



113 ~~Te Zin - 00 - 5~~ 410 228
Proceedings van het symposium
40 jaar Voedingsorganisatie TNO

uitkomst en uitzicht

Jaarbeurs, Utrecht
7-10 oktober 1980

Redactie: H. Maarse en B.J. Tinbergen



1980

Centrum voor landbouwpublikaties en landbouwdocumentatie
Wageningen

BIBLIOTHEEK
DER
LANDBOUWHOGESCHOOL
WAGENINGEN

15N 123311-01

ISBN 90 220 0748 0

© Pudoc - Centrum voor landbouwpublicaties en landbouwdocumentatie,
Wageningen, 1980

No part of this book may be reproduced in any form or by any electronic or mechanical means, including information storage and retrieval systems, without written permission from the publishers, except for review purposes.

B. Krol, Voorwoord	7
H. Maarse & B.J. Tinbergen, Woord van dank	9
Adressen van instituten binnen de Hoofdgroep Voeding en Voedingsmiddelen TNO	11
SESSIE 1: KWALITEITSONDERZOEK VAN VOEDINGSMIDDELEN, NUT EN NOODZAAK	
C.C.J.M. van de Meijs, Kwaliteitsbeleid ten aanzien van agrarische produkten	15
F. Dukel, Echtheidscriteria voor vruchtesappen	26
J.B. Luten & J.W. Vreeken, Nieuwe aspecten bij de bepaling van de versheid en kwaliteit van vis	36
G.A. Harrewijn, Invloed van verpakkingstechnieken op de microbiologische kwaliteit van voedingsmiddelen	46
P.J. Groenen, Blootstelling van de konsument, respectievelijk de werknemer, aan nitrosaminen: analytisch-chemisch onderzoek	57
A. Graveland, P. Bosveld, W.J. Lichtendonk, J.P. Marseille & J.H.E. Moonen, Kwaliteitsaspecten van het eiwit bij de bereiding van voedingsmiddelen uit granen	70
SESSIE 2: TECHNOLOGISCH ONDERZOEK VAN VOEDINGSMIDDELEN, WAARDE EN WAARDERING	
D.B. Lund, Influence of novel processing techniques of the nutritive quality of foods	83
H. Houwing & K.J.A. van Spreekens, Bestraling van verse vis en gekookte garnalen	88
P. Sluimer, Technologische aspecten van verbetering van het werkklimaat in de bakkerij	101
P.C. Moerman & B.J. Tinbergen, Interactie tussen vleesgrondstoffen bij de bereiding van een worstdeeg	115
J.A. Wijsman, Roostprocessen in de cacao- en chocolade-industrie	126
E.P. Köster, De functie van de sensorische analyse in de voedingsmiddelentechnologie	135
SESSIE 3: VOEDINGSONDERZOEK BIJ DE MENS, WETEN EN ETEN	
J.C. Waterlow, The assessment of nutritional status in the community	147
R.J. Egger, Epidemiologisch voedingsonderzoek bij 8- tot 60-jarigen	157
R. Luyken, Ervaringen bij voedingsonderzoek in de Derde Wereld	167
W. van Dokkum, De invloed van vet en vezel op de benutbaarheid van enkele mineralen bij de mens	174
W. Schreurs, Vitaminen in Nederland	182
R.J.J. Hermus, Hyper- en Hypo-responders: valstrik of uitdaging voor voedingsonderzoek?	191

SESSIE 4: TOXICOLOGISCH ONDERZOEK VAN VOEDINGSMIDDELEN, VEILIGHEID IN
DE VOEDING

J.H. Weisburger, B.S. Reddy, N.E. Springarn, L.A. Cohen, A. Rivenson, J. Silverman & G.M. Williams, Nutrition and cancer in man: experimental approaches	201
M.I. Willems, B.J. Spit & J.P. van Hees, Invloed van tinchloride op dunne darm en pancreas van ratten	216
R.B. Beems, L. van Beek & B.J. Spit, De invloed van kortdurende en langdurende voeding van lysinoalanine op de nieren van ratten	225
R. Kroes, Kortdurende screeningstesten ter aantoning van mogelijke carcinogeniteit: mogelijkheden en beperkingen	233
J.H. Koeman & J.C.M. van der Hoeven, Mutageniteitsonderzoek van levensmiddelen	247
Auteursregister en adressen	256

VOORWOORD

In de schokkende meidagen van 1940 startte het voedingsonderzoek binnen TNO. De behoefte daaraan was, mede onder de druk van de omstandigheden, op indringende wijze bij TNO en de overheid bepleit door onder andere Ir. J. Straub, directeur Keuringsdienst van Waren te Amsterdam. Ook het oordeel van Prof. Dr. H.W. Julius, hoogleraar te Utrecht, veel later voorzitter van TNO, liet er geen twijfel aan bestaan dat de tijd rijp was om spoedig met het voedingsonderzoek te beginnen. Aldus werd in maart 1940 besloten, de formele bevestiging kwam in juli van dat jaar af. Dr. M. van Eekelen werd de eerste directeur te Utrecht, al spoedig terzijde gestaan door Dr. C. Engel.

Voor beiden stond al gauw vast in welke richting gewerkt moest worden. Het doen van betrouwbaar analytisch onderzoek, zowel chemisch als microbiologisch, van het hele scala van voedingsmiddelen. Dit onderzoek zou tevens de basis dienen te zijn voor de bestudering of verbetering van productieprocessen voor voedingsmiddelen alsmede voor onderwerpen die samenhangen met voedingsproblemen van zowel jonge als oude mensen. Aan het nut en de noodzaak van die aanpak is in de afgelopen 40 jaar nimmer getwijfeld. Veel van de verkregen kennis heeft, zowel bij de consument als bij de producent, de waarde en waardering van voedsel vergroot. Meer te willen weten van ons eten en bij te dragen tot de ontwikkeling van de kwaliteit van het voedselpakket is voor velen in de instituten van de Voedingsorganisatie een stimulans geweest voor dit onderzoek. Toen rond 1960 het toxicologisch onderzoek van de grond kwam, kreeg de genoemde ontwikkeling nog een extra dimensie. De overheid maakte tot die tijd gebruik van kennis aanwezig in het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid, het bedrijfsleven kon nu voor deze problematiek bij het Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek TNO (CIVO-TNO) terecht. Aan de veiligheid in de voeding kon dankzij het beschikbaar komen van nieuwe werkruimte in Zeist - vanaf 1962 - nog meer aandacht worden besteed als voorheen.

In het kader van het 40 jarig bestaan van de Organisatie is besloten zowel een overzicht te geven van datgene wat gebeurd is als aan te geven wat in de toekomst verwacht mag worden. Naast het reeds verschenen boekje "Over de tong" met historische informatie, leek het nuttig dit symposium te organiseren, waarvoor voortbouwend op het gestelde als thema werd gekozen: "Uitkomst en Uitzicht".

Onderzoekers uit de Voedingsorganisatie alsmede enkele gastsprekers bleken bereid daaraan een bijdrage te leveren; de teksten zijn gebundeld in deze jubileumuitgave.

Ook de jaren die voor ons liggen zal de Voedingsorganisatie, in een nieuwe vorm als Hoofdgroep Voeding en Voedingsmiddelen TNO, actief bezig

zijn om kennis te verwerven, resultaten over te dragen en attent te reageren op signalen uit de samenleving.

Allen die deze uitgave hebben voorbereid, hebben mijns inziens een uiterst waardevolle bijdrage geleverd tot die kennisoverdracht.

Prof. Ir. B. Krol
Hoofddirecteur
Hoofdgroep Voeding en
Voedingsmiddelen TNO

WOORD VAN DANK

Met een zucht van verlichting mogen wij mèt u constateren dat de uitgave in boekvorm van de tijdens dit symposium uitgesproken teksten, is gerealiseerd.

Wij hebben deze uitgave slechts op tijd klaar kunnen krijgen met de hulp van velen. Daarvan willen we eerst de auteurs noemen, zonder hen kan men immers niets uitgeven. Verheugend is het dat zij, ondanks ons dringend wijzen op reeds lang verstreken "dead-lines", ons nog steeds goed bejegenen.

Nimmer aflatende medewerking hebben wij ondervonden van mw J.C.de Beauveser en mw A.G.Rensing van het secretariaat van de CIVO-Instituten.

Naast het accuraat uit elkaar houden van diverse concept-versies, wezen zij ons op de problematiek van de Nederlandse voorkeursspelling alsmede de redactionele consequenties van literatuurlijsten.

Daarnaast willen wij onze waardering uitspreken voor de nauwgezette en efficiënte wijze waarop de heer Beumer en zijn medewerkers van het Centrum voor Tekstverwerking te Utrecht de manuscripten in de definitieve vorm hebben gebracht.

Tenslotte vermelden wij de uitgever, het Centrum voor Landbouwpublicaties en -documentatie "PUDOC" te Wageningen. Onze samenwerking met betrekking tot het uitgeven van Proceedings stamt van jaren terug en zal beslist ook nog wel een lustrum bereiken.

H. Maarse

B.J. Tinbergen

ADRESSEN VAN INSTITUTEN BINNEN DE HOOFDGROEP
VOEDING EN VOEDINGSMIDDELEN TNO



Hoofdgroep Voeding en Voedingsmiddelen TNO
Utrechtseweg 48, 3704 HE ZEIST
Postadres: postbus 360, 3700 AJ ZEIST
Telex 40022 civo nl
Tel. 03404-52244

Instituut CIVO-Analyse TNO
Utrechtseweg 48, 3704 HE ZEIST
Postadres: postbus 360, 3700 AJ ZEIST
Telex 40022 civo nl
Tel. 03404-52244

Instituut CIVO-Technologie TNO
Utrechtseweg 48, 3704 HE ZEIST
Postadres: postbus 360, 3700 AJ ZEIST
Telex 40022 civo nl
Tel. 03404-52244
inclusief
Instituut voor Visserijprodukten TNO (IVP-TNO)
Dokweg 37, 1976 CA IJMUIDEN
Postadres: postbus 183, 1970 AD IJMUIDEN
Telex 40022 civo nl
Tel. 02550-19022

Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO
Utrechtseweg 48, 3704 HE ZEIST
Postadres: postbus 360, 3700 AJ ZEIST
Telex 40022 civo nl
Tel. 03404-52244

Instituut voor Graan, Meel en Brood TNO (IGMB-TNO)
Lawickse Allee 15, 6701 AN WAGENINGEN
Postadres: postbus 15, 6700 AA WAGENINGEN
Telex 40022 civo nl
Tel. 08370-19051

SESSIE 1

Voorzitter: Drs. W.J. Klopper

Motto: Kwaliteitsonderzoek van voedingsmiddelen, nut en noodzaak



KWALITEITSBELEID TEN AANZIEN VAN AGRARISCHE PRODUKTEN

C.C.J.M. van de Meijs

Directie Voedings en Kwaliteitsaangelegenheden,
Ministerie van Landbouw en Visserij

Samenvatting

De agrarische produktie is aan grote wijzigingen onderhevig geweest, in welk verband ondermeer kan worden gedacht aan de schaalvergroting, het gebruik van hulpstoffen en de toename in de verwerking van agrarische produkten. Voorts heeft één en ander er toe geleid dat wij van een tekortsituatie in een overschotsituatie zijn geraakt met een minder soepel verlopende afzet.

Daarnaast is de consument zich bewuster gaan opstellen ten aanzien van het produktenpakket dat wordt aangeboden. Zijn wensen in dit verband worden steeds duidelijker geformuleerd en nadrukkelijker naar voren gebracht.

De overheid is zich ervan bewust dat de kwaliteit van produkten, zowel voor de consument als voor de afzet, een steeds belangrijker rol gaat spelen. Zij speelt op deze ontwikkeling in door een kwaliteitsbeleid dat het maatschappelijk belang dient en zowel de produkten als de produktie-methoden betreft.

Inleiding

Nog niet zo lang geleden was het voor vrijwel iedereen een vanzelfsprekende zaak dat de agrarische producent en de consument elkaar direct ontmoetten. Immers de landbouw was afgestemd op de voedselvoorziening van mens en dier in de directe omgeving. In die tijd was de kwaliteit eenvoudig te herkennen: de voornaamste kenmerken daarvoor waren de identiteit ofwel herkenbaarheid, geur, kleur en smaak van het produkt. Het beleid van de overheid richtte zich vooral op een adequate voedselvoorziening van onze bevolking.

Later werd het beleid meer gericht op zaken als:

- de toename in de verwerking van agrarische produkten
- het verhogen van de opbrengsten door een efficiëntere produktie
- het beter conserveren van de levensmiddelen
- het beter transporteren en distribueren.

Dit alles is met veel succes gebeurd en we beschikken daardoor in Nederland over een goede voedselvoorziening met een ruime sortering. Daarmee kunnen we niet alleen onszelf goed en soms overvloedig voeden, maar we kunnen er ook nog flink wat van overhouden voor export en onze betalingsbalans een ruggesteun geven.

Allerwege blijkt echter dat vergroten of handhaven van de produktie steeds meer afhankelijk wordt van de kwaliteit ervan.

Prof. dr. J.P.I. van der Wilde zet in zijn inleiding "Voedsel voor de jaren '80" uiteen dat de betekenis die aan de kwaliteit wordt toegeschreven, mede afhankelijk is van de verandering in denk- en cultuurpatroon die zich op het ogenblik in de westerse wereld voltrekt en die in de economie tot uitdrukking komt in de overgang van de hoeveelheidseconomie naar de kwaliteitseconomie.

Aanleidingen hiertoe zijn onder andere de stagnatie in de groei van de wereldhandel en de problemen rond de energievoorziening maar ook de toenemende wetenschappelijke kennis en de verspreiding van die kennis. Vanuit het gezichtspunt van de consument houden deze veranderingen verband met de nieuwe oriëntatie die plaatsvindt op basis van ervaringen in plaats van op de dingen; hetgeen zich als volgt uit:

- een algemene matigingstendentie, minder gericht op groei en meer op behouden;
- minder napraterig, maar individueler, minder conformistisch;
- oriëntatie op kwaliteit in plaats van op hoeveelheid;
- oriëntatie op gebruikskosten van apparatuur in plaats van op aanschafkosten.

Deze nieuwe consument kijkt bij voedingsmiddelen behalve naar prijs en kwaliteit ook naar:

- de wijze van veehouderij en de invloed ervan op het welzijn der dieren en het milieu
- het gebruik van hulpmiddelen (bijvoorbeeld bestrijdingsmiddelen) in land- en tuinbouw
- de ecologische belasting van het milieu
- het energieverbruik
- de menselijke werkomstandigheden.

Bij de produktie en afzet van levensmiddelen zullen dit soort ontwikkelingen van bepalende invloed zijn en het beleid moet hierop inspelen. Tot zover Prof. v.d. Wilde.

De consument zal bovendien zijn voeding willen verbeteren ofwel gezonder willen eten. Dit vloeit ten dele voort uit angst voor ziekten, zoals hart- en vaatziekten en kwaadaardige gezwellen, waarvan de oorzaak mede toegeschreven wordt aan onjuist voedsel en voedselgebruik.

Het voedingsbeleid zal daardoor van grote betekenis zijn voor het kwaliteitsbeleid ten aanzien van levensmiddelen.

Ook in ons land wordt in toenemende mate ingespeeld op de verlangens van de nieuwe consument, zowel in de primaire landbouwproduktie als bij de industriële bereiding van levensmiddelen.

Voorbeelden hiervan in de primaire landbouw zijn:

- de stijgende afzet van scharreleieren afkomstig van kippen die met inachtnaam van bepaalde welzijnsaspecten worden gehouden;
- de aanzet te komen tot een geregelde en gecontroleerde produktie en afzet van alternatief geteeld fruit;
- de wens tot het terugdringen van overmatig gebruik van meststoffen waardoor te hoge nitraatgehalten kunnen voorkomen in ondermeer bladgroenten;
- de wens tot het terugdringen van chemische gewasbeschermingsmiddelen in de akker- en tuinbouw (onder andere de gechloreerde koolwaterstoffen zoals DDT, Dieldrin, Aldrin);
- het toenemen van geïntegreerde bestrijdingsmethoden.

Bij de industriële bereiding van levensmiddelen zijn er voorbeelden als:

- de opkomst van vruchtesappen ten koste van frisdranken;
- de opkomst van het verse pluimveeprodukt ten koste van de diepvrieskip;
- de opkomst van de warme bakker ten koste van het fabrieksbrood;
- de toenemende produktie en consumptie van boerenkaas;
- de opkomst van "magere" produkten zoals halvamelk en halvarine.

Begrip kwaliteit

Alvorens nader in te gaan op het te voeren beleid ware eerst het begrip kwaliteit nader te bezien. Onder kwaliteit moet worden verstaan het totaal van kenmerken die de mogelijkheid bieden verschillende monsters van een produkt van elkaar te onderscheiden en die van betekenis zijn bij het bepalen van de mate van aanvaardbaarheid van het produkt voor de consument.

Zulke kenmerken zijn:

- heilzaamheid/gezondheidsfactoren
- samenstelling
- voedingswaarde
- bestendigheid/stabiliteit
- toepassingsgeschiktheid
- gerief
- zintuiglijk waarneembare factoren
- afwezigheid van schadelijke stoffen en contaminanten.

Een bepaald kwaliteitskenmerk is afhankelijk van het produkt weer onder te verdelen in factoren. Zo kan bijvoorbeeld voor vlees het kenmerk zintuiglijk waarneembare factoren worden onderverdeeld in de volgende factoren

- uiterlijk, vorm, vlees/vet-verhouding
- kleur, smaak en geur
- malsheid

De kwaliteitskenmerken kunnen ook verdeeld worden in verborgen en niet verborgen factoren of in negatieve factoren - zoals bacteriologische verontreinigingen en residuen - en positieve factoren die tegemoet komen aan het gerief van de consument zoals de presentatie.

In groter verband omvat het begrip kwaliteit echter ook kenmerken als service en gebruiksaanwijzingen, waarbij dan gesproken kan worden over een "totale kwaliteit".

Kwaliteitsbeleid

Voor het voeren van een kwaliteitsbeleid is het noodzakelijk dat vastgestelde kwaliteitskenmerken door controles bewaakt worden (kwaliteitsbewaking).

Daarnaast moet door wetenschappelijk en inventariserend onderzoek worden nagegaan hoe de kwaliteitskenmerken in gunstige zin kunnen worden beïnvloed (kwaliteitsbevordering).

Wanneer hiertoe aanleiding bestaat moeten in het produktieproces of ten aanzien van het produkt maatregelen worden genomen waardoor de kwaliteit structureel verbetert (kwaliteitsbeheersing).

Op de drie genoemde aspecten van de kwaliteit zal hieronder nader worden ingegaan.

Het bewaken van kwaliteit (waarnemen)

Het bewaken van de kwaliteit gebeurt door het vaststellen van de echtheid, de samenstelling en de fysische, chemische, sensorische en biologische aspecten van grond- en hulpstoffen, half-fabrikaten en eindprodukten. Daarnaast door het toetsen van de gevonden waarden aan de wettelijke normen, dan wel door het uitoefenen van het toezicht op het vaststellen van de echtheid en de samenstelling door derden.

In de produktiefasen van levensmiddelen, dat wil zeggen in de ketens van big tot karbonade, van poot- en zaaigoed tot gewas, alsmede van grondstof tot levensmiddel vindt op verschillende plaatsen en door vele instellingen kwaliteitsbewaking plaats.

In verschillende wetten worden hiervoor regels gesteld die van beslissende invloed zijn op de eindprodukten en als zodanig voor de consument van belang zijn.

Bij de dierlijke produkten moeten hiervoor onder meer worden genoemd de Gezondheidswet voor Dieren, thans nog Veewet en de toekomstige Diergeneesmiddelenwet, waarin de huidige Antibioticawet en het Landbouwkwaliteitsbesluit Gemedicineerde Voeders zullen opgaan, alsmede de produktschapsverordening voor Veevoeders. Bij de plantaardige produktie zijn voor de kwaliteit van het consumptie-produkt van belang, de Bestrijdingsmiddelenwet en de daarbij horende Residuebeschikking, de Zaaizaad en pootgoedwet en verschillende verordeningen van de produktschappen en het landbouwschap voor produkten zoals granen, aardappelen en peulvruchten. De kwaliteit van de levensmiddelen is de totaal-resultante van de zorg voor het produkt vanaf het begin tot aan het einde van de produktie en het afleveren aan de consument. Hiertoe moet ook gerekend worden de controle op de naleving van de gestelde voorschriften.

Op de naleving van de voorschriften in de produktiefasen wordt door verschillende instellingen en keuringsinstanties gelet.

Zo valt de keuring van vlees en pluimveevlees onder het toezicht van veterinaire controle-instellingen zoals de gemeentelijke vleeskeuringsdiensten, de rijksvleeskeuringsdienst die de te exporteren produkten keurt en de rijkspluimveekeuringsdienst. Verder kennen wij de Algemene Inspectie Dienst van het Ministerie van Landbouw en Visserij die de naleving controleert van alle wettelijke voorschriften met betrekking tot het produktieproces, ook die van P.B.O.-organisaties.

Daarnaast zijn er verschillende publiekrechtelijke keuringsinstanties, zoals:

- de Nederlandse Algemene Keuringsdienst (en) - NAK's - voor zaaizaad en pootgoed, siergewassen, boomkwekerijgewassen en voor groente- en bloemzaden
- het Kwaliteitscontrolebureau voor Groenten en Fruit
- de Zuivelcontrole-instellingen
- de Stichting Nederlandse Baconcontrole en
- de Stichting Scharreleierencontrole.

Deze controle-instellingen zijn meestal geboren uit de noodzaak de gehele bedrijfstak te beschermen tegen niet bonafide bedrijfsgenoten of handelaren die zich door knoeierijen willen verrijken.

Ook het onderzoeksbeleid voor de voeding is van groot belang en moet daarom mee geïntegreerd worden in het produktie- en produktenonderzoek. Hiervoor zijn harde gegevens noodzakelijk over de huidige voeding, de gewenste voeding en de manieren om de voeding te beïnvloeden in de richting die gewenst wordt.

Het Rijksinstituut voor de Kwaliteit van Land- en Tuinbouwprodukten is mede behulpzaam door het aangeven en analyseren van objektieve consumentgerichte kwaliteitsmerken. Dit vereist een optimale communicatie en samenwerking met eerdergenoemde instituten en stations.

Het bevorderen van kwaliteit (het nemen van maatregelen)

Kwaliteitsbevordering is het ontwikkelen en doen van voorstellen ten aanzien van de technische formulering van regelingen betreffende de kwaliteit van voortbrengselen van landbouw en visserij. Op grond van eigen onderzoek of door derden verzamelde informatie wordt geadviseerd ten aanzien van kwaliteitseisen die gesteld moeten worden aan produkten en produktgroepen.

De huidige en toekomstige ontwikkelingen met betrekking tot het kwaliteitsbeleid zijn complex en van vele factoren afhankelijk. De agrarische produktie van levensmiddelen moet dan ook niet langer als een eenzijdig producent-gericht gebeuren worden gezien, maar als een maatschappelijk gebeuren waarbij een verwevenheid van belangen bestaat. In vele gevallen lopen de belangen parallel, maar ook zullen regelmatig tegenstellingen moeten worden overbrugd.

Hieruit vloeit de verantwoordelijkheid van de overheid ten aanzien van het kwaliteitsgebeuren voort.

Voor negatieve kwaliteitskenmerken, waarvoor de Warenwet en de Vleeskeuringswet de aangewezen instrumenten zijn, is dit reeds sinds lang geaccepteerd.

In toenemende mate moet de overheid door coördineren en initiëren ook participeren in de begeleiding van positieve kwaliteitsaspecten. Dit om de afzet te garanderen en ervoor zorg te dragen dat aan gerechtvaardigde wensen van groepen consumenten wordt voldaan.

In het overheidsgebeuren zijn hierbij verschillende ministeries betrokken en zijn vaak ingewikkelde en voor de gewone burger welhaast niet meer begrijpelijke coördinatielijnen aanwezig.

Het Ministerie van Landbouw en Visserij is verantwoordelijk voor de produktie en gezamenlijk met het Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne voor de kwaliteit. Het Ministerie van Economische Zaken moet zowel voor haar bedrijfs- als consumententaak een belangrijke inspraak hebben in dit overheidsbeleid voor levensmiddelen. De onderzoekinstellingen van universiteiten en hogescholen leveren een bijdrage aan het wetenschappelijk onderzoek. Ook het Ministerie van Onderwijs en Wetenschappen heeft daarom belangstelling op onderhavig gebied. De Minister voor Wetenschapsbeleid heeft eveneens een betrokkenheid vanuit

de onderzoeksfeer. Daarnaast heeft de Minister van Ontwikkelingssamenwerking gerichte belangstelling voor de afzet van produkten naar ontwikkelingslanden, terwijl het Ministerie van Cultuur, Recreatie en Maatschappelijk Werk de reclame voor levensmiddelen kritisch volgt.

Het Ministerie van Binnenlandse Zaken is mede verantwoordelijk voor de gemeentelijke dan wel provinciale keuringsinstellingen terwijl Ministeries zoals die van Financiën en Justitie vanuit specifieke verantwoordelijkheden het verloop ook kritisch volgen.

Vanuit het Ministerie van Landbouw en Visserij is het beleid gericht op de ontwikkeling van extra kwaliteitsprodukten. De consument moet de garantie krijgen dat de kwaliteit welke hij verwacht ook geboden wordt. Ook dit behoort, zowel voor gangbare als voor nieuwe kwaliteiten, tot de taak van het Ministerie van Landbouw en Visserij.

De kwaliteit kan betrekking hebben op intrinsieke kwaliteit dan wel op de wijze van voortbrenging van het produkt.

Voor wat betreft melk zijn de 19e eeuwse verhalen bekend over de verdunning door toevoeging van water. Hier moest wat aan gedaan worden. Ook werd ingezien dat de beste boter het meeste geld opbracht. Het bedrijfsleven is toen zelf op de Kwaliteitskenmerken gaan controleren en heeft daarvoor controle-lichamen ingesteld.

Deze controle-instellingen kregen meer waarde door plaatsing onder rijkstoezicht en het uitgeven van rijksmerken door de overheid. De zuivelsector is hiervan het beste voorbeeld geweest.

Het Rijkszuivelstation heeft in het kader van het rijkstoezicht gefunctioneerd. Daarnaast zijn boter- en kaasmerken door de Minister ingesteld en uitgegeven.

Ten behoeve van het functioneren van dit rijkstoezicht is voor bestaande en toekomstige controle-instellingen recent het Rijksinstituut voor de Kwaliteit van Land- en Tuinbouwprodukten ingesteld. Dit instituut heeft voor het rijkstoezicht de taak de kwaliteit en werkwijze van de laboratoria van de controle-instellingen te beoordelen. Hiertoe moet gekeken worden of de voorgeschreven analyses kwalitatief en kwantitatief op de juiste wijze worden uitgevoerd.

Deze activiteiten moeten passen in het kader van het verdrag van Rome (EEG) en daarom gelden de gestelde eisen zowel voor produkten bestemd voor de binnenlandse afzet als voor produkten bestemd voor export.

Als juridisch instrument is hiervoor de Landbouwkwaliteitswet in het leven geroepen.

Om enig inzicht te geven in de kosten van deze kwaliteitsbewaking, wordt hieronder een overzicht van de verschillende keuringsinstellingen gegeven met vermelding van de keuringskosten van levensmiddelen en andere produkten uit de agrarische sector in 1980

1. Nederlandse Algemene Keurings- diensten (zaaizaad en pootgoed, boomkwekerijgewassen, siergewassen, groente- en bloemzaden)	±	28	mln
2. Plantenziektenkundige Dienst (inclusief Rijksproefstation voor Zaadcontrole)	±	11	mln
3. Kwaliteitscontrolebureau voor Groente en Fruit	±	8,4	mln
4. Zuivelcontrole-instellingen	±	20	mln
5. Pluimveevlees en -produkten	±	14	mln
6. Vleeskeuring	±	120	mln
7. Veekeuring (Varkensclassificatie, export levend vee, en dergelijke)	±	20	mln
8. Vleeswarenkwaliteitscontrolebureau	±	1	mln
9. Stichting Baconcontrole	±	0,3	mln
10. Stichting Scharreleierencontrole	±	0,12	mln
	±	222,82	mln
In de consumentenfase wordt de kwaliteit voornamelijk bewaakt door de Keuringsdienst van Waren.	±	64	mln

Het beheersen van de kwaliteit (interpreteren)

Kwaliteitsbeheersing houdt in het aangeven en zichtbaar maken van de gevolgen voor de kwaliteit van een produkt of produktgroep van kwaliteitsbeïnvloedende handelingen en/of toevoegingen in de produktieketen. Een en ander gebeurt op basis van onderzoek en anderszins verzamelde kennis.

Het beheersen (interpreteren) van de kwaliteit, vereist het vergroten van kennis onder meer door onderzoek. Dit onderzoek is erop gericht de gevolgen van kwaliteitsbeïnvloedende handelingen en/of toevoegingen in de produktieketen zichtbaar te maken ten gunste van de kwaliteit van het produkt. Hiervoor staat in ons land een uitgebreid onderzoekapparaat ter beschikking waarin alleen al $\pm$ 30 landbouwinstituten en landbouwproefstations geheel of gedeeltelijk opereren. Daarnaast zijn de instituten van de Voedingsorganisatie TNO, de Landbouwhogeschool te Wageningen en de Faculteit der Diergeneeskunde te Utrecht op dit terrein werkzaam. Er wordt onderzoek verricht op gebieden van onder meer rassen en teelt, bodem en vruchtbaarheid, ziekten, verwerking en afzet van akker- en tuinbouwprodukten en produkten van dierlijke oorsprong.

In de meerjarenvisie van het landbouwkundig en visserij-onderzoek 1982-1986 kondigt de Minister van Landbouw en Visserij aan dat zijn beleid gericht zal zijn op de verhoging van de kwaliteit, op meer variatie van produkten en op afzetbevordering. Het accent in de produktie zal vooral moeten liggen op kwaliteitsverbetering en niet op produktieverhoging. Het welzijn van dieren zal hierbij een steeds belangrijkere rol gaan spelen.

Bij de voortbrenging van plantaardige en dierlijke produkten is het noodzakelijk het beleid voor de consument en dat voor de producent op elkaar af te stemmen. Er moet onderzoek plaatsvinden naar consumentenbehoefte/wensen/ideeën ten aanzien van produktie, samenstelling, kwaliteit, assortiment en presentatie.

Een voortdurende registratie van de opvattingen van diverse categorieën consumenten, gecombineerd met een registratieprogramma voor het voedings- en bestedingspatroon zou de noodzakelijke beleidsgegevens kunnen verschaffen over het consumentengedrag.

Het kwaliteitsonderzoek zal per produkt verspreid op de verschillende instituten plaatsvinden en vele kwaliteitskenmerken omvatten. Dit zowel voor fok- en teeltmateriaal, als voor produktie en produkten (grondstoffen, halffabrikaten en eindprodukten).

Het is van belang dat deze onderzoekactiviteiten gecoördineerd worden en aansluiten op het te voeren beleid. De Minister van Landbouw en Visserij heeft de Nationale Raad voor Landbouwkundig Onderzoek verzocht hem te adviseren over zijn meerjarenvisie en bij het opstellen van het advies rekening te houden met zijn streven de huidige omvang van het onderzoekapparaat te handhaven.

Het Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne verricht met de haar ten dienste staande onderzoekinstellingen en -middelen eveneens kwaliteitsondersteunend onderzoek. Uiteraard is dit sterk gericht op de volksgezondheids- en milieu-aspecten. Vooral de microbiologie en de toxicologie met de daaraan verbonden chemie zijn van belang. De belang-

stelling gaat hierbij uit naar hulpstoffen die in de landbouw worden gebruikt. Ook het achterblijven van niet afbreekbare stoffen in bodem, water en lucht wordt hierbij in overweging genomen. Deze onderzoekresultaten zijn van grote betekenis voor het landbouw-produktiegebeuren. Opgemerkt moet worden dat de produktiewijze niet steeds van invloed is op de intrinsieke kwaliteitseigenschappen van het produkt, waarmee wordt bedoeld dat het produkt niet beter of gezonder hoeft te zijn. Daarnaast zijn algemene kwaliteitskenmerken zoals versheid, produktidentiteit, samenstelling, voedingswaarde en produktinformatie over samenstelling, bewaren en houdbaarheid voor de consument van groot belang.

Kwaliteitsprodukten moeten voor de consument gemakkelijk herkenbaar zijn. Dit echter niet uitsluitend door algemene etiketteringsvoorschriften of welluidende benamingen. Overwogen wordt of voor bepaalde produkten van één of meerdere kwaliteitsklassen keurmerken kunnen worden ontwikkeld (zoals bijvoorbeeld voor boter, kaas en bacon reeds het geval is) zowel voor de binnen- als buitenlandse markt.

Hieronder volgen tenslotte voor een aantal produktgroepen voorbeelden van het beleid dat thans wordt ontwikkeld.

Voor vlees en vleesprodukten

- welzijn (huisvesting, behandeling) van de produktiedieren (scharrelei, scharrelvarken, graskalveren).
- behandeling van het dier en produktkwaliteit van vlees onder andere spierdegeneratie door stress tijdens vervoer.
- residuebewakingsprogramma's voor vee, vlees en eieren ten aanzien van gewasbeschermingsmiddelen, groeibevorderende stoffen en diergeneesmiddelen.
- preventie van besmetting van dierlijke produkten met micro-organismen (onder andere Salmonella-bacteriën).
- vaststellen van benamingen voor vleessoorten zoals voor biefstuk, gehakt, biefstuk-tartaar, filet-Americain in relatie tot de echtheid van het produkt.
- bevorderen van de kwaliteit van vleeswaren, het vaststellen van benamingen voor vleesprodukten, het vaststellen van identiteit en klassen (onder andere voor extra produkten).
- toelaten van het gebruik van soja- en separatorvlees voor een aantal vleesprodukten onder duidelijke declaratie dat het hier een ander produkt betreft.
- kwaliteitsverordening voor kroketten, bitterballen en frikadellen.
- beperking van hulpmiddelen bij de produktie (bijvoorbeeld extra ham zonder fosfaten).
- aandacht voor de voedingsaspecten verbonden aan vleesconsumptie (beperking vetconsumptie).

Voor melk, boter en kaas

- voorkomen van residuen van gewasbeschermingsmiddelen en diergeneesmiddelen en contaminanten.
- reductie van het gebruik van hulpmiddelen bij de bereiding van melkprodukten en kaas (onder andere voor nitraat en kleurstoffen).
- tegengaan van smaakvervlakking (vooral voor jonge kaassoorten) door het aangeven van leeftijdsklassen en bewaarvoorschriften.
- regelen van de produktie van boerenkaas.
- inspelen op de wens tot herkenbare produkten met een meer gedifferentieerde kwaliteit (niet uitsluitend voor Goudse en Edammer kaas).
- reduceren van het zoutgehalte in kaas in verband met voedingsaspecten.
- verbreden van het boterassortiment (verschillende verpakkingsvormen en eenheden; botersoorten zoals kruiden- en vruchtenboter).
- verhogen van de smeerbaarheid van boter.

Vóór akker en tuinbouwprodukten

- tegengaan van de nadelige gevolgen van het gebruik van meststoffen en andere hulpstoffen die konsekventies hebben voor
 - a. de opname van schadelijke stoffen in het gewas
 - b. het produktievermogen van de bodem
 - c. de uitspoeling in oppervlaktewater en de emissie in de lucht
- verlagen van het nitraatgehalte in bladgroente
- ontwikkelen en gebruiken van geïntegreerde bestrijdingsmethoden (onder andere voor de uievlieg)
- de produktie van alternatief geteelde appels
- uitbetalen van de producent van aardappelen naar kwaliteit
- stellen van eisen aan aardappelprodukten zoals frites, puree en chips
- verbeteren van de kwaliteit van peulvruchten voor zowel de diepvries als de conservenindustrie
- het ontwikkelen van kwaliteitseisen voor groenteconserven champignons, vruchtesappen, appelmoes.

Slotopmerking

In het bovenstaande is getracht een indruk te geven van de wijze waarop het overheidsbeleid poogt in te spelen op de wensen van de consument, die zich meer bewust wordt van zijn positie en daar zijn keuze op afstemt.

Een trend die zich zal voortzetten, mede als gevolg van meer scholing en een beter geïnformeerd zijn van de jeugd dan vroeger het geval was.

Een kritische generatie dient zich aan.

ECHTHEIDSCRITERIA VOOR VRUCHTESAPPEN

F. Dukel

Instituut CIVO-Analyse TNO

Samenvatting

Gedurende het laatste decennium heeft de consumptie van vruchtesappen in Nederland een grote vlucht genomen. Mede hierdoor werden onder meer door het CIVO-TNO in toenemende mate leemten ervaren in de bestaande wettelijke regeling, vooral op het punt van de authenticiteit.

In verband hiermee werd in 1973 een werkgroep opgericht waarvan het voorzitterschap en het secretariaat bij het CIVO berusten, en waarin industrie, overheid, PBO-organen en instituten participeren.

Na intensieve studie zijn door de werkgroep authenticiteitscriteria opgesteld voor sinaasappelsap. Deze zijn in 1979 in de produktschapsverordening opgenomen.

De activiteiten van de groep richten zich thans ook op andere sappen. Concept-criteria voor appelsap zijn inmiddels gereed gekomen en worden in de praktijk getoetst.

Inleiding

Nog niet zo lang geleden vormden de vruchtesappen een betrekkelijk onbelangrijk onderdeel binnen het Nederlandse consumptiepatroon. Iets verder terug in de geschiedenis gold dit ook voor de koolzuurhoudende frisdranken. Laatstgenoemde categorie heeft in de zestiger jaren een grote vlucht genomen. Hierbij is een duidelijke stimulans uitgegaan van de introductie en acceptatie van de zogenaamde gezinsflessen, de glazen literflessen.

Na 1970 zijn binnen de Nederlandse marktsituatie opnieuw verschuivingen opgetreden. Het laatste decennium, en vooral de tweede helft daarvan, wordt gekenmerkt door een explosieve groei in de consumptie van fabrieksmatig bereide vruchtesappen. Zeer opvallend daarbij is de grote omzettoename in het jaar 1976. Deze hield ten opzichte van het jaar 1975 bijna een verdubbeling in. Het eind van deze groei is inmiddels nog niet bereikt.

Bedroeg de consumptie aan sappen per hoofd van de bevolking in 1975 nog 6,1 liter, in 1978 was deze bijna verdrievoudigd tot 14,5 liter (tabel 1) (Anon., 1979).

Tabel 1. In Nederland voor binnenlands gebruik beschikbaar
gekomen hoeveelheden vruchte- en groentesappen over
het jaar 1978

	hoeveelheid x 1000 l	aantal liters per hoofd van de be- volking
sinaasappelsap	98.567	7,0
appelsap	69.122	4,9
druivesap	12.004	0,9
tomatensap	9.754	0,7
grapefruitsap	9.524	0,7
groentesappen	666	0,05
overige sappen	2.414	0,2
totaal 1978	202.051	14,5
totaal 1976	150.000	10,9
totaal 1975	84.000	6,1

Sinaasappelsap had hiervan aanvankelijk het grootste aandeel. De laatste jaren is appelsap dusdanig in opkomst gekomen, dat het omzetvolume hiervan nog maar nauwelijks voor sinaasappelsap onderdoet.

De in ons land geconsumeerde kwantiteiten druive-, tomaten- en grapefruitsap zijn onderling vrijwel gelijk, doch staan duidelijk in de schaduw van de eerstgenoemde twee sappen (consumptie 0,7 à 1 l per hoofd van de bevolking en per produkt). De omzet van andere sappen heeft (nog) weinig betekenis.

Factoren die een verklaring vormen voor de bovengenoemde ontwikkeling zijn, naast het toegenomen welvaartsniveau, de zucht naar het "natuurlijke" en het imago van "gezondheid". Verder bestaat er een samenhang met de sterk toegenomen produktie van de grondstoffen (bijvoorbeeld citrus in Brazilië), waardoor de prijsstelling relatief gunstig is. Parallel met de geschetste ontwikkeling werd het Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek TNO vanaf het begin van de jaren zeventig in toenemende mate geconfronteerd met verzoeken om arbitrage. Veelal was dit naar aanleiding van meningsverschillen tussen de leveranciers en afnemers inzake de deugdelijkheid (echtheid) van een partij sap of concentraat. De ervaringen die hierbij werden opgedaan maakten duidelijk dat deze materie onvoldoende geregeld was.

Wettelijke regelingen

De samenstelling van vruchtesappen was in Nederland tot november 1977 geregeld in het kader van het jam- en limonadebesluit van de Warenwet. Artikel 2 gaf definities voor de waar "vruchtesap" en noemde enkele geoorloofde toevoegingen, onder meer citroenzuur en, mits gedeclareerd, suiker.

Artikel 12 gaf de enige kwantitatieve authenticiteitsnorm: een minimumwaarde voor het soortelijk gewicht, afhankelijk van de aard van het sap. Artikel 23 lid 4 tenslotte stelde de eis dat het produkt "in deugdelijke toestand diende te verkeren en deugdelijk van samenstelling diende te zijn".

Met name deze laatste norm opende de mogelijkheid te kunnen optreden bij vervalste produkten. De bewijsvoering was echter vaak verre van eenvoudig door het ontbreken van wettelijke normen van kwantitatieve aard.

