

Project 505.7000

Ontwikkeling en verbetering methoden van onderzoek voor vlees en
vleesprodukten

Projectleider: dr J. de Jong

Rapport 90.24

juni 1990

Een literatuuroverzicht van methoden
voor identificatie en kwantificering
van slachtdiersoorten en vlees-
vreemde eiwitten in vlees en vlees-
produkten

G. Cazemier

Goedgekeurd door: dr J. de Jong

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-75400

Telex 75180 RIKIL

Telefax 08370-17717

Copyright 1990, Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten.

Overname van de inhoud is toegestaan mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur
sectorhoofden
projectleider
afdeling Algemene Chemie
dr R.J.A. Paulussen
programmabeheer en informatieverzorging
circulatie
bibliotheek

EXTERN:

Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Directie Wetenschap en Technologie
Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden
Directie Veehouderij en Zuivel
Directie Veterinaire Dienst
Directie Rijksdienst voor de keuring van Vee en Vlees
Informatie en Kennis Centrum, Veehouderij
Inspectie Gezondheidsbescherming/Keuringsdienst van Waren Zutphen,
ir F.W. Jansen
Inspectie Gezondheidsbescherming/Keuringsdienst van Waren Maastricht,
dr P.R. Beljaars
Veterinaire Hoofdinspectie, drs J.M.P. den Hartog
Produktschap Vee en Vlees
Produktschap Pluimvee en Eieren
Centrum voor Onderzoek en Voorlichting voor de Pluimveehouderij
"Het Spelderholt"
ATO Agrotechnologie drs H. Elenbaas
Instituut voor Veeteeltkundig Onderzoek "Schoonoord"
Rijksuniversiteit Utrecht, Vakgroep Voedingsmiddelen van
Dierlijke Oorsprong
Redactie De Ware(n)-Chemicus
Secr. Werkgroep MOVE p.a. ir F.W. Janssen IGB Zutphen
Agralin

ABSTRACT

Een literatuuroverzicht van methoden voor identificatie en kwantificering van slachtdiersoorten en vleesvreemde eiwitten in vlees en vleesprodukten.

A review of methods for the identification and quantification of meat species and non meat proteins in meat and meat products.

G. Cazemier

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT)
PO Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

The recent literature about the identification and determination of meat species and non meat proteins is reviewed. Identification of unheated meat species and non meat proteins is relatively simple, for heated products the applicability of most of the methods is limited. Quantification is cumbersome, even in unheated products. Microscopy, electrophoresis and immunochemistry are the most suitable methods for identification of non meat proteins, while ELISA seems to be the best method for quantitative determination. Identification of meat species can be done by gas chromatography, HPLC, electrophoresis, immunochemistry and DNA-hybridisation. With the exception of gas chromatography these methods may also be applied to the semi-quantitative determination of unheated products. Some electrophoretic methods, ELISA and DNA-hybridisation can be used for the determination of meat species in heated products.

Keywords: review, identification, quantification, meat species, non meat proteins, meat, meat products.

()

()

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
2 VLEESVREEMDE EIWITTEN	7
2.1 Algemeen	7
2.2 Microscopische en histologische methoden	8
2.3 Indirecte chemische methoden	9
2.4 Chromatografie	10
2.5 Polyacrylamide-gelelectroforese	11
2.6 Immunochemische methoden	12
2.7 Conclusies	16
3 VLEESSPECIES	17
3.1 Algemeen	17
3.2 Chromatografie	18
3.2.1 Vet	18
3.2.2 Eiwit	19
3.3 Electroforese	21
3.4 Immunochemische methoden	24
3.5 Hybridisatie van desoxyribonucleïnezuur	28
3.6 Conclusies	30
LITERATUUR	32

()

()

SAMENVATTING

Dit literatuuroverzicht behandelt methoden voor de identificatie en kwantificering van vleesvreemde eiwitten en vleesspecies aan de hand van literatuur van, in de meeste gevallen, de laatste tien jaar. Vleesvreemde eiwitten kunnen aan vlees worden toegevoegd als eiwitprodukt of als zuiver eiwit. In het eerste geval kunnen naast het eiwit ook andere stoffen dienen ter identificatie. Microscopische technieken kunnen hiervoor goed worden toegepast, bijvoorbeeld voor detectie van oxalaatkristallen als indicator voor gebruik van sojaproducten. Voor identificatie van de eiwitfractie kan gebruik gemaakt worden van diverse immunochemische technieken zoals immunodiffusie en tegenstroom-electroforese (CIE) evenals van elektroforese (SDS-PAGE), eventueel gecombineerd met immunochemische detectie, verder van dot blotting en ELISA. Voor de kwantitatieve bepaling van een aantal vleesvreemde eiwitten in zowel onverhitte als verhitte producten lijkt ELISA goede perspectieven te bieden. De kwantitatieve bepaling van caseïne kan goed worden uitgevoerd met Laurell elektroforese.

Identificatie van vleesspecies kan zowel via de vetfractie (met behulp van gaschromatografie) als de eiwitfractie gebeuren. Voor kwantificering komt voornamelijk de eiwitfractie in aanmerking. Omdat vleeseiwitten door verhitting sterk denatureren is identificatie en vooral kwantificering van verhitte producten problematisch. Voor de bepaling van vleesspecies door analyse van het vleeseiwit wordt gebruik gemaakt van een groot aantal technieken zoals HPLC van zowel wateroplosbare eiwitten (onverhit vlees) als van histidine-dipeptiden (rauw en verhit vlees), verschillende elektroforetische technieken als SDS-PAGE en IEF (rauw en verhit vlees), diverse immunochemische technieken, onder andere immunodiffusie en CIE (rauw vlees), ELISA (rauw en verhit vlees) en dot blotting (rauw vlees). Verder worden technieken gecombineerd, zoals elektroforese en immunochemische detectie na electroblotting van de eiwitten (rauw en verhit vlees). Daarnaast is een nieuwe techniek, DNA hybridisatie in ontwikkeling, welke geschikt is voor rauw en verhit vlees.

Alle genoemde technieken zijn redelijk tot goed bruikbaar voor de identificatie van vleesspecies, kwantificering is bijna niet mogelijk.

De meest geschikte methoden voor identificatie zijn immunodiffusie, CIE en dot blotting. Met behulp van electroforese met immunochemische detectie en ELISA is (semi) kwantitatieve bepaling mogelijk. In de toekomst lijkt DNA-hybridisatie goede perspectieven te bieden, vooral voor verhitte produkten.

1 INLEIDING

In verschillende nationale en internationale wetten en regelingen worden eisen gesteld aan de samenstelling van vlees en vleesprodukten. Het toevoegen van vleesvreemde eiwitten is verboden of moet worden gedeclareerd, het gebruik van bepaalde slachtdieren is soms niet toegestaan, de slachtdiersoort moet zijn gedeclareerd evenals het mengen van vlees van verschillende slachtdieren. Ter controle op deze regelingen zijn goede methoden voor de bepaling van de samenstelling noodzakelijk. Er wordt al vele jaren gewerkt aan het ontwikkelen van analysemethoden voor de bepaling van vleesvreemde eiwitten en vleesspecies. Dit heeft een scala van analysemethoden opgeleverd waarvan er enkele zijn vastgelegd in officiële methoden. Deze methoden kennen echter nog veel nadelen en beperkingen zodat verder onderzoek noodzakelijk blijft. In dit verslag wordt een overzicht gegeven van recente publicaties over het onderzoek naar zowel de bepaling van vleesvreemd eiwit als de bepaling van vleesspecies. De meeste geraadpleegde artikelen zijn gepubliceerd tussen 1980 en 1989 met de nadruk op de laatste vijf jaar.

2 VLEESVREEMDE EIWITTEN

2.1 Algemeen

Vleesvreemd eiwit kan om verschillende redenen aan vleeswaar worden toegevoegd. De belangrijkste toepassingen zijn: verbetering van de textuur, bindmiddel voor water en vet en het vervangen van vlees door een goedkoper produkt. Voor dit doel komen vrij veel eiwit-produkten in aanmerking, zowel plantaardige als dierlijke. Genoemd worden onder andere soja, tarwegluten, raapzaad-, katoenzaad-, pinda- en zonnebloemeiwit, caseïne, wei-eiwit en ei-albumine. De dierlijke eiwitten worden meestal in vrij zuivere toestand toegevoegd. De zuiverheid van plantaardige eiwitten kan sterk verschillen. Zo kan soja worden toegevoegd als sojameel, ontvet sojameel, soja-isolaat en sojaconcentraat met eiwitgehaltes van respectievelijk ca. 37, 56, 72 en 96%. Daarnaast kunnen plantaardige eiwitten worden getextureerd waardoor ze op vlees gaan lijken. Door de verschillende gehalten aan eiwit en andere stof-

fen is het moeilijk de toegevoegde hoeveelheid plantaardig vleesvreemd eiwit te kwantificeren.

Van bovengenoemde produkten worden soja en caseïne vrij veel gebruikt, over het gebruik van de overige produkten is veel minder bekend, mede door gebrek aan goede detectietechnieken (Janssen et al., 1987).

Technieken die voor de bepaling van vleesvreemde eiwitten worden gebruikt zijn microscopisch onderzoek, chemisch onderzoek, vloeistofchromatografie, polyacrylamide-gelelectroforese (PAGE) en verschillende immunochemische technieken, die hierna worden besproken.

2.2 Microscopische en histologische methoden

Vleesvreemde eiwitten kunnen microscopisch worden herkend aan hun structuur, aan de aanwezigheid van soortkenmerkende bestanddelen of met specifieke kleurreacties. In de methoden van onderzoek van de inmiddels ingetrokken Kwaliteitscontrole-verordening kroketten, bitterballen en frika(n)dellen (P.V.V.) 1979 werd een methode voorgeschreven voor het aantonen van getextureerd of gestructureerd vleesvreemd soja-eiwit. Hierbij dienden in het produkt aanwezige palissade- en zandlopercellen en oxalaatkristallen als indicator. Getextureerd soja-eiwit kan met behulp van een stereomicroscoop zonder veel voorbereiding worden onderscheiden van vleeseiwit.

Flint en Meech (1978) beschreven een techniek waarmee het behulp van een stereomicroscoop in met toluëdine gekleurde preparaten getextureerd soja kwantitatief kon worden bepaald. In modelprodukten leverde dit goede resultaten op. Flint en Johnson (1979) konden met behulp van dezelfde techniek tarwegluteneiwit, soja-eiwit en vleeseiwit van elkaar onderscheiden. De methode werd door Flint en Firth (1981) nog iets verbeterd. Luigi et al. (1983) stelden met behulp van microscopische en histologische technieken, waarbij werd gekleurd met hemoglobine-eosine, de samenstelling van ravioli-vulling vast, die onder andere gluten en getextureerd plantaardig eiwit bevatte. Eiwit-isolaat was moeilijker aan te tonen. Baylac et al. (1988) konden met behulp van dezelfde kleuringstechniek sojabonen en gluteneiwit in verhitte vleeswaar terugvinden.

