ gehalte in twijfelachtige broedeieren

OBS	RIRILNR	SPELDERHNR	BROEDTIJD	B-HBZ
3	43563.0000	1.0000	18.0000	424.1000
6	43566.0000	2.0000	10.0000	86.4000
10	43570.0000	3.0000	18.0000	230.8000
13	43573.0000	4.0000	18.0000	264.9000
16	43576.0000	5.0000	11.0000	89.4000
19	43579.0000	6.0000	15.0000	421.4000
22	43582.0000	7.0000	9.0000	175.5000
25	43585.0000	8.0000	8.0000	73.8000
29	43589.0000	9.0000	18.0000	190.4000
32	43592.0000	10.0000	17.0000	149.4000
35	43595.0000	11.0000	17.0000	478.9000
39	43599.0000	12.0000	17.0000	457.2000
43	43603.0000	13.0000	17.0000	710.2000
46	43606.0000	14.0000	17.0000	155.1000
53	43613.0000	17.0000	18.0000	340.3000
56	43616.0000	18.0000	18.0000	152.2000
59	44508.0000	19.0000	18.0000	254.0000
63	44512.0000	20.0000	18.0000	89.3000
66	44515.0000	21.0000	18.0000	79.9000
69	44518.0000	22.0000	18.0000	329.5000
72	44521.0000	23.0000	15.0000	136.9000
75	44524.0000	24.0000	15.0000	10.2000
78	44527.0000	25.0000	15.0000	345.7000
81	44530.0000	26.0000	18.0000	310.9000
84	44533.0000	27.0000	16.0000	163.6000
88	44537.0000	28.0000	16.0000	194.4000
91	44540.0000	29.0000	17.0000	196.2000
94	44543.0000	30.0000	17.0000	264.5000
MEAN			15.96429	241.96786
STIV			2.912071	155.522329
N			28	28

Tabel 8: Het β -HBZ gehalte in niet heldere broedeieren

OBS	RIRILNR	SPELDERHNR	BROEDTIJD	B-HBZ
7	43567.0000	2.0000	10.0000	46.1000
26	43586.0000	8.0000	8.0000	50.2000
36	43596.0000	11.0000	17.0000	60.2000
40	43600.0000	12.0000	17.0000	77.4000
60	44509.0000	19.0000	13.0000	182.5000
85	44534.0000	27.0000	16.0000	214.3000
95	44544.0000	30.0000	17.0000	55.4000
MEAN			14.71429	98.01429
STIV			3.988077	69.895575
N			7	7

Tabel 9: β -HBZ gehalten in vloeibare eiprodukten "zonder" toevoeging van broedei

RIKILT- nummer	Spelderholt- nummer	Toevoeging	β -HBZ gehalte op produktbasis (mg/kg)	β -HBZ gehalte op eibasis (mg/kg)
44545	3- 1		0,6	0,6
44546	3- 2		0,4	0,4
44550	3- 6		0,8	0,8
44551	3- 7		1,0	1,0
44552	3- 8	50% suiker	0,6	1,2
44553	3- 9	50% suiker	1,0	2,0
46749	3-11		1,8	1,8
46750	3-12		1,7	1,7
46751	3-13		1,5	1,5
46752	3-14		1,2	1,2
46753	3-15	1% suiker + 0,1% zout	1,1	1,1
46754	3-16	"	1,2	1,2
46755	3-17	"	0,7	0,7
46756	3-18	"	1,6	1,6
46757	3-19	8% zout	1,1	1,2
46758	3-20	"	1,2	1,3
46759	3-21	50% suiker	1,2	2,4
46769	3-31	45% suiker *	3,0/2,4	5,4
49449	3-34	50% suiker **	2,5	5,0
49450	3-35	50% suiker **	3,7	7,4
49451	3-36		2,9	2,9
49452	3-37		1,9	1,9
49456	3-41		3,6/2,5	3,0
49457	3-42		0,7/0,5	0,6
		Gemiddeld		2,0
		Standaardafwijking		1,7
		Variatiecoëfficiënt		85%

* toevoeging 5% koelhuisseieren (broedei?)