Op 17 november 1975 werd in het kader van de harmonisatie van wetgevingen binnen de E.G. een richtlijn gepubliceerd betreffende "de onderlinge aanpassing van de wettelijke voorschriften van de lid-staten inzake vruchtesappen en bepaalde soortgelijke produkten".

Stelde de warenwetregeling terzake van de samenstelling in verband met de authenticiteit nog één kwantitatieve eis (een minimum soortelijk gewicht), in de E.G.-regeling ontbreken deze eisen volledig. Wel kunnen deze blijkens artikel 13 van de desbetreffende regeling in de toekomst tegemoet worden gezien.

Als uitvloeisel van de E.G.-richtlijn dienden de wetgevingen van de lid-staten te worden aangepast. In Nederland werden de sappen daartoe gebracht onder de werkingssfeer van de "verordening P.G.F. 1976 Vruchtesappen en bepaalde aanverwante produkten", zoals vastgesteld op 9 december 1976. Deze verordening kreeg kracht van wet op 17 november 1977.

De in artikel 1 van deze richtlijn gegeven definitie van "vruchtesap" luidt als volgt: art. 1.7^a "het uit vruchten verkregen vergistbare doch niet gegiste sap, met de kleur, het aroma en de smaak kenmerkend voor het oorspronkelijk in deze vruchten aanwezige sap"; art. 1.7^b "het produkt verkregen uit geconcentreerd vruchtesap door toevoeging van:

- de hoeveelheid water die bij het concentreren aan het sap onttrokken is;
- het aroma door middel van de aromatische stoffen, welke zijn gewonnen bij het concentreren van dit sap of van sap afkomstig van vruchten van dezelfde soort".

De definitie van geconcentreerd vruchtesap luidt: art. 1.8 "vruchtesap, waaraan een gedeelte van het water is onttrokken; indien dit product bestemd is voor rechtstreekse consumptie, bedraagt dit gedeelte tenminste 50 %".

Dank zij de activiteiten van de Commissie "Vruchtesappen en aanverwante produkten" bevat deze richtlijn sinds 1979 tevens kwantitatieve normen, die in relatie staan met de echtheid.

Vervalsingen

In het bovenstaande werd reeds aangegeven dat de vigerende wettelijke regelingen de eis stellen dat - afgezien van enkele toevoegingen - een vruchtesap inderdaad voor 100 % moet bestaan uit sap van de desbetreffende vrucht.

Aangenomen kan worden, dat dit uitgangspunt de lezer alleszins logisch en acceptabel zal voorkomen.

De controle van sappen op deze karakteristiek is echter verre van eenvoudig. Dit heeft onder meer te maken met het feit dat in Nederland - en dat geldt voor de meeste Westeuropese landen - een groot deel van de behoefte aan sappen via import wordt gedekt. In deze gevallen is controle bij de bron meestal niet mogelijk, zodat alleen een (chemische) controle achteraf inzicht kan geven in de samenstelling.

Helaas is het zo, dat de interpretatie van de analytische gegevens niet eenvoudig is.

Deze problematiek hangt nauw samen met feit dat de samenstelling van sappen, evenals van andere natuurprodukten, aan grote natuurlijke variaties onderhevig is.

Hierdoor ontstaan marges waarvan gebruik kan worden gemaakt voor het uitvoeren van ongeoorloofde manipulaties: het fenomeen "vervalsen", (Benk, 1960, 1971; Benk en Cutka, 1972; Bielig et al., 1977).

Het zal overbodig zijn op te merken dat het vervalsen voor de producent aantrekkelijk is, als dit leidt tot een lagere kostprijs van het gereede produkt. Ook van andere factoren, zoals grondstofschaarste, kunnen stimulansen uitgaan.

In grote lijnen kan er op twee manieren worden geknoeid:

De eerste is door eenvoudig water toe te voegen (bij enkelvoudige sappen), dan wel te veel water toe te voegen bij het terugverdunnen van een concentraat. Volgens de vruchtesappenverordening moet een uit concentraat bereid sap worden terugverdund tot exact dezelfde sterkte als het sap vóór het concentreren had.

Deze laatste regel functioneert echter niet, doordat dit aspect oncontroleerbaar is: de oorspronkelijke sapsterkte van een partij is veelal niet bekend en niet te reconstrueren. In de praktijk wordt het concentraat daarom als een grondstof gezien, die tot een door de bottelaar als optimaal beschouwde sterkte wordt terugverdund. De mate van terugverdun-

nen kan van overheidswege worden begrensd door een minimumnorm ten aanzien van het extractgehalte.

Het detecteren van verdunning van primaire (enkelvoudige) sappen is wel mogelijk, namelijk via de analyse van de isotopensamenstelling, die bij toegevoegd water anders is dan bij het water uit de vrucht (Nissenbaum et al., 1974).

Aangezien het overgrote deel van citrussappen en appelsap in Nederland via concentraten wordt bereid, is het belang van deze detectiemethode zeer beperkt.

Onder vervalsen in engere zin verstaan wij het versnijden van sappen met andere (goedkopere) sappen, en/of met oplossingen van suikers en zuren, eventueel verrijkt met chemicaliën die ten doel hebben de controlerend chemicus zand in de ogen te strooien. (Benk, 1960, 1971; Benk & Cutka, 1972; Koch & Hess, 1971; Wallrauch, 1975; Wucherpfennig & Millies, 1972).

Normaalwaarden

Om in staat te zijn om een breed scala van vervalsingen te kunnen signaleren, dient men allereerst een gedetailleerd inzicht te verkrijgen in de samenstelling van authentieke sappen van diverse herkomst, alsmede van de variatie daarin (normaalwaarden). Er is zeer veel literatuur voorhanden over deze materie. Het merendeel daarvan heeft betrekking op sinaasappelsap, (Benk, 1971; Benk & Cutka, 1972; Lifshitz et al., 1974; Sawyer, 1963; Weits et al., 1971; Wucherpfennig & Millies, 1972).

Op basis van te stellen eisen kunnen uit de normaalwaarden parameters voor de authenticiteit worden afgeleid, (Anon., 1975^a; Bielig et al., 1977; Dukel, 1978; Koch, 1975; Koch & Hess, 1971; Korth, 1975).

De waarde van een sapparameter als authenticiteitscriterium hangt onder meer af van de natuurlijke spreiding. Voorts dient hij op eenvoudige wijze te kunnen worden vastgesteld, en niet te manipuleren te zijn (bijvoorbeeld vanwege het kostenaspect).

De selectieprocedure is meestal niet eenvoudig. Door veel parameters wordt niet of slechts ten dele aan de gestelde eisen voldaan: ideale criteria bestaan niet. Het devies is daarom: zoeken naar optimale criteria. Gelet op de dynamiek op dit terrein zal een status quo waarschijnlijk op korte termijn niet worden bereikt: authenticiteitscriteria dienen voortdurend te worden geëvalueerd en, waar nodig, bijgesteld.

Werkgroep "Vruchtesappen en aanverwante produkten"

Zoals reeds in de inleiding werd aangegeven, werd het in het begin van de laatste decade meer en meer duidelijk, dat de wettelijke regeling inzake sappen in Nederland ontoereikend was.

Het CIVO-TNO is daarom naar wegen gaan zoeken, om uit deze impasse te geraken. Het dacht daarbij aan het opstellen van een diepgaande regeling, die een wettelijke status zou dienen te verkrijgen, dan wel als gentlemen's agreement gehanteerd zou moeten worden. Hiertoe werd een commissie in het leven geroepen, die in oktober 1973 met haar werkzaamheden begon.

Naast het CIVO-TNO participeerden hierin het BBM (Bureau Bierhandel en Mineraalwaterindustrie, namens de frisdrankenindustrie), de Hoofdspectie Levensmiddelen, de Keuringsdiensten van Waren, de Landbouwhogeschool, het Produktschap voor Groenten en Fruit, het NEA (Vereniging van Nederlandse Aroma-industrieën) en de VNGFI (Vereniging der Nederlandse Groenten- en Fruitverwerkende Industrie). In een later stadium zijn daar nog het Sprengerinstituut, het RIKILT en het Ministerie van Landbouw bijgekomen.

De door de werkgroep geformuleerde doelstelling was het opstellen van echtheidscriteria voor sappen en het bevorderen van een officiële status ervan.

Uitgangspunt was, dat gestreefd moest worden naar optimale criteria, als compromis tussen de volgende wensen:

1. zoveel mogelijk niet-authentieke sappen dienen op grond van deze criteria te worden afgekeurd.
2. vrijwel alle authentieke sappen moeten aan deze normen voldoen.
3. het aantal criteria moet uit overwegingen van praktische aard zo beperkt mogelijk zijn.

Authenticiteitscriteria voor industrieel vervaardigd sinaasappelsap.

Door de Commissie werd allereerst de problematiek met betrekking tot het qua omzet in Nederland grootste produkt, sinaasappelsap, aangevat.

Er werd begonnen met een inventarisatie van de in de literatuur vermelde cijfers en criteria. Van de weliswaar in overvloed in de literatuur aanwezige informatie bleek een aanzienlijk deel betrekking te hebben op sap dat op laboratoriumschaal was geperst. Dergelijke gegevens waren niet bruikbaar, onder meer omdat de spreiding in de samenstelling in deze gevallen aanmerkelijk groter is dan bij op industriële schaal geperst sap.

Anderzijds stond van veel publicaties over industriële sappen de au-

thenticiteit van de onderzochte monsters niet, of onvoldoende vast. Gezien deze factoren bleef slechts een geringe hoeveelheid basismateriaal over, voornamelijk uit Westduitse bron (Koch en Hess, 1971). Met behulp hiervan werd de eerste versie van een concept-lijst van authenticiteitscriteria voor industrieel vervaardigd sinaasappelsap opgesteld. Bij de selectie van de criteria werden de hierboven geformuleerde uitgangspunten als leidraad gehanteerd. De criteria dienden als achtergrond voor het werk van de Commissie, dat het verfijnen, modificeren en bijstellen van de lijst ten doel had. Tevens werd een hierop afgestemde bundel analysemethoden gecompileerd, waarbij gebruik werd gemaakt van de resultaten van binnen de Commissie uitgevoerde ringonderzoekingen, alsmede van informatie en commentaar, verkregen uit correspondentie met specialisten in het buitenland.

De vormgeving van deze methoden wordt thans afgestemd op de eisen van het Nederlands Normalisatie Instituut (NNI); enkele zijn inmiddels aan het NNI ter publicatie aangeboden.

Tenslotte is van deze criteria gebruik gemaakt in het kader van het voor de Stichting Vergelijkend Warenonderzoek uitgevoerde onderzoek naar de samenstelling van een groot aantal sinaasappelsappen van de Nederlandse markt (Anon., 1977).

De ervaringen hebben uitgewezen dat de normen en de aan de hand daarvan verkregen resultaten door het bedrijfsleven worden geaccepteerd.

De definitieve versie van de lijst van authenticiteitscriteria is, na publicatie in Voedingsmiddelentechnologie, (Dukel, 1978), in de loop van 1979 opgenomen in de vruchtesappenverordening van het Produktschap (Tabel 2).

Sinaasappelsap wordt geacht nog aan de genoemde criteria te voldoen, indien dat sap slechts ten aanzien van twee van deze criteria ten hoogste 25 % afwijkt, dan wel slechts ten aanzien van drie van deze criteria ten hoogste 10 % afwijkt, een en ander met dien verstande dat aan het criterium betreffende het extract van het ongezoete sap te allen tijde voldaan dient te zijn.

De lijst bevat dus allereerst een absolute limiet ten aanzien van de sapsterkte. Verder een tweetal parameters, die gekoppeld zijn aan de aanwezigheid van "pulp wash" en/of schilextracten (te weten hesperidine en pektine). Vervolgens enkele kengetallen, waarvan aangenomen wordt dat ze minder eenvoudig te manipuleren zijn (sommige aminozuren). Tenslotte een aantal criteria die relatief eenvoudig kunnen worden geanalyseerd en waarvan het gehalte betrekkelijk stabiel is.

Aangezien statistisch gezien een enkele afwijking bij authentiek sap niet is uit te sluiten, voorziet de regeling in enkele geoorloofde afwijkingen.

Tabel 2. Authenticiteitscriteria voor sinaasappelsap, opgenomen in de Verordening P.G.F. 1976 "vruchtesappen en bepaalde aanverwante produkten" (met wijziging 1-8-79 en 17-11-79)

1. suikervrij extract	min.	2,2	%
2. suiker- en zuurvrij extract	"	1,4	%
3. as	"	0,30	%
4. kalium (K)	"	130	mg/100 g
5. fosfaat (P_2O_5)	"	26	"
6. vitamine B ₁	"	0,05	"
7. hesperidine	max.	90	"
8. proline	min.	50	"
9. betaïne	"	50	"
10. pectine (totaal, IFU)	max.	65	"
11. pulp	"	10	%
12. formolgetal	min.	1,3	ml 1 N/100 g
13. asparaginezuur	"	1,3	mmol/kg
14. serine	"	0,6	"
15. asparagine	"	1,55	"
16. glutaminezuur	"	0,45	"
17. alanine	"	0,45	"
18. γ -aminoboterzuur	"	1,3	"
19. arginine	"	1,75	"
20. glycine	max.	0,5	"
21. glutamine	"	0,1	"
22. extract van het ongezoete sap na correctie voor de zuurgraad	min.	10,5	°Brix

Lopende werkzaamheden, mogelijke toekomstige ontwikkelingen

Gebleken is, dat het bedrijfsleven zeer verheugd is met de regeling inzake sinaasappelsap, met name, omdat hierdoor een stuk duidelijkheid wordt geschapen. Op de Commissie Vruchtesappen wordt van verschillende wijze aandrang uitgeoefend om zo snel mogelijk te komen met regelingen voor andere sappen.

Een conceptregeling voor appelsap is inmiddels gereed gekomen, en wordt thans in de praktijk getoetst (Tabel 3).

Een eerste inventarisatie van gegevens over grapefruitsap is eveneens tot stand gekomen. Voorts ligt het in de bedoeling om de regeling inzake sinaasappelsap met enige regelmaat te evalueren en bij te stellen. Niet uit te sluiten is dat in de toekomst criteria, gebaseerd op de onderlin-
ge verhouding van kengetallen een rol zullen gaan spelen, (Fischer,

1973), alsmede de analyse van isotopenverhoudingen (Lucchesi, 1979; Nissenbaum et al., 1974; Doner et al., 1979).

Veel andere sappen moeten nog aan bod komen, evenals andere vruchteprodukten. De werkzaamheden op dit terrein zijn derhalve bepaald nog niet afgerond.

De positieve respons van de zijde van overheid en bedrijfsleven op het reeds verrichte werk vormt daarbij een stimulans om op de ingeslagen weg voort te gaan.

Tabel 3. Concept authenticiteitscriteria voor appelsap, opgesteld door de Commissie Vruchtesappen en aanverwante produkten

Suikervrij extract	min.	1,7 %
as	"	0,18 %
kalium (K)	"	86 mg/100 g
fosfaat (P_2O_5)	"	9,3 mg/100 g
L-appelzuur	"	0,50 %
D-appelzuur	afwezig	
anh. citroenzuur*	max.	35 mg/100 g
verhouding glucose/fructose	0,35 - 0,60	
saccharose	max.	3,0 %
extract van het ongezoete sap, na correctie voor de zuurgraad	min.	11,2 °Brix

* mits gedeclareerd, is de toevoeging van maximaal 0,3 gram citroenzuur per 100 ml sap toegelaten.

Literatuur

- Anon., 1975^a, Steckbrief eines Orangensaftes. Rundschreiben I.G.Z. 24-3-1975
- Anon., 1975^b. Werkgroep "Vruchtesappen" Voedingsmiddelentechnol., 8 (44): 33
- Anon., 1977. Sinaasappelsap. Consumentengids 25: 204-208
- Anon., 1979. Voor binnenlands gebruik beschikbaar gekomen hoeveelheden vruchte- en groentesappen in 1978. CBS-mededeling
- Benk, E., 1960. Verfälschte Orangendicksäfte. Dtsch. Lebensm. Rundsch., 56: 99-103
- Benk, E., 1971. Über Verfälschungen von Orangensäften und Orangensaftkonzentraten durch Schalenzubereitungen. Ind. Obst Gemüseverwert., 56: 692-694

- Benk E. & I. Cutka, 1972. Über Verfälschungen von Orangensäften und ihre Erkennung auf grund von Analysenergebnissen. Mitteilungsbl. GDCh-Fachgruppe Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem., 26: 165-171
- Bielig, H.J. et al., 1977. Richtwerte und Schwankungsbreiten bestimmter Kennzahlen für Apfelsaft, Traubensaft und Orangensaft. Flüssiges Obst, 44: 215-226
- Doner, L.W., D. Chia & J.W. White, 1979. Mass spectrometric $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ determinations to distinguish honey and C_3 plant sirups from C_4 plant sirups (sugar cane and corn) in candied pine apple and papaya. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 62: 929-930
- Dukel, F., 1978. Authenticiteitscriteria voor industrieel bereid sinaasappelsap. Voedingsmiddelentechnol., 11 (29/30): 12-13
- Fischer, R., 1973. Die inneren Relationen, eine Möglichkeit zur Aufklärung von Verfälschungen bei Orangensäften 100%. Flüssiges Obst, 40: 384-388; 407-413; 455-466
- Koch, J., 1975. Über Kennzahlen für industriell hergestellte Orangensäfte als Grundlage für eine gleichmässige Beurteilung der Erzeugnisse durch die amtliche Lebensmittelkontrolle. Flüssiges Obst 42: 217-224
- Koch, J. & D. Hess, 1971. Zum Nachweis von verfälschten Orangensäften. Dtsch. Lebensm. Rundsch., 67: 185-195
- Korth, A., 1975. Tätigkeitsbericht der Interessengemeinschaft Zitrusfrüchte e.V. Flüssiges Obst 42: 388-392
- Lifshitz, A., Y. Stepak & M.B. Brown. 1974. Method for Testing the purity of Israeli Citrus Juices. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 57: 1169-1175
- Lucchesi, C.A., 1979. The analytical approach. Anal. Chem., 51: 224-232
- Nissenbaum, A., A. Lifshitz & Y. Stepak, 1974. Detection of Citrus Fruit Adulteration using the distribution of natural stable isotopes. Lebensm. Wiss. Technol., 7: 152-154
- Rogers, G.R., 1970. Collaborative Study of betaine in Orange Juice. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 53: 568-571
- Sawyer, R., 1963. Chemical composition of some natural and processed orange juices. J. Sci. Food Agric., 14: 302-312
- Wallrauch, S., 1975. Aktuelle Verfälschungen von Fruchtsäften, deren Erkennen und Beurteilung. Flüssiges Obst 42: 225-229
- Weits, J., et al, 1971. Betaïn, Nicotinsäure und freie Aminosäuren in normalem und verfälschtem Orangensaft. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 145: 335-338
- Wucherpennig, K. & K.D. Millies, 1972. Beitrag zur Erkennung verfälschter Orangensäfte. Flüssiges Obst 39: 148-150

J.B. Luten, J.W. Vreeken
Instituut CIVO-Technologie TNO

Samenvatting

De vorming van bederfprodukten (ammoniak, trimethylamine, hypoxanthine, histamine, putrescine en cadaverine) tijdens opslag van makreel in ijs werd bestudeerd. De toename van histamine en cadaverine was aanzienlijk. Geringe stijging in het ammoniak-, hypoxanthine-, putrescine- en trimethylaminegehalte werd geconstateerd. De resultaten van een oriënterend onderzoek naar de aanwezigheid van bederfprodukten in volconserven gaven aan dat in sommige gevallen het histaminegehalte afwijkend hoog was.

Inleiding

Vanaf de vangst tot aan het gebruik door de consument is de vis onderworpen aan talrijke manipulaties en bewerkingen die de kwaliteit van het produkt op gunstige en ongunstige wijze kunnen beïnvloeden. Om de gevolgen hiervan te kunnen bestuderen zijn doeltreffende analysemethoden voor kwaliteitsbeoordeling noodzakelijk. Alvorens een bepaalde objectieve kwaliteitsmeting uitgebreid aan de orde te stellen volgt een kort overzicht van de hoofdlijnen van chemische veranderingen in vis tijdens het bederfproces. Na de rigor mortis wordt onder invloed van bacteriële, enzymatische en oxidatieve werking een geringe fractie van de bestanddelen van vis zoals eiwitten, extraheerbare stikstofverbindingen (vrije aminozuren, trimethylaminoxide, ureum), vetten, koolhydraten en derivaten van nucleïnezuuren afgebroken.

Afbraak van eiwitten via desaminering leidt tot de vorming van ammoniak en zuren. De gevormde zuren kunnen verder afgebroken worden tot kool-dioxide en water. Ook het in sommige vissoorten aanwezige ureum zal als gevolg van bacteriële activiteit omgezet worden in ammoniak. Van de extraheerbare stikstofverbindingen is het trimethylaminoxide (TMAO) een belangrijke component die tijdens bederf omgezet wordt in trimethylamine (TMA), dat van betekenis is voor de ontwikkeling van de geur van bedorven vis. Melkzuur, als afbraakprodukt van glycogeen, speelt als waterstofdonor een belangrijke rol bij de reductie van TMAO tot TMA. Het melkzuur wordt hierbij geoxideerd tot azijnzuur waarbij tevens kool-dioxide vrijkomt.

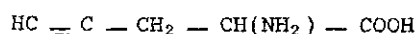
Het in de levende weefsels aanwezig zijnde adenosinetrifosfaat (ATP), van belang bij de energie overdracht in cellen, wordt in de doodstrijd van de vis en tijdens het bederf via adenosinemonofosfaat (AMP), inosinemonofosfaat (IMP) en inosine uiteindelijk in hypoxanthine (HX) omgezet. Veelal worden bovengenoemde afbraakprodukten (ammoniak, organische zuren, TMA, HX) als bederf- c.q. kwaliteitsindicator gebruikt bij de beoordeling van visprodukten.

De afbraak van een aantal vrije aminozuren tot hun overeenkomstige aminen staat de laatste tijd in de belangstelling. Het betreft hier de vorming van biologisch actieve aminen zoals histamine, putrescine en cadaverine. Biologisch actieve aminen zijn alifatische alicyclische en heterocyclische organische basen met een laag molecuulgewicht die ontstaan zijn tijdens stofwisselingsprocessen in planten, dieren en micro-organismen. Biogene aminen komen derhalve van nature in kleine hoeveelheden voor in allerlei levensmiddelen. Daarnaast kunnen de biogene aminen een gevolg zijn van microbiologische afbraakprocessen van aminozuren tijdens fermentatie of bederf van levensmiddelen.

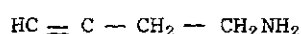
In het menselijk lichaam oefenen de biogene aminen hun werking uit op het centraal zenuwstelsel en het bloedvatenstelsel. Vergiftigings- en allergieverschijnselen als gevolg van de consumptie van (bedorven) voedsel zijn veelal toe te schrijven aan deze afbraakprodukten van aminozuren en in het geval van visserijprodukten spelen histamine, putrescine en cadaverine daarbij een belangrijke rol.

Vorming van histamine, putrescine en cadaverine in visserijprodukten

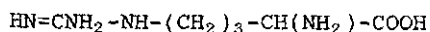
In zijn algemeenheid kan gesteld worden dat histamine, putrescine en cadaverine afbraakprodukten zijn van de aminozuren histidine, arginine en lysine:



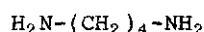
histidine



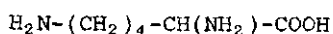
histamine



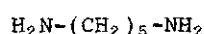
arginine



putrescine



lysine



cadaverine

In vis treft men histidine, arginine en lysine aan als bouwstenen van de eiwitten, daarnaast komen zij als vrije aminozuren voor. Het is bekend dat met name de makreel- en haringachtige vissoorten relatief veel vrij histidine en/of lysine bevatten. Onderzoek van Mackie & Ritchie (1974) heeft aangetoond dat lysine in aanzienlijke hoeveelheden als vrij aminozuur in diverse soorten vis voorkomt, terwijl het histidinegehalte in makreel beduidend hoger is dan in de overige onderzochte vissoorten. Door Hughes (1959) is geconstateerd dat het vrije histidine- en lysinegehalte in haring varieerde tussen 26-100 mg % respectievelijk 4,3-24,9 mg % in afhankelijkheid van het seizoen. De van nature aanwezige vrije histidine, lysine en in mindere mate arginine moeten als een voorname risicobron beschouwd worden voor de vorming van hun overeenkomstige biogene aminen. De vorming van histamine, putrescine en cadaverine is een gevolg van bacteriële enzymatische processen waarbij decarboxylering van het aminozuur optreedt.

Histamine, putrescine en cadaverine als bederf- en kwaliteitsindicator voor makreel- en haringachtige vissoorten

Sedert vele jaren wordt er onderzoek verricht naar de vorming van specifieke chemische verbindingen tijdens het bederf van vis. Voor vissoorten zoals makreel, tonijn en in mindere mate voor haring en sardines wordt histamine als bederfindicator gebruikt. Verschillende onderzoekers (Hardy & Smith, 1976; Edmunds & Eitenmiller, 1975) geven aan dat de histamineconcentratie drastisch toeneemt tijdens het bederf. Recent onderzoek van Ritchie & Mackie (1979) en Mietz & Karmas (1977, 1978) heeft echter duidelijk gemaakt dat de concentratie van putrescine en cadaverine aanvullende en mogelijk betere informatie geeft over de kwaliteit van visserijprodukten dan een meting van het histaminegehalte. Opvallend zijn de resultaten van het onderzoek van Ritchie & Mackie (1979) naar de ontwikkeling van histamine, putrescine en cadaverine in haring (*Clupea harengus*) en makreel (*Scomber scombrus*). In makreel is het gehalte aan de biogene aminen na zeven dagen bij + 1°C nauwelijks toegenomen, terwijl in haring er duidelijk stijging is in het histamine- en cadaverinegehalte. Tot voor kort was enig inzicht op dit terrein onmogelijk door het ontbreken van een geschikte en gevoelige analysemethode voor putrescine en cadaverine. Van de eerder genoemde vissoorten worden tonijn en sardines in Nederland uitsluitend als volconserveren aan de consument aangeboden. Uit invoercijfers van 1978 blijkt dat de invoer van sardines voornamelijk uit Marokko, Portugal en Italië plaatsvindt, terwijl Taiwan, Japan, Ghana en de Verenigde Staten de grootste leveranciers van de tonijnconserveren zijn.

Ofschoon het geen aanbeveling verdient is het mogelijk om vis van matige tot slechte microbiologische kwaliteit door verwerking tot een volconserve als een "aanvaardbaar" produkt af te leveren. Bovendien zullen door het koken van de vis voor sterilisatie eventuele vluchtige afwijkende geur- en smaakstoffen verdwijnen, terwijl door toevoeging van toegestane ingrediënten (olie, groente, sausen enz.) een zekere maskering van ongewenste geur- en smaakstoffen kan plaatsvinden. Histamine, putrescine en cadaverine zullen vanwege hun hittebestendigheid aanwezig blijven.

Toxiciteit biogene aminen

Biogene aminen in voedingsprodukten vormen normaliter geen gevaar voor de mens. In het geval van histamine, putrescine en cadaverine zorgen monoaminoxidasen, onder andere aanwezig in het slijm van de dunne darm, ervoor dat een omzetting plaatsvindt in hun overeenkomstige zuren. Bij het ontbreken van een dergelijk stofwisselingsmechanisme kan de aanwezigheid van biogene aminen in het voedsel, al dan niet in hoge concentratie, aanleiding tot ziekteverschijnselen geven. Het is eveneens bekend dat bepaalde medicamenten het stofwisselingsproces van de biogene aminen kunnen blokkeren, zodat ook in deze gevallen zich problemen voordoen na consumptie van bijvoorbeeld vis.

De toxiciteitsverschijnselen zoals misselijkheid, braken, diarree, hoofdpijn, huiduitslag (netelroos), hartkloppingen treden vrij snel op (incubatie = 15 minuten tot 3 uur (Merson et al., 1974)) na consumptie. Door verschillende onderzoekers is geprobeerd een onderverdeling in de mate van toxiciteit aan te brengen in relatie tot het histaminegehalte. Door Ienistea (1973) wordt de volgende indeling, gebaseerd op verschillende onderzoeken, gegeven:

	<u>histamine-concentratie</u>
normaal	<5 mg%
verhoogd (veroorzaakt mogelijk lichte ziekteverschijnselen in risicogroepen)	5-10 mg%
toxisch	10-100 mg%
hoog toxisch	>100 mg%

De Food and Drug Administration hanteert op het ogenblik een onofficiële norm van 10 mg% histamine in vis als maximaal toelaatbare concentratie. Tevens dient vermeld te worden dat door sommige onderzoekers aangegeven is dat putrescine en cadaverine een synergistische werking bezitten ten opzichte van histamine.

Uit geregistreeerde gevallen van vergiftiging door biogene aminen blijkt veelal de consumptie van tonijn en makreel de oorzaak te zijn ("scombroid fish poisoning"). In 1973 traden in de Verenigde Staten onder 232 personen vergiftigingsverschijnselen op na het eten van tonijn uit blik. Het gehalte aan histamine varieerde in die gevallen tussen de 62-280 mg% (Merson et al., 1974). In Engeland wordt men steeds meer geconfronteerd met vergiftigingsgevallen door een verhoogde consumptie van makreel. Door Gruickshank & Williams (1978) zijn een viertal gevallen beschreven waarbij de consumptie van makreel met een histaminegehalte van circa 150 mg % de oorzaak was. Door Coutinho et al. (1979) wordt een histamine vergiftiging na het eten van makreel beschreven. De makreel bleek bij onderzoek 400 mg % histamine te bevatten.

Evenzeer belangrijk is de constatering van Lijinsky & Epstein (1970) dat de primaire aminen zoals putrescine en cadaverine tijdens bakken van voedingsprodukten cyclische secundaire aminen kunnen vormen, die vervolgens met nitriet aanleiding kunnen geven tot het ontstaan van carcinogene nitrosaminen. Door Warthesen et al. (1975) en Bills et al. (1973) is de mogelijkheid van nitrosaminevorming uit putrescine en cadaverine bevestigd. Putrescine en cadaverine worden derhalve als precursors van nitrosaminen beschouwd.

Uit het voorgaande moge blijken dat onderzoek naar de vorming van afbraakprodukten en in het bijzonder de biogene aminen in vis gewenst is. De resultaten van een onderzoek naar de vorming van bederfprodukten tijdens opslag van makreel zijn in deze publicatie weergegeven alsmede de resultaten van een oriënterend onderzoek naar de aanwezigheid van afbraakprodukten in verschillende soorten volconserveren.

Praktische uitvoering

Bewaarexperiment makreel

Circa 60 kg verse makreel (*Scomber scombrus*) werd in ijs opgeslagen. De omgevingstemperatuur bedroeg 4°C. Elke dag werden een drietal makrelen gefileerd. Het visvlees werd vervolgens gehomogeniseerd. In ieder monster werd met de Technicon Auto Analyser het gehalte aan histamine (Luten, 1980), hypoxanthine, ammoniak en trimethylamine (Ruiter & Wese-man, 1976) vastgesteld. Putrescine en cadaverine werden gaschromatografisch bepaald. Daarnaast werden regelmatig enkele makreelmonsters sensorisch gekeurd.

Aanwezigheid van bederfproducten in visconserven.

In winkels van IJmuiden en directe omgeving werden in totaal circa 90 blikjes tonijn, makreel, haring en sardines van zoveel mogelijk verschillende merken gekocht. Na verwijdering van olie, groente enz. werd het monster gehomogeniseerd en vervolgens geanalyseerd (histamine, NH_3 , TMA en HX).

Resultaten

In tabel 1 zijn de gehalten (spreidingsgebied en het gemiddelde) van de verschillende bederfproducten in de onderzochte makreelmonsters vermeld. Een omschrijving van de kwaliteit van de makreel op basis van de organoleptische keuringen is eveneens weergegeven.

De verdeling van de gehalten van de verschillende afbraakproducten in de onderzochte visconserven zijn vermeld in tabel 2. Door toepassing van de uitbijtertest van Dixon op de resultaten per visconservensoort is het mogelijk om een indruk te krijgen welke monsters een afwijkend hoog gehalte aan een afbraakprodukt bevatten. Resultaten zijn vermeld in tabel 3.

Discussie en conclusies

Bewaarexperiment makreel.

Voor zowel NH_3 , TMA, HX als de biogene aminen geldt dat hun concentratie in makreel toeneemt tijdens opslag in ijs. Voor NH_3 , HX, en putrescine is de toename geleidelijk en gering, terwijl de toename in het TMA-gehalte aanzienlijk is. Het gehalte aan histamine en cadaverine neemt van alle onderzochte bederfindicatoren het sterkst toe. De vorming van cadaverine houdt ongeveer gelijke tred met die van histamine. De variatie in het histamine-, putrescine- en cadaverinegehalte tussen individuele makrelen op één tijdstip is vrij groot.

Dit houdt in dat de kwaliteitsbeoordeling alsmede een oordeel over de versheid van "verse" makreel op basis van het histamine- en cadaverinegehalte slechts goed mogelijk is, indien ervoor gezorgd wordt dat het oordeel gebaseerd is op een meting van een redelijk groot aantal makrelen. Uit dit experiment blijkt duidelijk dat opslag van makrelen in ijs gedurende ruim een week mogelijk is alvorens het produkt organoleptisch

Tabel 1. De vorming van histamine, putrescine, cadaverine, trimethylamine, ammoniak en hypoxanthine in makreel tijdens opslag in ijs.

Monster tijd (dag)**	Histamine (mg %)		Putrescine* (mg %)		Cadaverine* (mg %)		TMA (mg % N)		NH ₃ (mg % N)		HX (mg %)	
	spreiding	gem.	spreiding	gem.	spreiding	gem.	spreiding	gem.	spreiding	gem.	spreiding	gem.
0	0.065-0.075	0.068	0.15		<0.14		0.49-0.75	0.61	12.2-14.5	13.0	3.3-4.5	3.9
1	0.056-0.065	0.062	0.14		<0.14		0.60-0.66	0.62	12.2-12.9	12.6	4.1-7.9	5.4
2	< 0.030	<0.030	<0.12		<0.14		0.45-0.56	0.52	9.5-10.7	10.0	10.3-14.6	13.0
3	< 0.030	<0.030	0.16		<0.14		0.38-0.57	0.49	10.9-11.3	11.3	13.8-15.3	14.8
4	<0.030-0.037	0.037	<0.12		<0.14		0.48-0.98	0.76	9.2-10.4	10.0	12.4-13.5	12.8
5	0.10-0.18	0.13	<0.12		<0.14		1.42-1.61	1.50	11.9-12.1	11.9	13.8-17.2	15.0
6	0.10-0.12	0.11	<0.12		<0.14		1.48-2.00	1.74	11.6-13.1	12.1	14.7-19.1	16.6
7	0.095-0.53	0.31	<0.12		<0.14		2.11-2.85	2.52	12.2-14.0	13.3	18.2-29.7	22.1
8	0.046-0.19	0.13	<0.12-0.14	0.14	<0.14-0.37	0.29	2.65-3.60	3.23	13.5-14.5	14.1	13.2-20.9	18.2
9	0.11-0.59	0.38	0.17-0.25	0.22	0.34-0.72	0.58	3.31-5.21	4.38	16.9-19.7	18.5	21.3-23.4	22.5
10	0.18-2.04	0.95	0.12-0.35	0.25	0.34-2.90	2.02	3.14-12.12	6.59	17.5-27.6	22.2	18.7-32.0	23.4
11	1.11-6.36	3.00	0.19-0.21	0.20	0.82-2.60	1.78	4.87-10.60	6.80	19.9-20.6	20.2	22.5-28.7	25.0
12	1.54-8.81	4.99	0.26-0.49	0.37	1.48-3.25	2.12	9.39-11.11	10.20	23.4-27.8	26.3	25.7-30.9	28.6
13	1.58-5.89	3.22	0.17-0.44	0.32	1.38-4.19	2.36	8.57-9.59	8.95	30.2-40.5	34.7	22.0-25.7	24.0
14	2.56-4.95	3.37	0.36-1.14	0.79	4.72-6.30	5.57	7.59-10.96	9.21	36.5-50.6	45.0	22.6-35.5	27.7
15	1.77-6.08	3.53	<0.12-0.35	0.33	0.33-3.27	1.99	5.81-6.47	6.09	27.6-32.6	29.7	20.5-25.6	22.5
16	0.62-3.28	2.19	<0.12-0.12	0.12	<0.14-3.21	1.88	5.96-8.86	7.38	43.8-50.4	47.3	26.3-27.3	27.0
17	0.88-11.22	5.49	<0.12-1.37	0.75	<0.14-13.4	7.27	8.26-9.63	8.12	37.2-45.4	40.9	23.8-64.7	39.1
18	4.56-13.67	7.79	0.40-1.45	0.88	1.99-10.2	5.46	8.18-13.89	10.76	41.9-67.8	54.6	24.4-34.7	28.7

* In de eerste week is slechts in één makreel het putrescine- en cadaverinegehalte bepaald.

** Sensorische beoordeling: dag-0: zeer goed, dag-2: goed, dag-4: voldoende, dag-7: matig, dag-9: acceptabel, dag-11: afkeuringswaardig.

Tabel 2. De verdeling van histamine, trimethylamine, ammoniak en hypoxanthine over verschillende soorten visconserveren*.

Histamine					Trimethylamine				
Concentratie (mg %)	M	T	H	S	Concentratie (mg % N)	M	T	H	S
0-1	21	17	11	20	0-5	11	21	2	2
1-5	-	4	2	5	5-10	9	1	9	20
5-10	-	-	-	1	10-15	2	-	1	3
10-100	1	2	-	1	15-20	-	-	-	-
> 100	-	-	-	2	> 20	-	-	-	-

Ammoniak					Hypoxanthine				
Concentratie (mg % N)	M	T	H	S	Concentratie (mg %)	M	T	H	S
0-10	-	-	-	-	0-10	1	4	5	4
10-20	1	1	4	-	10-20	19	9	7	15
20-30	7	7	5	2	20-30	1	2	-	2
30-40	9	3	3	9	30-40	1	3	-	1
40-50	3	6	-	7	40-50	-	2	-	-
50-60	1	3	-	5	> 50	-	1	-	2
> 60	1	2	-	1					

* M=makreel, T=tonijn, H=haring en S=sardines.

Tabel 3. Afwijkende hoge gehalten aan histamine, TMA, NH₃ en HX in enkele monsters volconserveren volgens uitbijter-test van Dixon*.

Monster**	Histamine (mg %)	TMA (mg % N)	NH ₃ (mg % N)	HX (mg %)
Makreel-18	15.8	(9.1)	67.9	38.6
Makreel-20	(0.2)	14.8	55.3	(14.8)
Makreel-22	(0.3)	(11.0)	(24.4)	29.9
Tonijn-8	(0.6)	7.3	(21.2)	(14.5)
Tonijn-15	10.7	(2.4)	(30.7)	(34.9)
Tonijn-16	79.0	(2.8)	(58.5)	80.7
Haring-5	3.9	(3.6)	(16.4)	(8.4)
Haring-13	(0.2)	14.0	(21.3)	(13.1)
Sardines-2	110	(9.2)	(43.1)	75.6
Sardines-6	7.4	(8.4)	(29.1)	(15.5)
Sardines-9	200	14.6	(37.5)	69.5
Sardines-18	40	(8.6)	(57.5)	35.5

* De tussen haakjes vermelde waarden zijn geen uitbijters.

** Monster = soort - codenummer van het merk.

onacceptabel is geworden. Ofschoon op dat tijdstip het histaminegehalte in de makrelen sterk verhoogd is ten opzichte van de uitgangssituatie, blijkt dat de FDA norm van 10 mg% niet overschreden wordt. Onderzoek naar de vorming van de bederfprodukten tijdens opslag van makreel onder minder gunstige omstandigheden (hogere temperatuur) is evenwel wenselijk alsmede een herhaling van het bewaarexperiment in ijs met ander uitgangsmateriaal.

Volconserveren

Het merendeel van de onderzochte volconserveren (79%) bezat een histaminegehalte kleiner dan 1 mg%. In circa 7% van de produkten werd een histaminegehalte boven de FDA norm van 10 mg% waargenomen. Met name in sardines was het histaminegehalte nogal eens verhoogd. Slechts 7.5% van de volconserveren bezat een TMA-gehalte tussen de 10-15 mg%. Hogere gehalten werden niet geconstateerd. In ruim 87% van de onderzochte artikelen was het gehalte aan HX kleiner dan 30 mg%. Het is opvallend dat tweederde van de monsters een ammoniakgehalte had boven de 30 mg%.

Vergelijking van de gemeten gehalten met de resultaten van het makreelbewaarexperiment is vooralsnog niet mogelijk, enerzijds vanwege het feit dat andere vissoorten dan makreel zijn onderzocht, anderzijds vanwege de onbekende invloed van de sterilisatieprocedure op de vorming van de afbraakprodukten.

Echter uit tabel 3 blijkt dat sommige monsters op basis van statistische berekeningen afwijkend hoge histaminegehalten bevatten, terwijl de gemeten histaminegehalten ook uit oogpunt van volksgezondheid in een aantal gevallen onaanvaardbaar hoog waren. In sommige van deze gevallen (makreel-18, tonijn-16, sardines-2, sardines-9 en sardines-18) is het HX-gehalte eveneens afwijkend hoog. Uit deze resultaten van het oriënterend onderzoek moge blijken dat de meting van enkele bederfprodukten in visconserveren een indicatie kan geven over de kwaliteit van het produkt. Verder onderzoek is gewenst om de verschillende invloeden (sterilisatieprocedure, seizoen, bewaarprocedure enz.) op het gehalte aan de verschillende bederfprodukten te bestuderen teneinde een objectieve kwaliteitsbeoordeling van volconserveren mogelijk te maken.