Voor microscopisch en histologisch onderzoek is specifieke kennis en ervaring nodig. Wanneer die aanwezig zijn, kunnen deze technieken

goede hulpmiddelen zijn voor de kwalitatieve en semi-kwantitatieve bepaling van vleesvreemde eiwitten. Kwantificering wordt echter sterk bemoeilijkt omdat in het algemeen de oorspronkelijke samenstelling van het toegevoegde eiwitpreparaat niet bekend is. Een voordeel is dat een aantal vleesvreemde eiwitprodukten ook na verhitting nog is aan te tonen.

2.3 Indirecte chemische methoden

Verschillende onderzoekers proberen de hoeveelheid vleesvreemd eiwit te bepalen door bepaling van zich in het vleesvreemd eiwitprodukt bevindende soort-specifieke stoffen. Amarowicz et al. (1985) bepaalden de hoeveelheid gestructureerd melkeiwit in vleesmengsels aan de hand van de calcium en fosforgehalten en Abd Allah et al. (1986) voorspelden de hoeveelheid rauwe sojabonen in vleesmengsels aan de hand van de eiwit-, vet-, as- en aminozuurgehalten. Beide methoden lijken weinig perspectief te bieden, melkeiwit kan beter met behulp van goed uitvoerbare en meer specifieke electroforetische of immunochemische methoden worden bepaald, terwijl voor sojabevattende produkten aan de hand van de gehalten aan bovengeschreven hoofdcomponenten slechts een grove schatting gemaakt kan worden van de samenstelling die bovendien afhankelijk is van de soort soja die wordt gebruikt. Iets meer perspectief lijkt een onderzoek van Komándi en Dworschák (1988) te bieden. Zij bepaalden de hoeveelheid getextureerd soja-eiwit in worstmengsels met behulp van de gehalten aan α (1,6) galactosyl oligosacchariden (raffinose en stachyose) en fytinezuur (inositol waarvan alle hydroxylgroepen zijn veresterd met fosforzuur). Deze verbindingen worden in plantaardige produkten zoals soja aangetroffen. Nadeel van deze methode is, dat de gehalten aan deze stoffen afhankelijk zijn van het type produkt, sojameel bevat minder eiwit en meer andere stoffen dan sojaconcentraat terwijl soja-isolaat nagenoeg geheel uit eiwit bestaat. Ook Elenbaas et al. (1985) wijzen in een overzichtsartikel over kwantitatieve bepalingsmethoden voor plantaardige eiwitten in voedingsmiddelen op het verschil in omrekeningsfactoren van fytine-fosfaat in eiwit. Wanneer aan een vleesprodukt vleesvreemd eiwit wordt toegevoegd dat niet uit zuiver eiwit bestaat zal het, indien de oorspronkelijke samenstelling niet bekend is, niet mogelijk zijn de

toegevoegde hoeveelheid te bepalen. In deze gevallen lijkt het het beste om de hoeveelheid vleesvreemd eiwit te bepalen.

2.4 Chromatografie

Diverse chromatografische technieken zijn belangrijke hulpmiddelen voor het aantonen en bepalen van verschillende eiwitten en peptiden. Een aantal onderzoekers heeft getracht met behulp van chromatografie vleesvreemd eiwit in vleesprodukten te detecteren. Medina en Phillips (1982) hydrolyseerden vlees- en sojamonsters met behulp van trypsine. De zo verkregen peptiden werden gescheiden met dunnelaagchromatografie gevolgd door HPLC. Met deze techniek kon onderscheid worden gemaakt tussen rund-, kippe- en varkensvlees en soja in verhitte produkten. Agater et al. (1986) scheidde op dezelfde wijze verkregen peptiden met ionenuitwisselingschromatografie. Bij vlees, zowel afkomstig van rund als van varken, werd een specifieke vleespiek gevonden, bij soja werd een karakteristieke sojapiiek gevonden. In bekende mengsels kon soja-eiwit tot op 2% van het werkelijke gehalte worden teruggevonden. Er werden soja-isolaten, -concentraten, -melen en getextureerde soja's van respectievelijk 5, 4, 6 en 13 verschillende leveranciers toegevoegd. De resultaten waren wel afhankelijk van de gebruikte soort soja-eiwit, een ander nadeel was de lange analyseduur (chromatografisch gedeelte 6 uur). Karatzas en Zarkadas (1988) bepaalden met behulp van een aminozuuranalysator de hoeveelheden 3-methylhistidine en 5-hydroxylysine waarmee de totale hoeveelheid vleeseiwit kon worden berekend. Het verschil tussen de totale hoeveelheid eiwit en de hoeveelheid vleeseiwit was een nauwkeurige schatting van de toegevoegde hoeveelheid vleesvreemd eiwit. Volgens de auteurs heeft de methode als grote voordelen de korte analysetijd (< 6 uur) en de mogelijkheid om vleesvreemd eiwit in zowel rauw als verhit vlees te bepalen. Alle genoemde methoden zijn nogal bewerkelijk en daarom minder geschikt voor routine-analyses. Met de methoden van Medina en Phillips en van Agater et al. wordt soja direct bepaald. De bepaling van vleesvreemd eiwit volgens Karatzas et al. is indirect, er kan alleen mee worden aangetoond dat vleesvreemd eiwit aanwezig is, zonder dat dit wordt geïdentificeerd. Identificatie is voor de bepaling van vleesvreemd eiwit echter noodzakelijk. Om deze reden zijn andere methoden

waarmee de aanwezigheid van vleesvreemd eiwit via de bepaling van het vleesgehalte wordt vastgesteld niet in dit verslag opgenomen.

2.5 Polyacrylamide-gelelectroforese (PAGE)

PAGE wordt reeds geruime tijd toegepast als bepalingmethode voor vleesvreemde eiwitten, vooral in combinatie met monsterextractie met behulp van natrium dodecylsulfaat (SDS). Hofmann (1973) verkreeg met SDS-PAGE goed reproduceerbare eiwitbanden patronen van vleesmonsters die waren gemengd met soja-, melk- en kippeï-eiwit. Janssen en de Baaij (1982) onderzochten factoren die van invloed zijn op de bepaling van vleesvreemde en species-eiwitten met SDS-MZE (SDS-Multiphasic Zone Electrophoresis, een nieuwe naam voor disc electroforese; hierbij wordt gebruik gemaakt van een discontinu buffersysteem en - meestal - een discontinue polyacrylamide matrix). Voor een aantal vleesprodukten kan SDS-MZE electroforese een bruikbare aanwijzing geven over de aanwezigheid van vleesvreemd eiwit. Voorzichtigheid bij de interpretatie van de ferogrammen, vooral wat betreft kwantitatieve uitspraken, is echter geboden omdat de kleurintensiteit van de sojabanden sterk afhankelijk was van het toegevoegde sojapreparaat.

In een overzichtsartikel over de bepaling van eiwitten in levensmiddelen met electroforetische en chromatografische technieken stellen Kaiser en Krause (1985) dat voor het aantonen van soja in vleeswaren SDS-PAGE de beste resultaten geeft, zowel kwalitatief als kwantitatief. Een probleem blijft wel, dat het voor de kwantitatieve bepaling van soja noodzakelijk is de juiste omrekeningsfactoren te kennen, die per produkt sterk uiteen kunnen lopen omdat het eiwitgehalte van de toegevoegde soja niet bekend is. Dit is overigens een probleem dat zich bij iedere techniek waarmee soja kwantitatief wordt bepaald via het eiwitgehalte voordoet.

Berkowitz en Webert (1987) bespreken een tweetal onderzoeken waarbij met behulp van SDS-PAGE redelijke recoveries van getextureerde soja in verhitte produkten worden gevonden. In beide onderzoeken werden de monsters geëxtraheerd in een hete oplossing van SDS-mercaptoethanol. De laatste verbinding verbreekt de covalente disulfide bindingen. Met de ene methode werd $81 \pm 14\%$ en met de andere $88 \pm 27\%$ teruggevonden. Baylac et al. (1988) onderzochten worsten waaraan verschillende hoe-

veelheden (0,5, 2 en 4%) caseïnaat, wei-eiwit, varkensbloedplasma, kippeëi-eiwit, boneneiwit, soja-eiwit en gluten waren toegevoegd en die gedurende verschillende tijden waren verhit tot verschillende temperaturen, namelijk rauw, 40 min. bij 70°C, 0,6 min. bij 121°C, 1,5 min. bij 121°C en 5 min. bij 121°C, met 3 methoden, waaronder SDS-PAGE. In geen der monsters kon varkensbloedplasma en gluten worden aangetoond. In alle monsters, ook die gedurende 5 min. bij 121°C waren gesteriliseerd, kon caseïnaat worden aangetoond. Wei-eiwit werd aangetoond in alle monsters die maximaal 0,6 min. waren gesteriliseerd. Ei-eiwit was alleen aantoonbaar in het onverhitte produkt. Boneneiwit werd in alle monsters aangetoond, behalve in het monster dat 0,5% bevatte en dat 5 min. was gesteriliseerd. De verhitte monsters die 0,5% soja bevatten werden als negatief beoordeeld, alle overige waren positief.

2.6 Immunochemische methoden

Bij de immunochemie worden voor de herkenning van eiwitten specifieke antisera gebruikt. Deze bevatten eiwitten die met het betreffende eiwit, het antigeen, een onoplosbaar precipitaat geven (antigeen - antilichaam - reactie). Dit precipitaat is door kleuring zichtbaar te maken. Voor ieder aan te tonen eiwit is een ander antiserum nodig. Het voordeel van de immunologie, de grote specificiteit, kan zich ook tegen zich keren: zodra een eiwit, bijvoorbeeld door verhitten, wordt gedenameerd wordt geen reactie meer waargenomen. Denaturatie bemoeilijkt echter ook de bepaling van eiwitten met andere methoden.

De meest gebruikte immunochemische methoden zijn immunodiffusie, dot blotting, Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) en combinaties van immunochemische en elektroforetische technieken zoals tegenstroom immunoelektroforese, Laurell-elektroforese en elektro-blotting.

Een van de oudste en meest eenvoudige immunochemische technieken is de immunodiffusie volgens Ouchterlony. Hierbij worden in een agargel gaatjes geponst. In een gaatje wordt monster gebracht, in een ander het antiserum. Het antiserum en de monsteroplossing diffunderen in de gel. Wanneer de monsteroplossing antigeen bevat ontstaat een neerslag met het toegevoegde antilichaam hetgeen wijst op aanwezigheid in het monster van de stof waartegen de gebruikte antilichamen waren gemaakt. Baylac et al. (1988) toonden met behulp van deze techniek veldbonen-, soja- en gluten-eiwit aan in verhitte vleeswaar.

Door de kortere analysetijd wordt tegenstroom immunoelectroforese, (counterimmunoelectrophoresis, CIE) waarbij antigeen en antilichaam in een electrisch gelijkspanningsveld naar elkaar toe bewegen en op het equivalentiepunt een precipitaat vormen, vaker toegepast dan immunodiffusie. Bauer (1984) toonde met deze methode in verhitte worsten 0,001% melkeiwit, 0,01% soja-eiwit, 0,004% eipoeder en 0,02% weipoeder aan. Tebling (1985) toonde met CIE 0,125% veldboneneiwitisolaat in voedingsmiddelen duidelijk aan. De kwantitatieve bepaling voerde hij uit met Laurell electroforese. Bij deze techniek wordt het monster geëlectroforeerd in een met antiserum gemengd agarosegel zodat precipitaatpieken worden gevormd waarvan de hoogte afhankelijk is van de hoeveelheid antigeen. Andere leguminosezaden gaven positieve reacties, bij langer verhitten dan 2 minuten werden de eiwitten dermate gedena-
tureerd dat geen duidelijke reactie meer mogelijk was.