** gezien het verhoogde β -HBZ gehalte wordt vermoed dat hierin broedei is verwerkt

Tabel 10: β -HBZ gehalten in eipoeders zonder toevoeging van broedei

RIKILT- nummer	Spelderholt- nummer	β -HBZ gehalte op produktbasis (mg/kg)	β -HBZ gehalte op eibasis (mg/kg)
46770	3-32	6,5	1,6
46771	3-33	2,8	0,7
49458	3-43	2,2/2,0	0,5
		Gemiddeld	0,9
		Standaardafwijking	0,59
		Variatiecoëfficiënt	65%

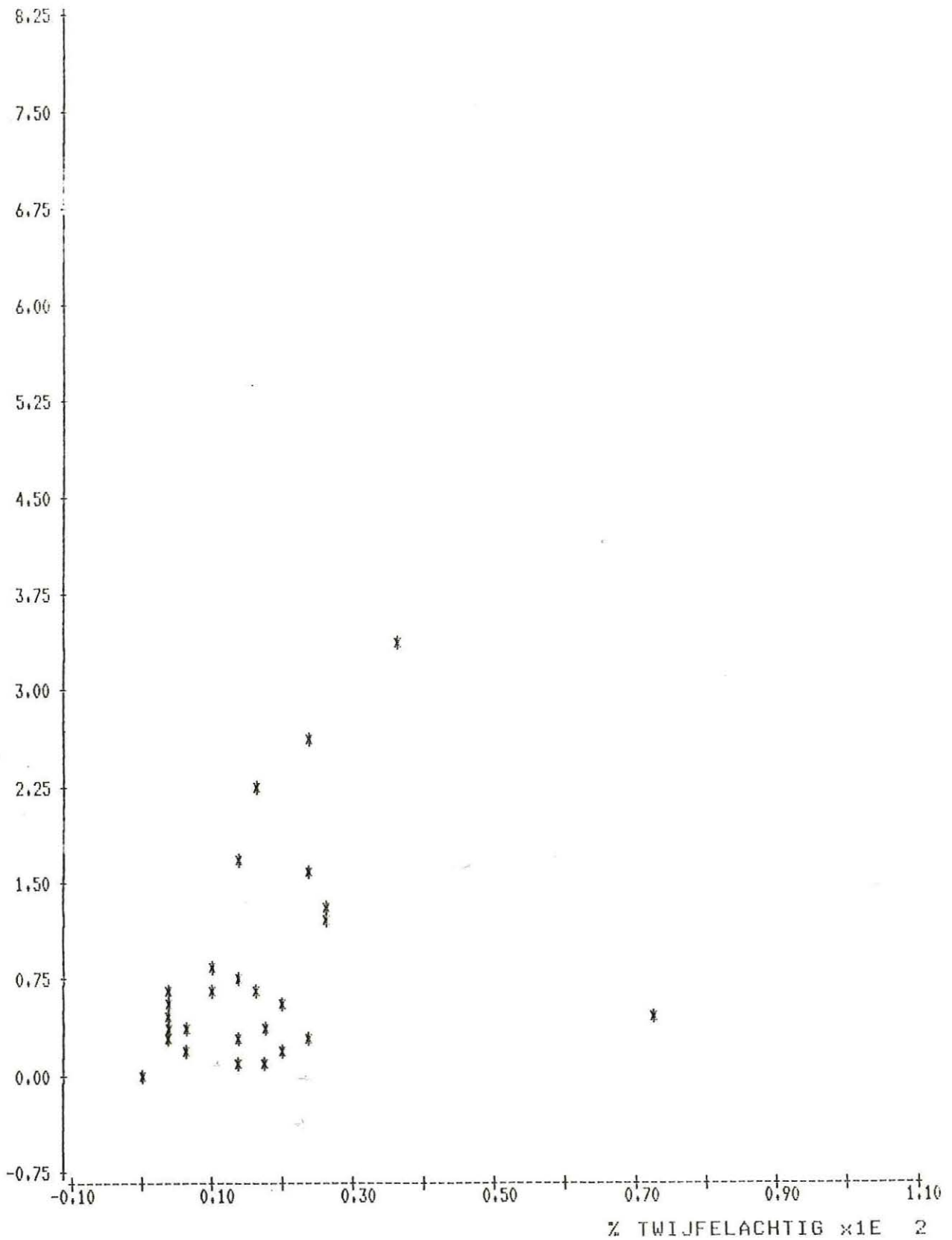
Tabel 11: β -HBZ gehalten in vloeibare eiprodukten met toevoeging van
broedel