Dankwoord

De auteurs zijn dank verschuldigd aan dhr. K. Brünner voor de technologische uitvoering van het makreel-bewaarexperiment.

Literatuur

- Bills, D.D. et al., 1973. Potential precursors of N-nitrosopyrrolidine in bacon and other fried foods. *J. Agric. Food Chem.*, 21: 876-877
- Coutinho, R.A. et al., 1979. Histamine vergiftiging na het eten van makreel. *Ned. T. Geneeskunde*, 123: 1519-1521
- Cruickshank, J.G. & H.R. Williams, 1978. Scombrototoxic fish poisoning. *Br. Med. Journal*, 2: 739
- Edmunds, W.J. & R.R. Eitenmiller, 1975. Effect of storage time and temperature on histamine content and histidine decarboxylase activity of aquatic species. *J. Food Sci.*, 40: 516-519
- Hardy, R. & J.G.M. Smith, 1976. The storage of mackerel (*Scomber scombrus*). Development of histamine and rancidity. *J. Sci. Food Agric.*, 27: 595-599
- Hughes, R.B., 1959. Chemical studies on the herring (*Clupea harengus*) II - The free amino-acids of herring flesh and their behaviour during Post-mortem spoilage. *J. Sci. Food Agric.*, 10: 558-564
- Ienistea, C. 1973. Significance and detection of histamine in food. *Microbiol. Saf. Food Proc. Int. Symp. Food Microbiol.*, 8 th, 1972 Academic Press-London-New York: 327-343.
- Lijinsky, W. & S.S. Epstein, 1970. Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature*, 225: 21-23
- Luten, J.B. 1980. An automated fluorimetric method for the determination of histamine in fish products. In voorbereiding.
- Mackie, I.M. & A.H. Ritchie, 1974. Free amino-acids of fish flesh. *Proc. IV Int. Congr. Food Sci. and Technol.*, 1: 29-38.
- Merson, M.H. et al., 1974. Scombroid fish poisoning: Outbreak traced to commercially canned tuna fish. *J. Am. Med. Assoc.*, 228: 1268-1269
- Mietz, J.L. & E. Karmas, 1977. Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. *J. Food Sci.*, 42: 155-158
- Mietz., J.L. & E. Karmas, 1978. Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimps as an indicator of decomposition. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 61: 139-145
- Ritchie, A.H. & I.M. Mackie, 1979. The formation of diamines and polyamines during storage of mackerel (*Scomber scombrus*). Torry Staff Jubilee Publication, TD 1259
- Ruiter, A. & J.M. Weseman, 1976. The automated determination of volatile bases (trimethylamine, dimethylamine and ammonia) in fish and shrimp. *J. Food Technol.*, 11: 59-68
- Wharthesen, J.J. et al., 1975. Formation of heterocyclic N-nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines and amino-acids. *J. Agric. Food Chem.*, 23: 898-902

INVLOED VAN VERPAKKINGSTECHNIEKEN OP DE MICROBIOLOGISCHE KWALITEIT VAN VOEDINGSMIDDELEN

G.A. Harrewijn
Instituut CIVO - Analyse TNO

Samenvatting

Hoewel de keuze van vele, nieuwe verpakkingstechnieken en -materialen in eerste instantie niet ingegeven is om de microbiële houdbaarheid te verbeteren, kan bij nieuwe toepassingen de microbiologische aspecten niet uit het oog worden verloren. In deze bijdrage worden deze aspecten bij enkele moderne verpakkingstechnieken besproken en wel bij (a) het vacuum- en gasverpakken; (b) het aseptisch verpakken; (c) het steriliseren in flexibele en halfstarre verpakking; (d) het verpakken van "Intermediate Moisture Foods". Hierbij wordt de invloed van de belangrijkste eigenschappen van het verpakkingsmateriaal op de microbiologische kwaliteit van het produkt behandeld, te weten de bacterie-ondoorlaatbaarheid, de microbiële contaminatie en de gas- en waterdampdoorlaatbaarheid.

Inleiding

Sinds lange tijd worden voedingsmiddelen verpakt in zakken, bussen, potten, vaten, flessen, e.d. om deze te beschermen tegen beschadiging en verliezen tijdens transport, opslag en gebruik. De materialen die hierbij gebruikt werden, bijvoorbeeld hout, aardewerk, tin en glas, dienden ook als barrière voor ongerechtigheden van buitenaf (stof, ongedierte, en dergelijke) en soms ook om bederf tegen te gaan. Men realiseerde zich toen nog niet dat micro-organismen hierbij een belangrijke rol konden spelen. Dit laatste gold ook toen Appert in 1810 ontdekte dat bederfelijke voedingsmiddelen na intensieve verhitting in luchtdicht gesloten glas voor lange tijd houdbaar konden worden gemaakt. Door toedoen van onder andere Pasteur werd later ontdekt dat de bacterie-ondoorlaatbaarheid van de verpakking een wezenlijk kenmerk van deze conserveermethode was.

In de loop der jaren is een grote diversiteit aan nieuwe verpakkingen op de markt gebracht. De door de kruidenier met de hand afgewogen en in papier verpakte produkten zijn voor een groot deel verdrongen door industrieel bereide, voorgepakte produkten. Naast glas en blik hebben vooral het gebruik van kunststof en laminaten als verpakkingsmateriaal voor beperkt en onbeperkt houdbare voedingsmiddelen een hoge vlucht genomen. De nieuwe verpakkingen en de daarbij behorende verpakkingstech-

nieken worden hierbij meer en meer beschouwd als een wezenlijk onderdeel van het gehele conserveerproces. Hoewel de keuze van deze nieuwe verpakkingen in eerste instantie niet ingegeven is door het streven naar een betere microbiële houdbaarheid, moeten bij nieuwe toepassingen de microbiologische aspecten niet uit het oog worden verloren. Juist op laatstgenoemde aspecten zal nader worden ingegaan.

Het verpakkingsmateriaal

Verpakkingsmaterialen vormen een barrière voor micro-organismen van buitenaf en beschermen het produkt tegen schade. Een eenvoudige, papieren zak of kartonnen doos is reeds voldoende om bijvoorbeeld slagroomgebak van de warme bakker te beschermen op weg naar huis. Vele moderne verpakkingsmaterialen moeten echter meer dan alleen maar een tijdelijke bescherming geven aan produkten die beperkt en onbeperkt houdbaar moeten worden gemaakt.

Het verpakkingsmateriaal moet bij deze min of meer houdbare produkten ervoor zorgen dat de kwaliteit tijdens opslag en distributie zoveel mogelijk behouden blijft, zoals bescherming tegen vochtverlies, uitdroging en verkleuring. In dit verband kan ook gesteld worden dat het verpakkingsmateriaal de microbiële houdbaarheid van het produkt niet nadelig mag beïnvloeden en, indien mogelijk, moet verbeteren en dat het materiaal, inclusief de sluiting, een permanente barrière vormt voor micro-organismen.

Er is op dit moment een zeer groot aantal uiteenlopende soorten verpakkingsmaterialen op de markt. De volgende groepen kunnen onderscheiden worden:

- de vormvaste verpakkingen van metaal en glas zoals bussen, blikken, potten en flessen
- de flexibele en halfstarre verpakkingen op basis van papier en karton. Deze kunnen voorzien zijn van een laagje aluminium of kunststof
- de flexibele en halfstarre (semi-rigid) verpakkingen van kunststof en aluminium. Hieronder zouden ook kunstdarmomhulsels gerekend kunnen worden.

Deze materialen kunnen in twee categorieën onderverdeeld worden: de enkelvoudige materialen en de laminaten. De laminaten zijn uit meerdere lagen van verschillende enkelvoudige materialen van verschillende diktes opgebouwd.

De belangrijkste eigenschappen van het verpakkingsmateriaal die in verband kunnen staan met de microbiologische kwaliteit zijn:

- de bacterie-ondoorlaatbaarheid

- de microbiële contaminatie
- de gas- en waterdampdoorlaatbaarheid.

Over de invloed van de belangrijkste eigenschappen van het verpakkingsmateriaal op de microbiologische kwaliteit zijn overzichtsartikelen geschreven door Bean (1979), Cerny (1978), Dallyn & Everton (1973) en Troller & Christian (1978).

Afgezien van de welhaast klassiek geworden pasteuriseren en steriliseren in hermetisch gesloten blik en glas, zullen bovengenoemde eigenschappen bij enkele moderne verpakkingstechnieken besproken worden.

Vacuum- en gasverpakken

De doorlaatbaarheid ten opzichte van gassen zoals zuurstof en koolzuur kan de overleving en groei van verschillende micro-organismen, met name tussen het produkt en verpakkingsmateriaal beïnvloeden. Bij vacuum- en gasverpakken moet het verpakkingsmateriaal ondoorlaatbaar voor gassen zijn.

Het vacuum verpakken van produkten heeft tot gevolg dat strict aerobe micro-organismen, zoals schimmels, sommige gistsoorten, Pseudomonas en andere aerobe, psychrotrofe Gram-negatieve bacteriën in hun groei geremd worden. Hoewel deze soorten nog veelal bij een geringe zuurstofconcentratie ($\leq 1\%$) kunnen groeien, wordt door een te sterk verbruik van de restzuurstof, veelal gecombineerd met een ophoping van koolzuur, de ontwikkeling uiteindelijk nagenoeg stilgezet.

Zo is vastgesteld dat Aspergillus-, Penicillium- en Byssoschlamys-soorten nog niet in hun groei geremd worden bij $0.2\% O_2$ in het gas, tenzij de reductie van O_2 gepaard gaat met koolzuurophoping. Volledige remming van de schimmelgroei treedt echter niet op bij $0.1\% O_2$ en $21\% CO_2$. Een tekort aan O_2 kan in dit geval wel leiden tot blokkering van de productie van aflatoxine B_1 , door Aspergillus flavus zonder dat de groei geremd wordt (Reiss, 1975).

In hoeverre het produkt door vacuumverpakken microbiëel houdbaarder wordt, hangt mede af van de vraag in hoeverre facultatief en strict anaerobe soorten zoals Lactobacillus (melkzuurbacteriën)-, Enterobacteriaceae- en Clostridium-soorten aanwezig zijn en zich kunnen ontwikkelen. Dit hangt niet alleen af van de hoogte van de beginbesmetting vóór het verpakken en de opslagtemperatuur en -tijd, maar ook van de antagonistische werking van de overheersende micro-flora. Bekend is dat melkzuurbacteriën een antagonistische werking op sommige pathogene bacteriën bezitten. In een recent onderzoek werd vastgesteld dat in verse paddestoelen, besmet met Clostridium botulinum en vervolgens verpakt in bakjes en folie van kunststofmateriaal, na bewaring botuline-toxine aanwezig was. Dit werd verklaard door een snel teruglopende

zuurstofconcentratie in de kopruimte. Werden gaatjes in de folie aangebracht, dan werd geen toxine aangetoond (Kautter, 1978).

Vacuümverpakken en daarna gekoeld bewaren bij 0 - 2° C van vers rundvlees geeft een betere microbiële houdbaarheid (Mulder, 1975; Paardekooper, 1979). Melkzuurbacteriën nemen weliswaar sterk in aantal toe, maar dit leidt meestal niet tot organoleptische afwijkingen. Dit geldt in grote lijnen ook voor vacuümverpakte gesneden, gekookte vleeswaren. In vacuümverpakte, gerookte vis die gekoeld bewaard wordt, ontwikkelen zich melkzuurbacteriën en psychrotrofe Enterobacteriaceae.

De belangstelling voor het gasverpakken om de microbiële houdbaarheid te verbeteren, neemt de laatste jaren toe. Bij deze techniek wordt na het vacumeren een gas of een mengsel van gassen gedoseerd. Interesse bestaat voor stikstof en mengsels van stikstof-koolzuur en zuurstof-koolzuur. Afgezien van het feit dat met deze techniek ook anaerobe omstandigheden gecreëerd kunnen worden (stikstof), hebben hoge concentraties aan koolzuur een duidelijk extra groeiremmend effect op bepaalde micro-organismen. In onderzoekingen is aangetoond dat de groei van Pseudomonas fluorescens wordt gestimuleerd door een lage koolzuurconcentratie in een vloeibaar medium ($pCO_2 = 100$ mm Hg), terwijl naarmate de koolzuurdruk (-concentratie) toeneemt, de groei meer en meer geremd wordt (Gill & Tan, 1979). De ontkieming van Bacillus cereus-sporen wordt bij een koolzuurdruk van 760 mm Hg sterk geremd, terwijl die van Clostridium-sporen sterk wordt bevorderd (Enfors & Molin, 1978). Zeer algemeen zou men kunnen stellen dat concentraties van 20 - 30% CO_2 bij normale druk de groei van Pseudomonas en andere Gram-negatieve, psychrotrofe bacteriën remt, maar dat Clostridium- en Lactobacillus-soorten hiervoor minder gevoelig zijn. De werking neemt toe naarmate de temperatuur lager wordt, vermoedelijk door een hogere oplosbaarheid van koolzuur in de waterige fase. De werking neemt eveneens toe wanneer een hoge druk (> 3-5 atm.) wordt toegepast.

Het gasverpakken wordt al lang commercieel toegepast om oxydaties te voorkomen. Op dit moment wordt het gasverpakken met ca. 20% koolzuur en 80% zuurstof toegepast bij geportioneerd vers vlees. De koolzuur zorgt voor verbetering van de microbiële houdbaarheid tijdens gekoeld bewaren. Veel interesse wordt getoond voor andere toepassingsgebieden zoals andere vleesprodukten, gevogelte, brood en gebakswaaren.

Aseptisch verpakken

Hierbij wordt het vloeibare produkt in doorstroom snel gepasteuriseerd of gesteriliseerd en gekoeld door middel van een warmtewisselaar en vervolgens onder strict aseptische omstandigheden koud afgevuld in voorgesteriliseerde blikken, flessen of kartons. Dit proces blijkt

economisch voordeliger te zijn dan het verhitten in hermetisch gesloten verpakking. Bovendien wordt de kwaliteit van het produkt minder benadeeld door de snelle opwarming en afkoeling.

Een variant op deze methode van verpakken is dat na de hittebehandeling het produkt heet wordt afgevuld (bijvoorbeeld jam en appelmoes), waardoor het verpakkingsmateriaal kiemvrij wordt. De deksel kan hierbij ontkiemd worden door de verpakking na sluiting om te keren. Dit hoeft echter niet onder strict aseptische omstandigheden uitgevoerd te worden. Afgezien van het feit dat bij het aseptisch verpakken na de verhitting en afkoeling herbesmetting via bijvoorbeeld de buffertanks, leidingen, afvulapparatuur en via de omringende lucht en personeel absoluut uitgesloten moet worden, dienen ook strenge microbiologische eisen gesteld te worden aan het verpakkingsmateriaal. In het algemeen is het stellen van microbiologische eisen aan verpakkingsmaterialen voor produkten die van nature micro-organismen bevatten, een moeilijke zaak. Bij aseptisch verpakken van verhitte produkten ligt dit echter aanzienlijk eenvoudiger te weten het verpakkingsmateriaal dient vrij van micro-organismen te zijn of van die micro-organismen die bederf kunnen veroorzaken. Vele verpakkingsmaterialen zijn van zichzelf kiemarm, maar zeker niet kiemvrij. Hiervoor kan pas een garantie worden gegeven, wanneer deze een voorsterilisatie ondergaan. Verpakkingsmateriaal dat niet tegen sterilisatie door middel van een hittebehandeling bestand is zoals karton, kan zogenaamd "koud gesteriliseerd" worden (Toledo, 1975). De vier bekendste methoden zijn: behandeling met (a) etheenoxide; (b) waterstofperoxide; (c) gamma-straling; (d) ultraviolet-straling. Uit oogpunt van volksgezondheid zijn bezwaren gerezen tegen het gebruik van etheenoxide, hoewel aangetoond is dat bij geforceerd ontluchten restconcentraties niet meer aangetoond worden (Driessen & Van Duin, 1975).

Bij het aseptisch verpakken van melk wordt veelal een waterstofperoxide-behandeling toegepast op de verpakkinglijn, direct vòòr het vormen van de verpakking. De "pure-pak"-plano's ondergaan hierbij ook nog een voorsterilisatie, vroeger met etheenoxide, tegenwoordig met gamma-straling (Duyvestein, 1975). Het microbicide en sporicide effect van waterstofperoxide-oplossing die hierbij in een concentratie van 35% of hoger wordt gebruikt, is aanmerkelijk beter naarmate de temperatuur van de oplossing hoger is. Uit onderzoekingen blijkt dat 50%-ige waterstofperoxide-oplossingen de beste resultaten geeft. Hierbij wordt een snelle eliminatie van zeer resistente sporen van Bacillus subtilis waargenomen boven de 80°C. Dit geldt voor schimmelsporen en gisten ver onder deze temperaturen (Cerny, 1976).

Op het gebied van behandeling met ultraviolet-straling is een nieuwe Brown Boveri stralingsbron ontwikkeld. De microbicide werking van UV-

straling met de conventionele lampen bleek in het gebied van 250-270 nm, waar een optimaal effect te bereiken is, toch nog vrij gering te zijn, vooral bij bacterie- en schimmelsporen en gisten. De kiemdodende werking bij 254 nm blijkt bij dit nieuw ontwikkelde apparaat veel effectiever te zijn. Binnen enkele seconden wordt op een afstand van 10,5 cm bij een intensiteit van 30 mW/cm² grote aantallen schimmels, gisten en Bacillus-sporen gedood. Wel blijkt dat na enkele seconden toch nog een zekere rest-besmetting achterblijft. Dit wordt o.a. toegeschreven aan het zgn. schaduw-effect, veroorzaakt door stofdeeltjes en over elkaar liggende micro-organismen.

Hoewel deze methode goede perspectieven biedt, moet men er goed van bewust zijn dat microbiële besmetting van het verpakkingsmateriaal bijna altijd gepaard gaat met besmetting met stofdeeltjes die op hun beurt de micro-organismen eventueel tegen UV-straling kunnen beschermen. Uiteraard wordt het schaduw-effect ook tegengegaan door het gebruik van zeer glad verpakkingsmateriaal en een gunstige verpakkingsvorm. Een voorafgaande koude waterstofperoxide-behandeling veroorzaakt een aanzienlijke verbetering van de microbicide werking van de UV-behandeling, terwijl deze waterstofperoxide-behandeling op zichzelf geen aanzienlijke verbetering geeft (Cerny, 1977). Hieruit blijkt dus dat een combinatie van twee behandelingen een sterk synergistisch effect kan veroorzaken.

Uit zeer recente onderzoeken blijkt dat zoutzure damp (HCl) ook een geschikt middel zou kunnen zijn om sterilisatie van oppervlakken te bewerkstelligen (Tuynenburg Muijs et al., 1978).

Het kiemvrij maken van het verpakkingsmateriaal is niet alleen afhankelijk van het microbicide effect van bovengenoemde sterilisatiemethoden of combinaties hiervan, maar ook van de beginbesmetting van het verpakkingsmateriaal. Dit hangt nauw samen met de wijze van fabricage en opslag voordat het gebruikt wordt. De hoge temperaturen die veelal bij de fabricage gebruikt worden, bijv. bij het aanbrengen van een laklaag bij blikken ($\pm 200^{\circ}\text{C}$), bij de fabricage van glazen potten en flessen ($600-800^{\circ}\text{C}$), bij het coaten van kartons met polyetheen ($\pm 300^{\circ}\text{C}$), het fabriceren van kunststoffolies ($100-300^{\circ}$), zorgen ervoor dat deze materialen meestal kiemarm of zelfs kiemvrij zijn. (Glerum, 1975; Lelie, 1975; Placzek & Witter, 1972) Hier komt nog bij dat de snelle produktiewijze van deze materialen ook zorgen voor weinig nabesmetting.

Tijdens opslag kan ook nabesmetting optreden zoals via de lucht in de opslagruimte en het personeel. Antistatica worden in kunststoffolies gebruikt om aantrekking van stof en dus ook van micro-organismen tegen te gaan. Droge opslag is vooral van belang bij papieren en kartonnen verpakkingsmaterialen. Bij een hoge relatieve luchtvochtigheid kan in principe schimmelgroei optreden. Daarom mogen volgens het Ontwerp Verpakkingen- en Gebruiksartikelenbesluit sommige conserveermiddelen in de deklaag van papier en karton aanwezig zijn.

Een overzicht van de microbiële besmetting van verschillende verpakingsmaterialen, inclusief gereinigde retourflessen, wordt door Bockelmann (1975), gegeven.

Hoewel het aseptisch verpakken bedoeld is om vooraf verhitte producten microbiëel onbeperkt houdbaar te maken, kan het uiteraard ook toegepast worden om de microbiële houdbaarheid van gepasteuriseerde producten enigszins te verlengen door verlaging van de beginbesmetting.

Steriliseren van producten in flexibele en halfstarre verpakking

Er is veel belangstelling voor sterilisatie van producten, zoals tafelgereede maaltijdcomponenten, in flexibele en halfstarre verpakking (Schulz, 1978). Het verpakkingsmateriaal bestaat meestal uit laminaten van kunststof en aluminium. Eén van de voordelen van sterilisatie in deze nieuwste typen verpakking is dat een vlakke vorm gekozen kan worden met daaruit volgend een betere warmtedoordringing, waardoor een meer homogene verhitting kan plaatsvinden.

De bacterie-ondoorlaatbaarheid van de verpakking (materiaal en constructie) is een wezenlijk kenmerk van gesteriliseerde, verpakte producten, in het bijzonder bij de sluiting en/of de fels-, las- en sealnaden. Niet goed werkende sluit- en sealmachines, voedselresten rondom de sluiting, en ruwe behandeling van de verpakkingseenheden kunnen leiden tot het ontstaan van met het oog onzichtbare lekjes (micro-lekjes) in de vorm van bijvoorbeeld kanaaltjes, scheurtjes, barstjes, waardoor het in principe mogelijk is dat micro-organismen van buitenaf het produkt kunnen bereiken (lekinfectie).

Hoewel lekinfectie bij gesteriliseerde producten in blik door micro-lekjes niet uitgesloten is, blijkt dit bij producten in flexibele en halfstarre verpakking een groter probleem te zijn. Oorzaak hiervan is meestal de kans op verontreiniging met voedselresten nabij de las- en sealnaden, waardoor na heet dichtsealen geen hermetische sluiting ontstaat. Uit onderzoek blijkt dat bij vervuiling van deze plaatsen het percentage niet-hermetisch gesloten verpakkingseenheden met een factor van tenminste 10 toeneemt. Ook blijkt dat de kans op lekinfectie in niet-hermetisch gesloten verpakkingseenheden sterk verlaagd kan worden door snelle droging van de buitenkant na koeling (Anema, 1975).

In de literatuur zijn microbiologische methoden beschreven om de bacterie-ondoorlaatbaarheid van een bepaalde verpakking vast te stellen. Een veel gebruikte test is dat de verpakking met een vloeibare voedingsbodem en/of produkt blootgesteld wordt aan een bacterie-suspensie van Enterobacter aerogenes (ca. 10^8 /ml). Men hoopt hierbij dat deze sterk beweeglijke bacteriën via eventueel aanwezige micro-lekjes binnen kunnen dringen en zich na groei manifesteren door zuur- en/of gasvorming.

Deze test is niet altijd betrouwbaar om micro-lekjes op te sporen. Bij verpakte, vaste produkten komen micro-lekjes, gevuld met vocht, veel minder voor dan micro-lekjes die afgesloten zijn door het produkt zelf. Hierdoor is de kans op lekinfectie aanmerkelijk minder. Met name is dat het geval bij vacuumverpakte produkten in flexibele verpakking, waarbij het contact tussen produkt en verpakkingsmateriaal veel intensiever is dan bij vormvaste produkten met een kopruimte. Daarom worden ook gemodificeerde testen toegepast. (Maunder et al., 1968; Schmidt-Lorenz, 1973).

Het verpakken van "Intermediate Moisture Foods"

Hoewel de methoden van het verpakken van "Intermediate Moisture Foods" niet specifiek zijn voor deze produktgroep, speelt vooral de waterdampdoorlaatbaarheid een belangrijke rol onder andere in verband met de microbiële houdbaarheid.

In het algemeen is de doorlaatbaarheid voor waterdamp vooral van belang in verband met het optreden van gewichtsverlies en uitdroging. Om dit tegen te gaan, wordt gestreefd naar verpakkingsmateriaal met een lage waterdampdoorlaatbaarheid. Een nadeel is echter dat bij natte produkten aan het oppervlak een hoge relatieve vochtigheid ontstaat, waardoor de groei van meerdere typen micro-organismen wordt bevorderd. Een voordeel is dat bij poedervormige produkten geen vocht uit de omgeving opgenomen kan worden met alle risico's voor beschimmelings.

Tot de groep van "Intermediate Moisture Foods" kunnen brood en droge banketwaren, zoals cakes, ontbijtkoek en rondo's, gerekend worden. Door de wateractiviteit die varieert tussen 0.65-0.90 wordt de microbiële houdbaarheid afgemeten aan de groei van schimmels (beschimmelings). Om de microbiële houdbaarheid van verpakte, meestal industrieel bereide, droge banketwaren te verlengen, kan een geringe waterdampdoorlaatbaarheid van het verpakkingsmateriaal soms gewenst zijn om een zeer lichte uitdroging aan het oppervlak te bewerkstelligen. (Oswin, 1976; Seiler, 1976) Voorwaarde is echter dan wel dat de opslag in droge lucht moet plaatsvinden. In tropische gebieden waar een relatieve vochtigheid van 80-90% niet abnormaal is, is zelfs een geringe doorlaatbaarheid zeer ongewenst (Quast, 1976). De keuze van het verpakkingsmateriaal in verband met de waterdampdoorlaatbaarheid is dus een zaak van compromis.

In verband met het strict aerobe karakter van schimmels, kan naast de waterdampdoorlaatbaarheid eveneens de zuurstofdoorlaatbaarheid van het verpakkingsmateriaal bij "Intermediate Moisture Foods" zoals droge gebakswaaren van belang zijn. De keuze van verpakkingsmateriaal met een lage zuurstofdoorlaatbaarheid en het vermijden van een kopruimte tijdens het verpakken, zouden de microbiële stabiliteit van droge gebakswaaren kunnen verlengen. Gasverpakken zou hier ook perspectieven kunnen geven.

De vraag kan hierbij gesteld worden in hoeverre er verband bestaat tussen de doorlaatbaarheid ten opzichte van verschillende gassen en waterdamp. In het algemeen geldt dat hoe doorlaatbaarder een bepaald verpakkingsmateriaal voor bepaalde gassen is, hoe doorlaatbaarder voor waterdamp.

Bij sommige materialen is echter dit verband niet te leggen. Zo hebben de rekfolies van PVC, die gebruikt worden bij vlees, een hoge zuurstof-doorlaatbaarheid, maar een lage waterdampdoorlaatbaarheid. Folies van polyetheen die voor vele doeleinden gebruikt worden, bezitten een hoge gas- en waterdampdoorlaatbaarheid. Folies van polyester hebben daarentegen een lage doorlaatbaarheid. Hoe dikker de films van bovengenoemde enkelvoudige kunststoffolies, hoe lager de permeabiliteit of doorlaatbaarheid.

Laminaten bezitten een permeabiliteit die beduidend kunnen verschillen van de lagen waaruit ze bestaan. Eén laag in het midden fungeert als drager en bestaat uit sterk materiaal zoals polyester, polyamide (bijvoorbeeld nylon) of cellofaan. Door toepassing van bijvoorbeeld een polyetheen-coating verkrijgt de laminaat sealbare eigenschappen, terwijl door bijvoorbeeld een polypropyleen-laag de laminaat bestand is tegen sterilisatie. De gasdoorlaatbaarheid kan worden verminderd door toepassing van polyvinylideenchloride.

Materialen van blik, glas en aluminium zijn ondoorlaatbaar voor gassen en waterdamp. De toegepaste aluminium-folies moeten echter tenminste 8 μm dik zijn, omdat anders "pinholes" ontstaan, waardoor de zuurstof-doorlaatbaarheid toeneemt.

Uit bovenstaande uiteenzetting blijkt dat de keuze van het verpakkingsmateriaal in verband met de waterdamp- en gasdoorlaatbaarheid uitermate belangrijk is om de microbiële houdbaarheid van "Intermediate Moisture Foods" niet nadelig te beïnvloeden.

Tijdens het snijden en verpakken van gebakswaaren en brood, maar ook bij andere "Intermediate Moisture Foods" is het uitermate belangrijk dat nabesmetting met schimmels (en gisten) via apparatuur, lucht en personeel zoveel mogelijk voorkomen moet worden. Zeer strikte eisen dienen gesteld te worden aan het verpakkingsmateriaal (Spicher, 1978).

Conclusie

Aan de hand van bovengenoemde voorbeelden is aangegeven welke invloed bepaalde verpakkingstechnieken en -materialen op de microbiologische kwaliteit van voedingsmiddelen kan hebben.

In de praktijk blijkt nogal eens dat bij de keuze van nieuwe verpakkingstechnieken en/of -materialen de microbiologische aspecten soms te weinig aandacht krijgen. Daarom is het van belang dat bij het bestuderen

van de microbiologische kwaliteit van beperkt en onbeperkt houdbare voedingsmiddelen de verpakking als een belangrijk onderdeel beschouwd wordt.

Literatuur

- Anema, P.J., 1975. Mikrobiologisch-hygienische problemen bei neuen Behältertypen. Voordracht gehouden voor de Schweizerischen Gesellschaft für Lebensmittelhygienien, Zürich
- Bean, P.G., 1979. Micro organisms and vapour. Chem. Ind., 10: 334-336
- Bockelman, I. van, 1975. Mikrobiologische Eigenschaften von Verpackungsmaterial für Lebensmittel - Eine Übersicht. Alimenta, 14: 145-149
- Cerny, G., 1976. Entkeimung von Packstoffen beim aseptischen Abpacken 1. Untersuchungen zur keimabtötenden Wirkung konzentrierter Wasserstoffperoxidlösungen. Verpack. Rundsch., 4: 27-32
- Cerny, G., 1977. Entkeimung von Packstoffen beim aseptischen Abpacken 2. Untersuchungen zur keimabtötenden Wirkung von UVC-Strahlen. Verpack. Rundsch., 10: 77-81
- Dallyn, H. & J.R. Evertsen, 1973. The influence of packaging on microbial growth. Food Technol. Aust., 25: 436-445
- Driessen, F.M. & H. van Duin, 1975. Steriliseren met etheenoxiede. Voedingsmiddelentechnol., 8: 15-19
- Duyvestein, W.J.M., 1975. Hygiene bij het verpakken. Zuivel. In: Leergang Voedingsmiddelenhygiene. Voedingsmiddelentechnol., 8 (30/31): 24-29
- Enfors, S.O. & G. Molin, 1978. The influence of high concentrations of carbondioxide on the germination of bacterial spores. J. Appl. Bact., 45: 279-285
- Gill, C.O. & K.H. Tan, 1979. Effect of carbondioxide on growth of Pseudomonas fluorescens. Appl. and Environm. Microbiol., 38: 237-240
- Glerum, J.A., 1975. Hygiene bij de verpakking en aflevering. Metalen verpakkingen. In: Leergang Voedingsmiddelen hygiene. Voedingsmiddelentechnol., 8 (26/27): 25-26
- Hemmes, H., 1974. Flexibele en semi-rigid verpakkingsmaterialen. Voedingsmiddelentechnol., 7: 30-33
- Kautter, D.A. et al., 1978. Evaluation of the botulism hazard in fresh mushrooms wrapped in commercial polyvinylchloride film. J. Food Prot., 41: 120-121
- Lelie, H.J., 1975. Hygiene bij de verpakking en aflevering. Verpakkingen van kunststof en laminaten. In: Leergang Voedingsmiddelenhygiene. Voedingsmiddelentechnol., 8 (26/27): 26-27
- Maunder, D.T. et al., 1968. Bio-test method for determining integrity of flexible packages of shelf-stable foods. Food Technol., 22: 81-84

- Mulder, S.J., 1975. Hygiene bij het verpakken van vlees en vleeswaren. In: Leergang Voedingsmiddelenhygiene. Voedingsmiddelentechnol., 8 (35): 17-19
- Oswin, R., 1976. Food packaging in relation to moisture exchange. Chem. Ind., 7: 1042-1044
- Paardekooper, E.J.C., 1979. Het vacuum verpakken van rundvlees. Vlees-distr. Vleestecnol., 14: 14-17
- Placzek, L. & K.T. Witter, 1972. Bakteriologische Oberflächenuntersuchung von Einmalpackungen. Verpack. Rundsch., 6: 742-748
- Quast, D.G. et al., 1976. Moisture problems of foods in tropical climates. Food Technol., 30: 98, 102, 104-106
- Reiss, J., 1975. Mycotoxine in Nahrungsmitteln IV. Der Einfluss verschiedener Verpackungsfolien auf das Wachstum von *Aspergillus flavus* und die Bildung des Aflatoxine B₁ und G₁ auf einigen Schnittbrotarten. Food Cosmet. Toxicol., 13: 325-329
- Schmidt-Lorenz, W., 1973. Untersuchungen zur Prüfung der Bakteriendichtigkeit von Heiss-siegelnähten halbstarrer Leichtbehälter aus Aluminium-Kunststoff-Verbunden. Verpack. Rundsch., 8: 59-66
- Schulz, G.L., 1978. Trends in food packaging for foodservice. J. Food Prot., 41: 464-466
- Seiler, D.A.L., 1976. The stability of Intermediate Moisture Foods with respect to mould growth. In: Intermediate Moisture Foods. Davies et al. (Eds). Applied Science Publishers, London
- Spicher, G., 1978. Ansatzpunkte zur Optimierung der Massnahmen zur Verhütung der während des Schneidens und Verpackens des Brotes eintretenden Kontamination mit Schimmelpilzen. Dtsch. Lebensm. Rundsch., 14: 31-38
- Toledo, T., 1975. Chemical sterilants for aseptic packaging. Food Technol., 29: 102-112
- Troller, J.A. & J.H.B. Christian, 1978. Wateractivity and food. Academic Press, New York
- Tuynenburg Muys, G. et al., 1978. Sterilization by means of hydrochloric-acid vapour. J. Appl. Bact., 45: 213-217

BLOOTSTELLING VAN DE KONSUMENT, RESPECTIEVELIJK DE WERKNEMER, AAN NITROSAMINEN: ANALYTISCH-CHEMISCH ONDERZOEK

P.J. Groenen

Instituut CIVO-Analyse TNO

Samenvatting

De meeste nitrosaminen - of meer in het algemeen gesproken: N-nitroso-verbindingen - hebben extreem-kankerverwekkende eigenschappen voor uiteenlopende soorten proefdieren, en naar men moet aannemen ook voor de mens. Hun aanwezigheid in voedingsmiddelen en in het leefmilieu is dan ook ongewenst, en moet waar mogelijk worden voorkomen of teruggedrongen. N-Nitroso-verbindingen ontstaan zeer gemakkelijk uit bepaalde aminen en nitriet of stikstofoxiden. Nitrosaminen worden soms aangetroffen in mout, bier, whisky, vleeswaren, gerookte vis, tabaksrook en cosmetica. Voorts in pesticidepreparaten, in synthetische snijoliën en in de lucht van leerlooierijen en rubberproducerende en -verwerkende bedrijven. Ook in het menselijk lichaam is vorming van N-nitrosoverbindingen te verwachten; inderdaad is reeds aangetoond dat bepaalde vissoorten onder nagebootste maagomstandigheden tot nitrosaminevorming aanleiding geven. Het is nog te vroeg om de eventuele nadelige effecten van de diverse nitrosaminebronnen in het leefmilieu te kunnen taxeren, maar:

- 1) blootstelling via het beroep is soms niet onaanzienlijk;
- 2) blootstelling van de konsument via bier lijkt sterk te dalen, die via vleeswaren en andere levensmiddelen is gering;
- 3) aanmerkelijke blootstelling kan optreden bij het inhaleren van tabaksrook en bij het gebruik van bepaalde cosmetica.

Een onzekere faktor blijft vooralsnog de vorming van N-nitroso-verbindingen in het lichaam zelf.

Inleiding

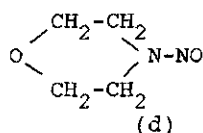
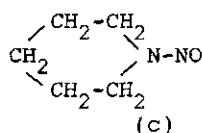
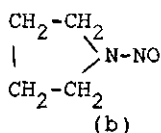
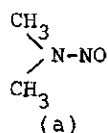
Van de onderwerpen die aan de orde komen tijdens dit symposium ter gelegenheid van het 40-jarig bestaan van de Voedingsorganisatie TNO, zijn er waarschijnlijk maar enkele die vanaf het begin hebben meegedaan. De meeste onderwerpen zijn van veel recenter datum. Dit geldt al heel sterk voor de groep van chemische verbindingen die hierna zullen worden besproken, de nitrosaminen. Het woord nitrosaminen komt niet voor in de jaarverslagen van onze Organisatie vóór 1972. Sinds die jaren is het onderzoek van de nitrosaminen op spectaculaire wijze gegroeid. Vanaf 1969 organiseert de International Agency for Research on Cancer (IARC,

Lyon, Frankrijk) tweejaarlijkse bijeenkomsten over nitrosaminen. De laatste werd eind 1979 gehouden in Budapest, en werd bijgewoond door ongeveer 180 onderzoekers uit 22 landen. Vanwaar dit alles? Vanwaar deze explosieve ontwikkeling op het gebied van het nitrosaminen-onderzoek? De hierna volgende uiteenzetting beoogt de lezer in kennis te brengen met een vrij nieuw gebied van onderzoek dat eigenlijk al nauwelijks meer valt te overzien en samen te vatten. Besproken zullen worden de chemie en de vorming van nitrosaminen, hun voorkomen in ons leefmilieu, en het belang van hun aan- of afwezigheid. De nadruk zal daarbij liggen op de analyse en het voorkomen van nitrosaminen; de toxicologische en epidemiologische aspecten zullen slechts in het voorbijgaan aangestipt kunnen worden.

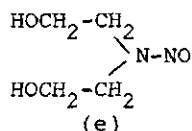
Chemie en vorming van nitrosaminen

In januari 1979 kwamen de kranten over de hele wereld met het alarmerende nieuws uit de Duitse Bondsrepubliek dat sporen van kankerverwekkend nitrosodimethylamine waren gevonden in vele merken bier. Later in dat jaar verschenen soortgelijke koppen met betrekking tot nitrosaminen in whisky. Enkele jaren daarvoor waren bepaalde vleesprodukten, met name gebakken bacon, het onderwerp geweest van verontrustende berichten in de lekenpers. Laat ons nu zien wat aan dit alles ten grondslag ligt.

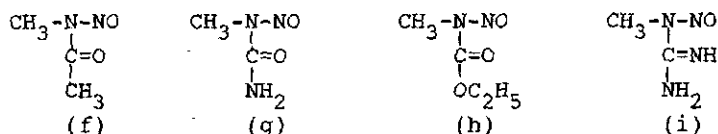
Het woord "nitrosaminen" wordt dikwijls gebruikt als een korte en handzame benaming voor een zeer grote groep van verbindingen, namelijk de N-nitrosoverbindingen. De algemene formule van deze verbindingen is R_1R_2NNO . De eenvoudigste N-nitrosoverbindingen zijn de N-nitroso-dialkylaminen zoals nitrosodimethylamine (a), nitrosopyrrolidine (b), nitrosopiperidine (c) en nitrosomorfoline (d):



Dit zijn matig vluchtige verbindingen met kookpunten tussen 150 en 250°C. Het zijn geen basen doch neutrale verbindingen. Zij zijn chemisch goed bestendig maar ontleden door fotolyse. Een verwante verbinding is N-nitroso-diethanolamine (e),



die maar weinig vluchtig is; deze verbinding heeft onlangs nogal wat aandacht getrokken en zal verderop nog worden besproken. Meer samengestelde N-nitrosoverbindingen zijn de N-nitroso-N-alkylamiden, geïllustreerd door (f), de N-alkyl-N-nitroso-ureumverbindingen, geïllustreerd door (g), de N-alkyl-N-nitroso-urethanen (h) en de N-alkyl-N-nitroso-guanidinen (i):



Deze verbindingen zijn over het algemeen niet-vluchtig, en zijn minder bestendig dan de N-nitroso-dialkylaminen.

Nitrosaminen ontstaan zeer gemakkelijk door reactie van secundaire aminen en nitriet in zuur milieu. Voor de vorming van simpele N-nitroso-dialkylaminen is de optimale pH omstreeks 3-4. Deze verbindingen kunnen vlot worden gesynthetiseerd, en dat zij onder bepaalde omstandigheden in het leefmilieu gevormd kunnen worden, indien de uitgangsstoffen gelijktijdig aanwezig zijn, kan dan ook nauwelijks een verrassing genoemd worden. De nitrosering verloopt langzamer naarmate het secundaire amine een sterkere base is en het treft gelukkig dat het veel vóórkomende dimethylamine zulk een sterke base is.

Nitrosaminen kunnen ook ontstaan uit secundaire aminen en stikstofdioxiden (NO_x). Deze laatste zijn aanwezig in tabaksrook, verbrandingsgassen en verontreinigde lucht.

