

Afdeling Microscopie 1982-06-10

VERSLAG 82.45 Pr.nr. 505.0020

Onderwerp: Bepaling van het botgehalte
in boterhamworst

Bijlage: 1

Verzendlijst: directeur, direktie VKA, sektorhoofd (3x), afdeling
Microscopie (3x), projektbeheer, afd. Normalisatie
(Humme), projektleider (De Jong), afdeling Vlees.

Afdeling Microscopie

1982-06-10

VERSLAG 82.45

Pr.nr. 505.0020

Projekt: Ontwikkeling van microscopische en andere optische onderzoeksmethoden voor diverse landbouw- en visserijprodukten.

Onderwerp: Bepaling van het botgehalte in boterhamworst.

Doel:

Door middel van microscopisch onderzoek nagaan of er botbestanddelen zowel kwalitatief als kwantitatief aan te tonen zijn in boterhamworst.

Samenvatting:

Verschillende monsters boterhamworst werden met behulp van diverse methoden onderzocht op botbestanddelen.

Conclusie:

Van de onderzochte methoden bleek dat voor een kwalitatieve methode de calciumkleuring volgens Kossa bruikbaar is. Voor de kwantitatieve methode bleek de sedimenteermethode het meest geschikt.

Hierbij werd vastgesteld dat beide methoden uitvoerbaar zijn alhoewel we nog vele moeilijkheden tegen kwamen, die te zijner tijd met de juiste apparatuur opgelost kunnen worden. In hoeverre deze methoden reproduceerbaar zijn zal uit verder onderzoek moeten blijken.

Verantwoordelijk: drs W.J.H.J. de Jong
Samenstellers: J.S. Ossenkoppele, J.J.M. Vliege
Projectleider: drs W.J.H.J. de Jong

1. Inleiding

Voor het vaststellen van het gebruik van separatorvlees bij de bereiding van boterhamworst enz. wordt in het algemeen gekeken naar de aanwezigheid van botbestanddelen in deze produkten. Verschillende methoden voor het vaststellen van botbestanddelen in separatorvlees worden in de literatuur genoemd zoals b.v. de KOH-methode volgens Gerats en Terbijhe (1), het onderzoek van Wenzel (2), Schulze (3), Sinell (4), Bijker (5) enz. en de kleurmethode volgens Kossa (6). Gezien onze ervaringen met de sedimenteermethode bij het onderzoek van veevoeders verwachten we, dat deze methode ook voor dit onderzoek het meest bruikbaar is. Voor de beschrijving van de methode wordt verwezen naar de Interne Analysevoorschriften Nr. M-3 (zie bijlage 1). De gevonden resultaten werden vergeleken met de chemisch vastgestelde calciumgehalten.

2. Methoden

2.1 Sedimenteermethode

+ 100 gram boterhamworst wordt gemalen en gehomogeniseerd in een omnimixer met tetra. De tetra wordt verwijderd door filtratie, waarna het monster wordt ontvet met aceton (2x). Na het ontvetten wordt het residu gedroogd in een droogstoof bij 75°C, gewogen en gemalen met een kruisslagmolen over 3 mm. Van dit gemalen monster wordt 10 gram afgewogen en gebracht in een sedimenteerkelk met tetra. De botbestanddelen bezinken en worden teruggewogen. Hieruit wordt het botpercentage berekend.

2.2 Calciumkleuring volgens Kossa

Men neemt uit zes plaatsen van het proefmonster enkele blokjes. Alvorens men tot het snijden van coupes overgaat worden de blokjes in een aantal vormpjes van aluminiumfolie (inhoud 1 cm³) 24 uur in ethanol 96% gefixeerd. Er wordt voor de fixatievloeistof ethanol gekozen, omdat het weefsel te poreus is om er direkt coupes van te snijden.

Na de fixatie worden er uit drie van deze blokjes twee coupes van 10 tot 12 micron gesneden, zodat er zes coupes ontstaan voor het onderzoek.

Nadat de coupes gesneden zijn worden ze gestrekt in een strekbad van 37°C, opgeplakt op een objectglaasje en in een droogstoof minimaal 24 uur gedroogd bij 37°C. Hierna wordt de calciumkleuring volgens Kossa toegepast, die als botkleuring het meest geschikt lijkt. Deze kleuring gaat als volgt:

1. de coupes worden gedurende tien minuten in een zilvernitraat oplossing geplaatst onder een U.V. lamp (366 nm)
2. 5 minuten spoelen in gedemineraliseerd water
3. 30 sekonden in een natriumthiosulfaat oplossing
4. 3 minuten in stromend leidingwater
5. 5 minuten in ethanol 70%
6. 5 minuten in ethanol 96%
7. 2 maal 5 minuten in ethanol 100%
8. 5 minuten in ethanol 100%/xylol 1:1
9. 2 maal 5 minuten xylol
10. insluiten met Entellan.

Na droging kunnen de preparaten microscopisch bekeken en beoordeeld worden.

De samenstelling van de gebruikte oplossingen is als volgt:

Strekbad oplossing:

los 2 gram gelatine op in 300 ml gedemineraliseerd water. Verwarmen tot 70°C en affiltreren. Voeg hierna 1700 ml gedemineraliseerd water en 10 ml 40% formaline toe.

Zilvernitraat oplossing:

los 5 gram zilvernitraat op in 100 ml gedemineraliseerd water.

Natriumthiosulfaat oplossing:

los 50 gram natriumthiosulfaat op in 1000 ml gedemineraliseerd water.

3. Resultaat

Met de calciumkleuring volgens Kossa werden botbestanddelen en zenuwweefsel aangetoond. De botbestanddelen (been en verbeend kraakbeen) worden zwart terwijl het overige weefsel ongekleurd blijft.