RIKILT- nummer	Spelderholt- nummer	Toevoeging	% broedel op eibasis	β -HBZ gehalte op produktbasis (mg/kg)	β -HBZ gehalte op eibasis (mg/kg)	β -HBZ gehalte in het gebruikte broedel (mg/kg)
44547	3- 3		10	8,4	8,4	84
44548	3- 4		20	11,6	11,6	58
44549	3- 5		40	21,9	21,9	55
44554	3-10	50% suiker	30	10,8	21,6	72
46761	3-23		100	15,7	15,7	16
46762	3-24		100	14,9	14,9	15
46763	3-25		100	28,2	28,2	28
46764	3-26		100	80,4	80,4	80
46765	3-27	3% zout	5	5,8	6,0	120
46766	3-28	3% zout	5	8,6	8,9	178
46767	3-29	35% suiker	5	5,1	7,8	156
46768	3-30	45% suiker	25	19,4	29,8	119
49453	3-38		100	120,2	120,3	120,3
49454	3-39	50% suiker	25	14,4	28,8	115
49455	3-40	50% suiker	25	17,4	34,8	139
		Gemiddeld		25,5	29,3	90,3
		Standaardafwijking		31,9	31,2	50,3
		Variatiecoëfficiënt		125%	106%	56%

Tabel 12: Vergelijking β -HBZ gehalte in vloeibare eiprodukten vóór en na pasteuriseren en na het bereiden van poeder

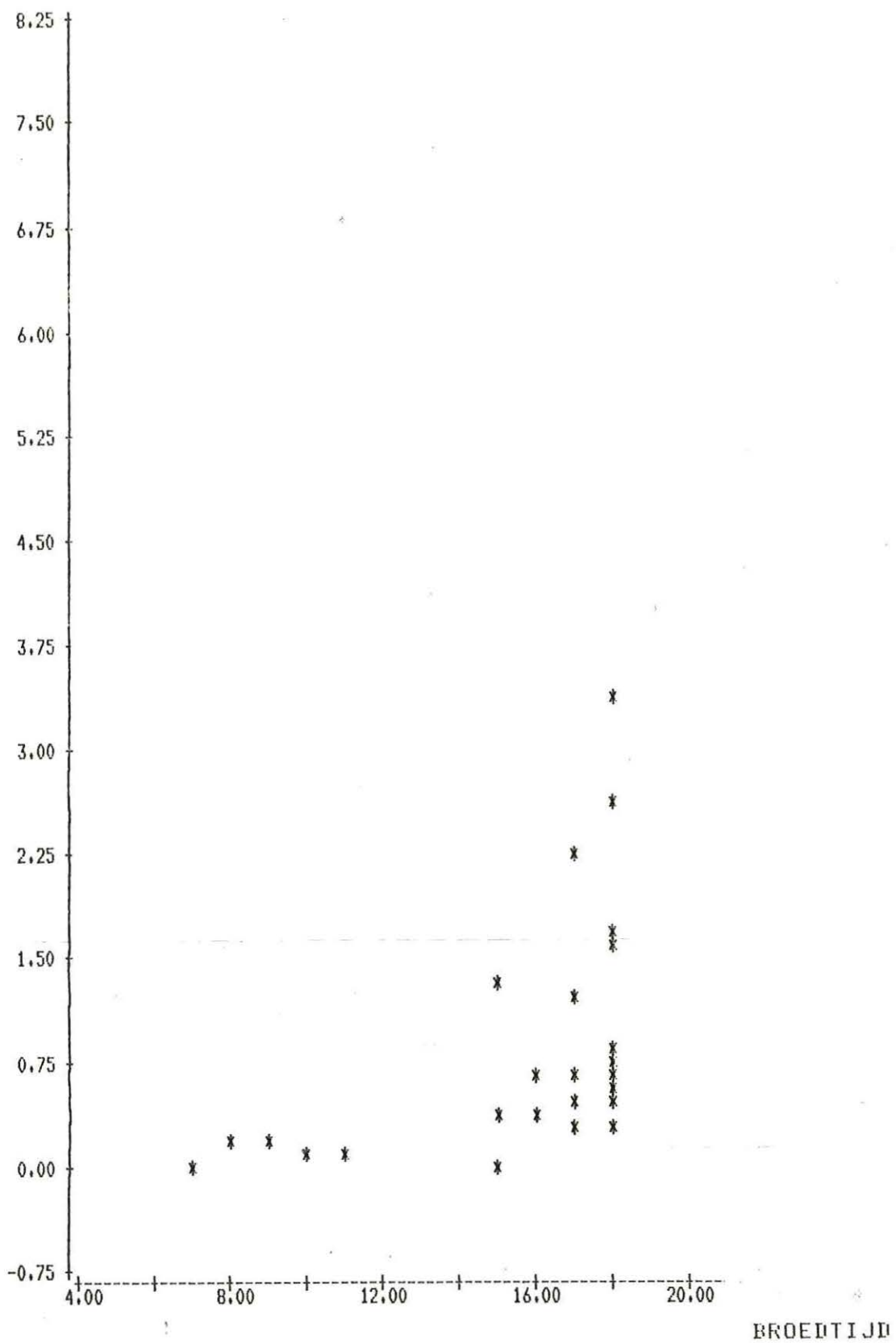
RIKILT- nummer	Spelderholt- nummer	β -HBZ gehalte (mg/kg)		
		Vóór pasteuriseren	Na pasteuriseren	Poeder
49449	3-34	8,0		
49450	3-35		5,7	
49451	3-36	0,3		
49452	3-37		1,9	
49454	3-39	14,4		
49455	3-40		17,4	
49456	3-41	3,0		
49457	3-42		0,6	
49458	3-43			2,1
	Gemiddeld	6,4	6,4	
	Standaardafwijking	6,2	7,6	
	Variatiecoëfficiënt	97%	119%	