Hierboven zijn alleen secundaire aminen vermeld als nitroseerbare substraten, maar in afwijking van een wijdverbreide opvatting kunnen ook tertiaire aminen worden genitroseerd, onder verlies van een van de alkylgroepen.

Er is aangetoond dat de vorming van nitrosaminen zowel kan worden gekatalyseerd als geremd. Katalysatoren voor de nitroseringsreactie zijn bijvoorbeeld fenolen, thiocynaat, suikers en alcoholen. Remmers zijn bijvoorbeeld ascorbinezuur (vitamine C) en α -tocoferol (vitamine E). Het is heel goed denkbaar dat om die reden deze vitaminen in de nabije toekomst een nieuwe rol krijgen toebedeeld als bestanddelen of toevoegstoffen in voedingsmiddelen en farmaca.

Binnen het kader van deze bijdrage is het niet mogelijk om op al deze aspecten van nitrosamine-vorming gedetailleerd in te gaan, maar er zijn uitstekende en zeer recente overzichten beschikbaar zowel over de chemie en vorming van N-nitrosoverbindingen (Stephany & Schuller, 1979; Fine, 1980; Mirvish, 1977) als over de toxicologische eigenschappen (Olajos & Coulston, 1978; Magee et al., 1976).

Biologische effecten van nitrosaminen

De vroege historie van de nitrosaminen is als volgt: in het begin van de jaren zestig was een ongewone kwaadaardige leverziekte waargenomen in enkele nertsfarms in Noorwegen, die gepaard ging met hoge sterfte onder de dieren. Hetzelfde verschijnsel trad enkele jaren later op bij schapen en runderen. Het duurde een paar jaren voor er werd ontdekt dat met nitriet behandeld vismeel de oorzaak was, en nog iets langer voordat ontdekt werd dat nitrosodimethylamine het toxische agens was (Ender et al., 1964). (Er is enige gelijkenis met de historie van de Turkey-X-disease onder kalkoenen, een afwijking die veroorzaakt bleek te worden door aflatoxine). Dat nitrosodimethylamine ook voor de mens zeer giftig is, was al gekonstateerd in 1937 toen een laboratoriumchemicus stierf een paar dagen na een kortstondige aanraking met de zuivere substantie (Freund, 1937). Deze waarneming is tot kortgeleden onopgemerkt gebleven. Vanaf het begin van de jaren zestig zijn de toxicologische eigenschappen van de N-nitrosoverbindingen uitgebreid bestudeerd, speciaal door de groep van Druckrey en medewerkers (1967) en door vele andere onderzoekers, en er is komen vast te staan dat de meeste N-nitrosoverbindingen sterk kankerverwekkend zijn voor een grote verscheidenheid van diersoorten. De eenvoudige nitrosaminen moeten doorgaans langs metabolische weg geactiveerd worden om hun kankerverwekkende activiteit te kunnen ontplooiën, terwijl daarentegen vele van de meer samengestelde N-nitrosoverbindingen zoals nitroso-ureumverbindingen en nitroso-urethanen, zelf kankerverwekkend zijn zonder voorafgaande activering.

Momenteel dienen nitrosaminen, nitroso-ureumverbindingen en nitroso-urethanen als modelstoffen of referentiestoffen in vele fundamentele studies over carcinogenese en mutagenese.

Wat nu de simpele nitrosaminen betreft, men denkt dat zij hun kankerverwekkende werking uitoefenen na metabole activering tot een alkylerend agens, bijvoorbeeld het carbonium-ion (CH_3^+) hetwelk bepaalde basen in DNA en RNA kan aangrijpen. Oorspronkelijk meende men dat alkylering van stikstofatoom Nr 7 (N^7) in guanine de beslissende reactie was. Naderhand bleek dat de graad van alkylering van zuurstofatoom Nr 6 (O^6) meer doorslaggevend was dan de N^7 -alkylering, dan wel dat de verhouding tussen deze twee alkyleringsreacties de doorslag gaf. Op het ogenblik gelooft men dat het vermogen van een organisme om O^6 -gealkyleerd guanine uit het nucleïnezuur te verwijderen eveneens een beslissende factor is in het proces van kankerverwekking (Singer, 1979).

Verdere discussie van dit onderwerp moet hier achterwege blijven. Wel moet beklemtoond worden dat er nog geen bewijsmateriaal bestaat dat aantoonst dat nitrosaminen kankerverwekkende eigenschappen hebben voor de mens. Het zou echter zeer onverwacht zijn als dit niet het geval was,

gezien hun effect bij diverse, zeer uiteenlopende diersoorten; en er is al komen vast te staan dat de metabolische processen van activering van bepaalde nitrosaminen in dieren en in de mens identiek zijn (Montesano & Magee, 1974).

Bronnen van nitrosaminen

Hiervoor is al vermeld welke uitgangsstoffen aanleiding geven tot de vorming van nitrosaminen; het zijn enerzijds secundaire of tertiaire aminen en anderzijds nitriet of stikstofdioxiden. In Tabel 1 zijn de belangrijkste milieu-bronnen van nitroserende agentia bijeengebracht. Hierbij moet de kanttekening worden gemaakt dat nitraat in bepaalde produkten en in vivo kan worden gereduceerd tot nitriet, en derhalve eveneens moet worden beschouwd als een potentiële nitrosaminevormer.

Tabel 1: Potentiële bronnen van nitroserende agentia in het leefmilieu

Nitraat	Nitriet	NO _x
ALGEMENE BRONNEN		
Groenten	Speeksel	Tabaksrook
Vleeswaren	Vleeswaren	Uitlaatgassen
		Verontreinigde lucht
Drinkwater	Ongekoeld be- waarde groente	
Kaas		
Speeksel	Geneesmiddelen	
TECHNOLOGISCHE, AGRARISCHE EN BEROEPSMATIGE BRONNEN		
Vleeswaren- pekels	Vleeswaren- pekels	Verbrandingsgassen
Kunstmest	Corrosieremmers	
Stalmest		

Voor het gemiddelde publiek zijn groenten zoals sla en spinazie de hoofdbron van nitraat, terwijl speeksel de voornaamste bron van nitriet is (White, 1975). Het nitriet in speeksel ontstaat uit nitraat, afgescheiden door de speekselklieren, door reducerende werking van bacteriën in de mondholte. Gepekeld vleesprodukten leveren slechts ongeveer 20%

van de totale nitriet-opname van de gemiddelde konsument, en speeksel ongeveer 75%, volgens een schatting uit de Verenigde Staten (White, 1975). De hoofdbron van nitraat in het milieu is kunstmest, maar organische mest moet niet worden veronachtzaamd als bron van nitraat.

Een belangrijke technologische toepassing van nitriet is het gebruik als corrosieremmer. Stikstofdioxiden in verbrandingsgassen zijn belangrijk wanneer voedingsmiddelen e.d. worden gedroogd in rechtstreeks contact met de gassen. Dit laatste aspect zal hierna nog aan de orde komen. Terwijl Tabel 1 de nitroserende agentia opsomde, geeft Tabel 2 de belangrijkste nitroseerbare substraten in het milieu.

Tabel 2. Nitroseerbare substraten in het leefmilieu

ALGEMEEN	BEROEPSMATIG
Mout	Snijoliën
Vis	Pesticiden
Tabaksrook	Hulpstoffen bij
Specerijen	de leder- en rubber-
Vlees	fabricage
Geneesmiddelen	Kosmetica
Kosmetica	
Pesticiden	

Mout, vis, tabak en specerijen zijn rijk aan secundaire en/of tertiaire aminen. Veel geneesmiddelen zijn zelfs voor de volle honderd procent secundaire of tertiaire aminen en dus belangrijke nitroseerbare substraten, temeer doordat zij dikwijls in grote hoeveelheden worden ingenomen, bij milligrammen of zelfs grammen tegelijk.

Gezien de wijde verspreiding van nitroserende agentia en nitroseerbare substraten in ons leefmilieu, is het te begrijpen, dat nitrosaminen zijn aangetroffen in bepaalde produkten. Hun aanwezigheid had soms kunnen worden voorspeld op grond van de aanwezigheid van deze precursors, en zij is in enkele gevallen inderdaad voorspeld (Druckrey & Preussmann, 1962). In andere gevallen kwam de aanwezigheid van het nitrosamine min of meer als een verrassing, doch was de verklaring spoedig bij de hand.

Tabel 3 geeft een opsomming van produkten waarin N-nitrosoverbindingen zijn aangetoond. Hoeveelheden en aard van de verbindingen staan vermeld. Tabel 3 maakt geen aanspraak op volledigheid; de aangegeven hoeveelheden zijn benaderingen, bedoeld om een algemene indruk te geven. Meer informatie is te vinden in bijv. de recente overzichtsartikelen van Fine

(1980) en Ember (1980). In het laatstgenoemde artikel wordt ook aandacht besteed aan de blootstelling van werknemers in de rubberproducerende en -verwerkende industrie en in leerlooierijen aan nitrosaminen in de lucht. Berichten hierover uit de Verenigde Staten hebben onlangs nog al opzien gebaard, en hebben geleid tot uitgebreide luchtmonstername-programma's in de betreffende bedrijfstakken, en tot gericht epidemiologisch onderzoek. Resultaten daarvan zijn vooralsnog niet beschikbaar.

Tabel 3. Potentiële bronnen van N-nitroso-verbindingen in het leefmilieu

Produkt ^a	Nitroso-verbinding ^b	Typische gehaltenes (µg/kg)	Spreiding (µg/kg) (orde van grootte)	Nitroserende faktor
Mout	NDMA	10	0->100	rechtstreekse droging
Bier	NDMA	2	0-86	rechtstreekse moutdroging
Whisky	NDMA	1	0-2	rechtstreekse moutdroging
Gebakken	NDMA	enkele	0-10	nitriet
bacon	NPYR	5-10	0-100	nitriet
Overige vleeswaren	NDMA	enkele	0-10 ^c	nitriet
Gerookte vis	NDMA	enkele	0-10	NO _x in rook
Tabaksrook	diverse	10 ^c	0-100 ^c	NO _x in rook
	NNN	100 ^c	0->100 ^c	NO _x in rook
Kosmetica	NDELA	100	0-10 ⁵	nitriet?
Pesticiden	diverse	10 ² -10 ⁴	0-10 ⁵	nitriet?
Synthetische snijoliën	NDELA	10 ⁶	0-10 ⁷	nitriet

- a) Niet genoemd is de blootstelling aan nitrosaminen via de ingeademde lucht, die tijdens bepaalde productieprocessen (leerlooierij, rubberproductie en -verwerking) kan optreden
- b) NDMA = nitrosodimethylamine; NPYR = nitrosopyrrolidine;
- c) NNN = N'-nitrosornicotine; NDELA = nitrosodiëthanolamine
ng per sigaret

Aantonen van nitrosaminen

Vluchtige nitrosaminen kunnen, na enige zorgvuldige destillatie-, extractie- en concentratiestappen, worden gedetecteerd met twee belangrijke detectiemethoden. De ene is de Thermal Energy Analyzer (TEA). De respons van dit instrument is zeer specifiek (maar niet exclusief specifiek) voor N-nitrosoverbindingen. Sedert zijn introductie enkele jaren geleden heeft de TEA ondanks de hoge kostprijs zijn weg gevonden naar vele landen over de hele wereld. De hoge specificiteit is een voor- én een nadeel, aangezien deze detector uitsluitend dienst kan doen voor N-nitrosoverbindingen.

De andere belangrijke detector voor N-nitrosoverbindingen is de massaspectrometer (MS). Deze kan worden ingesteld op volledig specifieke

detectie van nitrosaminen, indien gewerkt wordt bij hoog scheidend vermogen met de peak-matching technique en wanneer bovendien capillaire kolommen worden gebruikt voor de gaschromatografische scheiding. Dit is de methode die door ons wordt toegepast in het Instituut CIVO-Analyse. Anders dan de TEA kan een MS ook worden ingezet voor vele andere soorten chemische verbindingen en heeft dus veel ruimere toepassingsmogelijkheden.

Naast de simpele vluchtige nitrosaminen vermeldt tabel 3 slechts enkele andere N-nitrosoverbindingen: N'-nitrosornicotine (NNN) en nitrosodiethanolamine (NDELA). Tot nu toe bestaan er bijna geen methoden voor de bepaling van andere N-nitrosoverbindingen.

Een manier om een indruk te krijgen van het totale gehalte aan N-nitrosogroepen in een produkt is ontwikkeld door Walters et al. (1978), maar het is niet bekend in hoeverre deze parameter biologische betekenis heeft.

Activiteiten van de Hoofdafdeling Voeding en Voedingsmiddelen van TNO op het gebied van de analyse van N-nitrosoverbindingen

De produkten die wij oorspronkelijk onderzochten op vluchtige nitrosaminen waren tabak en tabaksrook (Groenen & Ten Noever de Brauw, 1975; Groenen, 1976) en vleeswaren (Groenen et al., 1976; 1977). Tot de laatstgenoemde groep behoorden onder andere "luncheon meat", rookworst, rookvlees en gekookte ham. De nitrosaminegehalten waren zeer laag. Tijdens ons meest recente onderzoek (Olsman & Groenen, niet gepubliceerd) werden zelden nitrosaminegehalten boven 5 µg/kg aangetroffen. De meeste waren aanzienlijk lager tot niet aantoonbaar. Een uitzondering is gebakken bacon waarin hoeveelheden van 10 µg/kg of meer kunnen voorkomen.

Een methode voor de bepaling van nitrosaminozuren is ontwikkeld door Dhont (Dhont, 1977; Dhont & Van Ingen, 1976). In sommige vleeswaren werden inderdaad nitrosaminozuren aangetroffen. De kankerverwekkende activiteit van nitrosaminozuren lijkt vooralsnog lager te zijn dan die van de vluchtige nitrosaminen.

Een ander onderwerp dat wij hebben bestudeerd is de mogelijke vorming van N-nitrosoverbindingen in het menselijk lichaam. Het was bij herhaling aangetoond dat de omstandigheden in de maag van de mens bij uitstek geschikt zijn om nitroseringsreacties te doen verlopen. Modelproeven op dieren met zuivere aminen of met bepaalde geneesmiddelen, tezamen met nitriet, hadden eenzelfde type van tumoren tot resultaat als inductie door de betreffende nitrosoverbindingen zelf (onder andere Sander, 1974). Nitriet is een normaal bestanddeel van het speeksel van de mens.

Om die reden hebben wij een onderzoek gedaan naar de vorming van nitrosaminen uit een grote verscheidenheid van voedingsmiddelen. Daarbij werd een modelsysteem gebruikt, bestaande uit nagebootst speeksel en nagebootst maagsap. Doorsnee-porties van een voedingsmiddel werden daarin gedurende 2 uur geïncubeerd bij 37°C en pH 3. Enigszins verrassend, bleken vele voedingsmiddelen onder deze omstandigheden in 't geheel geen nitrosaminen te vormen. Toch waren er ook enkele produkten die wel nitrosaminevorming vertoonden, met name enkele gerookte visprodukten (gerookte makreel) (Groenen et al., in druk); de gevonden hoeveelheid was bijna 10 µg per doorsnee-portie. De gerookte makreel zelf, dat wil zeggen zonder incubatie, bevatte overigens al enig nitrosamine. Dit onderzoek werd gefinancierd door het Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne; het onderzoek naar de nitrosering van visprodukten onder gesimuleerde maagomstandigheden wordt momenteel voortgezet.

Sedert begin 1979 is ons laboratorium ook intensief betrokken bij de analyse van mout en bier. Er is berekend dat de gemiddelde konsument dagelijks ongeveer 1 µg NDMA naar binnen krijgt, en dat bier de voornaamste bron van deze stof is in het dieet, althans in de periode waarin NDMA voor het eerst in mout en bier werd aangetoond (Spiegelhalder et al., 1979). Sedertdien heeft men de oorsprong van het NDMA in mout en bier opgehelderd. Rechtstreeks drogen van mout in de hete verbrandingsgassen van een gasbrander is de oorzaak. De verbrandingsgassen bevatten stikstofoxiden, het mout bevat dimethylamine.

Remedies zijn: 1) indirect drogen van het mout; indien niet mogelijk, dan: 2) lagere vlamtemperaturen; 3) het gebruik van zwavelbevattende olie; 4) meeverbranden van zwavel (Spiegelhalder et al., in druk).

Indirect drogen verdient de voorkeur. Een grote Nederlandse bierbrouwerij heeft onlangs de interessante waarneming gedaan, dat nitrosaminevorming bij direkte droging ook kan worden voorkomen door het groenmout vóór het eesten met oplossingen van bepaalde suikers te besproeien (Aalbers et al., 1980). Hierbij zijn de nadelen van het zwavelbranden (SO₂-vorming) geëlimineerd.

Mouters en brouwers over de hele wereld hebben sinds verleden jaar al het mogelijke gedaan om het NDMA in bier te verminderen of geheel te elimineren. De regering van de Verenigde Staten heeft inmiddels een maximum gesteld van 5 µg/kg.

Wij hebben in de laatste twee jaren een groot aantal mout- en biermonsters onderzocht. Vele daarvan waren uit Nederland en België, en ook een aantal uit andere landen. Het betrof zowel normale handelsprodukten als ook monsters van speciale brouw-experimenten. Onze indruk is dat er aanzienlijke vorderingen zijn gemaakt bij het verlagen van het NDMA-gehalte in mout en bier (Tabel 4), maar de ons toegezonden analysemonsters behoeven uiteraard geen getrouwe afspiegeling te zijn van de werkelijke situatie op de mout- en biermarkt.

Tabel 4. Daling van de nitrosodimethylaminegehaltenes (NDMA-gehaltenes) in mout en bier in de loop van 1979 en begin 1980

Product	NDMA-gehalte ($\mu\text{g/kg}$)						
	jan/mrt 1979	apr/juni 1979	juli/sep 1979	okt/dec 1979	jan 1980	feb 1980	mrt 1980
MOUT							
Gemiddeld	29,8	13,3		14,9	6,2	9,8	1,7
Maximaal	330	90		70	20	45	7
Aantal monsters	n=36	n=35	(n=3)	n=52	n=15	n=20	n=10
Boven 25 $\mu\text{g/kg}$	25%	11%		21%	0%	5%	0%
Boven 5 $\mu\text{g/kg}$	47%	40%		50%	47%	45%	10%
BIER							
Gemiddeld		(3,6)	(2,7)	1,3	1,3	0,8	0,6
Maximaal		(8)	(8)	6	10	5,1	3,5
Aantal monsters		(n=9)	(n=7)	n=82	n=107	n=105	n=46
Boven 5 $\mu\text{g/kg}$		(33%)	(43%)	1%	5%	1%	0%
Boven 1 $\mu\text{g/kg}$		(78%)	(43%)	41%	36%	15%	11%

Conclusies

Blootstelling aan N-nitrosoverbindingen kan bestaan of ontstaan tijdens:

- het drinken van sommige bieren (nitrosaminegehaltenes echter duidelijk dalend!) en whiskies
- het consumeren van sommige vleeswaren (speciaal gebakken bacon)
- het consumeren van bepaalde visprodukten
- het pruimen van tabak
- het roken van tabak
- het gebruik van bepaalde nitroseerbare geneesmiddelen
- het gebruik van bepaalde cosmetica.

De mogelijkheden van blootstelling aan N-nitroso-verbindingen bestaat ook tijdens:

- bepaalde leerlooierij-processen
- bepaalde processen bij de productie van rubber en rubberbanden
- het gebruik van bepaalde synthetische snijoliën
- het gebruik van bepaalde pesticideformuleringen.

Het is momenteel nog te vroeg, om de eventuele nadelige effecten van de diverse vormen van blootstelling aan N-nitrosoverbindingen te taxeren en tegen elkaar af te wegen. Blootstelling in bepaalde beroepen en die via

tabak en tabaksrook zouden belangrijke risicofactoren kunnen zijn. De vorming van N-nitroso-verbindingen in het lichaam zelf is nog met grote onzekerheid omgeven.

Voor wat betreft nitrosaminen in voedingsmiddelen, dranken en dergelijke is er doorgaans sprake van concentraties in het µg/kg- of ppb-gebied, dat wil zeggen in de orde van de getalverhouding 1:10⁹. Hoe gering dit is wordt duidelijk, als men zich realiseert dat deze verhouding overeenkomt met: nauwelijks meer dan een seconde in de gehele veertigjarige bestaansperiode van de Voedingsorganisatie TNO; met ongeveer f 100,-- op onze rijksbegroting; of met circa 4 cm op de omtrek van de aarde.

Er is schertsenderwijs wel eens gesteld, dat het uit het oogpunt van levensmiddelenwetgeving aanbeveling zou verdienen, om alle instrumenten uit de roulatie te nemen, die dergelijke uiterst lage concentraties kunnen aantonen. Het is niet moeilijk om in zekere zin begrip op te brengen voor zulk een bewering. Wat vroeger niet aantoonbaar was, is het - als gevolg van de toegenomen analytische mogelijkheden - nu vaak wel, zodat het steeds moeilijker wordt, om de afwezigheid van schadelijke stoffen aan te tonen. Bijzondere waakzaamheid tot in het lage ppb-gebied blijft echter wel degelijk geboden ten opzichte van die chemicaliën in ons leefmilieu, die extreem carcinogene eigenschappen bezitten.

Het is wel duidelijk, dat de N-nitroso-verbindingen daar bij uitstek toe behoren.

Literatuur

- Aalbers, V.J., B.W. Drost & P. Van Eerde, 1980. Praktische Methode zur Senkung des Nitrosamingehaltes im Malz. Brauwelt, 120: 719
- Dhont, J.H. & C. Van Ingen, 1976. Identification and quantitative determination of N-nitrosoproline and N-nitrososarcosine and preliminary investigations on N-nitroso-hydroxyproline in cured meat products. IARC Sci. Publ., 14: 355-360. International Agency for Research on Cancer, Lyon
- Dhont, J.H., 1977. Development of a method of estimating N-nitrosamino acids and its use on some meat products. Proc. 2nd Int. Symp. Nitrite Meat Prod., Pudoc, Wageningen. p. 221-225
- Druckrey, H. & R. Preussmann, 1962. Zur Entstehung carcinogener Nitrosamine am Beispiel des Tabakrauchs. Naturwissenschaften, 49: 498
- Druckrey, H. et al., 1967. Organotrope carcinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. Z. Krebsforsch., 69: 103-201

- Ember, L.R., 1980. Nitrosamines: assessing the relative risk. Chem. Eng. News, 31 maart: 20-26
- Ender, F. et al., 1964. Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. Naturwissenschaften, 51: 637-638
- Fine, D.H., 1980. N-Nitroso compounds in the environment. Adv. Environ. Sci. Technol., 10: 39-123
- Freund, H.A., 1937. Clinical manifestations and studies in parenchymatous hepatitis. Ann. Intern. Med., 10: 1144-1155
- Groenen, P.J., 1976. A new type of N-nitrosation inhibitor. Proc. 2nd Int. Symp. Nitrite Meat Prod. Pudoc, Wageningen. p. 171-172
- Groenen, P.J. et al., Formation of N-nitrosamines and N-nitrosamino acids from food products and nitrite under simulated gastric conditions. Sixth Meeting on Anal. Form. N-Nitroso Comp., Budapest, oktober 1979. International Agency for Research on Cancer, Lyon. In druk
- Groenen, P.J. et al., 1977. Further studies on the occurrence of volatile N-nitrosamines in meat products by combined gas chromatography and mass spectrometry. Proc. 2nd Int. Symp. Nitrite Meat Prod. Pudoc, Wageningen. p. 227-237
- Groenen, P.J. et al., 1976. Determination of eight volatile N-nitrosamines in thirty cured meat products with capillary GC/high-resolution MS. The presence of diethylnitrosamine and the absence of nitrosopyrrolidine. IARC Sci. Publ., 14: 321-331. International Agency for Research on Cancer, Lyon
- Groenen, P.J. & M.C. Ten Noever De Brauw, 1975. Determination of volatile N-nitrosamines in the vapour phase of the smoke from various tobacco products. Beitr. Tab. Forsch., 8: 113-123
- Magee, P.N., R. Montesano & R. Preussmann, 1976. N-Nitroso compounds and related carcinogens. In: Searle, C.E., Chemical Carcinogens. ACS Monogr. 173. Am. Chem. Soc., Washington, D.C. p. 491-625
- Mirvish, S.S., 1977. N-Nitroso compounds: their chemical and in vivo formation and possible importance as environmental carcinogens. J. Toxicol. Environ. Health, 2: 1267-1277
- Montesano, R. & P.N. Magee, 1974. Comparative metabolism in vitro of nitrosamines in various animal species including man. Chem. Carcinog. Essays. IARC Sci. Publ., 10: 39-56. International Agency for Research on Cancer, Lyon
- Olajos, E.J. & F. Coulston, 1978. Comparative toxicology of N-nitroso compounds and their carcinogenic potential. Ecotoxicol. Environ. Saf., 2: 317-367

- Sander, J., 1974. The formation of N-nitroso compounds in the stomach of animals and man and in the diet. IARC Sci. Publ., 4: 159-163. International Agency for Research on Cancer, Lyon
- Singer, B., 1979. N-Nitroso alkylating agents: formation and persistence of alkyl derivatives in mammalian nucleic acids as contributing factors in carcinogenesis. J. Nat. Cancer Inst., 62: 1329-1339
- Spiegelhalder, B., G. Eisenbrand & R. Preussmann, 1979. Contamination of beer with trace quantities of N-nitrosodimethylamine. Food Cosmet. Toxicol., 17: 29-31
- Spiegelhalder, B., G. Eisenbrand & R. Preussmann. Occurrence of volatile nitrosamines in food: a survey of the West-German market. Sixth Meeting on Anal. Form. N-Nitroso Comp., Budapest, oktober 1979. International Agency for Research on Cancer, Lyon. In druk
- Stephany, R.W. & P.L. Schuller, 1979. N-Nitrosaminen: vóórkomen en voorkómen (I). Chem. Weekbl.,: 373-376
- Walters, C.L. et al., 1978. Determination of a non-volatile N-nitrosamine on a food matrix. Analyst, 103: 1127-1133
- White, jr, J.W., 1975. Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite. J. Agric. Food Chem., 23: 886-891

KWALITEITSASPECTEN VAN HET EIWIT BIJ DE BEREIDING VAN VOEDINGSMIDDELEN UIT GRANEN

A. Graveland, P. Bosveld, W.J. Lichtendonk, J.P. Marseille, J.H.E.

Moonen

Instituut voor Graan, Meel en Brood TNO

Samenvatting

In de voedingsmiddelenindustrie wordt de verwerkbaarheid van eiwit-houdende grondstoffen hoofdzakelijk bepaald door de funktionele eigenschappen, anders gezegd de kwaliteit, van het eiwit. De kwaliteit van graaneiwitten wordt besproken aan de hand van hun primaire, secundaire en tertiaire eigenschappen.

Inleiding

Het streven naar produkten van constante kwaliteit, het ontwikkelen van nieuwe produkten en een toenemende automatisering zijn trends die zich in de voedingsmiddelenindustrie momenteel duidelijk manifesteren. Dit brengt met zich mede, dat hoge eisen gesteld worden aan de kwaliteit van de grondstoffen. Voor het merendeel bestaan deze uit natuurprodukten die in eigenschappen sterk kunnen variëren.

Voor het verkrijgen van een zo constant mogelijk eindprodukt, via een veelal sterk geautomatiseerd proces, moeten juist deze variaties in een bepaalde grondstof zoveel mogelijk worden opgevangen. Dit kan gebeuren door aanpassing van de receptuur of door veranderingen in het bereidingsproces. Om zo goed mogelijk te kunnen inspelen op die variaties is het niet alleen gewenst de chemische samenstelling van de grondstoffen te kennen, maar is ook een nauwkeurige analyse van de veranderingen die zij ondergaan tijdens de verschillende fasen van het bereidingsproces, noodzakelijk. Dit laatste geldt uiteraard ook voor de ontwikkeling van nieuwe produkten.

Een eerste stap tot de verwezenlijking van het hierbovengestelde doel is het leggen van verbanden tussen de fysische en chemische eigenschappen van de componenten, waaruit een bepaalde grondstof is opgebouwd, en de karakteristieke eigenschappen van het eindprodukt. Een bepaalde grondstof moet zowel geschikt zijn voor technologische verwerking als ook voor menselijke consumptie. Bovendien moet het bereide produkt goed verteerbaar zijn en een hoge voedingswaarde bezitten.

Functie van de eiwitten

Bij de bereiding van voedingsmiddelen uit plantaardige produkten speelt het eiwit vaak een overheersende rol. In de regel is niet de hoeveelheid eiwit de beperkende factor, maar de kwaliteit of te wel de functionele eigenschappen. De kwaliteit is te herleiden tot een aantal karakteristieke eigenschappen van één of meer eiwitfracties. Welke eigenschappen van belang kunnen zijn is weergegeven in tabel 1.

Tabel 1. Aspecten van het eiwit bij de voedselbereiding

Primaire eigenschappen	Secundaire eigenschappen	Tertiaire eigenschappen	Voedingsmiddel
Aminozuursamenstelling	Oplosbaarheid	Interacties met:	Structuur
Aminozuurvolgorde	Viscositeit	Eiwitten	Kleur
Sub-eenheden	Elasticiteit	Koolhydraten	Geur, smaak
Mol. gewicht	Beweeglijkheid	Lipiden	Verteerbaarheid
Conformatie	Hittestabiliteit	Emulgatoren	Voedingswaarde
	Enzymactiviteit	Reacties:	
		SS reductie	
	Gelering	SH oxydatie	
	Filmvorming	SH/SS uitwisseling	
		Hydrolyse d.m.v.:	
		HCl	
		Proteolytische enzymen	

Steeds opnieuw zal bij het onderzoek van eiwitten bestemd voor de bereiding van voedingsmiddelen getracht moeten worden een verband te leggen tussen de primaire respectievelijk secundaire en tertiaire eigenschappen van één of meer eiwitfracties of eiwitcomponenten en de karakteristieken van het eindprodukt, met andere woorden getracht zal moeten worden de functionele eigenschappen van een eiwit ten opzichte van het eindprodukt vast te stellen. Een goede illustratie hiervan is het onderzoek aan de graaneiwwitten, dat in het Instituut voor Graan, Meel en Brood TNO wordt uitgevoerd.

Bij de broodbereiding moet het eiwit samen met het zetmeel tijdens het kneden van een deeg een continu netwerk gaan vormen, zodat het de waterdamp en het CO₂ dat tijdens de vergisting wordt gevormd, kan vasthouden. Dit netwerk moet zo stevig en tevens zo elastisch zijn dat het de waterdamp en de CO₂ ook tijdens het bakproces vasthoudt, wanneer deze gassen

als gevolg van de temperatuurverhoging tijdens het bakken uitzetten. Met andere woorden het eiwit-zetmeel netwerk moet een elastische wand om deze gascellen vormen. Bovendien moeten de wanden zo stevig zijn dat aan het einde van het bakproces - wanneer de wanden poreus worden waardoor waterdamp en CO_2 kunnen verdwijnen - het brood niet in elkaar zakt. Een en ander resulteert in brood met een luchtige en samenhangende structuur.

Op moleculair niveau betekent dit, dat er voldoende eiwitmoleculen van optimale grootte en met elastische eigenschappen aanwezig moeten zijn, die tezamen met het zetmeel een raamwerk vormen. Tevens moeten er eiwitten met viskeuze en filmvormende eigenschappen aanwezig zijn die de ruimten in het raamwerk kunnen opvullen.

Bij een geheel ander proces waar graaneiwwitten bij zijn betrokken zoals de bierbereiding worden andere eisen gesteld aan de grondstof en dus ook aan het eiwit. Bij dit proces is vereist dat zoveel mogelijk zetmeel wordt omgezet tot al dan niet vergistbare suiker. Tevens moet een groot deel van het eiwit, ongeveer 40%, worden omgezet tot wateroplosbare peptiden en aminozuren, welke nodig zijn voor de gistgroei. Door middel van filtratie wordt het wateroplosbare materiaal aan het einde van de wortbereiding afgezonderd van de rest. De samenstelling echter van het wateronoplosbaar materiaal, dat voor een groot deel uit eiwitten, beta-glucanen en lipiden bestaat, bepaalt de filtratiesnelheid en het rendement aan oplosbaar materiaal. De eiwitten die in het bier terecht komen mogen niet gaan complexeren tot onoplosbaar materiaal (troebeling). Bovendien moeten deze eiwitten schuimvormende eigenschappen hebben. Dankzij het eiwit onderzoek, uitgevoerd in het instituut voor Graan, Meel en Brood TNO, is het gelukt een antwoord te geven op de vraag waarom alleen van tarwe en niet van gerst, haver of rogge brood met zijn karakteristieke luchtige en samenhangende structuur kan worden bereid en waarom gerst bij uitstek geschikt is voor de bierbereiding.

Fractionering van plantaardige eiwitten

Ons realiserende, dat de eiwitten in granen, zaden, peulvruchten en knolgewassen uit een groot aantal fracties bestaan en dat de fracties op hun beurt weer uit verschillende sub-componenten zijn opgebouwd, hebben we geprobeerd een zo universeel mogelijke extractie- en fractioneringsmethode te ontwikkelen voor plantaardige eiwitten. De extractie wordt uitgevoerd met een natrium dodecyl sulfaat (SDS) oplossing. (Graveland et al., 1979). Het grote voordeel van het gebruik van SDS is dat het eiwit wordt afgeschermd door een laag SDS moleculen (Tanford, 1973) en daardoor zijn specifieke eigenschappen behoudt, dus bijvoorbeeld geen splitsing van disulfide (SS) bindingen.

Na het materiaal te hebben gesuspenderd in een 1,5% SDS oplossing wordt met behulp van een ultracentrifuge - stap een scheiding gemaakt tussen SDS oplosbaar materiaal en SDS onoplosbaar materiaal. Het SDS onoplosbare materiaal in de centrifugebuis bestaat uit verschillende lagen, welke slechts materiaal van één bepaalde eiwitfractie bevatten. Het SDS oplosbare materiaal kan met behulp van alcohol- en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - precipitatie in een aantal fracties worden opgesplitst.

Met deze SDS-extractie en fractioneringsmethode is het eiwit van verschillende granen in een aantal fracties te scheiden. In tabel 2 zijn de resultaten weergegeven.

Hoewel de hier onderzochte graanmonsters ongeveer dezelfde eiwitgehalten hadden, is er een grote variatie in samenstelling en dus in kwaliteit van het eiwit. Opgemerkt dient te worden, dat de naamgeving van de fracties in tabel 2 afwijkt van de oorspronkelijke (Graveland et al., 1979).

De functionele eigenschappen van de afzonderlijke eiwitfracties kunnen worden bepaald door de fracties toe te voegen aan de uitgangsstof en na te gaan wat het effect hiervan is op de structurele eigenschappen van het eindproduct (reconstitutieproeven).

Bij de broodbereiding is gebleken dat twee eiwitfracties uit tarwebloem een positieve rol vervullen bij de ontwikkeling van een deeg, respectievelijk de vorming van het bakproduct namelijk a. de hoogmoleculaire in SDS onoplosbare en als gevolg van de aanwezigheid van SDS, gelvormende eiwitten (geleiwitten), b de in SDS en in 70% alcohol oplosbare eiwitten, welke precipiteren in 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (alcohol oplosbare eiwitten). Tarwebloem bevat ook een fractie met negatieve functionele eigenschappen nl. de glutelinen; deze behoren tot de in SDS oplosbare en in 70% alcohol onoplosbare eiwitten.

Eigenschappen tarwe-eiwit

Bij de vergelijking van de primaire eigenschappen van de hierboven genoemde fracties blijkt dat de geleiwitten en de alcohol oplosbare eiwitten voor 40 resp. 45% uit glutamine en voor 10 resp. 15% uit proline zijn opgebouwd (tabel 3). De amidegroep van het glutamine kan, omdat het zowel als waterstof-donor en ook als waterstof-acceptor functioneert, gemakkelijk waterstofbruggen vormen. De aanwezigheid van proline beperkt de rotatiemogelijkheden van de eiwitketens met als gevolg dat de vorming van α -helixstructuren wordt verhinderd. Het is aannemelijk dat door deze specifieke eigenschappen van het glutamine en proline eerder intermoleculaire waterstofbruggen worden gevormd dan intramoleculaire (Kasarda et al., 1976).

Tabel 2. Eiwitsamenstelling granen

	Tarwe	Gerst	Rogge
<u>SDS-onoplosbaar</u>			
Glycoproteinen I (pentosanen)	6 *	20	18
Geleiwitten (gluteninen)	25	10	8
Glycoproteinen II			
<u>SDS-oplosbaar en alcohol-onoplosbaar</u>			
Geleiwitten (gluteninen)	7	8	18
Glutinen	14	40	16
Globulinen	1	1	1
<u>SDS-oplosbaar en alcohol-oplosbaar</u>			
Glycoproteinen V Gliadinen	30	5	28
Glycoproteinen VI Albuminen	7	15	11

* Percentage van totale hoeveelheid eiwit

De glutelinen daarentegen bevatten veel niet-polaire aminozuren als tryptofaan, alanine, valine, leucine, isoleucine, methionine en fenylalanine. Op grond van de aminozuursamenstelling kan worden aangenomen dat hier hydrofobe bindingen een belangrijke plaats zullen innemen (Tanford, 1973). De geleiwitten hebben een mol. gewicht van enkele miljoenen, terwijl het mol. gewicht van de alcoholoplosbare eiwitten varieert van 40.000 tot 70.000 daltons en die van de glutelinen van 30.000 tot 120.000 d. Terwijl de geleiwitten hoofdzakelijk intermoleculaire SS bindingen bevatten, hebben de alcoholoplosbare eiwitten uitsluitend intramoleculaire SS bindingen.

Bij vergelijking van de secundaire eigenschappen blijken de geleiwitten bijzonder elastisch te zijn en slecht oplosbaar in welk oplosmiddel dan ook. Ze laten zich gemakkelijk stabiliseren bij hogere temperaturen. De alcoholoplosbare eiwitten zijn min of meer oplosbaar in water en vormen in gehydrateerde toestand een viskeuze massa die filmvormende eigenschappen bezit. De glutelinen zijn vanwege hun hydrofoob karakter slechts oplosbaar in SDS. Ze hebben geen viscoelastische eigenschappen en zijn in gehydrateerde toestand bijzonder stug. Deze secundaire eigenschappen komen deels tot uiting in de rasterelectronenmicroscopische opnamen REM (Fig. 1, 2, 3). De geleiwitten vormen een honingraatstructuur, de alcoholoplosbare eiwitten een draderige structuur, terwijl de glutelinen een massieve structuur te zien geven.



Fig. 1. REM-opname van de geleiwitten (3000 x)

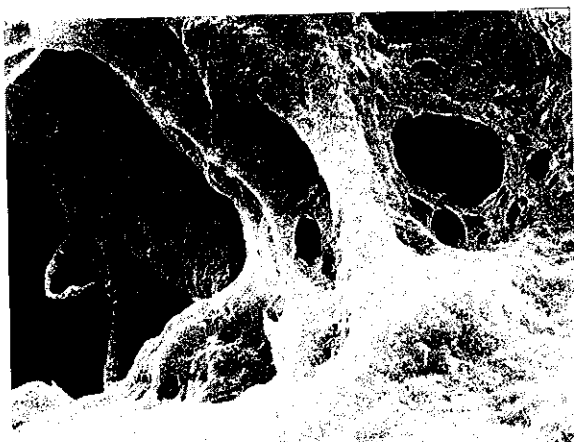


Fig. 2. REM-opname van de alcoholoplosbare eiwitten (3000 x)

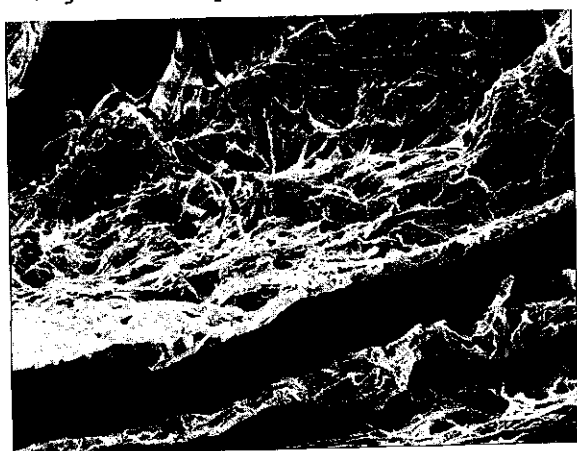


Fig. 3. REM-opname van de glutinen (3000 x)

Tabel 3. Aminozuursamenstelling van drie tarwe-eiwitfracties

Aminozuren g/16 g N	Geleiwitten	Alcoholoplosbare eiwitten	Glutelineen
lysine	1,04	0,53	5,00
histidine	1,66	1,94	2,86
arginine	2,84	2,13	6,80
tryptofaan	0,74	0,65	1,46
cystine (+ cysteine)	1,72	2,01	2,03
asparagine(zuur)	2,01	2,32	7,29
methionine	1,43	1,29	2,27
threonine	2,55	1,79	4,01
serine	5,59	4,56	5,69
glutamine(zuur)	38,35	44,93	22,39
proline	11,06	15,30	7,15
glycine	4,48	1,47	5,09
alanine	2,06	1,76	4,93
valine	3,71	3,82	6,22
isoleucine	2,93	4,14	4,25
leucine	6,11	6,65	8,12
tyrosine	4,00	2,66	4,26
fenylalanine	3,82	6,52	5,17

Bij de bestudering van de tertiaire eigenschappen, dat wil zeggen de interacties van de hierbovengenoemde fracties met andere bloemcomponenten of reacties waarvan zij deel uitmaken, blijken de geleiwitten een bijzondere plaats in te nemen. Tijdens het kneden worden zij gereduceerd tot SDS oplosbaar materiaal en tijdens de daaropvolgende rustperiode na het kneden wordt het gereduceerde materiaal weer geoxydeerd tot SDS onoplosbare geleiwitten. Gebleken is dat zuurstof een essentiële rol speelt bij deze redox-reacties. Zuurstof wordt tijdens het kneden van een deeg gereduceerd tot het superoxyde anion (O_2^-), dat op zijn beurt het electron via een Mn, Cu-eiwitcomplex (electronentransfer systeem) overdraagt aan een disulfide binding (SS) van de geleiwitten die dan tot SH wordt gereduceerd. Tijdens de rustperiode zorgt het inmiddels vrijgekomen Mn^{3+} ion voor de oxydatie van SH groepen tot SS bindingen, hetgeen zich uit in de terugvorming van de geleiwitten. Zowel de reductie van SS bindingen alsook de oxydatie van SH groepen kan op verschillende manieren worden beïnvloed (Graveland et al., 1980). In figuur 4 is reductie oftewel de afbraak van de gellaag tijdens het kneden en de terugvorming daarna tijdens de rustperiode weergegeven.