Laurell electroforese is volgens Janssen en Hägele (1989) een goede methode voor het bepalen van caseïne in verhitte vleeswaren. Bij een in 1988 uitgevoerd ringonderzoek bleek de gemiddeld gevonden waarde maximaal 0,2% af te wijken van de werkelijke waarde. Hierbij moet aangetekend worden dat het bepalen van caseïne in verhitte vleeswaren ook met andere technieken in het algemeen niet veel problemen oplevert omdat dit eiwit, in tegenstelling tot andere eiwitten, redelijk hitte-stabiel is.

De laatste jaren is er een grote ontwikkeling in het gebruik van enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA's) voor voedingsmiddelenanalyse. Hoek en Beljaars (1988) beschrijven in een duidelijk artikel enige algemene principes en methoden van het ELISA-onderzoek en geven verder een literatuuroverzicht van enkele toepassingen van ELISA's bij de levensmiddelenanalyse. ELISA is gebaseerd op de absorptie van antilichaam of antigeen op de oppervlakte van een vaste fase, bijvoorbeeld een plastic cupje. De antigeen-antilichaam reactie wordt gedetecteerd en versterkt door gebruik te maken van covalent gebonden enzym-antilichaam of enzym-antigeen moleculen, waarvan de aanwezigheid vervolgens wordt bepaald door het enzym-substraat. De hoeveelheid substraat die wordt omgezet in een bepaalde tijd is een maat voor de antigeen concentratie in het monster (Allen en Smith, 1987).

In de levensmiddelenanalyse worden voornamelijk drie ELISA-typen toegepast, te weten:

- A Dubbel-antilichaam ELISA (Sandwich ELISA). Hierbij wordt gebruik gemaakt van een primair (ongelabeld) en een secundair (gelabeld met een enzym) antilichaam. Het primaire antilichaam is geabsorbeerd aan de wand van het cupje. Het monster wordt in het cupje gebracht waarbij eventueel aanwezige antigenen aan de antilichamen worden gebonden waarna een bekende hoeveelheid secundair antilichaam wordt toegevoegd. Deze antilichamen koppelen zich aan het gebonden antigeen complex. Na uitwassen van de overmaat antilichaam wordt de enzymactiviteit gemeten door een enzym-substraat toe te voegen.
- B Directe competitieve ELISA. Ook hierbij wordt het antilichaam gebonden aan de wand van het cupje. Het antigeen in het monster gaat nu echter een directe competitie aan met een bekende hoeveelheid enzymgelabeld antigeen. Naarmate er meer antigeen in het monster zit zal er minder enzymgelabeld antigeen aan het vaste-fase antilichaam worden gebonden. Na wassen wordt een substraat toegevoegd en de kleurintensiteit gemeten.
- C Indirecte ELISA. Hierbij wordt antigeen gebonden aan de wand. Voordat het monster in het cupje wordt gebracht wordt het gemengd met een bekende hoeveelheid antilichaam. De overmaat antilichaam wordt gebonden aan het antigeen aan de wand. Na wassen wordt een secundair antilichaam-enzym-conjugaat toegevoegd, gericht tegen het eerste antilichaam. Na wassen wordt de enzymactiviteit gemeten na toevoeging van een geschikt substraat.

Hitchcock et al. (1981) maakten antiserum tegen in ureum verhitte soja en gebruikten dat voor een ELISA test. Wanneer het te onderzoeken monster voor de analyse werd verhit in ureum kon soja worden bepaald. Door het denatureren met ureum kunnen zowel rauwe als verhitte monsters worden onderzocht. McNeal (1987) bespreekt de resultaten van een in 1984 met deze methode uitgevoerde ringtest en concludeert dat, indien het te bepalen soja-eiwit als calibratiemonster wordt meegenomen, de methode kwantitatief is. Ravestein en Driedonks (1986) beschrijven een ELISA waarmee vanaf 0,5% soja in vleeswaar kwantitatief kan worden bepaald. De gebruikte antilichamen zijn specifiek voor met SDS gedenaatureerde soja-eiwitten. De bepaling is onafhankelijk van het gebruikte sojaras en voorbehandeling van het produkt. Ring (1987) vergelijkt een sandwich-ELISA-methode met een gemodificeerde indirecte ELISA procedure.

Met beide methoden kon een toevoeging van 0,25% soja-isolaat in verhitte worst worden bepaald. De indirecte methode was, doordat minder handelingen nodig waren, geschikt als screeningtest. Rittenburg et al. (1987) beschrijven een verbeterde indirecte ELISA. De voor het uitvoeren van deze procedure benodigde gestandaardiseerde, gestabiliseerde reagentia zijn commercieel verkrijgbaar in een "kit". Met deze methode kan 1-10% soja-eiwit in rauwe en verhitte vleeswaar worden bepaald. Deze methode werd door Hall et al. (1987) in een ringonderzoek getest. De herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid waren respectievelijk ca. 1 en 2% met een recovery van 80-100%. Yasumoto et al. (1990) maakten antiserum tegen peptide fragmenten van met trypsine gehydrolyseerd soja-eiwit dat specifiek was tegen glycine (een hitte stabiel soja-eiwit). Dit antiserum werd gebruikt in een ELISA-methode. De methode is bruikbaar voor verschillende sojarassen en geeft volgens de auteurs zeer betrouwbare resultaten bij de kwantitatieve bepaling van soja in rauwe en verhitte vleeswaren.

ELISA's zijn in het algemeen vrij bewerkelijk. Janssen et al. (1985) beschreven een dot blot immuno-assay die minder bewerkelijk is en geschikt voor de kwalitatieve en semi-kwantitatieve bepaling van soja in rauwe en verhitte vleeswaren. Hierbij wordt een SDS extract van het monster geïmmobiliseerd op nitrocellulose. Het nitrocellulosemembraan wordt, nadat de overige reactieve plaatsen zijn geblokt, gespoeld met een sterk verdund anti-soja-serum. Na uitwassen van de overmaat serum kan soja op twee manieren worden gedetecteerd, namelijk:

A Door peroxidase anti peroxidase (PAP). Hierbij wordt konijne-anti-soja IgG gebonden aan de te bepalen soja. Het geheel wordt geïncubeerd met een overmaat geite-anti-konijn IgG. Het antiperoxidase wordt gebonden aan de overmaat geite-anti-konijn IgG. De overmaat PAP wordt uitgespoeld. Peroxidase kan een substraat omzetten in een gekleurde verbinding. De intensiteit van de kleur is een maat voor de hoeveelheid soja.

B Door peroxidase conjugaat, hierbij wordt de blot behandeld met een anti-konijn IgG dat is geconjugeerd met peroxidase. De overmaat wordt uitgewassen, waarna na toevoegen van een substraat de kleuring intensiteit wordt gemeten.

Methode A is gevoeliger dan methode B, welke eenvoudiger is uit te voeren.

De detectielimiet is minder dan 0,1% soja-eiwit. Ter bevestiging van de voorafgaande dot blot methode gebruiken Janssen et al. (1986) een techniek waarbij een met SDS-PAGE geëlectroforeerd monster wordt overgebracht op nitrocellulose. De verdere detectie van de eiwitten komt overeen met de dot blot methode. Beide methoden hebben als groot voordeel dat commercieel verkrijgbare antisera worden gebruikt, dit in tegenstelling tot een aantal eerder genoemde ELISA methoden waarbij is uitgegaan van niet in de handel verkrijgbare antisera.

Janssen et al (1987A) bepaalden met een electroblot methode, waarbij met SDS-PAGE geëlectroforeerde eiwitten werden overgebracht op een nitrocellulosemembraan waarna werd gekleurd met PAP, naast soja-eiwit ook tarwegluten, wei-eiwit, caseïne en ovalbumine in verhitte producten. Wei-eiwit en caseïne waren niet goed van elkaar te onderscheiden omdat kruisreacties optraden. De dot blot screeningsmethode voor dezelfde vijf eiwitten wordt door Janssen et al. (1987B) beschreven. In dit artikel wordt tevens een vergelijking gemaakt tussen de detectie met het immunoperoxidase-PAP en het immunogoudversterkingssysteem. Bij het immunogoudversterkingssysteem wordt een gouddeeltje gebonden aan een antilichaam. Na reactie met het antigeen wordt Ag^+ toegevoegd. Goud katalyseert de reductie van Ag^+ , zodat op de plaatsen waar goud is gebonden een zilverneerslag ontstaat. Ook hier werden kruisreacties waargenomen tussen caseïne en wei-eiwit. De immunogouddetectie was gevoeliger maar duurder dan de peroxidase-detectie.

Berkowitz en Webert (1987) beschrijven een immunoassay waarbij gebruik wordt gemaakt van een polyclonaal antiserum tegen verhit soja-eiwit. De antilichamen werden geconjugeerd met peroxidase. De te meten soja-vleesextracten werden geïncubeerd in polystyreen cuvetten waarbij de soja-eiwitten proportioneel aan de wand werden gebonden. De hoeveelheid soja-eiwit werd spectrofotometrisch gemeten na toevoeging van het antisojaconjugaat en een substraat.

2.7 Conclusies

Zoals uit het voorafgaande blijkt is het niet eenvoudig om aan te geven wat de juiste analysemethode voor de bepaling van vleesvreemd eiwit is. De keuze van de methode hangt af van het te bepalen eiwit, het al dan niet verhit zijn geweest van het monster en de verkrijgbaarheid

van reagentia, in het bijzonder antisera.

Indien deskundigheid aanwezig is kunnen methoden als microscopie en histologie goede hulpmiddelen zijn voor de kwalitatieve detectie van vleesvreemde eiwitten, ook in verhitte produkten. Dit geldt in veel mindere mate voor indirecte chemische methoden. Momenteel lijkt chromatografie (HPLC, TLC, aminozuuranalyse) door de bewerkelijkheid van de methoden, niet de eerst aangewezen techniek voor de detectie van vleesvreemde eiwitten. Ontwikkeling van nieuwe apparatuur en kolommen zou hierin verandering kunnen brengen. Electroforese, in het bijzonder SDS-PAGE is een redelijk goede methode voor het aantonen van vleesvreemde eiwitten, ook in verhitte produkten. De detectie en interpretatie van de feroogrammen kan sterk worden verbeterd door immunochemische detectie na electroblootting. De dot blot methode kan goed worden gebruikt als screening, evenals immunodiffusie en CIE. Voor kwantitatieve bepalingen in zowel rauwe als verhitte produkten komen naast Laurell electroforese momenteel ELISA methoden het meest in aanmerking. Hiervoor is het, evenals voor alle immunochemische methoden, noodzakelijk dat specifieke antisera beschikbaar zijn. Deze zijn echter in veel gevallen slechts beperkt commercieel verkrijgbaar. Kwantificering van de hoeveelheid toegevoegd eiwitprodukt is voor een aantal vleesvreemde eiwitprodukten, zoals soja, een probleem, omdat ze met verschillende zuiverheden kunnen worden toegepast. Bepalen van de hoeveelheid eiwit lijkt in deze gevallen de beste methode. Gehalten vanaf 0,25% soja-eiwit kunnen goed worden gekwantificeerd.