E-HBZ $\times 1E^2$



Figuur 1: Het gehalte aan β -HBZ in broedeieren uitgezet tegen het % twijfelachtige eieren welke bij het naschouwen werd aangetroffen.

E-HBZ $\times 1E 2$



Figuur 2: Het gehalte aan β -HBZ in broedeieren uitgezet tegen de broedtijd

Uitgereikt aan:Hoofdgebouw

A.A. Jongebreur
 A.R. Kuit
 G.W.H. Heusinkveld
 A. Vosveld
 Financiële Zaken
 Prof. Ketelaars
 G. Backus

A 2

Comp. Afd.
 U. Haije

A 14

F.R. Leenstra
 J.P. Holsheimer
 C.W. Scheele
 P.J.W. v. Schagen
 Proefmap 5x
 P. Vereijken

A 9

G. Beuving
 N.M. Bolder
 B. Erdtsieck
 A.C. Germs
 A.R. Gerrits
 W.M.M.A. Janssen
 C.A. Kan
 R.W.A.W. Mulder
 A. Oosterwoud
 P.C.M. Simons
 A.T.G. Steverink
 Th.G. Uijttenboogaart
 C.H. Veerkamp
 A.W. de Vries
 B.W. Zaalink
 H.H.M. Zeelen
 H. Rozeboom

Bijlage 1Diversen

D.A. Ehlhardt
 H.J. Blokhuis
 P. v.d. Berg
 Ass.kamer (A13) 2x
 D.J. Dijk
 A. Zegwaard
 A. Overduin
 Malerij
 W.C. Veeger

Proefnr. 683.02 IPS

404.9100 RIKILT

Onderzoekers: Ir. Th.G. Uijttenboogaart (Centrum)

Ir. A.T.G. Steverink
 Proj.leider (Centrum)
 Hr. C. van Crujningen (Centrum)

Drs. H.K. Elenbaas
 Proj.leider (RIKILT)

Drs. B.G. Muuse (RIKILT)

Het bepalen van het gehalte β -hydroxy boterzuur (β -HBZ)
 in eieren en eiprodukten.

Doel:

Verwerking van uitgeschouwde broedeieren in eiprodukten lijkt achteraf goed aantoonbaar op grond van de aanwezigheid van β -HBZ.

De problemen met de analyse zijn nagenoeg opgelost. Daarom lijkt het nu zinvol na te gaan in welke mate het β -HBZ gehalte in 7 en 18 daagse uitgeschouwde heldere eieren spreidt, welke gehalten voorkomen in verse eieren en welke in eiprodukten.

Inleiding:

Jaarlijks worden in Nederland circa 70 miljoen helder uitgeschouwde broedeieren verwerkt tot eiprodukt voor humane consumptie.

Meestal worden de eieren, bij het overleggen van de broedmachine naar de uitkomstkast, na 18 dagen geschouwd, waarbij de heldere eieren worden geselecteerd en als "geel etiket eieren" worden verwerkt in de eiproduktenindustrie. De niet heldere eieren worden gekenmerkt als "rood etiket eieren" welke niet geschikt worden geacht voor menselijke consumptie. De "geel etiket eieren" zullen vooral bestaan uit onbevuchte eieren en uit eieren met een niet herkenbare afgestorven vrucht.

Tot dusverre is het aantonen van schouweieren in eiprodukt toegespitst op de aanwezigheid van β -HBZ.