Gebleken is dat zowel het van nature in de bloem aanwezige lipoxygenase-polyonverzadigde vetzuurcomplex als ook de oxydatieve meelverbetermiddelen als kaliumbromaat en ascorbinezuur bij de reductie van de geleiwitten zijn betrokken, ieder op hun specifieke wijze. Lipoxygenase, caroteen-oxydase en ascorbinezuur-oxydase onttrekken zuurstof aan het systeem, zodat de reductie van geleiwitten wordt belemmerd. $KBrO_3$ en KJO_3 leveren zuurstof aan het deegsysteem, zodat deze stoffen de reductie aktiveren. Bovendien heeft KJO_3 de eigenschap om met SH groepen te reageren, waardoor de oxydatie van SH tot disulfide bindingen wordt belemmerd.

In feite belemmeren alle SH blokkerende reagentia de terugvorming van de gellaag. Voor de vorming van een deegconsistentie is het noodzakelijk dat de hoogmoleculaire geleiwitten tijdens het kneden eerst worden gereduceerd en tijdens de rustperiode weer gedeeltelijk geoxydeerd, opdat ze goed kunnen participeren bij de vorming van een continu eiwit-zetmeel netwerk. In een slechtbakkende bloem zijn de geleiwitten al in kleine eenheden aanwezig; als gevolg hiervan moet reductie juist worden voorkomen omdat de geleiwitten anders tot te kleine eenheden worden omgezet, waardoor ze minder goed participeren in het eiwit-zetmeel netwerk. Bovendien is gebleken dat wanneer de geleiwitten tot te kleine eenheden worden omgezet de oxydatie tot grotere eenheden wordt bemoeilijkt.

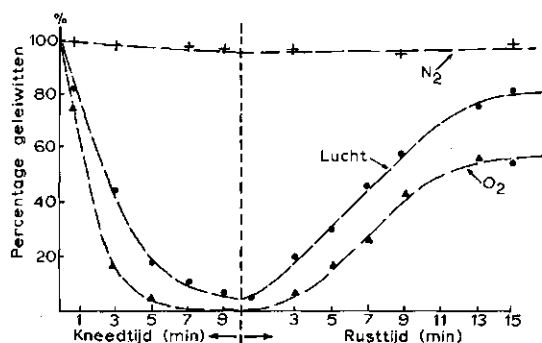


Fig. 4. Afbraak en terugvorming van de geleiwitten.

Voor de vorming van een continu eiwit-zetmeel netwerk zijn naast de geleiwitten ook de alcoholoplosbare eiwitten nodig. De geleiwitten,

welke als afzonderlijke eenheden in bloem voorkomen, worden tijdens het kneden gehydrateerd. Behalve de hierboven beschreven redoxreacties vindt tevens een gedeeltelijke ontvouwing van de eiwitmoleculen plaats. De geleiwitten fungeren als crosslinks tussen de zetmeelkorrels en vormen tezamen een netwerk. Het feit, dat de geleiwitten veel amidegroepen bevatten en het zetmeel veel OH groepen, maakt het aannemelijk dat H-bruggen een grote rol spelen bij de interactie van geleiwitten met zetmeel. De alcoholoplosbare eiwitten zullen vanwege hun viskeuze karakter de ruimten in het netwerk opvullen. Men kan zich voorstellen dat tijdens het bakproces het groter worden van de gascellen wordt opgevangen, doordat enerzijds het raamwerk kan uitzetten vanwege de elasticiteit van de geleiwitten en anderzijds de groter wordende ruimten in het raamwerk opgevuld blijven door de alcoholoplosbare eiwitten die vanwege hun filmvormende eigenschappen gemakkelijk dunne vliezen om de gascellen heen vormen.

Aan het einde van het bakproces, wanneer door het poreus worden van de gascel-wanden waterdamp en CO_2 verdwijnen, mag het brood niet in elkaar zakken, met andere woorden het raamwerk moet voldoende gefixeerd zijn. Ook hierbij spelen de geleiwitten een essentiële rol.

Bij vergelijking van de eiwitsamenstelling van verschillende granen (Tabel 1) blijkt, dat gerst en rogge veel minder geleiwitten bevatten dan tarwe en dat gerst bovendien weinig alcoholoplosbare eiwitten bevat. Dit verklaart waarom van deze granen geen brood met een luchtige en samenhangende structuur kan worden bereid.

Eigenschappen gersteiwit

Tijdens de vermouting van gerst worden de geleiwitten, die slechts een klein percentage vormen van het totale eiwit, omgezet tot wateroplosbaar materiaal, evenals een deel van de glycoproteïnen I. De SDS-oplosbare en alcohol-onoplosbare eiwitten (glutelinen) blijven zowel tijdens de vermouting als ook tijdens de wortbereiding onoplosbaar in water. Juist deze glutelinen bepalen samen met de glycoproteïnen I in hoge mate de filtratiesnelheid van de wort.

Discussie

Bij het hierboven beschreven onderzoek is gebleken, dat de geleiwitten (gluteninen) en de alcoholoplosbare eiwitten in tarwebloem verantwoordelijk zijn voor de vorming van een eiwit-zetmeel netwerk tijdens het kneden van een deeg en derhalve ook voor de luchtige samenhangende

structuur van het brood. Het percentage alcoholoplosbare eiwitten is constant bij verschillende tarwerassen, het percentage geleiwitten daarentegen kan sterk variëren. Deze variatie die genetisch bepaald is, komt tot uiting in het bakgedrag van de tarwe: rassen met een laag percentage geleiwit hebben slechte bakeigenschappen en rassen met veel geleiwit hebben veelal goede bakeigenschappen.

Tevens is gebleken, dat niet alleen de hoeveelheid maar ook de chemische samenstelling van het geleiwit bepalend is voor zijn functioneel gedrag. Met deze informatie kan de kweker bij de veredeling op bakkwaliteit meer gericht te werk gaan bij de keuze van de ouders en bij de selectie van de nakomelingen door gebruik te maken van de chemische samenstelling van de geleiwitten welke met electroforese kunnen worden bepaald.

Tijdens het kneden van deeg spelen oxydatie-reductiereacties een grote rol en ook hier weer staan de geleiwitten centraal. Het is bekend dat deze reacties de deeeigenschappen beïnvloeden en daardoor ook de structuur en het volume van het brood. In de meelverwerkende industrie wordt meestal kaliumbromaat als oxydatiemiddel aan bloem toegevoegd en bij de deegbereiding veelal ook nog wat extra ascorbinezuur. Een probleem echter is dat niet alle bloemsoorten in dezelfde mate reageren op deze toevoegingen. Nu bekend is hoe zowel bromaat als ascorbinezuur inwerken op de redoxreacties die in een deeg plaatsvinden, is het de moeite waard om te zoeken naar meer specifieke oxydatiemiddelen, teneinde schommelingen in de samenstelling van het meel beter te kunnen opvangen.

De hierboven beschreven onderzoeksmethodieken naar de functionele eigenschappen van tarwe- en gersteiwit kunnen uiteraard ook worden aangewend bij de bestudering van het eiwit bij de bereiding van andere voedingsmiddelen. Vooral bij voedingsmiddelen bereid uit een mengsel van verschillende grondstoffen kan een analyse van de functionele eigenschappen van de afzonderlijke eiwitcomponenten een uitstekend hulpmiddel zijn bij het zoeken naar optimale procesomstandigheden.

Door de ontdekking, dat superoxyde anionen (O_2^-) en metaal-eiwit complexen als transfersystemen een grote rol spelen bij de vorming van een optimaal eiwit-zetmeel netwerk, zijn nieuwe wegen geopend voor verder onderzoek.

Literatuur

- Graveland, A., P. Bongers & P. Bosveld, 1979. Extractions and fractionation of wheat flour proteins. J. Sci. Food Agric., 30: 71-84
- Graveland, A. et al., 1980. Superoxide involvement in the reduction of disulfide bond of wheat gel proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun.
- In druk

Kasarda, D.D., J.E. Bernadin & C.C. Nimmo, 1967, Advances in Cereal Science and Technology, Vol. 1. Uitgever: American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minn.

Tanford, C., 1973. The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes. Uitgever: John Wiley & Sons, London

SESSIE 2

Voorzitter: Ir. J.J. Doesburg

Motto: Technologisch onderzoek van voedingsmiddelen, waarde en waardering



INFLUENCE OF NOVEL PROCESSING TECHNIQUES OF THE NUTRITIVE QUALITY OF FOODS

Daryl B. Lund

University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, USA

It is a curious phenomenon that within the last five years perhaps more research papers have been published on the effects of processing on nutrients than in the previous fifty years. In our efforts to make a dependable food supply available to the consumer, our attention was focused on caloric value, protein and selected nutrients (for example vitamin D) in foods because these were more easily detected in the population if deficiencies occurred. Consequently, process technology developed on the basis of rates of production or maintenance of consumer quality. Built into the rate of production criterion is, of course, the cost of the product. From that perspective our technological advances include methods for increasing recovery of raw material (i.e., reducing waste and spoilage), reducing labor and improvements in packaging systems. Unfortunately, because of the magnitude of the costs of material, labor and packaging in food processing, energy was not considered as a basis for making production improvements. Even in today's economy, energy costs are so pervasive that the relative magnitude of direct energy costs in food processing is still a small fraction of total costs. Thus efficiency improvements are made which show very rapid economic returns and generally these improvements consist of house-keeping activities.

Although interest in the effect of processing on nutrients has increased, the real impact of this on technology is even less than the impact of energy costs. The rate of change of technology is subject to the basic principle governing all rate processes; that is, the rate is directly proportional to the driving force and inversely proportional to the resistance. The driving force for changing technology based on nutritional effects is increased sales due to a marketing advantage of increased nutritional quality. The resistance to changing technology is the capital cost of new technology and the attitude that nutritional improvements in products do not lead to expanded markets. For the food industry the life-time of procedures and equipment appears to be about 20-30 years. Thus process improvements through new technology experience a very long gestation period. Although we are not so naive to think that industrial processes will be transformed because of their impact on nutritional characteristics of foods, it is encouraging that at least the magnitude of the effect of processing on nutrients is examined and considered.

Recently several excellent books have been published which attempt to summarize to varying degrees the effects of processing on nutrients (c.f. Harris & Karmas, 1975; Tannenbaum, 1979; Bender, 1978; Hyem & Kvale, 1977; Priestley, 1979^b). The contents are arranged generally in one of two ways: by products (or raw materials) or by nutrient class (for example proteins, carbohydrates and vitamins). Generally, the data consist of measurements on nutrient content before and after a process; that is, a percent retention is determined for the nutrient exposed to a process. Although these data are sufficient for assessing the order of magnitude effects of processing on nutrients, they are totally unacceptable data for designing processes for maximizing retention of nutrients. For design purposes, data which describe the effect of the path of the process on the nutrient must be available.

In this paper I will not attempt to summarize the effects of processing on nutrients in foods. The current state of knowledge has been adequately summarized in the previously mentioned books. To condense these volumes into a short paper is extremely presumptive and perhaps not very productive. In my opinion a more beneficial approach is to discuss the nature of the research which should be conducted in assessing the effects of processing on nutrients. This is especially the case on the occasion of the 40th anniversary of TNO's Food Organization since some of this type of research is conducted within this organization.

One of the prerequisites for making process changes to improve nutrient retention is to know the nature of the degradative pathways which result in loss of biological activity of the nutrient. Classification of reaction pathways as oxidative, hydrolytic or multi-molecular can give insight into important parameters which must be studied. Furthermore, the biological activity of the reaction products must be measured to insure that loss of reactant can be interpreted as loss of nutrient activity. This is especially important as analytical procedures are developed to measure the concentration of a nutrient in a complex food system (as, for example, with liquid chromatography). Loss of a specific form of a nutrient does not mean loss of biological activity and investigators reporting on kinetics of degradation should be unambiguous on the data that are reported (for example loss of reactant or loss of activity.)

Conducting research on kinetics of nutrient degradation requires some special consideration. A recent symposium (Overview, 1980) identified procedures for data generation and analysis which are applicable in developing a data base which can be used to model and subsequently improve processes for nutrient retention. Paramount in this type of study is to state the local conditions as precisely as possible.

Factors such as temperature, oxidation-reduction potential, pH, concentration of compounds (including trace minerals), and moisture content (and water activity) all as a function of time should be specified. Experimental procedures can then be used to generate the parameters which define the dependence of the reaction on these variables. Recently Labuza (1980) reviewed the effects of water activity on reaction kinetics in food deterioration. Thijssen and Kerkhof (1977) and Lund (1977) examined the effect of temperature on nutrients and quality factors coupled with the objectives of thermal processes and concluded that optimum processes exist for maximizing nutrient retention. All of these studies identify the lack of good quantitative data as a limiting factor in optimizing processes for nutrient retention.

As our knowledge of the effects of processing on nutrients expands the more we realize the shallowness of our knowledge. Currently questions on the nutritional implications of oxidized cholesterol, trans fatty acids, unsaturated fatty acids, lysinoalanine, mutagens in fried foods, fiber, toxicity of browning reaction products, digestibility of starch and stability of the lesser studied micro nutrients (minerals and vitamins) to name a few, all require research. Several federal agencies in the U.S. have identified human nutrition and the effects of processing on nutrients as high priority funding areas. Of particular concern to these agencies is the impact of adoption of a new technology on the nutritional profile of the diet. Examples include food irradiation and microwave heating. In their review, Josephson et al. (1978) concluded that food exposed to ionizing radiation under conditions simulating commercial application experienced no significant impairment in the nutritional quality of protein, lipid and carbohydrate constituents. For vitamins it was no more destructive than other food preservation methods. Microwave heating appears to have no additional effect on nutrients other than through the temperature effect on stability (Priestley, 1979^a).

In conclusion, scientists at institutions such as TNO must consider the impact of process technology on nutrients. Process technology development can be a science-based evolution or a random evolution for the improvement of nutrient retention. It is a random evolution if we continue to generate before/after data on the effects of processing on nutrients. It will be a science-based evolution and a more rapid rate of evolution if the kinetic parameters affecting the stability of nutrients are known. Then the engineer can design by choice the best path of completing the process. We are gradually moving from a trial and error, art-based process industry to a science-based process industry.

Samenvatting

Het merendeel van het onderzoek naar het effect van procesomstandigheden op de hoedanigheid van nutriënten in voedingsmiddelen is pas in de laatste vijf jaar gerapporteerd. Voor die tijd werd de aandacht vooral gericht op de calorische waarde, de hoedanigheid van het gebruikte eiwit en een enkel specifiek vitamine (bijvoorbeeld vitamine D); mede door het feit dat daarvan de deficiëntieverschijnselen goed bekend waren. Daarnaast werd het technologisch onderzoek toegespitst op de verhoging van het rendement van de grondstoffen en het terugdringen van de hoeveelheid afval alsmede de benodigde energiekosten. Verhoging van de produktie-efficiency is thans nog gericht op directe bedrijfseconomische voordelen.

De aandacht voor de invloed van procesomstandigheden op de nutriënten is weliswaar toegenomen, maar de daaruit voortvloeiende consequenties van herziene technologische werkwijzen lijken minder dan die als gevolg van de gestegen energiekosten.

De drijfveer voor herziening van technologieën op basis van nutritionele effecten is de toename in de verkoop van producten welke een verbeterde voedingswaarde in hun "marketing-vaandel" voeren. Echter wordt in de voedingsmiddelenindustrie de levensduur van apparatuur en werkwijzen op 20 - 30 jaar geschat. Dit brengt een lange implementatieperiode voor nieuwe technologieën met zich mee. Belangrijk is dat het wezenlijk effect van procesvariabelen op de nutriëntenbalans thans wordt onderkend en bestudeerd.

Indien veranderingen in proces-technologische methoden het behoud van de nutriënten tot doel hebben, is het een eerste vereiste dat de wijze waarop de afbraak van een nutriënt plaats vindt, bekend wordt. Daartoe behoort een indeling van de veronderstelde reactiemechanismen in bijvoorbeeld: oxidatieve, hydrolytische, multi-moleculaire typen enz. In elk geval dient de biologische activiteit van reactieprodukten te worden vastgesteld om er zeker van te zijn dat het verdwijnen van een reactant gepaard gaat met een daadwerkelijke afname in biologische activiteit. Het onderzoek naar de afbraak van de nutriënten vereist een speciale aanpak. In een recent symposium zijn procedures aangegeven met betrekking tot analysemethoden en de formulering van criteria welke model kunnen staan voor een algemene procesverbetering voor het behoud van de nutriënten. Zeer essentieel daarbij is het vaststellen van de 'locale' specifieke omstandigheden, bijvoorbeeld de temperatuur, de redoxpotentiaal, de pH, de gehalten aan speciale verbindingen zoals sporen van metalen, het vochtgehalte, de wateractiviteit; al deze criteria als

functie van de tijd. Het is dan mogelijk om zodanige combinaties van factoren te kiezen dat een optimaal behoud van nutrienten wordt gerealiseerd.

Uit recent onderzoek blijkt hoe smal de basis nog is waarop het huidige inzicht berust. Kennis van voedingsaspecten zoals geoxideerd cholesterol, trans en onverzadigde vetzuren, lysinoalanine, mutagene stoffen in gebakken produkten, de rol van voedingsvezel, toxiciteit van produkten van de Maillard-reactie, verteerbaarheid van zetmeel en de stabiliteit van micronutrienten, is een voorwaarde. Met betrekking tot deze aspecten is het effect van de toepassing van het bestralen van produkten of verhitting met microgolven een te onderzoeken gebied. Daartoe zal men de kinetische kengetallen van elk nutrient dienen vast te stellen. Op basis van die gegevens kunnen de meest efficiënte procesmethoden worden ontworpen voor de vervaardiging van een eindprodukt met een optimale voedingswaarde. Op deze wijze zal de empirische, 'trial and error' procesindustrie plaats kunnen maken voor de procestechnologie op fundamentele grondslag.

References

- Bender, A.E., 1978. Food processing and nutrition. Academic Press, N Y
- Harris, R.S. & E. Karmas (eds.), 1975. Nutritional evaluation of food processing. AVI Publ. Co., Westport, CT
- Hyem, T. & O. Kvale (eds.), 1977. Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing. Applied Science Publ. Ltd., London
- Josephson, E.S., M.H. Thomas & W.K. Calhoun, 1978. Nutritional aspects of food irradiation: An overview. J. Food Proc. Pres., 2: 299-313
- Labuza, T.P., 1980. The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. Food Technol., 34(4): 36-41, 59
- Lund, D.B., 1977. Design of thermal processes for maximizing nutrient retention. Food Technol., 31(2): 71-78
- Overview, 1980. Food quality improvement through kinetic studies and modeling. Overview Symposium. Food Technol., 34(2): 50-95
- Priestly, R.J., 1979^a. Vitamins. In: R.J. Priestly (ed.) Effects of heating on foodstuffs. Applied Science Publ. Ltd. London. pp 121-156
- Priestly, R.J. (ed.), 1979^b. Effects of Heating on Foodstuffs. Applied Science Publ. Ltd., London
- Tannenbaum, S.R. (ed.), 1979. Nutritional and safety aspects of food processing. Marcel Dekker, Inc., NY
- Thijssen, H.A.C. & D.J.A.M. Kerkhof, 1977. Effect of temperature-moisture content history during processing on food quality. In: T.Hoyem & O. Kvale (ed.) Physical, chemical and biological changes in foods caused by thermal processing. Applied Science Publ. Ltd., London. pp 10-30

BESTRALING VAN VERSE VIS EN GEKOOKTE GARNALEN

H. Houwing en K.J.A. van Spreekens
Instituut CIVO-Technologie TNO

Samenvatting

In een groot aantal proeven is de invloed van bestraling op de verlenging van de houdbaarheid van voorverpakte verse visfilets en gekookte garnalen nagegaan.

Als proeffactoren werden bestudeerd de versheid van de grondstof, de toepassing van hygiëne bij de bewerking en de bewaartemperatuur. Bij deze proeven was de sensorische beoordeling van deze produkten steeds van doorslaggevende betekenis, waarbij ook aandacht werd besteed aan veranderingen in de organoleptische kwaliteit ten gevolge van bestraling. Tenslotte zijn een tweetal praktijkproeven genomen met het doel na te gaan of commercieel bestralen tot de mogelijkheden behoort.

Inleiding

De beperkte houdbaarheid van gekoeld bewaarde verse vis en gekookte Noordzeegarnalen is hoofdzakelijk te wijten aan de psychrofiele/ psychrotrofe microflora van deze produkten. Het voorkomen van deze flora bij gekookte garnalen is onder andere te wijten aan de nabesmetting die aan boord optreedt door koelen en spoelen met zeewater en de daaropvolgende bewerkingsfasen. De optimum temperatuur van deze flora ligt tussen 10 en 25°C. Ook bij een goede koeling (0 - 4°C) treedt nog groei op, alhoewel relatief langzaam. Bij de meeste koelcellen wordt deze temperatuur bereikt.

Ondanks het gebruik van goed tot redelijk uitgangsmateriaal en de toepassing van een zo goed mogelijke hygiëne en het handhaven van deze lage temperaturen is de houdbaarheid van genoemde produkten beperkt. Bij koelvitrinetemperaturen is deze beperking dusdanig dat men het vaak niet aandurft om voorverpakte filets of garnalen in de handel te brengen. Veel onderzoek is verricht naar de verlenging van de houdbaarheid van deze produkten door middel van bestraling met γ -stralen (Ehlermann, 1977; Houwing, 1976; Houwing et al., 1978; Oosterhuis, 1976; Vyncke & Declerck, 1972).

Tegelijkertijd is onderzocht of er toxicologische bezwaren zouden kunnen bestaan tegen het nuttigen van bestraalde vis en visprodukten. In uitvoerige proeven heeft men niets nadeligs kunnen vinden (Anon., 1975, 1976, 1979).

Bij bestraling van deze gekoelde (0°C) produkten is men uit organoleptisch oogpunt gehouden aan een vrij lage dosis van 100 krad (Houwing et al., 1978). Hierdoor werden de meest typische bedervers, zoals onder andere *Pseudomonas*, *Alteromonas* en *Photobacterium*, met ca. 5 log eenheden gereduceerd, maar de *Moraxella*'s, die niet of veel minder gevoelig zijn, blijven over. Aangezien ook *Moraxella*'s een psychrofiel/psychrotroof karakter hebben en verantwoordelijk zijn voor het bederf van bestraalde produkten, zal men genoemde bestraalde produkten eveneens goed gekoeld ($\leq 4^{\circ}\text{C}$) moeten transporteren en bewaren.

Door het handhaven van deze lage temperatuur wordt ook het theoretische bezwaar weggenomen van het uitgroeien van eventueel aanwezige sporen van anaërobe sporevormer *Clostridium botulinum*. Bovendien is uit oogpunt van presentatie een vacuümverpakking van verse vis (filets) en garnalen ongewenst.

In het algemeen kan men stellen dat bij toepassing van deze relatief lage bestralingsdosis de resterende flora zich bij gekoelde opslag zodanig zal ontwikkelen, dat men bederf zal waarnemen lang vóór een eventuele toxinevorming door *Clostridium botulinum* (Hobbs, 1976).

Alhoewel het tot op zekere hoogte buiten het bestek van het hier gepresenteerde valt, is het noodzakelijk erop te wijzen dat het afwezig zijn van toxicologische bezwaren er ook de reden van is dat nu op beperkte schaal bepaalde gevroren visserijprodukten worden bestraald met een hoge dosis met als doel deze *Salmonella*-vrij te maken. Het betreft hier onder andere bevroren kikkerdelen en uitheemse garnalen. Vanzelfsprekend wordt door deze bestraling ook het kiemgetal gereduceerd. Door het feit dat deze produkten bevroren zijn, kunnen en moeten deze hoge doses, soms tot 500 krad, worden toegepast, mits de produkttemperatuur ten hoogste ca. -20°C bedraagt. Ook bij het toepassen van deze hoge doses voor decontaminatiedoeleinden bij geïmporteerde gekookte tropische garnalen bleek de resterende flora overwegend uit *Moraxella* met daarnaast *Micrococcus radiodurans* te bestaan (Toepoel et al., 1980).

Overigens is op dit terrein nauwelijks onderzoek verricht naar de relatie bestralingsdosis/produkttemperatuur met betrekking tot eliminatie van micro-organismen en het ontstaan van geur- en smaakafwijkingen. Houdbaarheidsverlenging en decontaminatie van visserijprodukten behoren thans tot de mogelijkheden. De acceptatie van bestraalde produkten berust bij de nationale en internationale instanties die belast zijn met het opstellen van regels, maar, "last but not least" bij de consument zelf.

De hieronder te noemen proefnemingen zijn gerealiseerd dankzij een opdracht van de zijde van de Directie van de Visserijen van het Ministerie van Landbouw en Visserij. Voor wat betreft het garnalenonderzoek is

een bijdrage verkregen van het Bureau Eurisotoop van de Europese Gemeenschap.

Tijdens de proefnemingen werd bijstand verkregen van een begeleidingscommissie bestaande uit vertegenwoordigers van de overheid, het Productschap voor Vis en Visproducten, het Instituut voor Toepassing van Atoomenergie in de Landbouw (ITAL) en het bedrijfsleven. Deze commissie was tegen het einde van het onderzoek ervan overtuigd dat het zeer wel verantwoord was de Minister van Volksgezondheid en Milieuhygiëne te verzoeken op beperkte schaal bestraling en in de handel brengen van de onderzochte produkten toe te staan; deze vergunning werd verstrekt. Vervolgens zijn een tweetal praktijkproeven genomen.

Bij de eerste proef betrof het panklare tong die op ijs werd bestraald en bewaard. De bestraalde tong werd chefkoks van gerenommeerde restaurants en instellingen aangeboden direct na de bestraling en 5 of 6 dagen daarna. Deze praktijkproef werd genomen om na te gaan of het mogelijk zou zijn de distributiefrequentie te verlagen van éénmaal per dag tot éénmaal per week. Bij de beoordeling werd chefkoks naar hun bevindingen gevraagd.

Voor de tweede praktijkproef werd een andere doelgroep gekozen. Een firma die wekelijks grote instellingen van levensmiddelen voorziet, wilde geïnformeerd zijn over de mogelijkheid verse vis in haar pakket op te nemen. Voorwaarde was dat deze instellingen de vis nog gedurende één week konden bewaren in hun koelcel, waarbij geen vocht uit de verpakking de koelcel mocht bevuilden in verband met geuroverdracht op andere levensmiddelen. Ijs kon dus niet worden gebruikt. Bovendien moest het produkt tegelijk met andere gekoelde produkten kunnen worden vervoerd, hetgeen ook extra eisen aan de verpakking stelde. Steunend op de eerder in het Instituut voor Visserijproducten TNO opgedane ervaring is onzerzijds dan ook geadviseerd deze praktijkproef bij ca. 4°C uit te voeren.

Experimentele gegevens

Bij de proeven in het Instituut met schol- en kabeljauwfilets zijn de volgende proeffactoren in het onderzoek betrokken: kwaliteit (versheid) van het uitgangsmateriaal, toepassing van hygiëne bij de verwerking van de grondstof, bewaartemperatuur en aard van de verpakking. Bij garnalen werden de proeffactoren toegespitst op de specifieke garnalenproblematiek. Gepelde en ongepelde al dan niet met benzoëzuur behandelde garnalen werden in het onderzoek betrokken. Toevoeging van benzoëzuur bij bestraling moge bevreemding wekken, omdat altijd als voordeel van bestralen het niet hoeven toe te voegen van additieven wordt genoemd. Het toevoegen van benzoëzuur was echter onvermijdelijk. De piekaanvoeren vinden namelijk op vrijdag plaats en indien men de bestraling wil spreiden over

een aantal dagen moet men benzoëzuur toevoegen om te voorkomen dat de garnalen bedorven zijn voordat deze bestraald kunnen worden. Allereerst is door een speciaal getraind taste-panel, bestaande uit ca. 8 personen, nagegaan welke dosis nog een produkt opleverde met een aanvaardbare organoleptische kwaliteit. Toen was vastgesteld dat bij een dosis van 100 krad de organoleptische veranderingen nog aanvaardbaar waren voor de meeste keurders, is deze dosis in het vervolg aangehouden. (Houwing et al., 1978).

Bij alle proeven is als criterium voor het verstrijken van de houdbaarheidstermijn het overschrijden van de organoleptische acceptatiegrens gehanteerd, omdat dit criterium rechtstreeks voor de consument van belang is. De geur en de smaak waren bij deze proeven van doorslaggevende betekenis.

Van de filets werd de geur van het rauwe en de smaak, de geur en de consistentie van het "gekookte" produkt gewaardeerd volgens een schaal van 9 punten, waarbij 1 "zeer slecht, zwaar bedorven" en 9 "uitstekend" betekent. De acceptatiegrens ligt bij 4. Voor de gekookte garnalen werd een dergelijke schaal gebruikt. De keurders werden niet alleen verzocht hun oordeel uit te spreken volgens genoemde waarderingsschaal, maar tevens aan te geven of men aan het monster kon bemerken of het al of niet was bestraald.

Schol- en kabeljauwfilets en garnalen werden verpakt op een kunststof schaaltje dat omwikkeld werd met een gasdoorlatende rekfolie.

Bij de praktijkproef met panklare tong werd deze verpakt in commerciële polystyreen viskisten; de vis was gedurende de gehele periode omgeven door ijs.

De verpakking bij de tweede praktijkproef bestond eveneens uit polystyreen kisten. De vis werd vóór het verpakken gekoeld tot ca. 0°C. De met vis gevulde kisten werden, behoudens gedurende de bestraling, voortdurend in een omgeving van 4°C bewaard.

De monsters vis en garnalen werden tevens onderzocht op de chemisch gemakkelijk aantoonbare bederfproducten trimethylamine (TMA) en ammoniak volgens Ruiter & Weseman (1976) en hypoxanthine volgens Burt et al., (1968).

Bij de in dit artikel vermelde proeven werden de produkten steeds "aerob" verpakt.

Het kiemgetal werd bepaald met behulp van de strijkplaatmethode op het gemodificeerde medium volgens Long & Hammer (Van Spreekens, 1974). De platen werden 5 - 7 dagen bebroed bij 15°C.

Resultaten en bespreking

Organoleptische veranderingen ten gevolge van bestraling op laboratorium-schaal.

De resultaten van het onderzoek naar organoleptische veranderingen ten gevolge van bestraling zijn weergegeven in de tabellen 1 en 2.

Tabel 1. Invloed van bestraling van zeer verse vis op sensorische detectie. Percentages van het totaal aantal waarnemingen waarin vis als "bestraald" werd aangemerkt

Vissoort	Onbestraald		Bestraald	
	geur rauw	geur/smaak gekookt	geur rauw	geur/smaak gekookt
kabeljauw	3	1	23	23
schol	4	5	50 *	16

Tabel 2. Invloed van bestraling van garnalen op sensorische detectie. Percentages van het totaal aantal waarnemingen waarin garnalen als "bestraald" werden aangemerkt

Behandeling	gepeld	ongepeld
Onbestraald + 0,4% benzoëzuur	13	13
Onbestraald	4	4
Bestraald + 0,4% benzoëzuur	20	25
Bestraald	19	13

De kans bestaat dat fijnproevers ook bij een dosis van 100 krad zullen bemerken dat de vis is bestraald. Dit effect was groter bij schol- dan bij kabeljauwfilets, waarschijnlijk vanwege het iets hogere vetgehalte van de eerste soort. In gekookte toestand waren de verschillen bij schol veel kleiner.

Het feit dat de leden van het panel in enkele gevallen bij niet bestraalde filets aangaven dat deze waren bestraald, is een sterke aanwijzing dat de verschillen niet groot waren.

Voorts kan worden opgemerkt dat bij vis die vóór het bestralen enige tijd in ijs was bewaard het percentage herkenningen van bestraling afnam, waarschijnlijk ten gevolge van het overheersen van geuren ontstaan door beginnend bacterieel bederf.

Vrijwel iedere keurder was van mening dat de bestraling aanvankelijk smaak-nivellerend werkte. Dat wil zeggen dat vrijwel direct na het bestralen de karakteristieke visgeur en -smaak gedeeltelijk verloren waren gegaan. Naarmate de houdbaarheidstermijn verstreek, kruisten de waarderingen elkaar, uiteraard ten gunste van de bestraalde vis, omdat deze laatste langer houdbaar was.

Kennelijk was het moeilijk sensorisch aan te tonen of garnalen waren bestraald, vooral wanneer benzoëzuur was toegevoegd. Dit bleek uit het feit dat in 13% van het aantal waarnemingen bij de benzoëzuur bevattende, onbestraalde garnalen werd aangegeven dat deze bestraald waren.

Houdbaarheidsverlenging door bestraling op laboratoriumschaal

In een groot aantal proefnemingen werd het effect van bestralen met 100 krad op de houdbaarheid bij 4°C van rauwe schol- en kabeljauwfilets en gekookte garnalen nagegaan. De resultaten, gebaseerd op de sensorische beoordeling, zijn samengevat in de tabellen 3, 4 en 5.

De invloed van de opslagtemperatuur op de houdbaarheid is weergegeven in de tabellen 6 en 7 (Houwing et al., 1978).

Tabel 3. Invloed van de versheid van het uitgangsmateriaal op de gemiddelde houdbaarheid

Soort vis	Bewaartijd vis op ijs vóór fileren, in dagen	Houdbaarheid in dagen		Log kiemgetal	Reductie kiemgetal
		onbestraald	bestraald	uitgangs- materiaal	in log eenh. door bestraling
kabeljauw	1	8	18	3,9	1,3
	5	5	10	4,1	1,3
	8	<5	10	5,3	1,8
	12	2	6	6,2	2,1
schol	1	9	14	3,2	0,9
	6	5	11	4,0	1,1
	10	>2	5	5,8	1,8
	13	2	2	7,0	2,3

Tabel 4. Invloed van de toepassing van de hygiëne bij het fileren op de gemiddelde houdbaarheid in dagen

Vissoort	Bewaartijd op ijs van grondstof voor fileren	Fileerprocedure	bewaartijd in dagen na fileren	
			Onbestraald	Bestraald
kabeljauw	3	TNO	6	11
		commercieel	4	11
	10	TNO	3	8
		commercieel	<1	3
Schol	1	TNO	8	13
		commercieel	4	10
	8	TNO	4	10
		commercieel	3	7

Tabel 5. Invloed van voorbehandeling van garnalen op de gemiddelde houdbaarheid bij 4°C in dagen

Variatie	Houdbaarheid in dagen		Log kiemgetal aan einde houdbaarheidstermijn	
	onbestraald	bestraald	onbestraald	bestraald
gepeld				
zonder benzoëz.	3	7	8,7	8,3
met 0,4% benzoëz.	9	18	8,8	8,5
ongepeld				
zonder benzoëz.	3	9	8,5	8,2
met 0,4% benzoëz.	7	13	8,7	8,4

Tabel 6. Invloed van bewaartemperatuur in °C op de gemiddelde houdbaarheid in dagen

Vissoort	Houdbaarheid in dagen bij verschillende bewaartemperaturen (°C)							
	onbestraald				bestraald			
	0	2	4	6	0	2	4	6
kabeljauw	7	5	5	4	9	13	9	7
schol	15	10	7	5	12	12	9	9

Tabel 7. Invloed van bewaartemperatuur op de houdbaarheid in dagen van ongepelde garnalen + 0,4% benzoëzuur

Soort	Houdbaarheid in dagen bij verschillende bewaartemperaturen (°C)			
	0	2	4	6
Onbestraald	15	12	8	6
Bestraald	27	22	16	11

In het algemeen kan bij de resultaten van het onderzoek het volgende worden aangetekend:

De houdbaarheid van verse, voorverpakte visfilets hangt in hoge mate af van de kwaliteit van de grondstof. Ditzelfde geldt voor de houdbaarheid van bestraalde voorverpakte filets.

Ruwweg kan worden gesteld dat de houdbaarheid door bestraling met een dosis van 100 krad bij een bewaartemperatuur van 4°C wordt verdubbeld.

De houdbaarheid van verse voorverpakte visfilets hangt sterk af van de wijze waarop men de hygiëne heeft toegepast tijdens het fileren; hetzelfde geldt voor bestraalde visfilets.

De houdbaarheid van zowel bestraalde als onbestraalde visfilets hangt af van de bewaartemperatuur van de filets.

De houdbaarheid van bestraalde garnalen is ruwweg tweemaal zo groot als van niet bestraalde. Bij gepelde garnalen is van een synergistische werking sprake tussen een toevoeging van 0,4% benzoëzuur en bestraling. De houdbaarheid van zowel bestraalde als onbestraalde garnalen hangt af van de bewaartemperatuur.

De resultaten van het microbiologisch onderzoek gaven in diverse opzichten een verklaring voor bovengenoemde bevindingen.

Wat betreft de microflora kan het volgende worden vermeld:

De flora van de filets is hoofdzakelijk afkomstig van de vis zelf en van het fileerbedrijf. Gekookte Hollandse garnalen worden aan boord en later ook aan de wal nabesmet. In deze gemengde flora zijn vele soorten van bacteriën vertegenwoordigd. Tijdens het gekoeld bewaren van voorverpakte filets en garnalen zullen diverse soorten zich gaan vermeerderen, de ene soort sneller dan de andere.

Diverse groepen van bacteriën vormen vaak specifieke bederfprodukten. Vorming van sterke geuren en chemisch gemakkelijk aantoonbare bederfprodukten gaan niet altijd samen.

Een overzicht van de vorming van bederfprodukten door de belangrijkste bederfveroorzakende bacteriën is gegeven in tabel 8. Voor uitvoeriger informatie wordt verwezen naar een eerdere publikatie (Van Spreekens, 1977).

Tabel 8. Stralingsgevoeligheid en vorming van bederfprodukten door belangrijke groepen bederfbacteriën.

geslacht	stralingsgevoeligheid	bederfgeuren	TMA*	HX*
Pseudomonas				
groepen I en II	+	+++	-	-
Alteromonas				
A. putrefaciens	+	+++	+	+
"Typische garnalen- bedervers"	+	+++	-	+
Moraxella	+	+	+	-
Photobacterium	+	+	+	+

* TMA = trimethylamine; HX = hypoxanthine

De in deze tabel genoemde bacteriën groeien relatief het snelst en worden daarom gezien als de belangrijkste bedervers.

Bij bederf van voorverpakte rauwe filets treden de facultatief anaërobe bacteriën, die trimethylamineoxide reduceren tot trimethylamine (TMA), sterk op de voorgrond, met name A. putrefaciens en Photobacterium soorten. Bij bewaarde (onbehandelde) kabeljauw- en scholfilets maakten deze twee groepen te zamen in 52% van de monsters de meerderheid (> 50%) van de flora uit (Van Spreekens & Toepoel, 1978). Het TMA-gehalte is dan ook een zeer bruikbare objectieve maatstaf voor het bederf. Het hypoxanthine-gehalte is dat ook, maar alleen in geval van kabeljauw die een zeer langzame autolytische hypoxanthinevorming heeft. Een snelle en haast sprongsgewijze stijging van de concentraties van genoemde stoffen gebeurde vrijwel gelijktijdig met onaangename organoleptische veranderingen. Het achteruit gaan van de organoleptische kwaliteit verliep bij de onbestraalde filets zeer snel. Op het moment dat de filets organoleptisch onacceptabel werden, werden kiemgetallen van 10^7 - 10^8 per gram gevonden. Dan werden bij schol- en kabeljauwfilets TMA-gehalten

≥ 3 mg% N gevonden en bij kabeljauwfilets HX-gehalten van > 20 mg%. In de inleiding is de verschuiving in de flora reeds genoemd die optreedt door bestraling. Een Moraxella-flora is kenmerkend voor bestraalde monsters (Van Spreekes & Toepoel, 1978). Slechts 32% van de onderzochte Moraxella's reduceerden trimethylamineoxide, terwijl de hypoxanthinevorming te verwaarlozen was. Het TMA-gehalte van bestraalde filets steeg dan ook niet of nauwelijks; het HX-gehalte van bestraalde kabeljauwfilets steeg langzaam, door autolyse. Ook werden andere, minder sterke bederfgeuren waargenomen. De organoleptische kwaliteit van de bestraalde filets werd langer als "acceptabel" beoordeeld. De langere houdbaarheid, de tijdwinst, resulteerde echter steeds in een produkt van matige organoleptische kwaliteit.