3 VLEESSPECIES

3.1 Algemeen

In de Nederlandse Warenwet wordt, evenals in veel buitenlandse regelingen, voorgeschreven dat vleeswaren moeten zijn voorzien van een aanduiding waarop de slachtdiersoort(en) is(zijn) vermeld. Het mengen van vlees van verschillende dieren leidt in het algemeen tot een goedkoper produkt dat ten onrechte duur verkocht zou kunnen worden. Daarnaast is in sommige landen het eten van bepaalde diersoorten op religieuze gronden verboden.

Het aantonen en bepalen van de diersoorten, de species, lijkt voor wat de problematiek betreft op het aantonen en bepalen van vleesvreemde

eiwitten. Bij mengsels van vlees van verschillende slachtdieren heeft men te maken met mengsels van eiwitten (en vetten) van verschillende herkomst, die in veel gevallen ook nog door verhitting zijn gedenatureerd. Een aantal van de voor de bepaling van vleesvreemde eiwitten gebruikte technieken wordt ook voor de bepaling van vleesspecies gehanteerd.

De eiwitten in spiervlees kunnen globaal worden onderscheiden in drie groepen, de myofibrillaire, sarcoplasma- en bindweefseiwitten. De myofibrillaire eiwitten bestaan voornamelijk uit myosine, actine, troponomyosinen, troponinen en actininen. Ze zorgen voor de contractie van de spieren. De sarcoplasma-eiwitten bestaan voor het grootste gedeelte uit diverse enzymen en verder uit onder andere myoglobine, hemoglobine en albumine. De bindweefseiwitten, die de krachten van de myofibrillen moeten overbrengen op het skelet, bestaan hoofdzakelijk uit collageen en elastine. Verder komen er een aantal stikstofverbindingen voor die niet tot de eiwitten behoren zoals creatine, inosine-monofosfaat, di- en tri-fosfopyridine, nucleotiden, aminozuren, carnosine en anserine.

Een aantal van genoemde eiwitten en stikstofverbindingen kan worden gebruikt voor identificatie van de slachtdiersoort, ook de samenstelling van de vetfractie kan hiervoor dienen. Een andere, vrij nieuwe techniek maakt gebruik van het herkennen van specifieke DNA-sequenties.

Een probleem dat kan optreden bij de speciesbepaling met behulp van sarcoplasma-eiwitten is dat monsters verontreinigd kunnen zijn met geringe hoeveelheden uitgelekte sarcoplasma-eiwitten van een andere diersoort, doordat verschillende partijen vlees bij elkaar in de buurt hebben gestaan. Dit kan zowel met immunochemische als elektroforetische technieken sterk vals-positieve resultaten opleveren.

3.2 Chromatografie

3.2.1 Vet

Voor de identificatie van de vleessoort kan gebruik worden gemaakt van analyse van de vetfractie. Door gaschromatografische bepaling van specifieke vetzuren of vetzuurverhoudingen kan een indicatie worden

verkregen van de vleessoort. Paardevet heeft een hoog gehalte aan linoleenzuur, dit kan echter, afhankelijk van het door de dieren gegeten voer, vals negatieve resultaten geven (Hitchcock en Crimes, 1985).

Varkensvet zou opgespoord kunnen worden door het karakteristieke gehalte aan linol- en arachidonzuur in vergelijking met rundvet. Aangezien de vetzuursamenstelling van het voer ook hier gedeeltelijk de samenstelling van het vetweefsel bepaalt blijft discriminatie van species op basis van vetzuuranalyse op zijn minst twijfelachtig (Verbeke, 1984). Met behulp van clusteranalyse kunnen Verbeke et al. (1986) wel onderscheid maken tussen vet van paard, varken en rund + kip. Tussen rund en kip werd geen duidelijk verschil waargenomen.

De vetanalyse (vetzuursamenstelling van triglyceriden en 2-monoglyceriden, verhouding totaal C16/totaal C18 enz.) wordt in een aantal islamitische landen toegepast om varkensvlees aan te tonen. Nour El-Din et al. (1986) tonen op deze wijze varkensvet in schapevlees aan en Kamal et al. (1986) varkensvet in rundvlees. Saeed et al. (1986) bepaalden met behulp van het gehalte aan 11,14-eicosadien-2-ol (C20:2) 1% varkensvlees in rund- en schapevlees. Deze laatste methode leverde bij eigen (RIKILT) onderzoek minder bevredigende resultaten op. Saeed et al. (1989) ontwikkelden later een andere methode omdat C20:2 niet zo uniek voor varkensvlees bleek te zijn als zij aanvankelijk beweerden. Zij bepaalden de verhouding verzadigde/onverzadigde vetzuren in 2-positie met behulp van HPLC waarmee ze claimen 1% varken in rund en 3% varken in schaap te kunnen bepalen.

Een voordeel van speciesidentificatie door vetanalyse is dat vetten meer hittestabiel zijn dan eiwitten, zodat ook verhitte monsters zonder veel problemen kunnen worden geanalyseerd. Een nadeel is dat de vetgehalten sterk kunnen verschillen, terwijl ook de natuurlijke spreidingen groot kunnen zijn, zodat kwantitatieve uitspraken nauwelijks kunnen worden gedaan.

3.2.2 Eiwit

Zoals eerder gemeld konden Medina en Phillips (1982) in trypsine-hydrolysaten die met DLC en HPLC waren gechromatografeerd onderscheid maken tussen verhit soja-, rund-, varkens- en kippe-eiwit. Carnegie et al. (1983) bepaalden met behulp van HPLC de verhouding van de dipep-

tiden anserine, carnosine en balenine in verschillende vleessoorten. Hoewel de absolute gehalten soms zeer sterk verschilden, waren de verhoudingen tussen een aantal diergroepen dusdanig specifiek dat onderscheid gemaakt kon worden tussen deze groepen. Ter controle op toevoeging van paarde- of kangoeroevlees aan verhitte produkten van rund- of schapevlees bepaalden Carnegie et al. (1985) de anserine/carnosineverhouding. De methode was goed bruikbaar wanneer daarnaast als bevestiging de mobiliteit van de myoglobine met SDS-PAGE werd bepaald (zie 3.3). Bevestiging was noodzakelijk omdat de verhouding van een mengsel overeen kan komen met die van een andere diersoort. Plowman en Close (1988) bepaalden de gehalten aan anserine, balenine en carnosine van een aantal vleessoorten en in vleespasteitjes. Tussen een aantal species was met deze methode verschil aan te tonen, er waren echter ook vleessoorten, waarbij de spreidingen in de gehalten en verhoudingen zo groot waren dat er geen onderscheid kon worden gemaakt. Dit laatste gold ook voor de verhitte produkten.

Ashoor et al. (1988A) publiceerden een methode waarbij waterige extracten van rauw vlees van rund, varken, kalf, lam, kuiken, kalkoen en eend met reversed phase HPLC werden gescheiden. Alle genoemde vleessoorten vertoonden niet nader benoemde specifieke pieken waardoor zij konden worden geïdentificeerd. Met behulp van dezelfde methode maakten Osman et al. (1987) onderscheid tussen 31 soorten verse vis. Ashoor en Osman (1987) konden op deze wijze tot 1% varkensvlees in rundvlees bepalen. Volgens dezelfde auteurs (Ashoor en Osman 1988B) kon ook de hoeveelheid kip of kalkoenvlees in mengsels van kip en kalkoen worden bepaald, hoewel er wel een verschil in concentraties werd geconstateerd tussen borst- en dijvlees.

Chromatografie van de eiwitfractie met de hiervoor beschreven technieken kan een goed hulpmiddel zijn bij de vleesspeciesidentificatie. Zoals reeds eerder beschreven is de techniek van Medina en Phillips zeer bewerkelijk, maar geeft veel informatie, ook over vleesvreemde eiwitten. De anserine/carnosine verhouding kan goed worden gebruikt als screeningsmethode, ook bij verhitte monsters. Positieve monsters moeten echter met een andere methode worden bevestigd. Voor onverhitte monsters lijkt de methode van Ashoor en Osman goed bruikbaar.

3.3 Electroforese

Electroforese is een van de meest gebruikte hulpmiddelen voor de speciesidentificatie. De meest gebruikte techniek is iso-electrofocussing (IEF), daarnaast worden echter ook andere technieken gehanteerd. Yman en Sandberg (1987) beschreven een methode waarmee met zetmeelgelelelektroforese onderscheid werd gemaakt tussen vers vlees van paard, ezel en hun kruisingsprodukten (muilezel/muildier). Na electroforese van de sarcoplasma eiwitten werd het gel horizontaal in twee plakken verdeeld. In de ene plak werden de albuminen aangekleurd en in de andere de esterases. Op grond van de beide ferogrammen kon onderscheid worden gemaakt tussen de drie vleessoorten. Babiker et al. (1980) konden paardevlees aantonen in verhit rundvlees door de monsters te extraheren met een buffer die onder andere mercapto-ethanol bevatte, waarna werd geëlectroforeerd op een lineaire gradiënt gel met een polyacrylamide concentratie van 10-15%. Door deze wijze van extraheren en elektroforeren werden myofibrillaire eiwitten dusdanig van elkaar gescheiden dat verschil tussen de diersoorten kon worden waargenomen. Kim en Shelef (1986) scheidden de sarcoplasma eiwitten van niet verhit vlees van rund, varken, kip en kalkoen met dunnelaag-agarosegelelektroforese. Door het uitvoeren van drie aparte scheidingen respectievelijk van totaal eiwit, myoglobinen en enzymen konden in binaire mengsels de vleessoorten kwalitatief en kwantitatief worden bepaald. Slattery en Sinclair (1987) onderzochten een zeer groot aantal (vooral Australische) diersoorten door specifieke bepaling van de vijf lactaatdehydrogenase (LDH) iso-enzymen na electroforese op cellulose acetaat. De onderzochte monsters waren niet verhit. Binnen de drie onderzochte soortgroepen, gevogelte, kangoeroeachtigen en hertesoor-ten, werden met deze methode niet of nauwelijks verschillen in mobiliteit gevonden, tussen de drie soortgroepen werden wel duidelijke verschillen waargenomen. Voor verdere identificatie bleek IEF beter geschikt.

Sibour et al. (1988) modificeerden een PAGE methode uit de humane geneeskunde waarmee de LDH iso-enzymen werden bepaald. Dit gaf per onderzochte diersoort (rund, varken, lam en paard) vijf duidelijk te identificeren banden. Ook Heinert et al. (1988) gebruikten PAGE, waarbij zowel de eiwitpatronen als de esterasespatronen werden beoordeeld.

Om te zien of leeftijd, ras, geslacht en deelstuk invloed hadden op de analyseresultaten, onderzochten ze 50 runderen (kalveren, koeien en stieren) van 4 verschillende rassen, evenals 10 varkens en 10 konijnen. Zowel in de feroogrammen van de sarcoplasma-eiwitten als in die van de esterasen waren voor alle drie de diersoorten specifieke banden aan te wijzen waarmee de diersoort kon worden bepaald. De intensiteit van de banden kan per monster echter sterk verschillen.