Het β -HBZ gehalte in onbevruichte, bebroede eieren wijkt echter, volgens de literatuur niet of nauwelijks af van dat van verse eieren. Het percentage onbevruichte eieren in de "geel etiket eieren" is echter niet bekend.

Eieren met een afgestorven vrucht kunnen, afhankelijk van het tijdstip van afsterven, aanzienlijke gehalten aan β -HBZ bevatten. Hieruit blijkt dat het gehalte aan β -HBZ in "geel etiket eieren" sterk zal variëren en dat het noodzakelijk is om inzicht te verkrijgen in die spreiding.

Verwacht wordt dat het gemiddelde gehalte aan β -HBZ in eieren met een zichtbaar afgestorven kiem veel hoger ligt dan bij de onbevruucht bebroede eieren of eieren met een niet zichtbaar afgestorven kiem.

Om langs chemische weg een onderscheid te maken tussen deze eieren is het noodzakelijk om de spreiding van het β -HBZ gehalte daarin te bepalen.

Tevens is het noodzakelijk om goed inzicht te verkrijgen in de spreiding en het nivo van de β -HBZ gehalten in verse eieren. Daardoor wordt het mogelijk een zo laag mogelijke grenswaarde voor onbebroede eieren aan te geven, zodat bijmenging van geringe hoeveelheden broedei aantoonbaar is.

Er zijn in de literatuur gegevens bekend over het gehalte β -HBZ in verse eieren. Het is zinvol om daarnaast nog een aantal aanvullende gegevens te verkrijgen van eieren van diverse herkomst (legbatterij, grondhuisvesting, scharrel).

Ten slotte zullen eiprodukten worden onderzocht op het voorkomen van β -HBZ.

Mogelijk veroorzaken bepaalde toevoegingen (b.v. saccharose) problemen bij de bepalingen van β -HBZ. Tevens kan worden getoetst of β -HBZ gevonden wordt in eiprodukten waarin broedeieren zijn verwerkt.

De mogelijkheid om het β -HBZ gehalte in eiprodukten te gebruiken als indicatie voor de verwerking van broedei is afhankelijk van:

1. Het nivo en de spreiding van het β -HBZ gehalte in verse eieren, 6 daagse heldere en 18 daagse heldere bebroede eieren.
2. De invloed van processing op het gehalte β -HBZ.
3. De standaard afwijking of variatie van de bepalingsmethode

Methoden:

1. Een enzymatische methode voor het bepalen van het β -HBZ gehalte in eieren, vloeibaar eiprodukt en eiprodukt is ontwikkeld.

De methode heeft een detektielgrens van 1 ppm (produktbasis).

2. Een gaschromatografische methode voor het bepalen van het β -HBZ gehalte in eieren is in de eindfase van ontwikkeling en moet nog getest worden omtrent recovery, lineariteit en reproduceerbaarheid.

De vermoedelijke detektielgrens van deze methode ligt ver beneden het 1 ppm nivo.

3. Een elektroforetische methode van het kwalitatief aantonen van bebroede eieren, aan de hand van het eiwit patroon, is aanwezig.
Binnen het beschreven monsteronderzoek wordt deze methode getoetst omtrent bruikbaarheid met betrekking tot het aantonen van onbevruichte, bebroede eieren als zodanig en in eiprodukten.

Monsters:

1. Voor het bepalen van de spreiding van het β -HBZ gehalte worden ca. 30 monsters van 60 heldere bebroede eieren getrokken van een aantal verschillende merken leg- en slachtkippen en van een aantal verschillende broederijen.
De 60 eieren per monster worden op het IPS nageschouwd en verdeeld in heldere eieren (categorie 1), eieren die niet volkomen helder zijn (categorie 2) en niet heldere eieren (categorie 3).
Vervolgens wordt per groep een monster samengesteld waarin alle aanwezige categorieën naar evenredigheid voorkomen. Daarnaast wordt er een monster samengesteld van categorie 1 eieren, een monster van categorie 2 eieren en zo mogelijk een monster van categorie 3 eieren.
2. Voor het vaststellen van het maximale gehalte β -HBZ in onbebroede worden ca. 30 monsters bestaande uit 30 eieren onderzocht. Deze monsters zijn afkomstig uit verschillende bedrijven met legbatterijen (ca. 20), legbedrijven met grondhuisvesting (ca. 5) en legbedrijven met scharrelhuisvesting (ca. 5).
Vastgelegd worden: naam en plaats van het legbedrijf, datum monstername, merk en leeftijd van het koppen.
De monsters beschreven onder de punten 1 en 2 worden door het IPS genomen, van de schaal ontdaan en gehomogeniseerd.
3. Ten behoeve van het onderzoek naar het β -HBZ gehalte in diverse heeleiprodukten, welke in de handel verkrijgbaar zijn, worden ca. 30 monsters onderzocht.
De benodigde monstergrootte bedraagt ca. 500 g. en wordt gekenmerkt als zijnde ei-product, onder vermelding van soort produkt, merknaam, fabrikant, samenstelling, voorbehandeling, bereidingsdatum en datum monstername.
De monsters beschreven onder punt 3 worden ook door het IPS genomen.