Op het moment dat de filets organoleptisch niet meer acceptabel werden gevonden, bedroegen de kiemgetallen $10^6 - 10^7$ per gram of meer. Bij gebruik van niet vers uitgangsmateriaal, zoals 7 à 10 dagen in ijs bewaarde kabeljauw, werden de bestraalde filets vaak reeds bij lagere kiemgetallen sensorisch afgekeurd. Mogelijk werd dit mede veroorzaakt door de werking van enzymen van de door bestraling gedode bacteriën die vóór het bestralen in grote aantallen aanwezig waren.

In gekoeld bewaarde, niet door benzoëzuur geconserveerde garnalen, gaan de "typische garnalenbederfers" die strict aëroob zijn, vaak de belangrijkste flora vormen. In de eerste plaats bij de ongepelde, maar vaak ook bij de gepelde garnalen. In 63% van de monsters (gepelde en ongepelde garnalen) vormden deze "typische garnalenbederfers" de meerderheid ($> 50\%$) van de flora (Van Spreekens & Toepoel, 1978).

Benzoëzuur vertraagde deze ontwikkeling, bijvoorbeeld een toevoeging van 0,4%; 0,8% benzoëzuur remde de ontwikkeling van de "typische garnalenbederfers" volledig.

Door toevoeging van benzoëzuur trad een verschuiving in de flora op. Onder andere melkzuurbacteriën en "coryneforms" ontwikkelden zich op met benzoëzuur geconserveerde garnalen.

In geval van bestraling met 100 krad kwam op garnalen eveneens een Moraxella-flora tot ontwikkeling. Was tevens benzoëzuur aan deze garnalen toegevoegd, dan kwamen naast Moraxella's ook melkzuurbacteriën tot ontwikkeling die tot grote aantallen konden uitgroeien.

Wanneer de garnalen organoleptisch niet meer acceptabel werden gevonden bedroegen de kiemgetallen van al of niet met benzoëzuur behandelde garnalen, bestraalde zowel als onbestraalde, $10^8 - 10^9$ per gram. Het ammoniakgehalte bedroeg dan meestal ≥ 20 mg% N.

De langere houdbaarheid van garnalen, hetzij door gebruik van benzoëzuur, hetzij door bestraling of een combinatie van beide, resulteerde eveneens in een produkt van een organoleptisch acceptabele, doch matige kwaliteit. De onbehandelde garnalen gingen zeer snel in organoleptische kwaliteit achteruit.

Praktijkproeven met panklare tong

De keuring vond plaats in rauwe en gekookte toestand in de bedrijfs-ruimten van de chef-koks. In het laatste geval werd de vis op de door hen gebruikelijke wijze toe bereid (bijvoorbeeld gepocheerd of gebakken). Direct na de bestraling werd er een organoleptisch verschil geconstateerd tussen bestraalde en onbestraalde tong, waarbij door iets meer dan de helft de voorkeur aan onbestraalde tong werd gegeven. Na een bewaarperiode van 5 of 6 dagen werd door de helft van de chef-koks het bestraalde produkt geprefereerd, terwijl de anderen geen voorkeur hadden. De gemaakte opmerkingen waren vrij vaag. Een aantal keurders merkte op dat de bestraalde tong enigszins afweek van de onbestraalde. Dit zou deels kunnen duiden op geur- en smaakafwijkingen ten gevolge van de ioniserende stralen en deels op de nivellerende werking hiervan. Ongeveer één week daarna trad er een kleine verschuiving op ten gunste van de bestraalde vis. Ongetwijfeld is het feit dat de onbestraalde vis verder was voortgeschreden in het bederfstadium dan de bestraalde hiervan de reden.

Bij de tweede praktijkproef is gebleken dat de commercieel geproduceerde bestraalde visfilets bij 4°C een houdbaarheid hadden van ruim één week. De proef is beëindigd omdat het animo om deze vis af te nemen niet voldoende groot was. Uit een naderhand door het ITÄL uitgevoerde enquête bleken de redenen van de afnemende interesse. Deze waren zeer verschillend van aard. Ze liepen uiteen van een te hoge prijs (bestraling en verpakking brengen extra kosten met zich mede) tot het bij voorkeur aangewezen willen zijn op plaatselijke leveranciers bij wie men alle gewenste bestellingen tot op het laatste moment nog in detail kan veranderen. *Uit geen van de reacties bleek dat men aversie zou hebben tegen bestraling.*

Uit beide proeven blijkt dat commercieel bestralen van visserijprodukten uit technologisch oogpunt mogelijk is en een uitkomst kan bieden voor die gevallen waarbij het gebruikelijke distributiepatroon niet haalbaar is. In dit geval was bij de tweede praktijkproef het afwijkende van het normale patroon dat de vis niet van ijs mocht worden voorzien en dat ze slechts éénmaal per week kon worden gedistribueerd.

Conclusies

Door bestraling kan de houdbaarheid van verse vis worden verlengd, mits wordt uitgegaan van een goed uitgangsmateriaal en men een goede hygiëne hanteert. Het blijkt mogelijk het bestraalde produkt tweemaal zo lang te bewaren als het onbestraalde produkt met behoud van een alleszins accep-

tabele kwaliteit. Deze verlenging van de houdbaarheid gaat echter wel ten koste van de organoleptische kwaliteit, die als "matig" wordt aangeduid.

Ook bestraling van garnalen resulteert in een soortgelijke houdbaarheidsverlenging. Met behulp van iets minder dan de helft van de thans toegestane hoeveelheid conserveermiddelen kan een aantrekkelijke houdbaarheid worden verkregen.

Dit betekent dat bestraling een reële oplossing kan bieden voor houdbaarheidsproblemen van visserijproducten bij export en/of een modern distributiesysteem.

Reeds bij een dosis van 100 krad kunnen bovengenoemde resultaten worden bereikt.

Bij bestraling gaat aanvankelijk iets van de karakteristieke visgeur en -smaak verloren. Na enige dagen was dit effect niet meer waarneembaar. Ook treden lichte smaak- en geurafwijkingen op die door de doorsnee consument nauwelijks zullen worden opgemerkt.

Door bestraling treedt een verschuiving in de samenstelling van de microflora op. Een *Moraxella*-flora is kenmerkend voor bestraalde vis en garnalen.

Literatuur

- Anon., 1976. International Food Irradiation Project (Karlsruhe) R 39. One year chronic oral toxicity study on beagle dogs fed diets containing irradiated fish. Nine month status report
- Anon., 1976. International Food Irradiation Project (Karlsruhe) R 41. 90-day toxicity and reproductive toxicity of irradiated European plaice (*Pleuronectes platessa*). Final Report
- Anon., 1979. International Food Irradiation Project (Karlsruhe) R 50. Studies in mice fed a diet containing irradiated fish. Eighty week feeding study. Final Report
- Burt, J.R., J. Murray & G.D. Stroud, 1968. An improved automated analysis of hypoxanthine. *J. Food Technol.*, 3: 165-170
- Ehlerman, D., 1977. Zur Wirtschaftlichkeit einer Anwendung der Strahlenkonservierung von Nordseekrabben in der Bundesrepublik Deutschland. *Lebensm. Wiss. Technol.* 10 (2): 114-119
- Hobbs, G., 1977. *Clostridium botulinum* in irradiated fish. *Food Irradiation Information*, 7: 39-54
- Houwing, H., 1976. Bestraling van visserijproducten: deel I garnalen. *Voedingsmiddelentechnol.*, 9 (31/32): 10-15
- Houwing, H., J. Obdam & J.J. Oosterhuis, 1978. Irradiation of fishery products, especially shrimps and cod/plaice fillets. *Food Preservation by Irradiation*, I.A.E.A., Vienna, 1: 333-346

- Oosterhuis, J.J., 1976. Bestraling van visserijproducten: deel II vis-filet. Voedingsmiddelentechnol., 9 (45): 10-16
- Ruiter, A. & J.M. Weseman, 1976. The automated determination of volatile bases (trimethylamine, dimethylamine and ammonia) in fish and shrimp. J. Food Technol., 11: 59-68
- Spreekens, K.J.A. van, 1974. The suitability of a modification of Long and Hammer's medium for the enumeration of more fastidious bacteria from fresh fishery products. Arch. Lebensmittelhyg., 25: 213-219
- Spreekens, K.J.A. van, 1977. Characterization of some fish and shrimp spoiling bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 43: 283-303
- Spreekens, K.J.A. van & L. Toepoel, 1978. Detection of irradiation in prepacked fresh fish and shrimp on the basis of the microbial flora. Food Preservation by Irradiation, I.A.E.A. Vienna, 2: 157-170
- Toepoel, L., K.J.A. van Spreekens & J.F.M. Beuger, 1980. Het herkennen van bestraling bij tropische garnalen. Voedingsmiddelentechnol. In druk
- Vyncke, W. & D. Declerck, 1972. Extending the shelf life of brown shrimps (*Crangon vulgaris* Fabr.) by gamma irradiation. Lebensm. Wiss. Technol., 5 (5): 151-154

TECHNOLOGISCHE ASPEKTEN VAN VERBETERING VAN HET WERKKLIJMAAT IN DE BAKKERIJ

P. Sluimer

Instituut voor Graan, Meel en Brood TNO

Samenvatting

Behandeld worden veranderingen in de werkwijze van de bakkerij gedurende de laatste 25 jaren. Deze veranderingen hebben in het algemeen tot doel een vermindering van de nachtarbeid. Procesverkorting door gebruik van mechanische deegontwikkeling wordt in Nederland weinig toegepast, door gebruik van geactiveerde deegontwikkeling daarentegen veel.

Het diepvriezen van gereede produkten gebeurt voornamelijk met banket en slechts weinig met brood. Diepvriezen van gistdeeg wordt voor enkele produkten toegepast. Rijsonderbreking, dat is het bewaren bij ca. 0°C van gevormde deegstukken gedurende 1 of 2 nachten, wordt in Nederland in toenemende mate toegepast. Diepvriezen van gistdegen en rijsonderbreking stelt beperkingen aan de bereidingswijze van het deeg.

Tenslotte wordt ingegaan op de rol van emulgatoren bij de broodbereiding.

Inleiding

In 1869 heeft Justus von Liebig, een bekend Duits chemicus, gezegd: "Het bakkersambacht is, voorzover ik weet, het enige ambacht dat gedurende duizenden jaren door de vooruitgang onberoerd is gelaten". Een wat overtrokken uitspraak; een feit is echter dat de belangrijkste technologische vinding in de bakkerij tot die tijd het zuurdeeg is geweest. En dat was al sinds de Egyptische farao's bekend. Kenmerkten die eeuwen zich door een vrijwel volledige stilstand van de technologie, in de laatste 100 jaar vallen talloze technologische veranderingen te bespeuren. Rond 1870 de verspreiding op grote schaal van bakkersgist, een verbeterde maalmethode, het zogenaamde hoogmalen, een geleidelijke verschuiving van de consumptie van rogge naar die van tarwe, daarna ook de mechanisatie van het kneden, gevolgd door een verdere mechanisatie van de bakkersarbeid. Door deze mechanisatie is de betrekkelijk zware bakkersarbeid sterk verlicht.

Voor al bij vergelijking van de situatie van 25 jaar geleden en nu valt op dat zich in de bakkerij enorme veranderingen voltrekken, zowel wat betreft procesvoering als wat betreft de grondstoffen. Wat betreft de

procesvoering noemen we de mechanische en geactiveerde deegontwikkeling, de toepassing van diepvriezen en koeling, wat betreft de grondstoffen kunnen we vooral de emulgatoren noemen. In het onderstaande worden vooral deze 5 punten behandeld. Tot slot wordt nagegaan in hoeverre deze technologische aspecten de arbeidsomstandigheden in de bakkerij verbeterd hebben of in de toekomst nog kunnen verbeteren. Het betoog beperkt zich voornamelijk tot de broodbakkerij om slechts sporadisch een uitstapje te maken naar de banketbakkerij. Voor een goed begrip wordt allereerst nagegaan hoe het klassieke proces van broodbereiding, er uit ziet. Deze werkwijze wordt verder het conventionele broodbereidingsproces genoemd.

Het conventionele broodbereidingsproces

De belangrijkste onderdelen van het broodbereidingsproces zijn het kneden, het rijsproces en het bakken. Het rijsproces wordt meestal onderverdeeld in een voorproces en een narijs. De kenmerken van deze onderdelen zijn in het schema van tabel 1 samengevat, tesamen met de tijden, die zo'n 25 jaar geleden gebruikelijk waren.

Tabel 1. Schema van een conventioneel broodbereidingsproces

Onderdeel	Kenmerk	Tijd (minuten)
kneden	- mengen	20 - 40
	- deegontwikkeling	
	- luchtinsluitingen	
voorproces	- voortgezette deegontwikkeling d.m.v. rijs, doorslag en opbollen en vormen - vorming aromastoffen	70 - 100
narijs	- verkrijgen van het uitgangsvolume voor het bakken	60 - 90

Het kneden geschiedde met weinig intensief werkende kneders, een groot gedeelte van de kneedtijd was nodig om de grondstoffen, bloem, gist, zout, water en wat hulpgrondstoffen goed te mengen. Bovendien werd een begin gemaakt met de deegontwikkeling. Dat wil zeggen dat door zwelling van de eiwitten met water en door onderlinge verknoping van die eiwitten een driedimensionaal netwerk wordt gevormd. Dit zogenaamde gluten vormt de basis voor het vermogen van tarwedegen het door gist tijdens de rijs en tijdens het bakken geproduceerde koolzuurgas goed en fijnverdeeld vast te houden. Bij het kneden wordt tevens lucht in het deeg fijn verdeeld; dit is een onmisbare voorwaarde voor een luchtige structuur van de broodkruim.

Na het kneden volgde de eerste fase van het rijsproces. Bij de gangbare procedure van 25 jaar geleden bestond dit uit een rijs van het gehele deeg in de deegkuip, waarin het deeg gekneet werd, gewoonlijk met een doorslag. Deze bestond meestal uit enkele slagen van de knederarm in het deeg. Bij deze doorslag werd het gevormde koolzuurgas voor een groot deel uit het deeg gedreven. Na deze kuiprijs volgde het verdelen van het deeg in stukken ter grootte van één brood, het opbollen van deze deegstukken tot grote bollen en de zogenaamde bolrijs. Dit tamelijk arbeidsintensieve voorproces is nodig om het deeg een voldoende gashoudend vermogen te geven om uiteindelijk een luchtig en daardoor prettig eetbaar brood te verkrijgen. Figuur 1 laat het verschil zien tussen brood met en zonder een dergelijk voorproces.

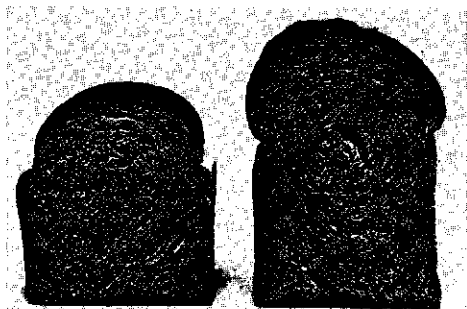


Fig. 1

Doorsneden van twee broden van hetzelfde deeg; links zonder, rechts met voorproces. Aan het begin van het bakken waren de volumina van beide deegstukken gelijk.

In het conventionele broodbereidingsproces lag voor het verkrijgen van een deeg met een goed gashoudend vermogen het accent op de rijs tijdens

het voorproces. We zullen nog zien dat dit bij de nieuw ontwikkelde methoden van broodbereiding anders ligt.

Aan het einde van het voorproces wordt het deegstuk in model gebracht, de bakker spreekt van opmaken, en wordt nog een rijs gegeven, de zogenaamde narijs.

Deze heeft tot doel het volume van het deeg te vergroten zodat een geschikt uitgangsvolume voor de ovenrijs tijdens het bakken ontstaat. Bij het bakken valt allereerst de volumevergroting op, die gedurende de eerste 10 minuten optreedt, de zogenaamde ovenrijs. Het hangt van de gebruikte grondstoffen en de deegontwikkeling af hoe groot die ovenrijs is. Het bepaalt in hoge mate de luchtigheid van het brood. Wittebrood van goede kwaliteit heeft als regel een soortelijk volume van 4,5 à 5 dm³/kg. Het is daarmee één van de luchtigste voedingsmiddelen en stelt daarom speciale eisen aan opslag en transport.

Het doel van het bakken is uiteraard het gaar maken van het brood door verstijfseling van het zetmeel en door hittedenaturatie van de eiwitten. Bij de vorming van de korst is de Maillard reactie, dat is een condensatiereactie tussen eiwitten en reducerende suikers, van belang. Ze speelt een essentiële rol bij de vorming van de broodgeur.

Dit is in vogelvlucht het bereidingsproces van brood. Bij het bewaren van brood veranderen de eigenschappen ervan geleidelijk aan. De typische broodgeur wordt minder, de korst wordt door migratie van vocht uit de kruim naar de korst slof en de kruim wordt door retrogradatie van het zetmeel geleidelijk aan stugger en kruimeliger. Een aantal uren na het bakken is brood dan ook niet meer als vers te verkopen. De consument wenst vers brood. De consequenties daarvan zien we terug in de structuur van de bedrijfstak.

Brood moet dus vers verkocht worden. Kijken we nog eens naar het schema van het bereidingsproces dan zien we dat het bereiden van brood, althans zoals dat tot voor kort gebruikelijk was, toch zo'n 3 à 4 uur vergde. Daarbij moeten we optellen 2 uur voor het afkoelen van het brood, waarna het pas goed snijdbaar wordt. Wil een bakker in de ochtenduren enige ovenladingen vers brood verkopen, dan zal dat voornamelijk in de nachturen geproduceerd moeten worden. Dat geldt voor zowel groot- als kleinbedrijf. Het grootbedrijf begint meestal voor 12 uur 's nachts met de produktie voor de volgende dag en het kleinbedrijf meestal tussen 2 en 4 uur 's nachts.

Een belangrijke beperking aan die nachtarbeid, en die is dan gedefinieerd als de arbeid tussen 8 uur 's avonds en 7 uur 's morgens, wordt gesteld door de arbeidswet. In essentie stelt hij dat niet meer dan de helft van de arbeidsuren aan nachtarbeid mag worden gemaakt. Vers brood 's morgens, een bereidingsproces dat met het afkoelen meegerekend tenminste 5 uur duurt, en een wet die bepaalt dat een bakker tenminste even-

veel arbeid overdag als 's nachts dient te verrichten, dat zijn problemen waar de bakkerij zich voor zag en ziet gesteld.

Een volledige oplossing van deze tegenstelling wordt hier niet gegeven. Wel zullen de mogelijkheden om de nachtarbeid te verminderen de revue passeren en bovendien wordt aangegeven wat de mogelijke ontwikkeling in de nabije toekomst zal zijn.

Mechanische en geactiveerde deegontwikkeling

Een groot deel van de deegontwikkeling die nodig is om deeg met een goed gashoudend vermogen te krijgen vindt bij de conventionele broodbereiding plaats gedurende het voorproces door het rijzen en bewerken van het deeg. Bekorting van de duur van het broodbereidingsproces door de deegontwikkeling niet door rijzen maar door kneden te bewerkstelligen was het uitgangspunt van een aantal onderzoeken zowel in Nederland als in Engeland in de jaren 50. In Nederland werd het onderzoek in ons instituut uitgevoerd door Jongh en het leidde tot een bruikbaar maar door het niet voorhanden zijn van geschikte kneders nauwelijks toegepaste werkwijze (Jongh, 1959).

Bij deze werkwijze werd de snelheid van de beweging van de knederarm in het deeg opgevoerd en kon het voorproces worden beperkt tot slechts één bolrijs van ca 20 minuten.

In Engeland had men meer succes en leidde het onderzoek tot het zogenaamde Chorleywood Bread Process; het meest succesvolle van de processen gebaseerd op mechanische deegontwikkeling (Elton & Devlin, 1959). Kort samengevat zijn de eisen die aan dit proces worden gesteld als volgt:

- gebruik een intensief werkende kneder, zodanig dat binnen 5 minuten een kneedenergie van ca 40 kJ per kg deeg kan worden toegevoerd. Bij conventioneel kneden wordt 10 tot 25 kJ per kg deeg toegevoerd.
- toevoeging van een grotere hoeveelheid meelverbetermiddel dan gewoonlijk. Meestal wordt bij een kort voorproces 50 tot 100 mg ascorbinezuur per kg bloem extra toegevoegd.
- toevoeging van een vet met een smelttraject tussen 35 en 40°C, in de orde van 1% van de bloem. Tegenwoordig wordt vet ook wel vervangen door ca 0,25% emulgator bijvoorbeeld calciumstearyl-lactylaat.
- een betrekkelijk hoge deegtemperatuur. Bij conventionele broodbereidingsprocessen is een deegtemperatuur van ca. 26°C gebruikelijk, bij een kort voorproces is 30°C gangbaar.

Onder deze condities is na het kneden een korte bolrijs voldoende om een deeg met een goed gashoudend vermogen te krijgen. In Engeland zijn bolrijzen tussen de 8 en 12 minuten gebruikelijk, in Nederland zal men voor het type brood, dat men hier wenst meestal een bolrijs van 20

minuten of meer toepassen.

Het gebruik van een zeer intensief werkende kneder is bij mechanische deegontwikkeling van wezenlijk belang. We kunnen de in Nederland gebruikte kneiders indelen in drie klassen te weten langzaam werkende zogenaamde conventionele kneiders, intensiever werkende snelkneiders en zeer intensief werkende high-speed mixers. De kenmerken van deze klassen zijn in tabel 2 weergegeven.

Tabel 2. Overzicht van in Nederland gebruikte typen kneiders met hun kenmerken

type kneder	kneedtijd in minuten	aantal toeren per minuut	motorvermogen in kW/100 kg bloem
conventionele kneder	12-30	30-100	1,5-4
snelkneder	5-12	100-250	4-15
high-speed mixer	1-5	250-500	25-50

Het blijkt dat alleen met high-speed mixers deeg bij het kneden zodanig ontwikkeld wordt dat het voorproces tot een korte bolrijs beperkt kan blijven. Met de conventionele kneder en een wat opgevoerde snelkneder lukt het niet deeg tijdens het kneden zodanig ver te ontwikkelen dat het een voldoende gashoudend vermogen heeft. In figuur 2 is dit aan de hand van doorsneden van broden, bereid met verschillende typen kneiders en een kort voorproces, te zien.



Fig. 2

Doorsneden van broden gemaakt met een kort voorproces; links met een conventionele kneder, midden met een snelkneder en rechts met een high-speed mixer.

Bij alle drie kneiders werd een optimale kneedtijd toegepast, dit wil zeggen dat verlenging van de kneedtijd niet tot een betere broodkwaliteit leidde. Brood bereid met de conventionele kneder was slecht van kwaliteit, met een snelkneder matig en met een high speed mixer goed. Onder kwaliteit verstaan we daarbij vooral de organoleptische kwaliteit. Met deze werkwijze wordt op het conventionele broodbereidingsproces ca

1 uur bespaard. Zoals al gezegd heeft het in Nederland nog nauwelijks voet aan de grond gekregen. Dat het in Engeland wel vlot geaccepteerd is vindt zijn oorzaak in het feit dat de voordelen ervan voor de Engelse bakkerij aanzienlijk groter waren dan voor de Nederlandse bakkerij. Het conventionele voorproces was daar langer dan in Nederland, de tijdwinst was dus groter. Bovendien kan meer water gebruikt worden dan bij conventioneel kneden. In Nederland, waar brood op het gewicht van de drogestof verkocht wordt is dat geen voordeel; in Engeland, waar brood op totaal gewicht verkocht wordt, wel.

In 1957 werd in Amerika (Henika & Zenner, 1960) de zogenaamde geactiveerde deegontwikkeling uitgevonden. De deegontwikkeling wordt bij deze werkwijze bevorderd door toevoeging van het aminozuur cysteïne. Bij geactiveerde deegontwikkeling is het gashoudend vermogen van het deeg aan het eind van het kneden vergelijkbaar met dat bij de mechanische deegontwikkeling; er kan dus met een even kort voorproces worden volstaan. Het voordeel boven mechanische deegontwikkeling is dat met een conventionele kneder gekneet kan worden. Bij overschakeling van een conventionele werkwijze op geactiveerde deegontwikkeling behoeft men dus niet te investeren.

Zoals dat voor mechanische deegontwikkeling is gedaan kunnen de voorwaarden voor geactiveerde deegontwikkeling ook worden samengevat. Ze zijn:

- toevoeging van cysteïne. De optimale toevoeging ligt meestal tussen 20 en 40 mg per kg bloem of meel.
- toevoeging van een grotere hoeveelheid meelverbetermiddel dan gewoonlijk. Ook bij deze werkwijze wordt 50 tot 100 mg ascorbinezuur extra per kg bloem gebruikt.
- toevoeging van een hoogsmeltend vet, bij voorkeur in combinatie met een emulgator.
- gebruik van een hogere deegtemperatuur.

Wat de high-speed mixer is voor de mechanische deegontwikkeling is cysteïne voor de geactiveerde deegontwikkeling. In figuur 3 is dit aan de hand van bakproeven geïllustreerd.

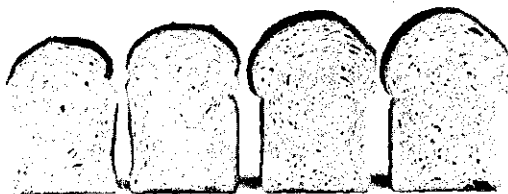


Fig. 3

Doorsneden van broden gemaakt met een kort voorproces en een conventionele kneder met van links naar recht, 0, 10, 20 en 40 mg cysteïne per kg bloem toegevoegd.

De bakproeven werden uitgevoerd met een conventionele kneder en een kort voorproces. Alleen de cysteïnetoevoeging werd gevarieerd en wel van 0

tot 40 mg per kg bloem. Zonder cysteïne was de broodkwaliteit matig, met 20 en 40 mg per kg bloem was ze goed.

In Nederland is geactiveerde deegontwikkeling rond 1970 op commerciële schaal geïntroduceerd en we kunnen stellen dat bij de produktie van veel Nederlands brood, zowel in het groot- als in het kleinbedrijf, procesverkortings door toepassing van geactiveerde deegontwikkeling wordt toegepast, zij het vaak niet zo extreem als hiervoor werd beschreven (Sluimer et al., 1976).

Bij het succes van geactiveerde deegontwikkeling speelden een drietal technische aspecten een belangrijke rol. Het eerste is de toepassing van emulgatoren bij de broodbereiding, waarover later; het tweede is het feit dat fabrikanten van hulpgrondstoffen zogenaamde all-in verbetermiddelen voor geactiveerde deegontwikkeling op de markt brachten, de zogenaamde rijstijdverkorters. Dit maakte het de bakker gemakkelijker geactiveerde deegontwikkeling toe te passen. Het derde aspect is de overschakeling van conventionele kneders naar intensiever werkende snelkneders. In de afgelopen 10-15 jaar zien we een zeer sterke afname van het gebruik van conventionele kneders en een enorme toename van het gebruik van snelkneders (Smak & de Vries, 1975). En geactiveerde deegontwikkeling mag best een beetje geholpen worden door mechanische deegontwikkeling. Het mag echter niet te sterk zijn: gebruik van bijvoorbeeld cysteïne in een high-speed mixer levert over het algemeen geen goede broodkwaliteit.

Uiteraard is vooral het sociale aspect, het verkorten van de nachtarbeid en het vergemakkelijken van de bakkersarbeid, de belangrijkste reden geweest voor de Nederlandse bakkerij om in die mate over te schakelen van een conventioneel voorproces naar eenvoudiger en kortere voorprocessen.

Koeling en diepvriezen

Het diepvriezen is rond 1960 in de bakkerij geïntroduceerd (Belderok et al., 1971). Het heeft belangrijke veranderingen in de werkwijzen tot gevolg gehad, in het bijzonder in die van de banketbakkerij. Vroeger moest bederfelijk, zogenaamd natgebak vanwege zijn slechte houdbaarheid dagelijks vers bereid worden. Tegenwoordig kan men grote aantallen van eenzelfde gebak maken en dit opslaan in de diepvries. Wat een bepaalde dag beschikbaar moet zijn, haalt men uit de diepvries en werkt men eventueel verder af. Daardoor is het ook voor de kleinste banketbakkerij steeds mogelijk een groot assortiment voorradig te hebben.

Ook brood is bij kamertemperatuur niet lang houdbaar. Bij bewaren neemt, zoals al eerder is gezegd, de geur af, wordt de korst door vochtmigratie

slof en wordt de kruim door retrogradatie van het zetmeel stugger en kruimeliger.

In de diepvries worden deze processen stopgezet en vers ingevroren brood kan zonder noemenswaardige achteruitgang in kwaliteit enkele weken worden opgeslagen.

Toch slaat de bakkerij slechts weinig brood in de diepvries op. De reden is dat brood zeer volumineus is. Daardoor zijn grote opslagruimten nodig en moet een zeer lage invriestemperatuur gebruikt worden om de tamelijk goed isolerende kruim snel genoeg op -20°C te brengen.

Bovendien is brood een tamelijk goedkoop produkt, waardoor het nauwelijks loont. Uitzonderingen zijn het brood voor de maandagochtend in sommige bedrijven en piekverkopen voor bijvoorbeeld Kerstmis en Pasen.

Een andere mogelijkheid om efficiënter te werken is gistdeeg bij lage temperaturen op te slaan. De rijs van deeg is bij temperaturen onder 0°C verwaarloosbaar. Gevormde deegstukken, die dus nog slechts een narijs behoeven, kunnen in principe onder 0°C langere tijd bewaard worden. Na opwarmen op een geschikt tijdstip volgt dan de narijs en het bakken.

Nachtarbeid zou zo op een eenvoudige manier voor een groot deel in dagarbeid zijn om te zetten. We kunnen daarbij twee methoden onderscheiden: het diepvriezen van deeg bij -20°C en de zogenaamde rijsonderbreking bij temperaturen tussen 0 en -10°C . Bij diepvriezen is de bewaarduur langer dan enkele dagen, bij rijsonderbreking worden de degen in principe de ene dag bereid en verwerkt en de volgende dag afgebakken. Diepvriezen van deeg wordt momenteel vooral gebruikt voor luxe kleinbrood en specialiteiten als bijvoorbeeld croissant. Rijsonderbreking is met alle typen gistdeeg mogelijk en wordt momenteel in tal van bedrijven in Nederland toegepast. Beide processen zijn op ons instituut uitgebreid onderzocht.

Pogingen om door koelen of vriezen van gevormde deegstukken de deegbewerking en het afbakken in tijd onafhankelijk van elkaar te maken, en zodoende de nachtarbeid te verminderen, zijn al in de eerste helft van deze eeuw ondernomen (Calvel, 1964). Toen was het vooral de gebrekkige koel- en regeltechniek die een uitgebreide toepassing in de weg stond. Maar ook bij een perfecte koel- en regeltechniek blijkt het niet eenvoudig om met rijsonderbreking of met diepvriezen van deeg produkten van goede kwaliteit te maken. Afwijkingen bij brood verkregen met rijsonderbreking zijn wel (Fig. 4):

- een zeer grove kruimstructuur met onprettige eeteigenschappen
- een sterke roodbruine verkleuring van de korst; bij langer bewaren dan één nacht bij lage temperatuur treden ook wel blaasjes op
- een klein volume veroorzaakt door een gering gashoudend vermogen tijdens het bakken.

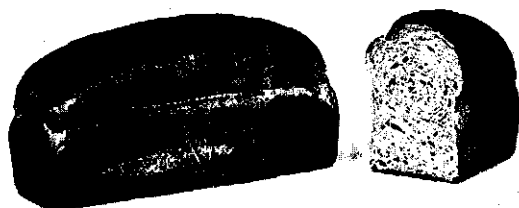


Fig. 4

Brood bereid met rijsonderbreking heeft soms een grove kruimstructuur, een verkleuring van de korst en een klein volume

Deze afwijkingen doen zich vooral voor bij toepassing van een conventioneel voorproces. Bij toepassing van de eerder genoemde mechanische en geactiveerde deegontwikkeling bleek het, met wat verdere aanpassingen, wel mogelijk brood van goede kwaliteit met rijsonderbreking te verkrijgen; dus deegontwikkeling tijdens het kneden in plaats van tijdens de rijs. De reden dat een lang voorproces niet en een kort wel geschikt is voor rijsonderbreking ligt in het feit dat de oplosbaarheid van koolzuurgas in water, en ook in deegvocht, sterk stijgt naarmate de temperatuur daalt; die van stikstof daarentegen neemt nauwelijks toe (tabel 3).

Tabel 3. Oplosbaarheid in water van stikstof en koolzuurgas bij verschillende temperaturen.

temperatuur in °C	stikstof	koolzuurgas
28	14	650
22	15	800
10	18	1150
0	23	1650

Zoals al gezegd is, wordt tijdens het kneden lucht in het deeg ingeslagen en fijnverdeeld. Aan het begin van het voorproces zal het gas in deze gaskernen voornamelijk uit stikstof bestaan; de zuurstof wordt namelijk door de ademhaling van de gist zeer snel verbruikt. Tijdens de rijs groeien de gaskernen door produktie van koolzuurgas. Bij doorslagen

tijdens het voorproces wordt gas uitgedreven; aan het einde van een conventioneel voorproces is het stikstofgehalte van de gaskernen nihil. Bij een kort voorproces daarentegen is bij het vormen van de deegstukken nog ca 25% van het gas als stikstof in de kernen aanwezig. Deze stikstof zorgt ervoor dat vrijwel alle gaskernen het proces van koeling overleven, waarna ze bij verwarmen van het deeg weer groter worden door het opnemen van uit het deegvocht uitgedreven gas. Bestaan de gaskernen alleen uit koolzuurgas dan zal bij koeling het gas volledig oplossen; daardoor verdwijnen de kernen.

De structuur wordt daardoor grover, de bakaard die met de gasverdeling in het deeg samenhangt verdwijnt, en de korstkleur wordt daar waar dikkere celwanden ontstaan, door een sterkere Maillard reactie donkerder.

Dat de gassamenstelling in de kernen bij rijsonderbreking inderdaad een enorm effect heeft, is aangetoond met bakproeven, waarbij gekneet werd in koolzuurgas (Sluimer, 1978). In de figuren 5 en 6 is dat te zien.



Fig. 5

Doorsneden van broden bereid met rijsonderbreking, links met mechanische deegontwikkeling en gekneet in lucht, midden met mechanische deegontwikkeling en gekneet in koolzuurgas, rechts met een conventioneel voorproces.



Fig. 6

Het uiterlijk van de broden van figuur 5.

Links een brood gemaakt met een kort voorproces, gekneet in lucht, midden hetzelfde proces maar dan gekneet in koolzuurgas, beide degen waren in een high-speed mixer mechanisch ontwikkeld, en rechts een brood gemaakt met een conventioneel rijsproces. Alleen het brood links is goed van kwaliteit.

Rijsonderbreking is in Nederland aan het begin van de jaren 70 geïntroduceerd. Een kleine 10% van de Nederlandse bakkerijen werkt er momenteel mee en in die bedrijven blijkt dat een deel van de arbeid in de nacht naar de dag kan worden verschoven. Een wondermiddel, zoals het wel is

aangekondigd, is het echter niet. Het stelt, zoals we zagen, nogal wat beperkingen aan de procesvoering.

De problemen die zich bij diepvriezen van gistdeeg voordoen liggen in hetzelfde vlak als bij rijsonderbreking. Daar komt nog bij dat bij bewaren van deeg gedurende langere tijd de activiteit van de gist sterk achteruit gaat. Om dit te voorkomen dienen speciale maatregelen genomen te worden.

Emulgatoren

Ook de toepassing van oppervlakte actieve stoffen, is de laatste 25 jaar in de bakkerij sterk toegenomen. Overeenkomstig het spraakgebruik in de bakkerij kan men ze emulgatoren noemen. Gebruik ervan is vrij algemeen in de banketbakkerij met zijn luchtige, opgeklopte produkten, maar het geldt ook voor de broodbakkerij. In laatstgenoemde werd al lang gebruik gemaakt van lecithine en glycerol-mono-stearaat. In 1954 werd calcium-stearyl-lactylaet (CSL) ontdekt (Thomson & Buddemeyer, 1954) en deze oppervlakte actieve stof wordt momenteel in Nederland bij de broodbe-reiding veel gebruikt.

Bij gebruik van een emulgator wordt de kruim van het brood luchtiger en zachter. Het broodvolume neemt iets toe. Belangrijker voor de Nederlandse bakkerij zijn twee andere kenmerken namelijk het verbeteren van de deegstabiliteit en het grote effect bij korte rijprocessen. Om het effect op de deegstabiliteit te laten zien hebben we deeg met en zonder CSL aan het einde van de narijs geschud, om zo het trillen op de transportbanen in volledig gemechaniseerde bedrijven na te bootsen. De resultaten zijn te zien in figuur 7. Links twee doorsneden van broden zonder CSL, rechts 2 met CSL.



Fig. 7

Links doorsneden van twee broden zonder CSL, rechts met CSL. Van beide paren is het deeg links niet, rechts wel geschud aan het einde van de narijs.

Van beide paren is het deeg links niet en rechts wel geschud. Zonder schudden is het verschil tussen beide broden gering, met schudden zeer groot.

Vooral bij korte voorprocessen is het effect van een emulgator op de kwaliteit van brood zeer groot en het is niet overdreven om te stellen

dat zonder gebruik van emulgatoren de toepassing van geactiveerde deeg-ontwikkeling en daarmee ook van rijsonderbreking en diepvriezen van deeg nooit zo'n vlucht zou hebben genomen.

Slot

Uit het bovenstaande werd duidelijk dat in de bakkerij de laatste 25 jaar de werkwijzen als gevolg van toepassing van nieuwe produkten en machines zeer sterk veranderd zijn. Er werd daarbij nog niet gesproken over bloemsilo's die zo langzamerhand ook bezit hebben genomen van de bakkerij en de hoogkniepers en wagenovens die de bakkersarbeid sterk verlicht hebben. Ook worden steeds meer kant en klare produkten gebruikt of halffabrikaten die nog slechts een kleine bewerking nodig hebben. De hulpgrondstoffenindustrie heeft altijd voorop gelopen met het leveren van zogenaamde all-in broodverbetermiddelen, waardoor de bakker slechts één hulpgrondstof behoefde toe te voegen, in plaats van wat suiker, wat vet, wat lecithine, wat zout en wat melkpoeder, die alle afzonderlijk afgewogen moeten worden. Momenteel worden voor de grotere bedrijven ook afgewogen porties verbetermiddel voor één deeg geleverd, waaraan ook het zout al is toegevoegd. Dit maakt het mogelijk deegmakers in te zetten die de Nederlandse taal niet erg machtig zijn en die situatie komt in de bakkerij maar al te vaak voor.

Je kunt je afvragen of door al deze technologische veranderingen het arbeidsklimaat in de bakkerij is verbeterd. Het antwoord hangt sterk af van degene die je het vraagt. Het antwoord van de Voedingsbonden FNV zal niet erg positief zijn, gezien de brochure die ze een aantal maanden geleden over de bakkerij hebben uitgegeven (Anon., 1980). Vraag je het iemand uit het klein- of middenbedrijf dat rijsonderbreking toepast dan zal het antwoord ongetwijfeld positiever zijn. Mijn antwoord zou zijn dat er nog veel verbeterd kan worden aan de arbeidsomstandigheden. Feit is dat bij de meeste jongeren die een vakopleiding volgen, de bakkersarbeid door de nachtelijke arbeidsuren in een kwade reuk staat en ook van diegenen die uiteindelijk kiezen voor een bakkerij-opleiding vallen er nog veel af wegens het vooruitzicht van die nachtarbeid. Mijn antwoord "dat de arbeidsomstandigheden verbeterd kunnen worden" suggereert dat er in de toekomst meer mogelijkheden zullen zijn om de nachtarbeid te verminderen. Die zijn er ook wel. We mogen verwachten dat de tendensen van procesverkorting en rijsonderbreking wel enigszins zullen doorzetten. Een werkelijke doorbraak in het verminderen van de nachtarbeid kunnen we vinden in recente marktstudies. Hierbij bleek dat ca 1/3 van de Nederlandse huishoudens brood regelmatig, en ongeveer de helft brood soms, in de diepvries bewaart alvorens het te consumeren. En

het is natuurlijk te zot om 2 uur 's nachts op te staan en brood te produceren dat pas na een paar dagen geconsumeerd wordt. Wellicht zal deze tendens doorzetten en de bakkersarbeid voor het overgrote deel naar de dag verplaatsen.

Literatuur

- Anon., 1980. De donkere dagen en nachten van de bakkerij. Brochure Voedingsbonden FNV, mei 1980
- Belderok, B. et al., 1971. Diepvriezen in de brood- en banketbakkerij. Agon Elsevier, Amsterdam
- Calvel, R., 1964. La technique de ralentissement de la fermentation des patons à l'aide de chambres conditionnées à basse temperature. Bull. ENSMIC, 204: 279-283
- Elton, G.A.H. & J.J. Devlin, 1959. The Chorleywood Bread Process. Baker's Review, 76: 1047-1049
- Henika, R. & S.F. Zenner, 1960. Baking with the New Instant Dough. Development Process. Bakers Digest, June 1960
- Jongh, G., 1959/1960. Intensief kneden en direkt verdelen. Mogelijkheden voor de toepassing in de praktijk, Bakkerswereld 20 (44)
- Sluimer, P. et al., 1976. Enige opmerkingen over geactiveerde deegontwikkeling. Bakkerswereld (Misset), 37 (17): 4-7
- Sluimer, P., 1978. Rijsonderbreking bij de broodbereiding. Voedingsmiddelentechnol., 11 (13/14): 9-13
- Smak, C. & L.W.B.M. de Vries, 1975. Kneden en Kneders. Periscoop (Zeelandia), 9: 27-34
- Thomson, J.B. & B.D. Buddemeijer, 1954. Improvement of flour mixing characteristic by stearyl lactic acid salts. Cereal Chem. 31: 296-302

P.C. Moerman en B.J. Tinbergen
Instituut CIVO-Technologie TNO

Samenvatting

De stabiliteit van kookworstsoorten tijdens de verhitting kan niet uitsluitend worden verklaard door waterbinding en vetemulgering.