Met de sedimenteermethode werden 17 monsters boterhamworst botpercentages bepaald (zie Tabel).

Drie van deze monsters werden in duplo bepaald. De gevonden cijfers werden vergeleken met de chemisch vastgestelde calcium (Ca) gehalten. Hieruit bleek dat er enigszins overeenkomsten bestaan tussen het chemisch bepaalde calcium (Ca) gehalte en de gevonden cijfers bij de sedimenteermethode, vooral bij de hogere gevonden waarden. In alle monsters werden botbestanddelen teruggevonden. De KOH-methode volgens Gerats en Terbijhe bleek niet geschikt omdat er geen botbestanddelen werden teruggevonden. Wel werden met deze methode kruiden teruggevonden.

Tabel:

<u>nummer</u>	<u>% bot</u>	<u>% bot (duplo)</u>	<u>% Ca</u>
1	0,261		0,138
2	0,012		0,015
3	0,022		0,013
4	0,020	0,028	0,012
5	0,006		0,004
6	0,007		0,008
7	0,011		0,012
8	0,055	0,048	0,027
9	0,009		0,006
10	0,018		0,013
11	0,005		0,015
12	0,326		0,115
13	0,012		0,016
14	0,010		0,012
15	0,015		0,009
16	0,019	0,016	0,015
17	0,059		0,056

4. Conclusie

De beschreven calcium kleuring volgens Kossa voldeed als kwalitatieve methode om botbestanddelen aan te tonen, alhoewel de mogelijkheden beperkt waren daar de juiste apparatuur nog niet aanwezig was.

De sedimenteermethode voldeed zodanig dat in alle monsters boterhamworst botbestanddelen werden teruggevonden.

In hoeverre deze methode reproduceerbaar is zal uit verder onderzoek moeten blijken. De voordelen van deze methode zijn:

- vrij eenvoudig van opzet
- vrij snel
- de botbestanddelen kunnen onder de stereo-microscop geïdentificeerd worden.

5. Literatuur

1. Kwantitatieve botbepaling in pluimveemeat volgens de KOH-methode van G.E. Gerats en R.J. Terbijhe.
2. Vergleichende Untersuchungen zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Knochengewebe in Fleisch- und Wursterzeugnissen durch direkte und indirekte Verfahren von S. Wenzel, G. Anhalt, M. Schaal und H. Froehner.
3. Bestimmung des Knochengehaltes in Separatorenfleisch aus Schweineknochen von K. Schulze.
4. Zum quantitativen Nachweis geringer Knochenmengen in Dosenleberwurst von Hans J. Sinell.
5. Botgehalte in mechanisch ontbeend varkensvlees door P.G.H. Bijker, G.E. Gerats en T. Fransen.
6. Mikroskopische Technik von Benno Romeis.
7. Über die Bestimmung und den Gehalt von Knochensplittern in Fleischwaren von H.W. van Gend.

Bijlage I

Intern Analysevoorschrift nr. M-3

1e oplage (1981-02-22)

De scheiding naar soortelijk gewicht door middel van vloeistoffen met een hoog soortelijk gewicht

I. Bereiding van het bezinksel

1. Reagentia

1. Tetrachloorkoolstof (tetra)
2. Chloroform.

2. Apparatuur

1. Glazen sedimenteerkelken van 1/4 liter: conische glazen met voet, voorzien van glazen afsluitplug in het onderste, smalle gedeelte. In de plug bevindt zich een holte, waarin het bezinksel zich verzamelt, waarna dit door draaien van de plug kan worden gescheiden van de verdere inhoud van de kelk.
2. Zeefdoosjes: voorzien van zeefgaas met vierkante mazen van 0,32 mm maaswijdte.
3. Horlogeglazen: diameter ongeveer 9 cm.

3. Analyse materiaal

Zie intern analysevoorschrift nr. M-1.

Van dierlijke produkten, behalve bloedmeel, levermeel en vetkanen 2,0 g;

Van gras-, klaver- en lucernemeel 5,0 g;

Van andere produkten (inclusief bloedmeel, levermeel en vetkanen) 10,0 g.

4. Uitvoering

Breng de afgewogen hoeveelheid analyse materiaal in een sedimenteerkelk, waarin zich ongeveer 100 ml tetra bevindt. (Indien het monster in geperste vorm voor onderzoek is aangeboden, wordt het analyse materiaal in een mortier aangewreven met een weinig tetra en daarna met ongeveer 100 ml tetra overgespoeld in de kelk).

Roer het monster zorgvuldig met een roerstaaf door de vloeistof en laat daarna bezinken. Als regel zal bezinksel na ongeveer 5 minuten in de holte van de plug zijn verzameld. Draai vervolgens de plug een kwart slag om, schenk de tetra met de bovendrijvende bestanddelen af en schuif daarna de plug met het bezinksel voorzichtig uit de voet van de kelk. Schenk de bovenstaande tetra voorzichtig af en breng het bezinksel kwantitatief op een gewogen horlogeglas. Laat de tetra volledig verdampen, weeg horlogeglas met bezinksel en bereken de hoeveelheid bezinksel in procenten van het monster. Scheid daarna het bezinksel door middel van een zeefdoosje in een grove en een fijne fractie.

5. Opmerking

Het gevonden gehalte is meestal geringer dan het ware gehalte aan soortelijk zware stoffen, doordat in geperste voeders, maar ook in andere, de zware delen, vooral wanneer ze zeer fijn verdeeld zijn, blijven kleven aan de lichtere en daardoor niet bezinken.

Het omgekeerde kan echter ook voorkomen.