Onderzoek:

De monsters verkregen van het IPS worden bewaard bij -20° C en 1 dag voor het onderzoek langzaam (bij 20° C) ontdooid. 90% van de monsters worden in enkelvoud en 10% in duplo onderzocht op het β -HBZ gehalte met behulp van de enzymatische methode.

Een, nog nader vast te stellen, gedeelte van de monsters, met nadruk op de verse en heldere bebroede eieren, zullen eveneens onderzocht worden met behulp van de gaschromatografische methode om het nivo verschil tussen de beide methoden te bepalen en om een indruk te verkrijgen omtrent het β -HBZ gehalte in verse eieren, welke vermoedelijk beneden de 1 ppm ligt.

Circa 10% van de monsters, en in het geval van de heldere bebroede eieren met een laag β -HBZ gehalte alle monsters, worden onderzocht met behulp van elektroforese. Het elektroforetisch onderzoek in heldere 18 dagen bebroede eieren met een laag β -HBZ gehalte (vermoedelijk onbevuchte eieren), is belangrijk om de mogelijkheid van het detekteren van onbevuchte, bebroede eieren te beoordelen.

Planning monstername:

- ()
()
- week 38 en 39 - monstername en voorbereiding uitgeschouwde broedeieren en enkele eiprodukten
 - week 40 en 41 - monstername verse eieren en voorbereiding
 - week 41 t/m 44 - monstername eiprodukten

Onderzoek:

- week 39 en 40 - uitgeschouwde eieren
- week 41 en 42 - methoden toetsen met eiprodukten
- week 43 en 44 - verse eieren
- week 45 t/m 47 - eiprodukten

Verslag:

()
()
December 1983

Beekbergen, 4 oktober 1983
gh

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. VV 9

1e oplage (1983-08-18)

EIPRODUKTEN: BEPALING VAN HET β -HYDROXYBOTERZUURGEHALTE

Verzendlijst: sektorhoofd, afd. Eiwitchemie (4x), afd. Normalisatie
(Humme), bibliotheek (5x).

Eiprodukten: bepaling van het β -hydroxyboterzuurgehalte

1. Toepassingsgebied

De methode is toepasbaar op eieren, vloeibaar eiproduct en eipoeder met een onderste detectiegrens van 1 mg/kg.

2. Beginsel

De eiwitten van het monster ei (produkt) worden met behulp van perchloorzuur neergeslagen. Het β -hydroxyboterzuur (β -HBZ) in het supernatant wordt met behulp van het enzym β -hydroxyboterzuurdehydrogenase, NAD^+ en hydrazinehydraat geoxideerd tot acetoacetaat.

Hydrazinehydraat laat de reactie naar rechts verlopen:



De hoeveelheid β -HBZ wordt berekend aan de hand van de gemeten hoeveelheid NADH bij 340 nm. De methode wordt getoetst met behulp van een standaardoplossing β -HBZ.

3. Reagentia

Alle reagentia moeten van analysekwaliteit zijn. Gebruik dubbelgedestilleerd water.

3.1 Perchloorzuur 30%

Voeg geconcentreerd perchloorzuur (60%) aan een gelijke hoeveelheid water toe.

3.2 Kaliumhydroxide-oplossing 30% (m/v).

3.3 Kaliumhydroxide-oplossing 3% (m/v).

3.4 Zoutzuur, 1M

Verdun één deel geconcentreerd zoutzuur $d_{20} = 1,16$, met negen delen water.

3.5 Zoutzuur, 0,2M

Verdun één deel zoutzuur (3.4) met vier delen water.

3.6 Tris(hydroxymethyl) methylamine, 0,2M

Weeg 24,23 g af en los op in 1 liter water.