Kaiser et al. (1980A) vergeleken twee PAGE methoden (in buisjes en op vlakgel) en twee IEF methoden (in polyacrylamide en agarose) met elkaar door sarcoplasma-eiwitten uit waterige extracten van rauw vlees van 31 diersoorten (8 zoogdieren, 6 pluimveesoorten, 4 zoet- en 12 zoutwatervissen en inktvis) met die methoden te onderzoeken. De beide PAGE-methoden leverden identieke resultaten op evenals de beide IEF-methoden. Alle onderzochte diersoorten vertoonden karakteristieke eiwitspectra. Met PAGE kon onderscheid worden gemaakt tussen ree en de antilopesoorten impala en springbok, tussen rund en ree, tussen ree en hert en tussen kalkoen en kip. De mogelijkheden met IEF waren nog groter, bij enkele diersoorten kon bij een aantal dieren zelfs onderscheid worden gemaakt naar geslacht en leeftijd. IEF op polyacrylamide gaf scherpere banden dan op agarose. De beide IEF methoden waren door de uitstekende resultaten, goede reproduceerbaarheid en snelheid beter geschikt dan de PAGE methoden.

Hofmann (1986) onderzocht monsters van verschillende onverhitte deelstukken van rund, varken en paard met SDS-PAGE van de myofibrillaire eiwitten. Daarnaast werden de sarcoplasma-eiwitten (uit waterige extracten) geëlectroforeerd op SDS-PAGE en IEF. Er werd met SDS-PAGE geen verschil tussen de diersoorten vastgesteld, wel was er verschil in intensiteit van banden tussen verschillende deelstukken. Met IEF van de sarcoplasma-eiwitten was het moeilijk om verwante diersoorten met zekerheid te identificeren doordat de intensiteit van een aantal banden door verschillende factoren, zoals deelstuk en behandeling van het monster, wordt beïnvloed, verder was beoordeling moeilijk door het grote aantal banden. Wel kon verschil tussen een groot aantal species worden vastgesteld wanneer alleen naar de myoglobinebanden, die voor iedere diersoort specifiek bleken te zijn, werd gekeken. Deze banden waren in veel gevallen met het blote oog zichtbaar.

Kaiser et al. (1980B, 1981) en Führling en Gersonde (1980) identificeerden de species van rauwe vlees- en vismengsels met behulp van IEF van de sarcoplasma-eiwitten op polyacrylamide en agarose. Kaiser et al. konden in binaire mengsels 2-5% van een species bepalen door de intensiteit te meten met een densitometer. Führling en Gersonde verkregen met IEF op ultradunne gelen betere resultaten dan met commercieel verkrijgbare kant en klare gelen.

Sinclair en Slattery (1982) maakten onderscheid tussen rauw vlees van een aantal diersoorten door IEF en detectie van de myoglobinebanden. Alle vleessoorten vertoonden twee kenmerkende banden met voor de meeste diersoorten specifieke iso-electrische punten die met het blote oog zichtbaar waren. Alleen schaaap en geit konden niet worden onderscheiden. Wanneer alle banden werden aangekleurd ontstonden complexe fero-grammen die geen extra informatie gaven. Ook Hofmann (1986) kon aan de hand van de myoglobinepatronen van waterige extracten van onverhit vlees na IEF de diersoort identificeren. In tegenstelling tot Sinclair en Slattery vond hij voor een aantal diersoorten meer dan twee myoglobinebanden. Bij veel monsters werden namelijk ook één of meer nevenbanden waargenomen. Dit kan het gevolg zijn van het opbrengen van een grotere hoeveelheid monster. In een vervolgonderzoek konden Hofmann en Blüchel (1986) evenals Gissel (1987) een groot aantal rauwe vleessoorten van elkaar onderscheiden aan de hand van de myoglobinepatronen na IEF.

Een nadeel van speciesidentificatie door middel van myoglobinebanden zowel met PAGE als IEF is dat het myoglobinegehalte per diersoort en per deelstuk sterk kan verschillen. Vleessoorten met een laag myoglobinegehalte kunnen daardoor moeilijk worden aangetoond, terwijl de kwantificering vrijwel onmogelijk wordt. Verder is de hittestabiliteit te klein om op bovenstaande wijze verhitte produkten te differentiëren.

Bauer en Hofmann (1987A) vergrootten de gevoeligheid van de methode door pseudoperoxidasekleuring waardoor vlees met een laag myoglobinegehalte en verhit vlees (tot 100°C) kon worden geïdentificeerd. De gevoeligheid kon nog worden vergroot door zilverkleuring (Bauer en Hofmann, 1987B). Met deze methode kon 10% varkensvlees worden aangetoond in een mengsel met rundvlees dat 60 min. bij 80°C was verhit. Ook kan in een zelfde produkt 1% varkensvlees worden aangetoond als de

extracten met behulp van ultrafiltratie worden geconcentreerd. Met de twee bovenstaande methoden konden Bauer en Hofmann (1989) naast rund en varken ook verhit schaap, paard, hert, konijn en kalkoen identificeren.

Een andere manier van detectie waarmee ook species in verhitte monsters konden worden onderscheiden werd beschreven door King (1984) en King en Shaw (1984). Na extractie met guanidine en IEF werden de enzymen adenylaat-kinase (AK) en creatine-kinase (CK) specifiek aangekleurd. CK bleek redelijk en AK goed hittestabiel. Bij vleesmengsels kunnen er echter CK hybriden worden gevormd die identificatie bemoeilijken. De methode is bovendien zeer bewerkelijk, terwijl de banden niet scherp zijn. In verhitte vleeswaren konden Janssen et al. (1989B) rund-, varkens-, schape-, paarde- en kangoeroevlees aantonen door elektroforese (IEF) van de myoglobinen waarna de eiwitpatronen worden geblot op nitrocellulose. Hierna worden myoglobinebanden specifiek aangekleurd door het blot te incuberen met een anti-humaan myoglobineserum, peroxidase-anti-peroxidase complex en substraat. In produkten die tot 120°C waren verhit was het mogelijk tenminste 10% varkens-, schape- of paardevlees aan te tonen. Het aantonen van pluimveevlees was met deze methode niet mogelijk.

Electroforese, zowel PAGE als IEF, is een goede techniek voor de bepaling van de slachtdier soort, vooral als naar specifieke banden, zoals enzymen of myoglobinen wordt gekeken. De detectiegrenzen voor de diverse species liggen met elektroforese in de orde van grootte van 5 á 10%.

3.4 Immunochemische methoden

Voor de identificatie en bepaling van vleesspecies worden, evenals bij de bepaling van vleesvreemde eiwitten, veelvuldig immunochemische methoden ingezet, waarbij meestal gebruik wordt gemaakt van antisera tegen de sarcoplasmaeiwitten. De hiervoor gebruikte methodieken zijn ook vrijwel identiek aan die voor de vleesvreemde eiwitten, namelijk immunodiffusie, immuno-electroforese en diverse immuno-assays, waarvan ELISA de belangrijkste is. Ook de problemen zijn vergelijkbaar: een antiserum is slechts werkzaam tegen één diersoort, de verkrijgbaarheid van commerciële antisera is beperkt tot die van een klein aantal dier-

soorten, de antisera werken niet of slecht tegen gedenateerde eiwitten en verder geven veel antisera kruisreacties tegen soort-verwante diersoorten.

De immunodiffusie wordt voor vleesspeciesidentificatie nog veelvuldig gebruikt. In de USA zijn voor een aantal diersoorten kant en klare immunodiffusietests ontwikkeld die zijn gebaseerd op de Ouchterlony-test. Ze bestaan uit petrischalen gevuld met agar waarin de opbrengplaatsen zijn voorgeponsd. De antisera en standaarden worden gevriesdroogd op filtreerpapiertjes bijgeleverd. Leverbaar zijn de ORBIT test voor rundvlees (Mageau et al., 1984) de PROFIT test voor pluimvee (Cutrufelli et al., 1986) en de PRIME test voor varkensvlees (Cutrufelli, 1988). De ORBIT en PROFIT methoden werden in een ringonderzoek uitgetest (Cutrufelli et al., 1987). In rauwe monsters kan 10% rund- of pluimveevlees (kip/kalkoen) worden aangetoond.

Wanneer antisera niet commercieel verkrijgbaar zijn kunnen ze, hoewel niet eenvoudig, gemaakt worden. Doberstein en Greuel (1986) maakten een antiserum tegen rauw kangoeroevlees. Manz (1987) maakte polyvalente antisera tegen een groot aantal (9) diergroepen. Door absorptie met sera van andere groepen en ondergroepen konden deze dusdanig specifiek worden gemaakt dat vele diersoorten in rauwe mengsels konden worden geïdentificeerd. Kang'ethe et al. (1986) maakten op vergelijkbare wijze antisera tegen thermostabiele antigenen van 14 soorten runderachtigen. Deze antisera werden verkregen door eiwitextracten te verhitten, waarna de niet gedenateerde eiwitten werden gebruikt voor de productie van de antisera. De detectie van species in commercieel gesteriliseerde producten werd uitgevoerd met behulp van de Ouchterlony test. Allsup (1987) onderzocht een groot aantal niet verhitte vleesmonsters zowel met immunodiffusie als met CIE. De laatstgenoemde methode bleek sneller, gevoeliger en goedkoper te zijn. Schweiger et al. (1983) maakten antiserum tegen troponine T, afkomstig van pluimvee waarmee met diverse immunochemische technieken zoals immunodiffusie, CIE en immuno-electroforese (electroforese met detectie door immunodiffusie) pluimveevlees in verhitte vleeswaren kon worden aangetoond. Casa et al. (1985) vervaardigden antiserum tegen oplosbaar spiereiwit van paardvlees. Met dit serum kon door immuno-electroforese in rauwe producten paardvlees worden aangetoond zonder dat kruisreacties met rund- en varkensvlees werden waargenomen. Om antisera tegen verhitte

species te verkrijgen verhitte Hayden (1981) bijnieren van paard, varken, schaap, kalkoen en kip tot 98°C. Hiervan werden extracten gevormd waartegen antisera werden gemaakt. Via immunodiffusie konden met deze antisera de diverse species in verhitte vleeswaar worden aangetoond. Er werden kruisreacties waargenomen tussen rund en schaap en tussen kalkoen en kip.

Johnston et al. (1982) onderscheidden twee rundersoorten van schaap, ezel, varken, paard en kangoeroe met behulp van een door hen ontwikkelde radio-immuno-assay (RIA).

Patterson en Spencer (1985) beschrijven een ELISA waarmee rauw vlees van nauw verwante diersoorten zoals paard en ezel, geit en schaap evenals buffel en rund kunnen worden onderscheiden. Hiervoor werden species-specifieke antisera geproduceerd door de ene soort te immuniseren met de andere waarna op een kolom werd gezuiverd. Met deze methode kon binnen een uur 0,1% ezel in paard, 0,1% geit in schaap en 1% buffel in rund worden aangetoond. Jones en Patterson (1985) hanteerden een andere (dubbel antilichaam) ELISA waarmee ze in rauwe rundvleesprodukten 1-3% varkensvlees konden aantonen. De twee benodigde antisera tegen varkensserumalbumine werden opgewekt in konijnen en schapen. Dezelfde auteurs, Jones en Patterson (1986) modificeerden een indirecte ELISA voor de speciesbepaling in rauwe vleeswaren door gebruik te maken van antisera die monospecifiek waren gemaakt door ze te mengen met sera van andere diersoorten zodat kruisreacties in de assay werden voorkomen. Hierdoor kan gebruik gemaakt worden van polyclonale antisera. Verder gebruikten ze op filterpapierschijfjes gestabiliseerde antilichamen en referentievleesextracten die lang houdbaar waren.