Uit het beschreven onderzoek blijkt dat het ontsluiten van de vlees-eiwitten tijdens het cutterproces en de daarbij optredende temperatuur bepalend zijn voor de stabiliteit. Nevenfactoren zijn het gedrag van rauw bindweefsel, waardoor de stabiliteit ongunstig kan worden beïnvloed en het beschadigen van vetcellen door een onjuiste behandeling van het vetweefsel.

Bij het onderzoek is verder gebleken dat het mogelijk is om de bewerkingen mengen en verkleinen, welke in de cutter plaats vinden, goed te beschrijven, zodat mogelijkheden aanwezig zijn om deze processen te beheersen.

Inleiding

Voor een goed begrip van de te bespreken interactie tussen grondstoffen is het nuttig eerst een globaal overzicht te geven van de meest voorkomende vleeswaren. Vleeswaren kan men indelen in twee grote groepen, namelijk de enkelvoudige vleeswaren (bereid vlees) die bestaan uit een losse spier, een deelstuk of een orgaan (bijvoorbeeld rookvlees, ham of lever) en de samengestelde vleeswaren (vleesbereidingen) waarbij de grondstoffen min of meer zijn verkleind. Tot deze laatste groep behoren onder andere alle worstsoorten en vleesconserven zoals luncheon meat. Het te bespreken onderwerp heeft betrekking op de kookworstsoorten (inclusief de conserven). Gemakshalve zal in het onderstaande steeds de term worst worden gebruikt, hoewel veel onderzoek slaat op produkten in bus.

De kookworstsoorten bestaan uit de volgende bestanddelen: vlees (spierweefsel), spek en vetweefsel, bindweefsel, water en hulpstoffen zoals nitrietpekelsout, meel, specerijen en dergelijke. Door variatie in samenstelling, mate van verkleining, uitwendige afmetingen en de gebruikte specerijen en andere smaakstoffen kan men een zeer grote verscheidenheid van produkten verkrijgen.

Wanneer men de grondstoffen mengt en daarna verkleint tot de gewenste fijnheid zal men zonder meer geen stabiel produkt verkrijgen dat gepasteuriseerd of gesteriliseerd kan worden. Deze instabiliteit blijkt uit de afscheiding van vet en gelei tijdens de verhitting, de zogenaamde vet- en geleiafzet. In de loop van de tijd zijn er verschillende werkwijzen ontwikkeld die leiden tot stabiele produkten. In de praktijk wordt van deze produkten gezegd dat ze een goede "binding" bezitten.

Het doel van het beschreven onderzoek is meer inzicht te verkrijgen in de factoren die de stabiliteit van worstdegen beïnvloeden zowel ten aanzien van de interactie tussen de gebruikte grondstoffen als ten aanzien van de toegepaste werkwijzen.

Over de interactie tussen de grondstoffen bestaan diverse hypothesen, waarmee bepaalde verschijnselen meer of minder goed kunnen worden verklaard. Desondanks wordt hiermee geen verklaring gegeven van alle verschijnselen die samenhangen met de "binding" of stabiliteit van het worstdeeg.

In dit verband kan gewezen worden op het onderzoek van Hamm (1960) over het waterbindend vermogen van vlees. Hierbij werd vooral gelet op de interactie tussen (spier)eiwit, water en hulpstoffen. Een andere publicatie die veel invloed heeft gehad is die van Hansen (1960), waarin gesteld wordt dat de bereiding van worstdegen een emulgeringsproces is, waarbij alle vetdeeltjes of vetdruppeltjes omgeven worden door een dun laagje oplosbaar eiwit. De Amerikaanse term "emulsion" voor een worstdeeg is dan ook zeer gebruikelijk. Uitgaande van deze gedachte wordt het onderzoek meestal verricht met behulp van waterige extracten van vlees waarmee vet of olie wordt geëmulgeerd. De hiermee verkregen emulsies hebben een water/eiwitverhouding van circa 100 of hoger, terwijl deze verhouding voor worstdegen rond 4 ligt.

Ook ons eigen onderzoek ging in het begin van de veronderstelling uit dat een worstdeeg een emulsie is, totdat bleek dat hiermee onjuiste conclusies werden getrokken (de Fiellietaz Goethart, 1971). Naast de emulgering spelen ook andere factoren een rol omdat niet alleen het spiereiwit, dat maar voor een klein deel oplost, maar ook het onoplosbare bindweefsel en de aard van het vetweefsel van grote invloed blijken te zijn op de stabiliteit, naast andere factoren zoals pH en dergelijke.

Begrippen en onderzoeksmethoden

Voor een goed begrip is het nuttig in het kort de bereidingswijze van een kookworstsoort te beschrijven en de hierbij gebezigde vaktermen te verklaren.

Een vaak toegepaste werkwijze is de volgende:

Mager vlees wordt met water of ijs, zout en eventueel andere hulpstoffen sterk verkleind tot een homogene visceuze massa ontstaat die farce wordt genoemd. Tegenwoordig wordt zo'n farce meestal met een cutter gemaakt. Een cutter heeft snel draaiende messen in een (roterende) schotel. Deze farce wordt gemengd met de overige grondstoffen en ingrediënten en zonodig verkleind tot de gewenste deeltjesgrootte is verkregen. Het eindprodukt heet een worstdeeg. Dit deeg wordt overgebracht in een darm of bus en al dan niet na roken verhit waarbij een worst of vleeswaar in bus ontstaat.

In moderne apparatuur wordt de farce- en deegbereiding vaak in één arbeidsgang uitgevoerd.

Kenmerkend voor het cutterproces zijn de hoge messnelheden en de grote motorvermogens die worden gebruikt. Gelijktijdig met het verkleinen (en mengen) vindt dan ook een temperatuurstijging plaats. Om dat te beperken worden bijna steeds gedeeltelijk bevroren grondstoffen of ijs gebruikt. De cuttertijd is vooral bepalend voor de fijnheid of deeltjesgrootte en de farce- of deegtemperatuur voor de "binding" of stabiliteit tijdens de verhitting. Dit wordt in de volgende paragraaf nader toegelicht.

De methode die bij dit onderzoek werd toegepast was meestal de volgende: Tijdens het cutterproces werden op vooraf bepaalde tijdstippen monsters genomen van de farce en/of het worstdeeg, terwijl gelijktijdig de temperatuur werd gemeten. Hoewel de schotelvulling geen grote invloed uitoefent op de werking van de cutter is het effect toch niet geheel te verwaarlozen. De grootte van de monsters moet daarom zodanig zijn dat na beëindiging van de proef de schotel nog redelijk gevuld is; meestal was het monster kleiner dan 5% van de schotelvulling. De monsters werden overgebracht in kleine conservenbussen en na gesloten te zijn verhit op één of meerdere temperaturen. Na afkoeling, zodat het vet weer was gestold, maar de gelei nog vloeibaar was, werd het vet en de gelei afzonderlijk verzameld, gewogen en berekend als percentage van de businhoud.

Met behulp van deze methode, waarbij het in de praktijk toegepaste cutterproces zo dicht mogelijk wordt benaderd, is de invloed van een groot aantal factoren op de "binding" onderzocht. In het onderstaande worden de voornaamste factoren besproken. Daarna worden nog enkele proces-technologische aspecten van het cutterproces behandeld, namelijk het mengen en verkleinen.

Alvorens tot de bespreking over te gaan dienen er nog twee opmerkingen te worden gemaakt:

1. Het onderzoek heeft betrekking op de bereiding van worstdegen bij lage temperaturen met behulp van een farce. Deze werkwijze wordt in

de praktijk veel toegepast. Daarnaast kent men echter een andere werkwijze waarbij temperaturen boven 25°C worden toegepast. Mede door het gebruik van bepaalde hulpstoffen speelt emulgering dan wel een belangrijke rol. Deze tweede werkwijze blijft echter grotendeels buiten beschouwing.

2. De meting van de "binding" geschiedde met behulp van de vet- en/of geleiafzet. Bij een stabiel deeg komt geen afzet voor, zodat ook geen variaties meetbaar zijn. Bij het onderzoek is daarom bewust de samenstelling zodanig gekozen dat het deeg niet geheel stabiel zou zijn, althans in het grootste gedeelte van het meetgebied.

Invloed van cuttertijd en- temperatuur

Het cutterproces blijkt meer te zijn dan snijden met ronddraaiende messen. Het is een vrij complex geheel dat nog niet volledig is doorgrond. Men kan in dit proces de volgende eenheidsbewerkingen of "unit operations" onderscheiden:

- verkleinen (snijden),
- mengen,
- verwarmen ("wrijvings"-warmte van de messen),
- "ontsluiten" van de eiwitten.

De eerste twee bewerkingen zijn van mechanische aard, deze worden later afzonderlijk besproken. De derde bewerking is slechts een gevolg van de twee eerste, maar is wel van grote betekenis, zoals uit het onderstaande blijkt.

- De nadruk zal hier echter gelegd worden op de vierde bewerking, het "ontsluiten" van de eiwitten. Deze bewerking is bepalend voor de "binding". Om aan te tonen dat deze vierde bewerking van wezenlijke invloed is, het volgende:

Wanneer vlees in een cutter in bevroren toestand wordt verkleind, ontstaat een korrelige rulle massa. Na ontdooien en eventueel mengen met zout en water blijft een gehaktachtige structuur bestaan.

Indien echter vlees bij temperaturen boven 0°C wordt gecutterd, vooral bij toevoeging van zout en water, ontstaat een op het oog homogene, samenhangende massa waarin slechts weinig losse deeltjes zijn te herkennen. Bij microscopisch onderzoek blijkt dat deze massa bestaat uit een amorse eiwitgel, waarin zich stukjes spier- en vetweefsel, losse vetcellen en weefselfragmenten bevinden. Kennelijk is dus de celinhoud grotendeels buiten de cellen getreden. Dit wordt nu aangeduid met het "ontsluiten". Deze amorse eiwitgel omhult alle andere bestanddelen en coaguleert bij verhitting. Hierdoor worden alle andere bestanddelen gefixeerd en ingesloten. Zolang de eiwitgel intact blijft, treedt er geen vet- en/of geleiafzet van enige betekenis op.

Wanneer we het cutterproces van de farce met grove delen vlees en spek op de voet volgen verkrijgen we het volgende beeld (Fig. 1):

- in het begin neemt de stabiliteit toe met de tijd (en de temperatuur), in deze opbouwfase (I) worden de grove bestanddelen verkleind en omhuld met de eiwitgel uit de farce;
- daarna volgt een periode waarin wel verdere verkleining plaatsvindt maar de stabiliteit niet noemenswaardig verandert: de stabiele fase (II), in deze periode stijgt de temperatuur geleidelijk;
- tenslotte begint de stabiliteit af te nemen en bij deegtemperaturen van ca. 16 tot 18°C en hoger neemt de stabiliteit zo sterk af dat bij verhitting bijna een volledige ontmenging optreedt: de instabiele fase (III).

De overgang tussen fase II en III wordt voornamelijk door de temperatuur bepaald en niet door de mate van verkleining. Vandaar dat men in de praktijk meestal ijs toevoegt om langer te kunnen cutteren zonder dat de temperatuur te hoog oploopt. Het is nog niet duidelijk of deze instabiliteit optreedt door veranderingen in de eiwitgel of door een grotere kwetsbaarheid van de vetcellen. Het gedrag van het vetweefsel wordt in de volgende paragraaf besproken. Opgemerkt moet nog worden dat bij gebruik van bepaalde hulpstoffen, zoals fosfaat en natriumcaseïnaat, fase III soms niet optreedt: ondanks de stijgende temperatuur blijft de stabiliteit constant of neemt zelfs nog toe. Bij microscopische waarneming blijkt dan dat er naast insluiting van grove bestanddelen in de eiwitgel ook emulgering plaatsvindt van kleine vetdruppeltjes: emulsiefase (IV).

Het bovenstaande geldt voor de bereiding van een deeg. De cuttertijd en -temperatuur van de farce blijken een analoge invloed te hebben. Indien de farce tot een te hoge temperatuur is gecutterd blijkt de "binding" minder goed te zijn dan wanneer de temperatuur van de farce niet hoger dan 10 à 15°C is geweest. Een en ander zou erop kunnen wijzen dat het nadelige effect van de hoge temperatuur in eerste instantie gezocht moet worden in de eiwitgel.

Gedrag van het vetweefsel

De invloed van het vetweefsel is tweeledig: de hoeveelheid en de aard of voorbehandeling van het vetweefsel spelen beide een grote rol. De invloed van de hoeveelheid vet komt hierin tot uiting dat naarmate het vetgehalte toeneemt, de gehele kromme in figuur 1 naar hogere Y-waarden verschuift. Bij lage vetgehalten zal de kromme dan ook gedeeltelijk samenvallen met de X-as (0% afzet): het gebied dat in de praktijk wordt gebruikt.

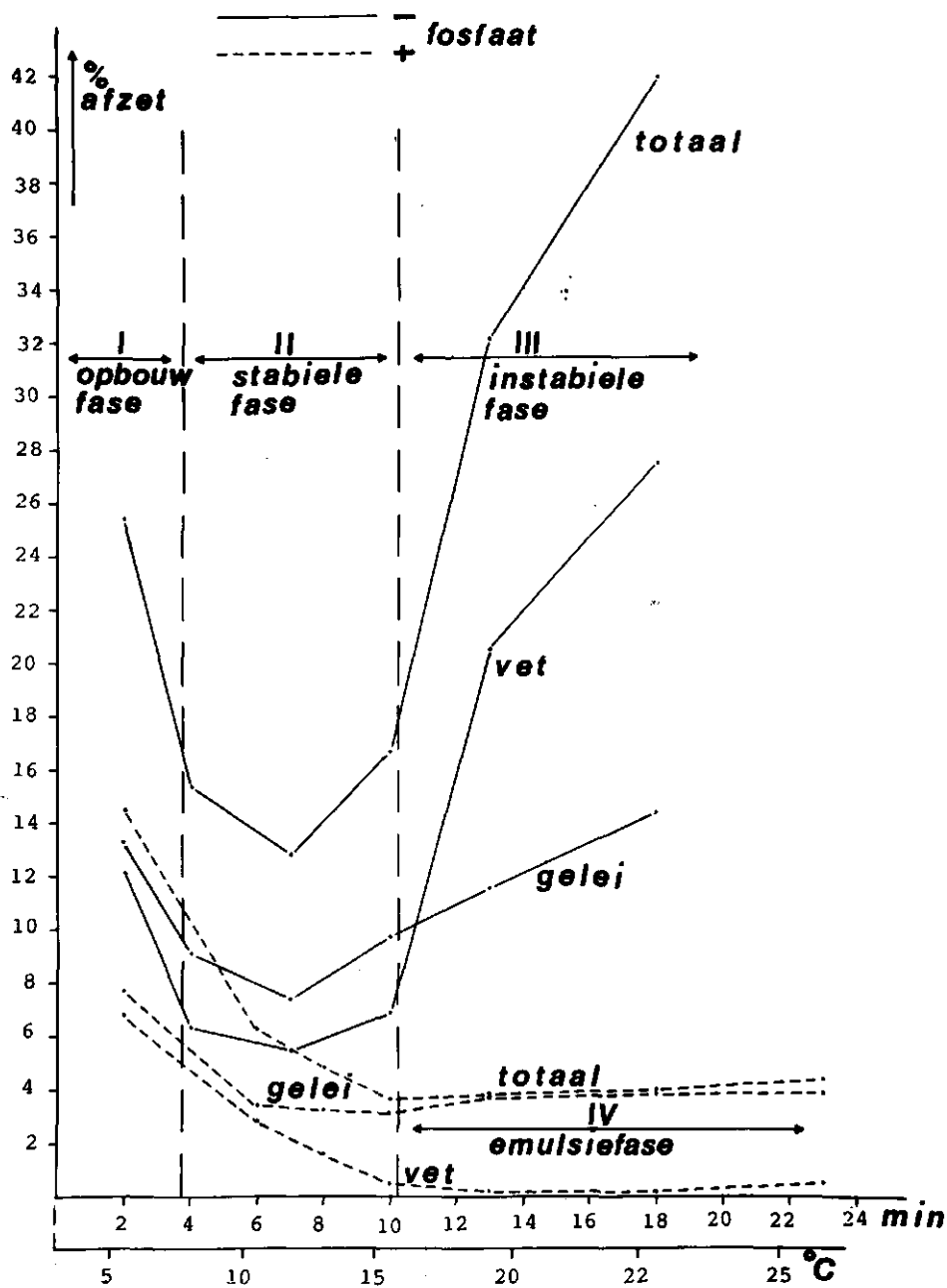


Fig. 1 Invloed van de cuttertijd en deegtemperatuur op de afzet van vet en gelei tijdens verhitting op 120°C

De aard en voorbehandeling van het vetweefsel blijkt ook een grote rol te spelen. Tinbergen & Olsman (1979) hebben aangetoond dat de hoeveelheid vetafzet samenhangt met het aantal beschadigde vetcellen. Zij deden dit door een suspensie van het worstdeeg in water bij lage temperatuur te extraheren met hexaan. Hierbij wordt alleen het vet uit beschadigde cellen geëxtraheerd. Deze hoeveelheid bleek nagenoeg gelijk te zijn aan de vetafzet na verhitting.

De kans op beschadiging is afhankelijk van de aard van het vetweefsel: rugspek met een relatief dikke celwand en kleine celinhoud geeft een stabielere produkt dan weefsels met een grote celinhoud en relatief dunne celwanden.

Ook de temperatuur waarbij het vetweefsel wordt behandeld heeft veel invloed. Bij temperaturen beneden 0°C blijkt de celwand veel sneller te worden beschadigd dan boven 0°C. Verkleinen van het spek beneden 0°C geeft dan ook meer vetafzet dan dezelfde handeling boven 0°C. Verder bleek dat het verkleinen met de wolf (gehaktmolen), vooral in bevroren toestand, veel ongunstiger was dan verkleinen met de cutter. Bij de vervorming van het vetweefsel in de worm blijken er dus meer vetcellen te worden beschadigd dan bij het snijden met de cutter.

Gedrag van het bindweefsel

Behalve spierweefsel, vetweefsel, water en hulpstoffen bevatten de meeste vleeswaren een niet te verwaarlozen hoeveelheid bindweefsel. Voor een deel is dit onlosmakelijk met het spierweefsel verbonden. Grover bindweefsel, zoals pezen en zenen kan men in principe wel verwijderen, maar dit is arbeidsintensief. Bovendien bevat vlees dat wordt gebruikt voor de worstbereiding, zoals kopvlees, schenkelvlees en dergelijke meer bindweefsel dan de duurdere vleessoorten zoals de rib, de ham en dergelijke. Bindweefsel is onoplosbaar en men zou verwachten dat hierdoor het systeem (vlees)eiwit-vet-water niet zal worden beïnvloed, dit blijkt echter wel het geval te zijn, er is een duidelijke interactie aanwezig. Ook Amerikaanse onderzoekers (Carpenter et al., 1979) kwamen tot deze conclusie.

De verklaring van de invloed van bindweefsel is gebaseerd op twee geheel verschillende waarnemingen.

1. Bij de bereiding van knakworst, waarvan het deeg zeer sterk wordt verhit, bleek het optreden van zogenaamde open kopjes en het krimpen in de lengterichting toe te nemen naarmate het bindweefselgehalte steeg. Wanneer het bindweefsel echter zorgvuldig werd uitgesorteerd en vooraf werd gekookt en daarna weer toegevoegd trad dit verschijnsel niet op.

2. Wanneer aan een worstdeeg voorverkleind bindweefsel wordt toegevoegd dan kan er tijdens de verhitting vet- en geleiafzetting ontstaan. Deze hoeveelheid is groter naarmate het bindweefsel sterker is verkleind. Wordt het bindweefsel echter voor het verkleinen gekookt, dan heeft de mate van verkleining geen invloed op de hoeveelheid vet- en geleiafzet (Fig. 2).

De verklaring hiervoor is de volgende: Evenals spiereiwit denatureert bindweefseleiwit tijdens het verhitten, maar het gedraagt zich hierbij geheel anders. In het temperatuurtraject tussen ca. 50 en ca. 60°C krimpen de bindweefselvezels sterk, boven 65°C gaat het bindweefsel zwellen (wateropname) en gaat het langzaam gedeeltelijk over in het oplosbare gelatine.

Tijdens de bereiding van de farce en het worstdeeg zal het bindweefsel fijn verdeeld worden in de massa. Door de aard van het bindweefsel zal het gedeeltelijk in de vorm van vezels uit elkaar worden geslagen en niet in de vorm van korrels. Deze vezels worden ingebed in de eiwitgel die de overige bestanddelen moet insluiten. Tijdens de verhitting, waarbij de eiwitgel tot een vaste massa coaguleert krimpen de bindweefsels en wordt de eiwitgel verstoord.

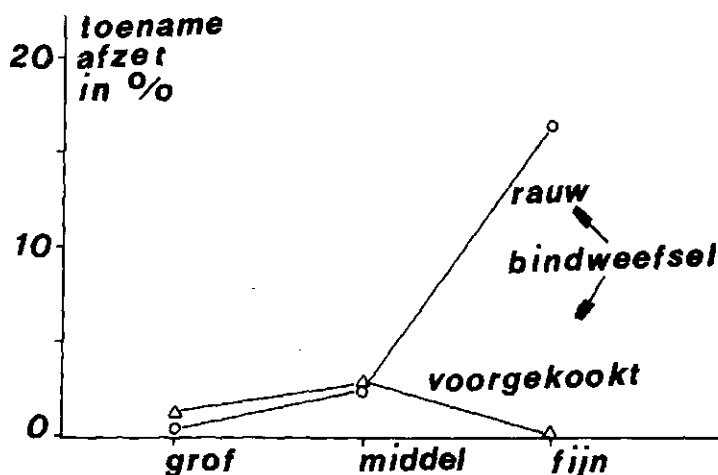


Fig. 2 Toename van de afzet door toevoeging van 10% bindweefsel dat op verschillende wijze is voorbereid

Vermoedelijk heeft dit mede tot gevolg dat ook de celwand van de vetcellen beschadigd wordt waardoor gesmolten vet kan uittreden, hetwelk door de verstoorde eiwitgel-structuur niet meer op zijn plaats wordt gehouden maar kan uittreden. Bij knakworst worden de bindweefselvezels

door het persen via een nauwe vulhoorn in de darm min of meer evenwijdig gericht. Het krimpen heeft hier het dikker en korter worden van de worstjes tengevolge waardoor de kopjes openscheuren.

Voorgekookt bindweefsel dat wordt toegevoegd zal niet meer krimpen, maar alleen onder opname van water zwellen. Hierdoor wordt eventueel niet gebonden water vastgehouden zodat het juist stabiliserend werkt.

Hulpstoffen

Niet alleen de aard van het vlees heeft invloed, ook het gebruik van hulpstoffen, met name van (poly)fosfaten, niet-vlees eiwitten, bijvoorbeeld natriumcaseïnaat, en meel.

Kort samengevat komen de effecten op het volgende neer:

- (Poly)fosfaten ($0,3\% \text{P}_2\text{O}_5$) en natriumcaseïnaat (2%) wijzigen duidelijk de vorm van de afzetkromme, omdat hierbij emulgering gaat optreden, waardoor bij hogere temperaturen de vetafzet blijft dalen in plaats van toenemen bij ca. 18°C . De geleiafzet wordt minder beïnvloed. Het niveau wordt wel lager, maar de geleiafzet daalt niet verder bij lange cuttertijden.
- Meel (4%) verandert de vorm van de afzetkromme niet, maar verschuift deze naar een lagere Y-waarde door vermindering van de geleiafzet. De vetafzet wordt slechts in zeer geringe mate beïnvloed door het meel.

Verhitting

Hoewel de verhitting van het worstdeeg geen directe invloed uitoefent op de stabiliteit, zijn de verhittingstemperaturen, en in mindere mate de duur van de verhitting, wel van invloed op de hoeveelheid vet en gelei die wordt afgescheiden. Bij verhoging van de temperatuur tijdens de verhitting verschuift de afzetkromme naar een hogere Y-waarde. De vorm van de kromme wordt daarentegen niet ingrijpend gewijzigd.

Mengen en verkleinen

Het mengen in een cutter vindt als volgt plaats:

Door de snel draaiende messen wordt materiaal uit de deegmassa opgenomen en tegen het cutterdeksel geslingerd, waarna dit weer terugvalt in de cutterschotel. Aangezien deze draait valt het materiaal op een andere

plaats terug dan het werd opgenomen. Door een speciale vorm van het deksel kan de afstand tussen opnemen en terugvallen worden vergroot, waardoor de mengende werking toeneemt.

Dankzij de beschikbare kennis uit de procestechnologie over de eenheidsbewerking "mengen", een proces dat op zeer grote schaal wordt toegepast, was het mogelijk het mengproces in een cutter goed en ook eenvoudig te beschrijven. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van het begrip menggraad (M) dat varieert van 0 (geén menging) tot 1 (volledige menging). Indien $\log(1-M)$ grafisch wordt uitgezet tegen de tijd, dan wordt een rechte lijn verkregen. De helling van deze lijn is een maat voor de mengsnelheid.

Uit het onderzoek is onder andere het volgende gebleken:

- verhoging van het toerental van de messen versnelt de menging meer dan evenredig;
- verhoging van het aantal messen kan de menging vertragen indien het deeg voor de messen wordt opgestuwd, dit komt in de praktijk veelvuldig voor;
- degen met weinig samenhang (snijworstdeeg) worden veel langzamer gemengd dan degen met veel "binding" (degen van kookworstsoorten).

Met behulp van de toegepaste methode is het mogelijk de mengende werking van cutters objectief te meten en te beschrijven. Uit een oriënterend onderzoek is gebleken dat er zich grote verschillen tussen de diverse typen kunnen voordoen.

Het verkleiningsproces in een cutter blijkt veel moeilijker te beschrijven dan het mengproces. Dit heeft verschillende oorzaken:

- de achtergrondkennis vanuit de procestechnologie is veel beperkter dan bij het mengen;
- het verkleinen wordt door meer variabelen bepaald dan het mengen;
- het verkleiningsproces bij niet bevroren vleesgrondstoffen wordt vaak in sterke mate beïnvloed door het ontstaan van "binding".

Hierdoor is het (nog) niet mogelijk om de verkleinende werking van een cutter in enkele parameters objectief vast te leggen.

Wel kunnen reeds de volgende resultaten van het onderzoek worden genoemd:

- door verhoging van de messnelheid neemt het aantal deeltjes meer dan evenredig toe;
- door vergroting van het aantal messen neemt het aantal deeltjes minder dan evenredig toe;
- scherpe messen geven een veel betere verkleining dan stompe messen;
- naarmate de afstand tussen de messen en de kom groter wordt, neemt bij eenzelfde aantal omwentelingen van de messen de gemiddelde deeltjesgrootte eerst af om na het passeren van een minimum bij nog grotere afstand weer toe te nemen;

- de extraheerbaarheid van eiwit uit vlees is reeds na een betrekkelijk korte verkleining maximaal.

Wanneer dit laatste wordt vergeleken met hetgeen eerder vermeld is, dan blijkt dat na het effectief ontsluiten van het eiwit ter verkrijging van een optimale binding een veel langere cuttertijd nodig is dan voor het verkrijgen van een maximale extraheerbaarheid. Hierbij moet er rekening mee worden gehouden, dat het extraheren zelf ook een verdere ontsluiting betekent.

Wel blijkt uit een en ander, dat het cutterproces voor worstdegen door mengen en verkleinen alleen onvoldoende wordt beschreven. Het "ontsluiten" van de eiwitten is hierbij een onmisbare aanvulling.

Literatuur

- Carpenter, J.A. et al., 1979. Relationship of collagen content to functional properties of sausage meats. Bull. Meat & Meat Prod. (Japan), 8: 35-43
- Fiellietaz Goethart, R.L. de, 1971. Determination of emulsifying properties of some non-meat proteins and the relation to sausage emulsions. Proc. 17th Meeting Eur. Meat Res. Workers, Bristol, 787-793
- Hamm, R., 1960. Biochemistry of meat hydration. Adv. in Food Res., 10: 355-463
- Hansen, 1960. Emulsion formation in finally comminuted sausage. Food Technol., 14: 565-569
- Tinbergen, B.J. & W.J. Olsman, 1979. Fat cell rupture in a comminuted meat batter as a determinative factor of heat stability. J. Food Sci., 44: 693-695

J.A. Wijsman

Instituut CIVO-Technologie TNO

Samenvatting

Het roosten van cacaobonen of van gebroken kernen, zijnde de van doppen en kiemen ontdane bonen, is in de cacao- en chocolade-industrie één van de belangrijkste bewerkingen. Een overzicht wordt gegeven van de wijze waarop het roosten op industriële schaal plaatsvindt. Vervolgens wordt nader ingegaan op een aantal aspecten van het roostonderzoek dat in samenwerking met de cacao- en chocolade-industrie werd uitgevoerd. De resultaten van een onderzoek naar de invloed van het roosten op de eigenschappen van de uit de kernen verkregen cacaoboter worden vermeld. Aandacht wordt besteed aan een onderzoek dat tot doel heeft het roostproces en de daarbij plaatsvindende reacties nader te karakteriseren.

Inleiding

Een van de technieken om voedingsmiddelen een hitte-behandeling te doen ondergaan is het roosten. Het roostproces wordt uitsluitend op industriële schaal toegepast in tegenstelling tot bijvoorbeeld koken, bakken, braden en frituren. Laatstgenoemde processen lenen zich ook voor toepassing op huishoudelijke schaal.

Het roosten of branden is een proces dat noodzakelijk is om van een ongenietbare zo niet oneetbare grondstof te komen tot een consumabel eindprodukt en/of halffabrikaat. Sprekende voorbeelden van produkten waarbij dit het geval is zijn koffie en cacaobonen.

Het branden van koffie en het roosten van cacaobonen hebben beide het doel de vorming van reuk- en smaakcomponenten en het verwijderen van ongewenste aromastoffen via verdampen van het vocht. Toch zijn er verschillen aan te wijzen. Het roosten van koffie (Eichler, 1976) is een proces dat ca. 10-15 minuten in beslag neemt, waarbij temperaturen worden toegepast van 200-220 °C. Is echter donker gebrande koffie gewenst, dan zal de roosttemperatuur dienen te stijgen tot ongeveer 250 °C. Bij het branden van cacaobonen daarentegen worden lagere temperaturen aangewend. Het temperatuurtraject waarbinnen geroost wordt zal in het algemeen liggen tussen 120 °C en 140 °C. Indien de bonen gebruikt worden voor de chocoladebereiding zal "laag" gebrand worden; bij verwerking

tot cacaopoeder is een hogere temperatuur noodzakelijk. Het roosten zal ook veel langer moeten worden doorgezet dan bij het branden van koffie: brandtijden tot 1 uur zijn geen uitzondering. Het roosten zal het verwijderen van het dopmateriaal en het verkleinen van de cacaokernen vergemakkelijken.

Nederland behoort voor wat betreft de export van cacao- en chocolade-produkten tot één van de belangrijkste landen in de wereld: nummer één voor cacaoboter én voor cacaopoeder. De omvang van de cacao- en chocolade-industrie in Nederland moge blijken uit de in- en uitvoercijfers over 1979: $210 \cdot 10^6$ kg/f 1.584.10⁶ respectievelijk $228 \cdot 10^6$ kg/f 1.718.10⁶.

Het Instituut CIVO-Technologie TNO en met name de Afdeling Oliën, Vetten en Margarine voert in samenwerking met het grootste gedeelte van de Nederlandse cacao- en chocolade-industrie al sinds jaren onderzoekswerkzaamheden uit op het onderhavige gebied. Een aanzienlijk deel van de research activiteiten werd en wordt gewijd aan het roosten. In eerste instantie werd aandacht besteed aan de invloed van het roosten van cacaobonen op de eigenschappen van de uit de kernen door persen verkregen cacaoboter. Later heeft het onderzoeksterrein zich verlegd naar het roostproces zelf, waarbij het verkrijgen van inzicht in het hele roostgebeuren centraal staat, zodat zo optimaal mogelijk geroost kan worden.

Alvorens dieper in te gaan op een aantal resultaten verkregen uit de op laboratoriumschaal uitgevoerde roostexperimenten zal enige aandacht besteed worden aan de omstandigheden waaronder cacaobonen c.q. cacaokernen op industriële schaal geroost worden.

Het roosten op industriële schaal

De wijze waarop de verhitting van cacaobonen c.q. cacaonibs kan geschieden, zou men kunnen onderverdelen naar het principe, dat er aan ten grondslag ligt.

- De warmtetoevoer kan plaatsvinden uitsluitend door conductie. De bonen nemen de voor het roosten benodigde warmte op, doordat zij direct contact maken met verhitte oppervlakken.
- Een andere manier waarop de bonen de warmte krijgen toegevoerd is door middel van convectie, dat wil zeggen een hete luchtstroom draagt zorg voor de gewenste temperaturen. Genoemde principes worden in de industrie toegepast. In feite berust het grootste gedeelte van de industriële roostapparatuur hierop, waarbij opgemerkt moet worden dat in roostmachines veelal gebruik gemaakt wordt van zowel conductie- als convectieverhitting.

- Overdracht van warmte door middel van straling is ook een mogelijkheid. Het is gebleken dat cacaobonen geroost kunnen worden door gebruik te maken van infraroodstraling (micronisatie), die er voor zorgt dat de moleculen in de cacaobonen gaan vibreren in overeenstemming met hun eigen resonantie, hetgeen resulteert in een snelle inwendige verhitting van de bonen. Roostapparatuur gebouwd volgens dit principe wordt echter nauwelijks toegepast. Infraroodstraling wordt echter wel gebruikt om het verwijderen van de schillen van de cacaobonen te vergemakkelijken. (Attiyate, 1978). Indien men in plaats van gehele cacaobonen gebroken kernen (de nibs) wenst te branden zal het dopmateriaal eerst verwijderd moeten worden. Infrarood ontdopping kan hierbij met voordeel worden toegepast: het proces levert grotere nibs en minder fijn materiaal, terwijl schimmels, bacteriën, parasieten en insecten vernietigd worden. Dergelijke ontdopinstallaties worden dan ook op industriële schaal toegepast.
- Een andere manier om cacaobonen te roosten is door gebruik te maken van hoogfrequent trillingen, (ca 2450 MH). (Faillon et al., 1978) Hoewel dergelijke systemen voordelen (lagere procestemperaturen, betere resultaten) schijnen te hebben, wordt het hoogfrequent roosten niet op industriële schaal toegepast; onder andere hogere bedrijfskosten zullen hierbij ongetwijfeld van invloed zijn: dergelijke apparatuur moet gevoed worden met elektrische energie, terwijl bij de andere systemen primaire brandstoffen (gas) worden gebruikt.

Conductie en convectie worden zowel in batchgewijze als in continue apparatuur toegepast. Het chargegewijze roosten is echter in onbruik geraakt en in vele gevallen vervangen door roosten in continue branders. Tot eerstgenoemde apparatuur moeten de trommelroosters gerekend worden. Bij dit type kan zowel conductie- als ook convectieverwarming worden toegepast. De zogenaamde kogelroosters worden ook tot de chargegewijs werkende apparatuur gerekend. Hierin wordt de verhitting van de bonen uitsluitend door convectie bewerkstelligd.

Bij de continue branders kan men een onderscheid maken naar de wijze waarop het te roosten materiaal de brander doorloopt: horizontaal of verticaal. Als voorbeelden van horizontaal transporterende roosters kunnen genoemd worden die apparatuur waarbij de bonen in een verhitte trommel (conductie) worden voortbewogen door een wormas en verder machines waarbij het roostgoed door middel van een hete luchtstroom (convectie) tot zweven worden gebracht: de zogenaamde "fluidbed" roosters. De verticaal werkende branders worden aan de bovenkant gevoed met het te roosten materiaal, dat onder invloed van de zwaartekracht (valstroom-principe) een aantal kompartimenten doorloopt; de verhitting geschiedt

door hete lucht in tegenstroom. Van de volgens dit principe werkende branders bestaan uiteraard ook weer diverse uitvoeringen.

De invloed van het roosten op de eigenschappen van de uit de kernen verkregen cacaoboter.

Door middel van op het laboratorium uitgevoerde roostexperimenten met niet-ontdopte, gehele cacaobonen van bekende botanische en geografische herkomst werd nagegaan of het roosten van invloed is op een aantal chemische en fysische kengetallen van de door persing verkregen cacaoboters. Een en ander ook in verband met de eisen, die aan een zuivere cacaopersboter gesteld dienen te worden. Voor het branden van de bonen werd gebruik gemaakt van een laboratoriumtrommelrooster, waarvan de ronddraaiende trommelwand elektrisch kan worden verwarmd. De bonen werden geroost bij 140 °C gedurende 30 tot 35 minuten. De gebrande bonen alsmede de rauwe bonen werden zorgvuldig van dopmateriaal en van kiemen ontdaan en met een hydraulische laboratoriumhandpers bij 50 °C én 600 kg/cm² uitgeperst. De aldus verkregen en vervolgens gefiltreerde persboters werden onderzocht op een aantal analytische kengetallen. Gekozen werd voor het joodgetal, zuurgetal, onverzeepbare rest (petroleum ether methode), extinctiemeting bij 270 nm en de blauwwaarde. De laatste twee kengetallen behoeven nadere uitleg. Met behulp van extinctiemetingen bij 270 nm is het mogelijk persboters te onderscheiden van geraffineerde boters. Met name door het bleken worden triëen verbindingen gevormd, die in het UV-gebied bij ca. 270 nm absorberen. Bij het vaststellen van een minimum extinctiewaarde voor persboter is het zaak te weten of het roosten hierop van invloed is. De blauwwaarde is een grootte die aangeeft of bij het persen dopmateriaal is meegeperst; bij de bepaling wordt gebruik gemaakt van het feit dat cacaodoppen een groep van verbindingen bevatten, waarvan beheenzuuryryptamide de belangrijkste vertegenwoordiger is. Bij het roosten van niet ontdopte bonen is het heel wel mogelijk dat genoemde verbinding door migratie in de kernen komt en via het persen in de boter. De resultaten van het onderzoek zijn samengevat in tabel 1.

Tabel 1. Analytisch onderzoek van een aantal cacaopersboters, verkregen uit ongebrande en gebrande bonen van diverse herkomst; brandtemperatuur 140 °C.

Herkomst	Brand-tijd (min.)	Ongebrand					Gebrand				
		jg	zg	or	ext	bw	jg	zg	or	ext	bw
Cameroen	35	38,5	1,6	0,26	0,09	0,03	38,9	1,2	0,18	0,19	0,01
Ghana	35	37,0	1,0	0,26	0,11	0,02	37,5	1,2	0,19	0,17	0,00
Togo	35	37,6	1,1	0,27	0,09	0,00	37,6	1,1	0,18	0,18	0,01
Sierra-Leone	35	36,6	1,0	0,18	0,09	0,04	36,9	1,1	0,26	0,15	0,01
Lagos	30	37,0	1,4	0,23	0,09	0,03	37,0	1,4	--	0,17	0,00
Ivoorkust	30	36,4	1,7	0,17	0,11	0,03	36,8	1,8	0,20	0,19	0,01
St. Thomé	30	35,3	1,1	0,20	0,10	0,00	35,8	1,2	0,22	0,23	0,01
Ghana	30	36,6	1,3	0,30	0,09	0,00	36,7	1,3	0,21	0,16	0,00
Arriba	35	35,1	1,4	0,24	0,08	0,00	35,2	0,8	--	0,27	0,01
Bahia	30	37,8	0,9	0,34	0,14	0,00	38,4	1,0	0,34	0,40	0,00

jg = joodgetal; zg = zuurgetal in mg KOH/g; or = onverzeepbare rest in % (petroleumether-methode); ext = $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ bij 270 nm in iso-octaan; bw = blauwwaarde

Uit tabel 1 blijkt dat vergeleken met het ongebrande produkt het roosten van de bonen niet of nauwelijks van invloed is op de eruit verkregen persboter voor wat betreft de onderzochte kengetallen. Een uitzondering moet echter gemaakt worden voor de extinctie bij 270 nm: door het branden neemt deze gemiddeld een factor 2 toe. Een verklaring hiervoor is dat de purinen (theobromine, cafeïne) door het roosten via migratie vanuit de dop naar de kernen in de boter terecht komen. Deze verbindingen vertonen een absorptie bij 270 nm, waardoor geen juist beeld van de eventueel aanwezige triëenverbindingen wordt verkregen. De purinen dienen eerst verwijderd te worden door middel van loogwassing; twee extincties worden dan bepaald: vóór en ná loogwassing.