3.7 Tris HCl buffer, 0,05M

Meng 50 ml Tris (hydroxymethyl) methylamine met 16,5 ml 0,2M HCl (3.5), breng over in een maatkolf van 200 ml, vul aan met water en meng. Breng de pH op 8.4 met KOH oplossingen (3.2 en 3.3).

Bewaar bij 4°C, maximaal 1 maand houdbaar.

3.8 Hydrazinehydraatoplossing 0,2mM

Meng 5 ml hydrazinehydraat met 25 ml 1M HCL (3.4), breng over in een maatkolf van 50 ml, vul aan met water en meng. Breng de pH op 8.4 met KOH oplossingen (3.2 en 3.3).

Bewaar bij 4°C, maximaal 1 maand houdbaar.

3.9 NAD⁺ oplossing, 10mM

Los 0,3317 g NAD⁺ op in water, breng over in een maatkolf van 50 ml, vul aan met water en meng.

Bewaar bij 4°C, maximaal 1 maand houdbaar.

3.10 D-β-hydroxyboterzuurdehydrogenase

Sigma H-4005, Type III.

3.11 Natriumzout van β-hydroxyboterzuur

Sigma art.nr. H6501 (98%-zuiver).

3.11.1 Standaardoplossing van β-hydroxyboterzuur

Weeg af tot op 1 mg nauwkeurig 0,61 g (3.11) welke overeenkomt met 0,5 g β-hydroxyboterzuur (β-HBZ).

Los op in water en breng over in een maatkolf van 100 ml, vul aan met water en meng. Concentratie β-HBZ is 5 g/l.

3.12 Schilferm of gruizelijfs.

4. Toestellen, glaswerk en hulpmiddelen

- 4.1 Analytische balans, tot op 1 mg nauwkeurig.
- 4.2 Bovenweger, tot op 0,01 g nauwkeurig.
- 4.3 Spectrofotometer, geschikt voor het meten bij een golflengte van 340 nm, met bijbehorende plasticcuvetten van 1 cm weglengte en een cuvetverwarmingssysteem geschikt voor het meten bij 30°C.
- 4.4 Centrifuge, 10.000 toeren/min.
- 4.5 Centrifugebuizen, Dupont, Sorvall Type 03143.
- 4.6 pH-meter, afleesbaar op 2 decimalen en gelijkt bij 40 à 45°C.
- 4.7 Vouwfilters, Schleicher & Schüll 595/1/2 ϕ 150 mm art. nr. 311645.
- 4.8 Konische kolf van 250 ml.
- 4.9 Bekerglazen van 50 en 150 ml.
- 4.10 Trechters ϕ 10 cm.
- 4.11 Volpipetten van 10 en 25 ml.
- 4.12 Verdeelpipetten van 5 en 10 ml.
- 4.13 Micropipetten van 10, 200 en 500 μ l.
- 4.14 Maatkolven van 50, 100 en 200 ml.
- 4.15 ULTRA-TURRAX T 18/10 met hulpstuk 18N en toerenregelaar TR50.
- 4.16 Plastic roerstaafjes.
- 4.17 Plastic beerglas (20l).

5. Werkwijze

5.1 Eipoeder

Weeg 10 g gehomogeniseerd monster, tot op 0,01 g nauwkeurig, af in een centrifugebuis (4.5), voeg 30 ml water toe en homogeniseer met behulp van een ULTRA-TURRAX (4.15). Voeg 25 ml perchloorzuur (3.1) toe, meng met behulp van een ULTRA-TURRAX en handel verder zoals beschreven bij 5.4. (Voorkom klontvorming!)

5.2 Vloeibare eimonsters

Weeg 40 g gehomogeniseerd monster, tot op 0,01 g nauwkeurig, af in een centrifugebuis (4.5), voeg 25 ml perchloorzuur (3.1) toe, meng met behulp van een ULTRA-TURRAX en handel verder zoals beschreven bij 5.4.

5.3 Standaard β -HBZ

Neem bij elke serie monsters een standaard van β -HBZ mee. Verdun hiervan voor de standaardoplossing (3.11.1) door 1,0 ml te pipetteren in een maatkolf van 100 ml en deze met water aan te vullen. Breng 40 ml van deze verdunde standaardoplossing (50 mg/l) over in een centrifugebuis, voeg 25 ml perchloorzuur (3.1) toe, meng en handel verder zoals beschreven bij 5.4.