Dincer et al. (1987) vergeleken de resultaten van een competitieve en een indirecte ELISA methode met elkaar. Verder onderzochten ze de invloed van pekelen en verhitten op de identificatie van species. Ze gebruikten commerciële antisera tegen schaap en varken die ze zuiverden met affiniteitschromatografie. Hierbij wordt het antiserum door kolommen geleid die de ongewenste antigenen in gebonden vorm bevatten met als resultaat dat een antiserum overblijft dat zeer specifiek tegen een diersoort is. De competitieve ELISA vertoonde de laagste kruis-reactiviteit. Met beide methoden kon 5% schapevlees of varkensvlees in rundvlees worden aangetoond. Pekelen had weinig of geen invloed op de bepalingen. Wanneer rauw of gepekeld vlees werd verhit kon in de

meeste gevallen geen reactie meer worden waargenomen. Alleen bij de indirecte ELISA kon varken nog in geringe mate worden aangetoond. Martin et al. (1988A, 1988B) maakten antisera tegen sarcoplasma-eiwitten van paard en varken en maakten deze species-specifiek met behulp van affiniteitschromatografie. Met dubbel-antilichaam ELISA kon 1-50% paarde- of varkensvlees in rauwe vleesmengsels worden bepaald. Ayob et al. (1989) vergeleken een verbeterde directe niet-competitieve ELISA met een indirecte competitieve ELISA voor de bepaling van varkensvlees in rauwe vleesprodukten. De indirecte methode gaf bevredigende resultaten, de directe methode was echter veel nauwkeuriger, sneller en meer betrouwbaar.

Berger et al. (1988) isoleerden hitteresistente immuniserende antigenen (IgG) van varken en pluimvee en gebruiken deze voor ELISA's. Hiermee kon varkens- en pluimveevlees worden aangetoond in vleeswaren die 15 min. waren verhit bij 120°C.

Om species-specifieke antisera te verkrijgen maakten Goerlich en Greuel (1986) monoclonale antisera tegen rauwe en hittebehandelde (70°C) vleeseiwitten van rund en kangoeroe. Met behulp van ELISA kon tot 70°C verhit vlees van deze beide diersoorten worden aangetoond. Monoclonale antilichamen tegen pluimvee werden geproduceerd door Martin et al. (1989). Ze verkregen drie antisera waarmee onderscheid gemaakt kon worden tussen onverhit pluimveevlees (kip en kalkoen) en vlees van zoogdieren (varken, rund, paard en schaap).

Met één van deze antisera was het mogelijk om met behulp van ELISA onderscheid te maken tussen kip en kalkoen. De antisera reageerden, hoewel slechter dan bij vers vlees, met antigenen van verhit- en orgaanvlees.

Janssen et al. (1989A) beschrijven een dot-blot immunoassay waarmee het mogelijk is met dezelfde monstervoorbereiding zowel speciesidentificatie uit te voeren als schildklierweefsel (met behulp van antiserum tegen thyroglobuline) aan te tonen. De methode is semi-kwantitatief, er kan ca. 5% paarde-, varkens- of kippevlees en 0,01% schildklierweefsel mee worden aangetoond in rauwe produkten.

Alle hierboven genoemde immunochemische technieken zijn, indien de juiste antisera aanwezig zijn, goed bruikbaar voor de identificatie van de slachtdiersoort van vlees en vleesmengsels. De kwantitatieve bepaling zal met deze methoden echter altijd een moeilijke zaak blij-

ven. Vlees bestaat naast water en vet uit een groot aantal eiwitcomponenten. De antisera zijn daarentegen gemaakt tegen een of enkele van deze eiwitten. Omdat de gehalten in vlees van de te bepalen eiwitten doorgaans niet constant zijn, is het ook niet mogelijk om hiermee een juist vleesgehalte te bepalen. Voor de detectie van vleesspecies in kleinere aantallen rauwe monsters zijn immunodiffusie, CIE en de dot blot methode goed bruikbaar. Bij grotere aantallen monsters geniet ELISA de voorkeur. Door de grote gevoeligheid kan ELISA, wanneer gebruik wordt gemaakt van de juiste antisera, ook worden toegepast voor verhitte waren. Kwantitatieve bepaling van vleesspecies is echter een moeilijke zaak omdat de denaturatie van de eiwitten afhankelijk is van verhittingstemperatuur en -tijd.

3.5 Hybridisatie van desoxyribonucleïnezuur (DNA)

Recentelijk werd door een aantal onderzoekers een geheel ander principe, DNA hybridisatie, voor de speciesidentificatie toegepast. DNA is de drager van de genetische eigenschappen en is in iedere cel aanwezig. DNA is opgebouwd uit nucleotiden die een suikerdeel (desoxyribose), een fosfaatdeel en een base bevatten. Er worden vier basen in DNA aangetroffen, adenine, guanine, cytosine en thymine. DNA bestaat uit twee ketens die in een dubbele helix om elkaar heen gedraaid zitten. Deze beide ketens worden door waterstofbruggen tussen de tegenover elkaar liggende basen verbonden. Hierbij is adenine altijd gepaard met thymine en guanine met cytosine zodat beide ketens complementair aan elkaar zijn. Wanneer DNA wordt gedenatureerd, bijvoorbeeld door verhitten, worden enkelvoudige ketens gevormd. De ketens worden, afhankelijk van de denaturatietemperatuur, gedeeltelijk afgebroken en daardoor ingekort. Na afkoelen worden de waterstofbruggen opnieuw gevormd, zodat de dubbele helix opnieuw ontstaat. Dit wordt hybridiseren genoemd.

De genetische informatie is vastgelegd in de volgorde van de basen in het DNA molecuul. Het verschil tussen twee dieren van een soort is dermate gering dat hybridisatie van ketens mogelijk is. Tussen verschillende diersoorten is dit, wanneer deze evolutionair voldoende van elkaar af staan, niet mogelijk. Wanneer enkelvoudige ketens van een bekende diersoort worden gelabeld, bijvoorbeeld met een radioactief

isotoop of een verbinding die kan worden gekleurd, kunnen deze zogenaamde probes dienen voor identificatie van die bekende diersoort. De probes worden hiertoe gemengd met DNA ketens van het monster. Wanneer de te bepalen species aanwezig is zal DNA uit het monster hybridiseren met de probe. De hybridisatie kan worden gemeten door de label.

Baur et al. (1987) labelden DNA van rund, varken en kip met radioactieve fosfor (^{32}P). Hoewel kruisreacties werden waargenomen was het mogelijk vlees van varken, kip en rund met zekerheid aan te tonen. Om het nadeel van het werken met radioactiviteit te vermijden labelden Antonisse en Janssen (1989) DNA van rund, kip, varken en paard met digoxigenine. Hiervoor is een labeling en detectiekit commercieel verkrijgbaar. Het was mogelijk om in verhitte (120°C) vleeswaren 10% van de genoemde species aan te tonen. Omdat schaap en rund evolutionair te dicht bij elkaar staan is het niet mogelijk om deze diersoorten met deze methode te onderscheiden. Winterø et al. (1990) bepaalden de hoeveelheid rauw varkensvlees in rundvlees met immunodiffusie, CIE, IEF en DNA hybridisatie. Met immunodiffusie kon 1% varkensvlees worden aangetoond, met CIE 0,4%, met IEF 5% en met DNA hybridisatie (gelabeld met ^{32}P) 0,5%. Chikuni et al. (1990) labelden DNA van kip, varken, geit, schaap en rund met biotine. Vleesmonsters werden 30 min. verhit bij 80, 100 en 120°C . Bij kip en varken werd geen kruisreactie waargenomen maar bij herkauwers vond onderlinge reactie plaats.

De gevoeligheid en specifiteit zou theoretisch vergroot kunnen worden door de probes in plaats van met totaal (genomisch) DNA met soortspecifieke sequenties te maken. Dit blijkt in de praktijk echter niet altijd goed te werken. Bij het onderzoek van Winterø werden namelijk beide soorten probes gebruikt; de probes gemaakt met genomisch DNA bleken gevoeliger. De gevoeligheid wordt verder beïnvloed door de wascondities. De stabiliteit van de gevormde helix is namelijk, onder andere, afhankelijk van de ionsterkte. Andere belangrijke parameters voor de stabiliteit zijn temperatuur, base samenstelling, kortste keten in de helix en de concentratie van helix-destabiliserende verbindingen.

Speciesidentificatie door DNA hybridisatie lijkt perspectieven te bieden. Voor deze techniek veelvuldig kan worden toegepast zal echter nog onderzoek met name naar het vinden van optimale labeling- en reactiecondities nodig zijn. Ook het vinden van optimale DNA sequenties,

waardoor de techniek gevoeliger en specifiekere zou worden, zou de toepasbaarheid verbeteren. Op dit moment zijn nog geen gelabelde specifieke probes commercieel verkrijgbaar. Het grote voordeel van deze techniek is dat zij werkzaam is voor verhitte vleesprodukten. Er moet echter nog worden onderzocht tot welke verhittingscondities dit nog geldt.

3.6 Conclusies

Bij onderzoek van vleesspecies moet onderscheid worden gemaakt tussen identificatie en kwantificering. Deze beide onderdelen kunnen weer worden verdeeld in rauw en verhit. Identificatie van de slachtdier-soort van rauw vlees levert in het algemeen niet veel problemen op, kwantificering is echter veel moeilijker. Het gehalte van de species-specifieke componenten kan namelijk per dier en per deelstuk sterk verschillen. Identificatie van verhit vlees is echter nog moeilijker doordat de vleeseiwitten door verhitting vaak dusdanig worden gedena-tureerd dat er chemisch nauwelijks nog verschillen kunnen worden waar-genomen. Kwantificering wordt daardoor vrijwel onmogelijk.

Een aantal auteurs claimt dat met de door hen beschreven methode de hoeveelheid vlees van een bepaald slachtdier kwantitatief kan worden bepaald. Dit is echter meestal onderzocht met door hen zelf gemaakte standaarden. Het is zeer de vraag of de door hen opgegeven nauwkeurigheid in de praktijk ook mogelijk is.

Gaschromatografische analyse van de vetfractie kan in een aantal gevallen goed als screening worden toegepast, terwijl zij ook goed als bevestigingsmethode dienst kan doen. Voor identificatie en semi-kwantitatieve bepaling van de in water oplosbare vleeseiwitten lijkt HPLC (volgens Ashoor) een vrij goede methode. De chromatografische bepalingen van peptiden zijn zeer arbeidsintensief en lijken daardoor minder geschikt. De HPLC bepaling van histidine-dipeptiden kan, ook in verhitte produkten een goede indicatie geven over de samenstelling van vleesmengsels.