5.4 Centrifugeer gedurende 15 minuten bij 10.000 toeren/min en filtreer de bovenstaande vloeistof door een vouwfilter (4.7). Breng 30 ml filtraat over in een bekerglas van 150 ml en breng met behulp van KOH-oplossingen (3.2 en 3.3) de pH op 8.4 met een pH-meter gelijk bij 40-45°C (4.6). Breng, met behulp van water, kwantitatief over in een maatkolf van 100 ml, koel af tot kamertemperatuur, vul aan en meng. Plaats de kolfjes gedurende 15 min in een met ijs (3.12) en water-mengsel gevuld vat (4.17). Breng de inhoud over in een centrifugebuis (4.5) en centrifugeer gedurende 10 minuten bij 10.000 toeren/min.

5.5 Pipetteer 2,0 ml monsteroplossing in een cuvet en voeg toe 0,5 ml Tris HCl-buïffer (3.7), 0,5 ml hydrazinehydratoplossing (3.8), 0,4 ml NAD⁺ oplossing (3.9) en 10 μ l enzymesuspensie (3.10). Meng met behulp van een plastic roerstaafje (4.16) en meet de absorptie van het monster met enzym, t.o.v. het monster zonder toevoeging van het enzym, met behulp van een spectrofotometer (4.3) bij 340 nm en bij een temperatuur van 30°C.

Meet de absorptie met tussenpozen van 10 minuten tot een constante absorptiewaarde is verkregen. De absorptie wordt constant beschouwd indien deze niet meer dan 0,0010 extinctie eenheid/min verandert. Veelal is de absorptie na ca. 60 minuten constant. Controleer tijdens op gasvorming in de cuvet en verwijder deze zondig door roeren met behulp van een plastic roerstaafje.

6. Berekening

6.1 Bereken het β -HBZ gehalte in eimonsters, uitgedrukt in mg/kg, met behulp van de formule:

$$\frac{A \times V_1 \times M \times V_2 \times V_3}{E \times V_4 \times G \times V_5} = \text{mg/kg}$$

waarin:

- A = de gemeten absorptie, bij 5.5
- V₁ = totaalvolume vloeistof in de cuvet (3,4 ml)
- M = molecuulgewicht β -HBZ (104.1)
- V₂ = volumemonster + water + perchloorzuur (65 ml)
- V₃ = volume maatkolf (100 ml)
- E = molaire extinctiecoëfficiënt van NADH (6,3 l.mmol⁻¹.cm⁻¹)
- V₄ = ml monsterextract in de cuvet gebracht (2 ml)
- G = ingewogen monster in grammen (ei-poeder 10 g en vloeibaar ei 40 g)
- V₅ = aantal ml geneutraliseerd monster (25 ml)

6.2 Bereken de recovery, van de in (5.3) in bewerking genomen standaardoplossing, uitgedrukt in % met behulp van de formule:

$$\frac{A \times V_1 \times M \times V_2 \times V_3}{E \times V_4 \times V_5 \times C} \times 100\% = \%$$

waarin:

- C = de concentratie van D- β -hydroxyboterzuur in de verdunde standaardoplossing bereid in 5.3, en uitgedrukt in mg/l (zie 6.2.1).

6.2.1 Berekening van de concentratie (C) van D-β-hydroxyboterzuur in de verdunde standaardoplossing, met behulp van de formule:

$$\frac{G \times M_1 \times Z \times 1000}{M_2 \times V \times 2 \times f \times 100} = C \text{ (mg/l)}$$

waarin:

G = afgewogen natriumzout van β-HBZ (mg)

M₁ = molecuulgewicht β-HBZ (104.1)

M₂ = molecuulgewicht van het natriumzout van β-HBZ (126.1)

V = volume standaardoplossing, zoals beschreven in 3.10.1 (100 ml)

Z = zuiverheid van de standaard, zoals opgegeven door de leverancier (98%)

f = verdunningsfactor (100)

Het enzym β-HBZ dehydrogenase reageert alleen met het D-isomeer van β-HBZ. De standaardoplossing bevat, in gelijke verhouding, de D en L isomeren van β-HBZ.

7. Herhaalbaarheid

Het verschil tussen twee bepalingen, gelijktijdig of kort na elkaar uitgevoerd door dezelfde analist (met gebruikmaking van dezelfde reagentia, toestellen, glaswerk en hulpmiddelen) dient niet groter te zijn dan 10%.

Literatuur:

Parry A.E.J., Robinson D.S., Wedzicha B.L.,
J. Sci. Fd. Agric, 1980, 31, 905-910.

Verantwoordelijk: drs H.L. Elenbaas

Samenstellers : P. Stouten en W. Haasnoot