Electroforese, in het bijzonder IEF maar ook SDS-PAGE, is nog steeds een zeer goed bruikbare semi-kwantitatieve techniek, vooral wanneer slechts bepaalde eiwitten zoals enzymen of myoglobinen specifiek

worden aangetoond. Door gevoelige kleuringen zoals pseudoperoxidase- en zilverkleuring kunnen in enkele gevallen ook species in verhitte produkten worden aangetoond.

Een scala van immunochemische methoden geeft vele mogelijkheden voor de identificatie en kwantificering van vleesspecies. Voor de identificatie en semi-kwantitatieve bepaling in rauwe vleeswaren zijn immunodiffusie, CIE en dot blot geschikte en eenvoudige technieken. Bij grote monsteraantallen kunnen hiervoor ook diverse ELISA's worden ingezet. Wanneer men beschikt over antisera tegen verhitte vleessoorten kunnen met ELISA ook species in verhitte vleesprodukten worden aangetoond. Een interessant perspectief lijkt een methode te bieden waarmee na electroforese en electro-blotting species in tot 120°C verhitte produkten konden worden aangetoond. Een groot probleem bij de meeste immunochemische methoden is het beperkte aanbod van commercieel verkrijgbare antisera en ELISA kits waardoor het voor laboratoria die niet de mogelijkheid bezitten om zelf antisera te maken, moeilijk wordt dit onderzoek te doen.

De recentelijk ontwikkelde techniek om species te identificeren met behulp van DNA hybridisatie lijkt, vooral voor verhitte produkten goede perspectieven te bieden. Er moet echter nog veel onderzoek uitgevoerd worden om de techniek te optimaliseren.

LITERATUUR

Abd Allah M.A., Y.H. Foda, S. El-Dashlouty, N.Y.A. El-Sanafiry, and F.M. Abu Salem. Detection of soybean in soy-based substitutes.
Die Nahrung, 30 (1986) 5, 549-558.

Agater I.B., K.J. Brian, J.W. Llewellyn, R. Sawyer, F.J. Bailey, and C.H.S. Hitchcock. The determination of soya and meat protein in raw and processed meat products by specific peptide analysis. An evaluation.
J. Sci. Food. Agric., 37 (1986), 317-331.

Allen J.C. and C.J. Smith. Enzyme-linked Immuno assay kits for routine food analysis.
Tibtech, 5 (1987), 193-199.

Allsup T.N. A comparison of agar gel immuno-diffusion (AGID) and counter-immuno-electrophoresis (CIE) tests for species identification of imported red meat and offal.
Meat Science, 20 (1987), 119-128.

Amarowicz R., Z. Smietana and S. Smoczyński. Calcium and phosphorus levels as indices of textured milk proteins being substituted for meat proteins.
Die Nahrung 29, (1985) 7, 681-684.

Antonisse A.J.J. en F.W. Janssen. Herkenning van de slachtdiersoort in vleesprodukten met behulp van DNA/DNA hybridisatie met niet-radioactief gelabelde probes.
Voorproef (Boehringer Mannheim), (1989) 1, 2-4.

Ashoor S.H. and M.A. Osman. Liquid chromatographic quantitation of chicken and turkey in unheated chicken-turkey mixtures.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71 (1988) 2, 403-405 (B).

Ashoor S.H., C.M. Woodrow and P.G. Stiles. Liquid chromatographic identification of meats.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71 (1988) 2, 397-403 (A).

Ashoor S.H. and M.A. Osman. Detection and quantitation of pork in unheated pork-beef blends by high-performance liquid chromatography.

J. Chromatogr., 393 (1987), 329-334.

Ayob M.K., A.A. Ragab, J.C. Allen, R.S. Farag and C.J. Smith.

An improved, rapid, ELISA technique for detection of pork in meat products.

J. Sci. Food Agric, 49 (1989), 103-116.

Babiker S.A., P.A. Glover and R.A. Lawrie. Improved methodology for the electrophoretic determination of horse meat in heated foodstuffs.

Meat Science, 5 (1980-81), 473-477.

Bauer F. und K. Hofmann. Elektrophoretische Tierartidentifizierung bei erhitztem Fleischerzeugnissen.

Fleischwirtsch. 69, (1989) 3, 419-422.

Bauer F. und K. Hofmann. Empfindlicher elektrophoretischer Nachweis von Schweinefleisch in erhitzten Rindfleisch/Schweinefleisch-Mischungen.

Fleischwirtsch., 67 (1987) 9, 1141-1144 (B).

Bauer F. und K. Hofmann. Elektrophoretische Tierartbestimmung.

Steigerung der Empfindlichkeit durch Peroxidasefärbung der Myoglobine.

Fleischwirtsch., 67 (1987) 7, 861-867 (A).

Bauer F. Zur immunoelektrophoretischen Analyse von Fremdeiweiss in Fleischwaren 1. Mitt. Gegenstromelektrophorese von Milch-, Soja, Ei- und Molkeneiweiss.

Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 8 (1984), 171-174.

Baur C., J. Teifel-Greding und E. Liebhardt. Spezifizierung hitzedenaturierter Fleischproben durch DNA-analyse.

Archiv für Lebensmittelhygiene, 38 (1987), 172-174.

Baylac P., R. Luigi, M.T. Lanteaume, F.M. Paillier, A. Lajon, M. Bergeron et P. Durand. Vérification des limites de l'identification de différents liants protéiques dans un produit carné soumis a des valeurs cuisatrices connues, par utilisation de méthodes électrophorétiques, immunologiques et histologiques.

Ann. Fals. Exp. Chim., 81 (1988) 870, 333-348.

Berger R.G., R.P. Mageau, B. Schwab and R.W. Johnston. Detection of poultry and pork in cooked and canned meat foods by enzyme-linked immunosorbent assays.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71 (1988) 2, 406-409.

Berkowitz D.B. and D.W. Webert. Determination of soy in meat.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70 (1987) 1, 85-90.

Carnegie P.R., M.Z. Ilic, M.O. Etheridge and M.G. Collins. Improved high-performance liquid chromatographic method for analysis of histidine dipeptides anserine, carnosine and balenine present in fresh meat.

J. Chromatogr., 261 (1983), 153-157.

Carnegie P.R., M.Z. Ilic, M.O. Etheridge and S. Stuart. Use of histidine dipeptides and myoglobin to monitor adulteration of cooked beef with meat from other species.

Australian Veterinary Journal, 62 (1985) 8, 272-276.

Casa C., J. Tormo, P.E. Hernandez and B. Sanz. The detection and partial characterization of horse muscle soluble proteins by immunoelectrophoresis in agarose gels.

Meat Science, 12 (1985), 31-37.

Chikuni K., K. Ozutsumi, T. Koishikawa and S. Kato. Species identification of cooked meats by DNA hybridisation assay.

Meat Science, 27 (1990), 119-128.

Cutrufelli M.E., R.P. Mageau, B. Schwab and R.W. Johnston. Development of Porcine Rapid Identification Method (PRIME) by modified agar-gel immunodiffusion.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71 (1988) 2, 244-445.

Cutrufelli M.E., R.P. Mageau, B. Schwab and R.W. Johnston. Detection of beef and poultry by serological field screening tests (ORBIT and PROFIT): Collaborative study.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70 (1987) 2, 230-233.

Cutrufelli M.E., R.P. Mageau and B. Schwab. Development of Poultry Overnight Field Identification Test (PROFIT).

Assoc. Off. Anal. Chem., 69 (1986) 3, 483-487.

Dincer B., J.L. Spearow, R.G. Cassens and M.L. Greaser. The effects of curing and cooking on the detection of species origin of meat products by competitive and indirect ELISA techniques.

Meat Science, 20 (1987), 253-265.

Doberstein K.H. und E. Greuel. Serologische Differenzierung von Känguruhfleisch.

Archiv für Lebensmittelhygiene, 33 (1986), 133-134.

Elenbaas H.L., F.W. Janssen and W. Haasnoot. Quantitative methods for differentiation of vegetable proteins in foods. A review.

De Ware(n)-Chemicus, 15 (1985), 123-128.

Flint F.O. and M.V. Meech. Quantitative determination of texturised soya protein by a sterological technique.

Analyst, 103 (1978), 252-258.

Flint F.O. and R.F.P. Johnson. Histochemical identification of commercial wheat gluten.

Analyst, 104 (1979), 1135-1137.

Flint F.O. and B.M. Firth. A toluidine blue stain mountant for the microscopy of comminuted meat products.

Analyst, 106 (1981), 1242-1243.

Führling D. und C. Gersonde. Erfahrungen mit der isoelektrischen Fokussierung bei der Tierartenbestimmung.

Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chemie, 34 (1980), 135-138.

Gissel C. Die Anwendung der isoelektrischen Fokussierung an Polyacrylamidgelen (PAGIF) zur Tierartendifferenzierung in der Praxis.
Archiv für Lebensmittelhygiene 38 (1987), 19-22.

Goerlich R. und E. Greuel. Der Nachweis nativer und hitzedenaturierter Muskelproteine von Rind und Känguruh mit Hilfe muriner monoklonaler Antikörper.

Archiv für Lebensmittelhygiene, (1986) 37, 87-90.

Hall C.C., C.H.S. Hitchcock and R. Wood. Determination of soya protein in meat products by a commercial enzyme immunoassay procedure: Collaborative trial.

J. Assoc. Publ. Analysts, 25 (1987), 1-27.

Hayden A.R. Use of antisera to heat-stable antigens of adrenals for species identification in thoroughly cooked beef sausages.

Journal of food science, 46 (1981), 1810-1819.

Heinert H.H., H. Brehmer, H.J. Baumann und A. Klinger. Tierartliche Untersuchungen von nativen Muskelfleisch mit Hilfe der Standard-Gel-Elektrophorese (PAGE). Überprüfung und Reproduzierbarkeit von Untersuchungsergebnissen.

Fleischwirtsch., 68 (1988) 3, 386-389.

Hitchcock C.H.S., F.J. Bailey, A.A. Crimes, D.A.G. Dean and P.J. Davis. Determination of soya proteins in food using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure.

J.Sci. Food Agric., 32 (1981), 157-165.

Hitchcock C.H.S. and A.A. Crimes. Methodology for meat species identification: a review.

Meat Science, 15 (1985), 215-234.

Hoek A.C. en P.R. Beljaars. ELISA's in levensmiddelen - een literatuuroverzicht.

De Ware(n)-Chemicus, 19 (1989), 37-68.

Hofmann K. und E. Blüchel. Bestimmung der Tierart von rohem Muskelfleisch anhand der Myoglobinemuster im pH-Gradienten-Gel.

Fleischwirtsch., 66 (1986) 5, 916-921.

Hofmann K. Grundlegende Probleme bei der Identifizierung der Tierart von Muskelfleisch mit Hilfe elektrophoretischer Methoden.

Fleischwirtschaft, 66 (1986) 1, 91-98.

Hofmann K. Nachweis und Bestimmung von Fremdeiweiss in Fleischerzeugnissen.

Fleischwirtsch., 68 (1988) 9, 1050-1051.

Hofmann K. Identifizierung und Bestimmung von Fleisch- und Fremdeiweiss mit Hilfe der Dodecylsulfaat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.

Z. Anal. Chem., 267 (1973), 355-361.

Janssen F.W., J.A. de Baaij en G.H. Hägele. Een gecombineerde methode voor species-identifikatie en het aantonen van schildklierweefsel in rauwe vleesprodukten door middel van een dot blot immuno-assay op nitrocellulose.

De Ware(n)-Chemicus, 19 (1989), 12-21 (A).

Janssen F.W., G.H. Hägele, A.M.B. Voorpostel en J.A. de Baaij. Simultane herkenning van rund-, varkens-, paarde-, schape- en kangoeroevlees in door warmte verduurzaamde vleesprodukten door middel van elektrofoocussing, blotting en immunochemische detektie van myoglobinebanden.

De Ware(n)-Chemicus, 19 (1989), 22-36 (B).

Janssen F.W. en G.H. Hägele. Een gemeenschappelijk onderzoek naar het bepalen van vlees-vreemd eiwit in vleeswaren door middel van een dot-blot immuno-assay en Laurell immuno-elektroforese. Ringonderzoek na-jaar 1988.

Verslag werkgroep MOVE, juli 1989.

Janssen F.W., G. Voortman and J.A. de Baaij. Detection of wheat gluten, whey protein, casein, ovalbumine, and soy protein in heated meat products by electrophoresis, blotting, and immunoperoxidase staining.

J. Agric. Food Chem., 35 (1987), 563-576 (A).

Janssen F.W., G. Voortman and J.A. de Baaij. Rapid detection of soya, protein, casein, whey protein, ovalbumin and wheat gluten in heat-treated meat products by means of dot blotting.

Fleischwirtsch., 67 (1987) 5, 577-580 (B).

Janssen F.W., G. Voortman and J.A. de Baaij. Detection of soya proteins in heated meat products by "blotting" and "dot blot".

Z. Lebensm. Unters. Forsch., 182 (1986), 479-483.

Janssen F.W., G. Voortman en J.A. de Baaij. Een snelle screeningsmethode voor soja-eiwit in vleeswaren door middel van een enzyme immuno-assay op nitrocellulose.

De Ware(n)-Chemicus, 15 (1985), 42-49.

Janssen F.W. en J.A. de Baaij. Een bijdrage tot het elektroforetisch onderzoek van vleeswaar op de aanwezigheid van speciesvreemd of vlees-vreemd eiwit door middel van SDS-MZE elektroforese.

De Ware(n)-Chemicus, 12 (1982), 176-184.

Johnston L.A.Y., P. Tracey-Patte, R.A. Donaldson and B. Parkinson. A screening test to differentiate cattle meat from horse, donkey, kangaroo, pig and sheep meats.

Australien Veterinary Journal, 59 (1982), 59.

Jones S.J. and R.L.S. Patterson. A modified indirect ELISA procedure for raw meat speciation using crude anti-species antisera and stabilised immunoreagents.

J. Sci. Food Agric., 37 (1986), 767-775.

Jones S.J. and R.L.S. Patterson. Double-antibody ELISA for detection of trace amounts of pig meat in raw meat mixtures.

Meat science, 15 (1985), 1-13.

Kaiser K.P., G. Matheis, C. Kmita-Dürrmann und H.D. Belitz. Identifizierung der Tierart bei Fleisch, Fisch und abgeleiteten Produkten durch Proteindifferenzierung mit elektrophoretischen Methoden. I. Rohes Fleisch und roher Fisch.

Z. Lebensm. Unters. Forsch., 170 (1980), 334-342 (A).

Kaiser K.P., G. Matheis, C. Kmita-Dürrmann und H.D. Belitz. Proteindifferenzierung mit elektrophoretischen Methoden bei Fleisch, Fisch und abgeleiteten Produkten. II. Qualitative und quantitative Analyse roher binärer Fleischmischungen durch isoelektrische Focussierung in Polycrylamidgel.

Z. Lebensm. Unters. Forsch., 171 (1980), 415-419 (B).

Kaiser K.P und I. Krause. Analytik von Proteinen in Lebensmitteln mit elektrophoretischen und chromatographischen Verfahren.

Z. Lebensm. Unters. Forsch., 180 (1985), 181-201.

Kaiser K.P., G. Matheis, C. Kmita-Dürrmann and H.D. Belitz. Qualitative and quantitative analysis of binary mixtures of raw meat and fish by isoelectric focussing in agarose gel.

Science Tools, 28 (1981) 1, 5-7.

Kang'ethe E.K., J.M. Gathuma and K.J. Lindqvist. Identification of the species of origin of fresh, cooked and canned meat and meat products using antisera to thermostable muscle antigens by Ouchterlony's double diffusion test.

J. Sci. Food Agric., 37 (1986), 157-164.

Karatzas C.N. and C.G. Zarkadas. Determination of the myofibrillar and connective tissue protein contents and amino acid composition of selected composite meat products.

J. Agric. Food Chem., 36 (1988), 1109-1121.

Kim H.L.A. Shelef. Characterization and identification of raw beef, pork, chicken and turkey meats by electrophoretic patterns of their sarcoplasmic proteins.

Journal of Food Science, 51 (1986) 3, 731-735/741.

King N.L. Species identification of cooked meats by enzyme-staining of isoelectric focussing gels.

Meat Sciences, 11 (1984), 59-72.

King N.L. and F.D. Shaw. Identification of species in smallgoods products.

CSIRO Fd. Res. Q., 44 (1984), 1-6.

Komándi K. and E. Dworschák. Measurement of some antinutritive factors in meat products containing texturated vegetable protein (TVP).

Die Nahrung, 32 (1988) 7, 643-648.

Luigi A., M. Bergeron et P. Durand. Identification des composants des farces de ravioli. Utilisation et intérêt de l'examen histologique.

Ann. Fals. Exp. Chim., 76 (1983) 821, 379-392.

Mageau R.P., M.E. Cutrufelli, B. Schwab and R.W. Jonhston. Development of an Overnight Rapid Identification Test (ORBIT) for field use.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67 (1984) 5, 949-954.

Manz J. Serologische Bestimmung der Tierartzugehörigkeit von Proteinen in Extrakten aus Fleisch und Fleischerzeugnissen.

Fleischwirtsch., 67 (1987) 2, 199-202.

Martin R., J.I. Azcona, T. Garcia, P.E. Hernandez and B. Sanz. Sandwich ELISA detection of horse meat in raw meat mixtures using antisera to muscle soluble proteins.

Meat Science, 22 (1988), 143-153 (A).

Martin R., J.I. Azcona, C. Casas, P.E. Hernandez and B. Sanz, Sandwich ELISA for detection of pig meat in raw beef using antisera to muscle soluble proteins.

Journal of Food Protection, 51 (1988) 10, 790-794 (B).

Martin R., R.J. Wardale, S.J. Jones, P.E. Hernandez and R.L.S. Patterson. Production and characterization of monoclonal antibodies specific to chicken muscle soluble proteins.

Meat Science, 25 (1989), 199-207.

McNeal J.E. Semiquantitative enzyme-linked immunosorbent assay of soy protein in meat products.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71 (1988) 2, 443.

Medina M.B. and J.G. Phillips. Investigations on trypsin-hydrolyzed peptides for protein identifications.

J. Agric. Food Chem., 30 (1982), 1250-1253.

Nour El-din H., A. Soliman, F. Ashour, A. El-Dashloty and A. Bayoumi. Detection of lard and pork in canned mutton.

Abstracts 32nd European Meeting of meat Research Workers, (1986)
Ghent Belgium.

Osman M.A., S.H. Ashoor and P.C. Marsh. Liquid chromatographic identification of common fish species.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70 (1987) 4, 618-625.

Patterson R.M. and T.L. Spencer. Differentiation of raw meat from phylogenically related species by enzyme-linked immunosorbent assay.

Meat Science, 15 (1985), 119-123.

Plowman J.E. and E.A. Close. An evaluation of a methode to differentiate the species of origin of meats on the basis of the contents of anserine, balenine and carnosine in skeletal muscle.

J. Sci. Food Agric., 45 (1988), 69-78.

Ravestein P. and R.A. Driedonks. Quantitative immuno-assay for soya in raw and sterilized meat products.

Journal of Food Technology, 21 (1986), 19-32.

Ring C. Quantitativer Nachweis von Sojaprotein in Brühwurst. Nachweis mittels ELISA.

Fleischwirtsch., 67 (1987) 2, 203-204.

Rittenburg J.H., A. Adams, J. Palmer and J.C. Allen. Improved enzyme-linked immunosorbent assay for determination of soy protein in meat products.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70 (1987) 3, 582-587.

Saeed T., F. Abu-Dagga and H.A. Rahman. Detection of pork and lard as adulterants in beef and mutton mixtures.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69 (1986) 6, 999-1002.

Saeed T., S.G. Ali, H.A. Abdul Rahman and W.N. Sawaya. Detection of pork and lard as adulterants in processed meat: Liquid chromatographic analysis of derivatized triglycerides.

J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72 (1989) 6, 921-925.

Schweiger A., S. Baudner and H.O. Günther. Isolation by free-flow electrophoresis and immunological detection of troponin T from turkey muscle: An application in food chemistry.

Electrophoresis, (1983) 4, 158-163.

Sibour M., V. Giaccone und E. Parisi. Tierartbestimmung anhand der Proteinmuster von LDH-Isoenzymen.

Fleischwirtsch., 68 (1988) 3, 390-393.

Sinclair A.J. and W.J. Slattery. Identification of meat according to species by isoelectric focussing.

Australian Veterinary Journal, 58 (1982), 79-80.

Slattery W.J. and A.J. Sinclair. A comparison of electrophoretic techniques for the species identification of meat.

Food technology in Australia, 39 (1987) 3, 105-108.

Tebbing F. Zum Einsatz immunochemischer Bestimmungsmethoden in der Fremdproteinanalytik. 1. Mitt. Bestimmung bzw. Nachweis von Ackerbohnenproteinisolat mittels Rocket-Technik auf Celluloseacetatfolie und gegenstrom-immunoelektrophorese.

Die Nahrung, 29 (1985) 7, 685-691.

Verbeke R. Kwaliteitsbeoordeling van vleeswaren door chemische parameters.

Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 53 (1984) 6, 497-508.

Verbeke R., D. van de Sompel and H. de Brabander. Identification of animal species by cluster analysis.

Abstracts 32nd European meeting of meat research workers, august 24-29 1986, Ghendt Belgium.

Winterø A.K. and P.D. Thomsen. A comparison of DNA-hybridization, immunodiffusion, countercurrent immunoelectrophoresis and isoelectric focussing for detecting the admixture of pork to beef.

Meat Science, 27 (1990), 75-85.

Yasumoto K., M. Sudo and T. Suzuki. Quantitation of soya protein by enzyme linked immunosorbent assay of its characteristic peptide.

J. Sci. Food Agric., 50 (1990), 377-389.

Yman I.M. and K. Sandberg. Differentiation of meat from horse, donkey and their hybrids (mule/hinny) by electroforetic separation of albumin.

Meat Sciences, 21 (1987), 15-23.

Youssef K.E., M.B. Omar, A. Skulberg and M. Rashwan. Lipolytis and fractionation of triglycerides by argentation-TLC in lard and beef tallow mixtures.

Abstracts 32nd European Meeting of Meat Research Workers, (1986)
Ghendt Belgium.