Uit de resultaten volgt dat boters verkregen uit gebrande en daarna zorgvuldig ontdopte bonen geen aanwijsbare hoeveelheid beheenzuurtryptamide (blauwwaarde) bevatten. Een zorgvuldig schonen van het gebrande materiaal is in de praktijk echter niet mogelijk: er zal steeds een zekere niet te vermijden hoeveelheid dopmateriaal in de kernen achterblijven. Om de invloed hiervan op de blauwwaarde van de persboters na te gaan, werden op de eerder beschreven wijze een aantal roostexperimenten uitgevoerd. De gebrande bonen werden ontdopt; zowel de doppen

als de kernen werden gemalen. Van deze produkten werden mengsels van bekende samenstelling gemaakt. De aldus verkregen monsters werden met de laboratoriumpers bewerkt. De boters werden onderzocht op blauwwaarde en extinctie bij 270 nm, dit maal zowel vóór als ná loogwassing. De resultaten zijn samengevat in tabel 2.

Tabel 2. Analytisch onderzoek van een aantal persboters, verkregen uit ongebrande en gebrande bonen, en uit mengsels van gebrande bonen en doppen; brandtemperatuur 140 °C; brandtijd 50 minuten.

Herkomst	Monster	Extinctie*		Blauwwaarde
		loogwassing vóór	ná	
Cameroen	ongebrand	0,15	0,11	0,05
	gebrand + 0% dop	0,24	0,12	0,00
	gebrand + 2% dop	0,21	0,13	0,02
	gebrand + 5% dop	0,23	0,11	0,05
	gebrand + 10% dop	0,23	0,14	0,10
	gebrand + 15% dop	0,22	0,13	0,15
Ghana	ongebrand	0,12	0,10	0,05
	gebrand + 0% dop	0,20	0,11	0,01
	gebrand + 2% dop	0,19	0,10	0,03
	gebrand + 5% dop	0,19	0,10	0,05
	gebrand + 10% dop	0,21	0,11	0,09
	gebrand + 15% dop	0,19	0,10	0,13
* extinctie = $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ bij 270 nm in iso-octaan				

Uit het verkregen cijfermateriaal blijkt dat het al dan niet aanwezig zijn van dopmateriaal bij het persen van de gebrande bonen geen invloed heeft op de bij 270 nm gevonden extinctie-waarden. Het verschil tussen de gebrande en ongebrande bonen enerzijds en het al dan niet wassen met loog anderzijds hangt samen met purinen in het persvet als gevolg van het roosten. De voor Cameroen bonen gevonden extinctie-waarden ná loogwassing zijn hoger dan de overeenkomstige waarden bij de Ghana bonen en naderen het voor cacaopersboter gestelde maximum van 0,16. Uit de resultaten volgt duidelijk dat de aanwezigheid van meer of minder dopmateriaal van grote invloed is op de blauwwaarde. Reeds een vermenging met

meer dan 5% dopmateriaal heeft een overschrijding van de gestelde norm, zijnde 0,05 ten gevolge.

Invloed van het roosten van cacaobonen op kwaliteit en eigenschappen

Bij de in de voorgaande paragraaf besproken experimenten stond de persboter centraal. In een later stadium van de samenwerking met de cacao- en chocoladeindustrie werd het terrein van onderzoek verlegd naar het roostproces zelf. Zoals reeds bij het begin werd opgemerkt is het roosten één van de belangrijkste bewerkingen in de genoemde industrietak. Het draagt in hoge mate bij tot de ontwikkeling van het cacao-aroma. De keuze van de procesparameters geschiedt momenteel nog veelal op zuiver empirische wijze.

Voor een optimale kwaliteitsbewaking en procesbesturing is een meer fundamentele kennis van het brandproces noodzakelijk. Teneinde deze leemte op te vullen werd een onderzoek opgezet, dat tot doel heeft inzicht te verkrijgen in genoemde materie.

Voor het welslagen van een dergelijk onderzoek is het een vereiste dat de roostexperimenten onder zo optimaal mogelijk gestandaardiseerde en reproduceerbare condities kunnen worden uitgevoerd. Met name parameters als brandtijd, brandtemperatuur, uniforme temperatuurverdeling in de roosters, toe te voeren elektrisch vermogen en debiet en temperatuur van de verwarmingslucht zijn van essentieel belang. De proeven waarbij de invloed van de diverse parameters werd bekeken, resulteerden in een roostopstelling met als "hart" de eerder genoemde laboratoriumtrommelrooster. De verhitting van de cacaobonen c.q. kernen geschiedt zowel door conductie (elektrische verwarming) als door convectie (hete luchtstroom). Een grondige isolatie alsmede het doorleiden van lucht door de rooster bewerkstelligt een uniforme temperatuurverdeling in de ronddraaiende trommel. Tijdens het branden moet het mogelijk zijn de roostgassen kwantitatief op te vangen. Daartoe werd een koppeling met een teflon glij-afdichting ontworpen die de verbinding vormt tussen de roterende trommel en de vastopgestelde opvangeenheid.

Met een dergelijke roostopstelling is het mogelijk de invloed van bijvoorbeeld brandtijd, brandtemperatuur, brandatmosfeer (lucht, stikstof enz.) te bestuderen. Op de resultaten van één van de uitgevoerde roostexperimenten zal nader worden ingegaan. Hierbij wordt de invloed van de brandtijd en de brandtemperatuur op het verloop van het vochtgehalte, de aldehyden, de reducerende suikers en de vluchtige zuren, die tijdens het roosten ontwijken, bestudeerd. Als monstermateriaal diende ontdopte, gebroken Bahia bonen (nibs). De resultaten zijn samengevat in tabel 3.

Tabel 3. Vocht, aldehyden, reducerende suikers en azijnzuur als functie van brandtijd en- temperatuur; Bahia nibs; eindbrandtemperatuur 120 °C en 140 °C.

120 °C-brandexperiment						140 °C-brandexperiment					
brand-temp. (°C)	vocht*	ald.	red.s.	azijnz.	brand-tijd (min)	brand-temp. (°C)	vocht	ald.	red.s.	azijnz.	
22	4,1	5	18	0	0	22	4,2	4	20	0	
45	4,1	5	18	10	10	34	3,9	4	19	sp	
89	2,7	6	15	70	20	92	3,1	6	18	80	
117	1,7	20	10	150	30	124	1,6	17	10	150	
120	1,1	29	8	270	40	139	1,0	18	3	270	
120	0,9	31	6	320	50	140	0,8	19	2	340	
120	0,7	37	4	280	60	140	0,6	21	2	360	
120	0,6	40	3	340	70	140	0,5	22	2	400	
120	0,5	45	2	380	80	140	0,4	27	-	450	

* vocht = vochtgehalte in %; ald. = aldehyden als formyl-2-pyrrol in mg/kg nibs; red.s = reducerende suikers als fructose in mg/g vetvrije droge nibs; azijnz. = azijnzuur in mg/kg nibs.

Het verloop van het vochtgehalte is bij de twee brandproeven nagenoeg identiek. In de eertste 30 á 40 minuten treedt een sterke daling op; vervolgens neemt de hoeveelheid vocht met het voortschrijden van de brandtijd slechts geleidelijk af.

Het verloop van de hoeveelheden aldehyden en reducerende suikers met de brandtijd geeft gedurende de eerste 20 minuten van het roosten een gelijk beeld te zien: er verandert nauwelijks iets. Na 20 minuten treedt echter een vrij plotselinge wijziging op: een stijging voor de aldehyden en een daling voor de reducerende suikers. De aard van het verloop is echter bij de diverse brandproeven verschillend: bij de 140°C-proef is de toename (aldehyden) respectievelijk afname (reducerende suikers) per tijdseenheid groter dan bij de 120°C-proef.

Zoals bij tabel 4 blijkt, ontwijkt er tijdens het roosten azijnzuur. De betreffende hoeveelheid is bij de 140°C-brandproef duidelijk meer dan bij die van 120°C.

Het effect van de verschillende proces-omstandigheden op de smaak van het gerooste produkt vormt uiteraard een zeer belangrijk, zo niet het belangrijkste, gegeven. De daartoe noodzakelijke organoleptische keuringen worden uitgevoerd door een groep van experts van de cacao- en chocolade industrie. Uit de verkregen keuringsresultaten werd een sensorisch kengetal afgeleid. Met behulp van computermodellen werd ge-

tracht een relatie te vinden tussen dit kengetal en de chemisch bepaalde kengetallen. Uit de resultaten van diverse roostexperimenten, waarvan de hier behandelde brandproeven met Bahia nibs een onderdeel vormden, kon met enige reserve, geconcludeerd worden dat kleine verschillen in met name de hoeveelheid reducerende suikers van belang zijn voor het geur en smaak profiel van de gerooste nibs en dat het verloop van het sensorisch kengetal met de brandtijd beschreven kan worden door een 2^e graads polynoom met als variabele een combinatie van reducerende suikers en aldehyden.

Momenteel worden roostexperimenten uitgevoerd met als doel genoemde hypothese te bewijzen.

Literatuur

- Attiyate, Y., 1978. Infra-red removal of cocoa bean skins; yield is increased, quality is improved. Food Eng. Int., 3 (8): 32-33
- Eichler, O, 1976. Kaffee und Coffeïn, 2^e editie. Springer Verlag
Berlin, Heidelberg, New York, pag. 8
- Faillon, G., C. Couashard & E. Maloney, 1978. New uses of microwave power. Food Eng. Int. 3 (9): 46-48

DE FUNCTIE VAN DE SENSORISCHE ANALYSE IN DE VOEDINGSMIDDELENTECNOLOGIE

E.P. Köster

Psychologisch Laboratorium, Rijksuniversiteit Utrecht.

Samenvatting

In de meeste bedrijven is de eerste aanzet tot sensorische analyse - het zo objectief mogelijk analyseren van de subjectieve zintuigelijke indrukken van menselijke waarnemers - uitgegaan van de behoefte aan kwaliteitscontrole. In veel bedrijven is echter het besef ontstaan dat produktontwikkeling en -verbetering noodzakelijk zijn om in een veranderende markt met succes te kunnen concurreren. De wensen van de consument veranderen en het bedrijf moet beslissen of het zijn eigen kwaliteitsstandaard daaraan wil aanpassen. Om dit te kunnen doen moeten mogelijkheden geschapen worden om de subjectieve voorkeuren die de consument uitspreekt te vertalen in hanteerbare fysische en chemische eigenschappen van het produkt. Meer en meer wordt dit het centrale probleem waarmee de sensorische analyse binnen het bedrijf zich bezighoudt. Voor het vervullen van deze waardevolle vertaalfunctie is het nodig dat er nieuwe inzichten ontstaan in de verhouding tussen instrumentele en sensorische analyse, dat de sensorische analyse nieuwe methoden ontwikkelt voor de nauwkeurige beschrijving van produkten en dat ze zich meer dan voorheen bezighoudt met het voorkeursgedrag van mensen. Bovendien is het nodig dat binnen het bedrijf organisatorische condities worden geschapen die een afdeling sensorische analyse een grote mate van onafhankelijkheid garanderen. Wanneer aan deze voorwaarden is voldaan kan de sensorische analyse zeer waardevolle bijdragen tot het voortbestaan en de groei van het bedrijf leveren.

De ontwikkeling van de sensorische analyse in het bedrijf

Het gebruik van sensorisch analytische meetmethoden in de voedingsmiddelenindustrie is de laatste twee decennia sterk toegenomen. De zorg voor de organoleptische kwaliteit van het produkt is meer en meer op de voorgrond getreden nu de voedingswaarde en de vitaminerijkdom alom zo goed worden bewaakt dat daaraan geen argumenten in de concurrentiestrijd meer kunnen worden ontleend. Bovendien is er veel meer beweging in de markt ontstaan en volgen trends en modes elkaar sneller op dan in de periode tussen de wereldoorlogen of in de eerste tijd na de laatste oorlog. Door dit alles is een grote behoefte ontstaan aan betrouwbare methoden om de subjectieve zintuigelijke indrukken van mensen op zo

objectief mogelijke wijze meetbaar te maken. Aanvankelijk zocht men het vooral in de toepassing van meer statistiek zonder veel oog te hebben voor de eigenaardigheden van het menselijk meetinstrument dat men gebruikte. De laatste jaren neemt de belangstelling toe voor methoden die op een betere manier gebruik maken van de menselijke mogelijkheden en beperkingen, omdat men zich realiseert dat de beste statistiek niet in staat is slechte metingen te verbeteren. Kennis van het menselijk instrument is een belangrijke voorwaarde voor het verbeteren van de gegevens die er mee verzameld worden. Het is vaak eigenaardig te zien met hoeveel zorg de voedingsmiddelentechnoloog zijn gaschromatografen en massaspectrometers omringt, terwijl aan de factoren die van invloed zijn op het gedrag van het menselijk meetinstrument nauwelijks aandacht wordt besteed. Over de aard van deze factoren is elders reeds uitgebreid bericht (Köster, 1975). Hier willen we eerder de rol bespreken die de sensorische analyse in het bedrijf kan spelen.

In de voedingsmiddelenindustrie bestaat een lange traditie op het gebied van ruiken en proeven. Meestal worden eindprodukten gekeurd op hun kwaliteit voordat ze de fabriek verlaten en worden grondstoffen zintuigelijk onderzocht alvorens ze ingekocht worden.

Dit werk is traditioneel altijd in handen geweest van experts, mensen die een grote ervaring met het produkt en met de grondstoffen hebben. Veel van deze experts hebben een zeer opmerkelijke kennis opgebouwd en experts zijn en blijven voor de voedingsmiddelenindustrie van grote waarde. Zij zijn het, die vaak niet alleen de huidige zintuigelijke eigenschappen van een monster goed kunnen beoordelen, maar die bovendien uit ervaring weten hoe bepaalde eigenschappen van het produkt zich qua reuk en smaak zullen ontwikkelen. Het voorbeeld bij uitstek op dit punt is de wijnexpert die met redelijke (we moeten het ook niet overdrijven) zekerheid kan voorspellen hoe een jonge wijn zich over vijf tot acht jaar zal ontwikkelen. Voor een psycholoog is het haast onbegrijpelijk dat iemand zo iets binnen de normale lengte van een mensenleven kan leren en dat nog wel zonder dat er directe terugkoppeling over het succes van de leerprestaties plaatsvindt.

Dichter bij huis kennen wij bijvoorbeeld kaasexperts die op grond van zeer subtiele zintuigelijke waarnemingen kunnen voorspellen hoe een kaas zich zal ontwikkelen. Daarnaast kan men in Nederland thee-experts vinden die een enorme kennis van thee bezitten en die in staat zijn om met theeën van vaak verschillende en wisselende herkomst melanges samen te stellen die eenzelfde karakter behouden.

Zijn met de aanwezigheid van zulke experts niet eigenlijk alle sensorische analytische problemen in een industrie opgelost, zo zal men zich afvragen. Wat moeten gewone stervelingen nog ruiken en proeven wanneer de experts het al doen? Toch zijn er aan het werken met experts een

aantal bezwaren verbonden. In de eerste plaats is het steeds moeilijker goede experts te vinden. Weinig mensen zijn bereid de vaak langdurige en eenzame weg te gaan die iemand tot een werkelijk expert maakt. Daarbij helpt het gebrek aan een echte systematische opleiding tot expert bepaald niet. Velen moeten de kunst maar zo'n beetje afkijken. Het verdient aanbeveling voor de opleiding van experts goede instructiemethoden te ontwikkelen. In de laatste jaren hebben wij daaraan reeds in enkele bedrijven gewerkt. Maar zelfs wanneer de expert goed is opgeleid en veel kennis bezit, is hij niet voor alle sensorisch analytische taken geschikt. Juist zijn kennis en ervaring met de eigen produkten van de industrie waarin hij werkt, kunnen daarbij een hinderpaal zijn. Door de sterk analytische instelling die de expert ontwikkelt, wordt hij bijvoorbeeld ongeschikt om te beoordelen wat de consument lekker vindt. Bovendien heeft hij vaak zeer vaste overtuigingen over wat hij onder kwaliteit verstaat en kan hij daardoor de grillen van de markt niet volgen. Zelfs voor traditionele produkten, zoals bijvoorbeeld koffie, kan dit een bezwaar zijn. Tenslotte zijn experts duur en als gevolg daarvan schaars in het bedrijf. Dat betekent dat men eenvoudige, sensorische analytische taken, zoals de dagelijkse controle van eindprodukten, beter kan overlaten aan een goed getraind panel. Het feit, dat een dergelijk panel uit een aantal leden bestaat (10-15), garandeert bovendien een betere representativiteit ten opzicht van de waarnemingscapaciteiten van de gewone waarnemer. In de meeste industrieën waar sensorische analyse wordt toegepast is men begonnen met de instelling van dergelijke technische controlepanelen, die met eenvoudige methoden, zoals de driehoekstest of waarderingschalen, de produkten op afwijkingen beoordelen en daarmee routinewerk uit de handen van de expert nemen. Worden er afwijkingen geconstateerd dan wordt de expert vaak ingeschakeld om de aard en de betekenis van de afwijking verder te analyseren. Het gebruik van deze panelen en van goede methoden is zeker een belangrijke eerste stap in het objectiveren van de subjectieve indrukken van mensen en wij hebben dan ook de laatste jaren in samenwerking met het CIVO en in aansluiting op de cursus sensorische analyse die we regelmatig geven, verschillende industrieën kunnen helpen om dergelijke panelen te selecteren en te trainen. Wanneer deze panelen eenmaal bestaan worden ze vaak ook voor andere doeleinden gebruikt. Zo kan men ze bijvoorbeeld laten bepalen of bij de invoering van nieuwe goedkopere grondstoffen of produktiemethoden de oorspronkelijke kwaliteit wel gehandhaafd blijft. Vaak gaat ook de afdeling produktontwikkeling van een bedrijf gebruik maken van hun diensten. Niettemin hebben dergelijke panelen hun duidelijke beperkingen. Zij zijn, evenals de experts, sterk bedrijfsgebonden en kennen de eigen produkten doorgaans zeer goed. Dit maakt hen ongeschikt om uitspraken te doen over voorkeuren, die enigszins representatief moeten zijn voor wat de gewone consument vindt.

Om daarachter te komen maken veel bedrijven gebruik van marktonderzoekers, die beschikken over grote consumentenpanels en over steekproeftechnieken die het mogelijk maken redelijk representatieve uitspraken te doen over de voorkeur en wensen van de doelgroep consumenten waarop men zich wil richten. Ook hebben wij, gezien de hoge kosten die vaak aan een uitgebreid consumentenonderzoek zijn verbonden, een aantal bedrijven aangeraden met lekenpanels van ongeveer 50 personen te werken om althans een eerste indruk te krijgen van wat niet-deskundigen van produkten vinden. Dergelijke panels komen eens per week naar het bedrijf. Men kan ze voorkeuren laten uitspreken tussen eigen produkten of nieuwe ontwikkelingen en produkten van concurrenten. Veel meer kunnen ze ons echter niet vertellen en daarmee blijft het centrale probleem, waarvoor het bedrijf zich geplaatst ziet, bestaan.

Het centrale probleem: de vertaling van consumentenvoorkeuren in produkteigenschappen

De vraag die in veel bedrijven meer en meer centraal is komen te staan is: hoe kunnen we de voorkeuren van de consument vertalen in hanteerbare produkteigenschappen die het voor het bedrijf mogelijk maken goed op de marktontwikkelingen in te spelen?

Binnen het bedrijf wordt een vaste standaard gehandhaafd voor de kwaliteit van het eigen produkt. Deze vaste standaard is zoveel mogelijk vastgelegd in fysische en chemische eigenschappen van het produkt en in procedures en bereidingswijzen waarvan niet wordt afgeweken. De sensorische analyse dient als een uiteindelijke kwaliteitscontrole en er bestaat in het bedrijf kennis over de mogelijke oorzaken van bepaalde afwijkingen in het produkt. Er kan bijvoorbeeld een fout gemaakt zijn bij het branden van koffie of er kan iets mis geweest zijn bij de opslag. Iedere afwijking die geconstateerd wordt leidt in het gunstigste geval tot een correctieve maatregel die voorkomt dat in de toekomst opnieuw afwijkingen van de vaste standaard worden geconstateerd. We noemen dit geheel van metingen en procedures, produktonderhoud. Het vormt een essentieel deel van de zorg voor het behoud van de kwaliteit. Toch kan de interne vaste standaard, die in het bedrijf gehandhaafd wordt, ertoe leiden dat het marktaandeel in de zich ontwikkelende markt, die gekenmerkt wordt door zijn eigen bewegende standaard, zich ongunstig ontwikkelt. De smaak van het publiek verandert onder allerlei invloeden en er dient produktverbetering of produktontwikkeling plaats te vinden om opnieuw aansluiting bij de bewegende standaard in de markt te vinden. Daarbij blijft echter de eis bestaan de nieuwe ontwikkeling te vertalen in een nieuwe vaste standaard waarmee de produktie-afdelingen en de kwaliteitscontrole kunnen werken. Ook voor het nieuwe produkt moeten de

grenzen waarbinnen de fysisch-chemische eigenschappen zich mogen bewegen en de procedures die daartoe leiden, worden vastgesteld en gehandhaafd. Voor de sensorische analyse betekent dat, dat er naar gestreefd moet worden om, in nauw samenspel met de produktontwikkelingsafdelingen en de mensen die de instrumentale analyse uitvoeren, te komen tot zodanige beschrijvingen van het nieuwe produkt dat er een nieuwe vaste standaard binnen het bedrijf kan worden opgebouwd. Deze taak van de sensorische analyse is de afgelopen jaren steeds meer op de voorgrond gekomen. Om hem goed te kunnen vervullen moet echter aan een aantal voorwaarden zijn voldaan die we hier achtereenvolgens willen bespreken.

De verhouding tussen de instrumentele en de sensorische analyse

De nieuwe rol die de sensorische analyse als vertaler van de voorkeursuitspraken van de consument in eigenschappen van het produkt gaat vervullen, brengt ook een omwenteling in de verhouding tussen de instrumentele analyse en de sensorische analyse met zich mee.

Maar al te vaak bestond vroeger de neiging eerst bepaalde fysische en chemische eigenschappen van het produkt vast te stellen en vervolgens het sensorisch analytische panel als het ware te testen, door na te gaan hoe goed ze verschillen in fysisch-chemische eigenschappen konden waarnemen. Vooral bij het onderzoek naar de textuur van levensmiddelen heeft dit enigszins groteske vormen aangenomen. Vrijwel iedere onderzoeker die zichzelf respecteerte begon eerst een nieuw instrument te ontwerpen voor het meten van samendrukbaarheid, scheurkracht, hardheid, elasticiteit of wat men maar wil. Vervolgens nodigde hij een panel uit om zintuigelijk dezelfde monsters te beoordelen die in zijn apparaat gemeten werden. Wie de eerste jaargangen van het Journal of Texture Studies doorkijkt, zal zien dat de correlaties tussen de fysische en de sensorische metingen vrijwel nooit hoger dan .60 uitvielen. Doorgaans werd daaruit de conclusie getrokken dat de subjectieve menselijke beoordeling toch niet zo betrouwbaar was. De vraag of het instrument wel een voor de menselijke waarnemer relevante eigenschap van het produkt mat, kwam bij sommige onderzoekers niet eens op.

In de nieuwere methoden, die voor de beschrijvende analyse van levensmiddelen zijn ontwikkeld, wordt er juist de nadruk op gelegd dat eerst de zintuigelijke eigenschappen zo eenduidig mogelijk moeten kunnen worden vastgelegd en dat het er dan pas om gaat met instrumenten de fysisch-chemische eigenschappen van het produkt te ontdekken die hoog met die sensorische eigenschappen correleren.

Belangrijk is dus in de eerste plaats de psychologisch relevante kenmerken van het produkt goed te karakteriseren en dan de instrumentele analyse te gebruiken om uit te zoeken welke (vaak complexe) fysisch-

chemische variabelen de psychologische indruk bepalen. Het oude adagium "De mens is de maat van alle dingen" steekt hier op 'venijnige wijze de kop weer op. Voor de instrumentele analyticus brengt dit problemen met zich mee, omdat het vaak om combinaties van variabelen gaat die zich niet zo makkelijk met één instrumentele aanpak laten vangen. Soms blijkt dan variatie van de bereidingsprocedures een oplossing te kunnen bieden zonder dat men nog precies begrijpt waarom. In zulke gevallen vormt dit een goede aanleiding voor verder instrumenteel onderzoek waardoor het proces beter begrepen kan worden en de complexe variabelen die mee spelen kunnen worden gedetermineerd.

Voor de acceptatie van deze nieuwe rol van de instrumentele analyse door de onderzoeker die hem moet uitvoeren, is het natuurlijk wel een vereiste dat hij een redelijk vertrouwen heeft in de stabiliteit en de betrouwbaarheid van de psychologische eigenschappen die door de sensorische analyse bepaald worden en waarbij hij zijn fysische en chemische variabelen moet zoeken. Dat betekent dus een nieuwe opgave voor de sensorische analyse en voor de psycholoog.

De ontwikkeling van beschrijvende methoden

Voor de beschrijving van de zintuigelijke eigenschappen zijn in de loop der tijden veel methoden ontwikkeld. Aanvankelijk was het kenmerkend voor deze methoden dat ze de menselijke waarnemer dwongen in een keurslijf van begrippen, die van tevoren waren vastgesteld, en die hij moest leren hanteren. Er bestaan lijsten van termen die eigenschappen van koffie en wijn beschrijven. Sommige daarvan zijn direct inzichtelijk, zoals bijvoorbeeld zuur of zoet, en zullen bij degene die ze moet leren gebruiken niet veel moeilijkheden opleveren. Andere termen zoals bijvoorbeeld "muf" of voor koffie "geil" zijn zeer dubbelzinnig. Verschillende mensen verstaan onder muf vaak verschillende produkteigenschappen en het ontdekken van wat met de term "geil" bij koffie bedoeld wordt, vergt vaak een lang leerproces, aan het eind waarvan men nog niet geheel zeker is dat alle waarnemers er hetzelfde mee bedoelen. De laatste jaren zijn methoden ontwikkeld die ervan uitgaan dat men een beschrijvend panel beter zijn eigen terminologie kan laten ontwikkelen. Het is misschien goed de best ontwikkelde methode, de zogenaamde "Quantitative Descriptive Analysis" methode, hier wat gedetailleerder te bespreken. Men selecteert een achttal panelleden op grond van een normale reuk- en smaakgevoeligheid, een goed herinneringsvermogen voor geuren en een goed vermogen om zich in taal uit te drukken. Deze panelleden worden nu gedurende een vijftal weken twee maal per week bij elkaar gebracht. In deze zittingen biedt men ze verschillende monsters aan van het soort produkt dat men wil onderzoeken (bijvoorbeeld Coladranken) en men vraagt

ze, ieder voor zich, in iedere zitting om zoveel mogelijk eigenschappen van deze soort drank op te schrijven. Halverwege de zitting vraagt men ieder van de panelleden het lijstje van termen dat hij voor de beschrijving heeft gehanteerd, ter bespreking voor te leggen. Het panel besluit dan gezamenlijk welke van deze termen voor alle leden van het panel zinvol zijn. Zij doen dit in veel gevallen door nog eens verschillende monsters te proeven en aan elkaar duidelijk te maken welke eigenschap bedoeld wordt met een term, door bijvoorbeeld elkaar monsters te laten vergelijken waarvan de één de eigenschap in sterkere mate heeft dan de ander. Wordt het panel het over een term eens dan wordt deze op een lijst geplaatst. Soms zijn daar enigszins bizar aandoende, zeer specifieke termen bij. Zo werd in het geval van Coladranken door een panel de term "doorgesneden appel (golden delicious)" als een zinvolle omschrijving van een bepaalde eigenschap aanvaard. Sommige van de Cola's hadden dit smaakkenmerk wel en andere niet. Andere termen liggen meer voor de hand, zoals bijvoorbeeld in het geval van Coladranken de term "kaneel". Alle termen die een waardering inhouden zoals "goed" of "smakelijk" worden als niet inhoudelijke omschrijvingen buiten beschouwing gelaten. In de tien zittingen worden zoveel mogelijk verschillende monsters van het produkt aangeboden, zodat het panel een goed overzicht krijgt. Na deze zittingen beschikt men over een lijst die vaak meer dan 100 door het panel aanvaarde termen omvat. Sommige van deze termen overlappen elkaar geheel of gedeeltelijk. Zo zal bijvoorbeeld naast "doorgesneden appel" ook "fruit" en "peer" kunnen voorkomen. De volgende fase van de training is er nu op gericht het aantal termen te reduceren. In de volgende zittingen beoordeelt ieder panellid ieder van de monsters van de produktsort waar het om gaat op alle termen, met behulp van een schaal waarop hij kan aangeven in welke mate de betreffende term op het betreffende monster van toepassing is. Door middel van factoranalyse wordt nu uitgezocht welke termen sterk met elkaar samenhangen en welke niet. Voor groepen van sterk samenhangende termen wordt vervolgens een nieuwe term gekozen en deze wordt weer aan het panel voorgelegd. In het geval van koffie was het op deze wijze mogelijk een aanvankelijke lijst van meer dan 90 termen tot acht karakteristieke termen terug te brengen. Deze termen kunnen nog steeds bizar aandoen (bij koffie bijvoorbeeld "hout").

Hoofdzaak is, dat het panel precies begrijpt wat er mee bedoeld wordt en ze dus éénduidig kan gebruiken om bepaalde aspecten van het produkt te beschrijven. Met deze uiteindelijk gekozen termen gaat het panel nu aan het werk. Zij vormen de basis voor het profiel van het produkt. Ieder apart monster kan er mee beschreven worden. Samen met de analytische afdelingen moet nu uitgevonden worden welke fysische en chemische eigenschappen bepalend zijn voor het al dan niet voorkomen van de met ieder

van de termen beschreven zintuigelijke eigenschappen van het produkt. Wanneer dit gelukt is heeft men een machtig instrument ontwikkeld. Het panel kan immers bepalen op welke aspecten een door de consument geprefereerd produkt van een concurrent verschilt van het eigen produkt en daarmee weet men tegelijkertijd wat men zou moeten veranderen om het eigen produkt aan te passen of juist op karakteristieke wijze van dat van de concurrent te laten verschillen.

De analyse van het voorkeursgedrag

Een ander aspect van deze nieuwe ontwikkelingen in het gebruik van de sensorische analyse is de toegenomen belangstelling voor de analyse van het voorkeursgedrag van consumenten. Traditioneel werd dit geheel aan de marktonderzoekers overgelaten. In het ongunstigste geval gaan die uitsluitend statistisch te werk. Hun uitkomsten vermelden dan hoe groot de voorkeur voor produkt A is, vergeleken met die van produkt B of C of D en gemeten in een test waarbij men mensen gevraagd heeft twee of meer monsters even te proeven en te vergelijken. De betrouwbaarheid van die uitspraak is, gezien de grote steekproef waarop ze gebaseerd is, doorgaans groot, maar ze vertelt ons weinig over de oorzaken van de preferentie en over de mate waarin de gevonden preferentie het koopgedrag van de consument zal beïnvloeden. Dit laatste realiseert de goede marktonderzoeker zich doorgaans terdege en hij heeft een heel arsenaal van methoden om ook daar meer zekerheid over te krijgen. Over de achtergronden van de preferentie en de invloed daarvan op het consumptiegedrag is hij doorgaans minder goed ingelicht. Wel gebruikt hij vragenlijsten en diepte-interviews, maar vaak blijkt dat men, om werkelijk inzicht te krijgen, beter het consumptiegedrag zelf kan bestuderen dan de uitspraken die proefpersonen over hun beleving doen. Dit is ons onder meer gebleken uit een onderzoek dat wij samen met het Rijksinstituut van de Drinkwatervoorziening hebben gedaan (Zoeteman, 1978). In dit onderzoek werden onder andere de uitspraken van een groot aantal personen over de kwaliteit van het water in hun eigen stad vergeleken met de uitslag van een panelonderzoek met een twintigtal drinkwatermonsters. Er bleek maar één vraag te zijn die werkelijk hoog correleerde met de door het panel vastgestelde kwaliteit, en dat was de simpele vraag: "Hoeveel glazen water drinkt u per dag?". Deze vraag weerspiegelt rechtstreeks het consumptiegedrag. Alle vragen naar de beleving van de consument leverden weinig informatie op. Onder andere op basis van deze ervaring hebben wij geconcludeerd dat het zinvol is uitgebreider onderzoek te doen met methoden waarin het consumptiegedrag rechtstreeks geobserveerd wordt (Köster, 1979). Ook voor de bestudering van problemen zoals de duurzaamheid en veranderlijkheid van voorkeuren leveren dergelijke methoden

betere mogelijkheden. Sensorisch-analytische afdelingen kunnen zelf veel doen om meer inzicht in voorkeuren en voorkeursgedrag te krijgen. Dit betekent wel dat een afdeling sensorische analyse in staat moet zijn een eigen onderzoeksbeleid te ontwikkelen en niet ondergesneeuwd moet blijven onder opdrachten die zij van verschillende kanten krijgt toegeschoven. De laatste voorwaarde voor het optimaal functioneren van een sensorische afdeling is daarom van organisatorische aard.

De plaats van de sensorische afdeling in het bedrijf

Het is van groot belang dat een sensorische afdeling in een bedrijf een relatief zelfstandige positie kan handhaven. Niet alleen omdat ze dan van binnen het bedrijf in samenwerking met de produktontwikkelaars initiatieven en eigen onderzoek kan ontplooiën, maar vooral ook omdat ze anders tot partij gemaakt wordt in het spanningsveld dat binnen het bedrijf bestaat tussen de kwaliteitscontrole-afdelingen en de produktie-afdelingen, als verdedigers van de vaste standaard enerzijds en de marktonderzoekers als proponenten van de bewegende standaard anderzijds. Het handhaven van een onafhankelijke positie in deze strijd is voor een goede sensorische afdeling van levensbelang. Wanneer het bedrijf over een eigen Research en Development afdeling beschikt verdient het aanbeveling de sensorisch-analytische afdeling daar als zelfstandige eenheid aan te koppelen. Is dit niet het geval dan dient op hoog niveau in het bedrijf de zelfstandige oordeelskracht van deze afdeling beschermd te worden. Is dit het geval dan kan de sensorische afdeling in het bedrijf in vele opzichten baanbrekend werk verrichten en grote financiële voordelen bieden. Wij hebben daarvan de afgelopen jaren in verschillende bedrijven goede voorbeelden gezien. Een ding moet daarbij wel opgemerkt worden. Ook in dit opzicht gaan de kosten voor de baten uit. Goed sensorisch-analytisch onderzoek kost geld. Slecht sensorisch onderzoek is niet waard om gedaan te worden en kost dus nog meer geld. Het wordt mijns inziens tijd dat men zich realiseert dat "al dat ruiken en proeven" zoals het vaak denigrerend genoemd wordt, zich een volwaardige plaats naast de instrumentele analyse heeft verworven die niet meer weg te denken is uit de voedingsmiddelentechnologie.

Literatuur

Köster, E.P., 1975. The human instrument in sensory analysis. In: Proceedings International Symposium Aroma Research, Zeist 1975. Pudoc Wageningen

- Köster, E.P., 1979. Time and frequency analysis: a new approach to the measurement of some less-well-known aspects of food preferences? In: Proceedings International Union of Food Scientists Symposium, Einsiedeln, Zwitserland oktober 1979. In druk
- Zoeteman, B.C.J., 1978. Sensory assessment and chemical composition of drinking water, Proefschrift, Utrecht

SESSIE 3

Voorzitter: Prof. Ir. B. Krol

Motto: Voedingsonderzoek bij de mens, weten en eten



THE ASSESSMENT OF NUTRITIONAL STATUS IN THE COMMUNITY

J.C. Waterlow

London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK

Abstract

The methods used for assessing nutritional status in the community must be related to the particular questions asked and the actions which are expected to follow. It is concluded that the use of an international reference for anthropometric measurements is necessary and justifiable. The choice of cut-off points has to be flexible; in principle they should be based on estimates of risk or of functional impairment rather than on purely statistical considerations. When one examines the natural history of malnutrition in Third World countries, it is apparent that it generally starts in the first few months of life. Many public health programmes have been misdirected because this has not been taken into account. Among the most important problems for future research are the causes and consequences of stunting.

Introduction

It might be thought that the subject of assessment of nutritional state is played out, so much has been written about it in recent years. However, I find that my own ideas are changing, and this is an opportunity to re-examine the subject.

Assessment is pointless unless it is related to action, or at least to a plan of action. This is a pious sentiment, which is often ignored. Sen (1973) has observed caustically, 'The Indian poor may not be accustomed to receiving much help, but they are beginning to get used to being counted'. The 'counting' is often useless. Mata (1978) has stated, I believe correctly, that much of the data collected in surveys never has been and probably never will be analysed.

There are several different kinds of questions for which answers may be needed as a basis for action. Examples are:

1. Is malnutrition in this region, community or country a public health problem?
2. How does the prevalence of malnutrition vary in different social, occupational or regional groups? This question is the logical consequence of the functional classification proposed by Payne (for example Valverde et al., 1978).

3. What is the nature of the malnutrition?
4. Has a given programme been effective? If not, why not?

The most widely used method of assessment is, or at least has been up to now, the Gomez system based on deficits in weight for age according to the Harvard standards. I have criticized this method on the grounds that it does not distinguish between the two different processes of wasting and stunting (Waterlow, 1973, 1976). On the other hand, it has been argued, I think with much force, that weight-for-age has great advantages: everyone can understand what it means, and it makes the most impact. Because this measure includes two different forms of malnutrition it gives higher prevalence rates than the other indices. This is considered to be important for convincing politicians and administrators that a problem exists. Therefore weight-for-age is an appropriate measure for tackling the first type of question, geared to a particular practical objective - to show that there is a public health problem. For this purpose it is not necessary for the measure to be very precise. It does not matter very much whether the prevalence of malnutrition is said to be 20% or 40%, since in either case the situation is obviously serious. If a higher figure has a greater psychological impact, it is legitimate to use an index which produces it, provided that we know what we are doing and do not fool ourselves. In the same way, weight-for-age may be useful for general comparisons between communities and groups (question 2 above), to indicate where the main force of a programme should be directed.

It is different when we come to the other questions. For planning programmes and for evaluating their effects it is surely necessary to have more detailed knowledge of the nature of the nutritional problem. To give one example: a supplementary feeding programme targeted to children aged 2-5 years is unlikely to have a measurable effect in the short term if, as is often the case, the children are mainly stunted rather than wasted.

References and standards

Whatever indices are used, it is the common practice to relate the measurements to some kind of standard, and then to put the children into categories according to grades of deficit. The Gomez system is based on measurements made on children in Boston nearly fifty years ago. Is it sensible to go on using this standard? The International Union of Nutritional Sciences recommended that countries should develop their own standards based on 'élite' groups (IUNS, 1971). On the other hand, a WHO

working group has recommended the adoption of an international reference, based on more recent US data, to replace the Harvard standard (Waterlow et al., 1977). Which of these views is right?

The first point to be made in examining this question is the importance of distinguishing between a reference and a standard. A reference is simply a set of measurements which are used for comparison; a standard includes the concept of something that is normal or ideal. The distinction is perhaps rather theoretical, since the same set of measurements is generally used in both ways.

In evaluating a set of measurements of growth it is convenient first to group the data by relating them to a reference. Thus it is meaningless to say that the average weight of children between 1 and 2 years was X kg, since the value of X will depend very much on the age distribution of the sample. It has more meaning to say that on average the weight of children was Y % of the reference, or Y standard deviation units below the reference, or fell on the Yth centile of the reference, because here each child is being compared with a reference of the same age or height. This is a completely neutral comparison, which does not imply any value judgment. It is obviously desirable for this purpose that people should use the same reference, so that their results are comparable. Therefore I believe that there is a need for an internationally accepted set of reference measurements. The necessary characteristics of such a reference are that it should be derived from a large sample and that the statistical parameters should be well worked out. It was for this reason that the WHO working group (Waterlow et al., 1977) chose the American figures (National Centre for Health Statistics, 1977) as an international reference.

The next step is to make a value judgment. Should the reference be regarded as a norm, or should we take some other set of figures as a norm? Goldstein & Tanner (1980) have justly criticized the use of standards based on élite groups, as proposed by IUNS, on the ground that these groups are often ethnically different from the poor people in their countries. If there are ethnic differences in the growth of children, then little is gained by using such standards. On the other side, Habicht et al. (1974) have argued that children of all ethnic groups have the same growth potential, at least for the first few years of life. The well known secular trends in growth (Cone, 1961; Cameron, 1979) and the changes that have been seen in immigrant groups (Grulich, 1958) support this view, at least as a first approximation. If it is correct that ethnic differences are not important, then we might as well use the international reference as a standard, with all the connotations implied by that word of being not only a norm but an ideal or target. This at least avoids the use of double standards for industrialized and

developing countries and the distasteful idea that what is desirable in the one is unnecessary in the other. I also disagree with the use of standards which simply represent local averages, as in Nigeria and India. This may be useful for screening, for indentifying children who fall below their peers, but it does not allow any real assessment of the nutritional state of the community as a whole.

When all is said and done, the problem of standards or targets is not a statistical but a biological problem. I have suggested that we should follow Habicht, and assume that the growth potential of all young children is the same, and equal to that of Western children. Someone from the Third World might say: 'We do not want your Western 'ideal' growth, even if our children have the potential for it. What evidence is there that it is optimal?'. All we can say is that this growth is the product of a generally favourable environment. However, as Goldstein & Tanner (1980) point out, an increase in growth may be disadvantageous if the environment as a whole does not improve.

I have long been an advocate of the view that it is 'smart to be small'. The height explosion, with consequent increased demands for food, clothing and shelter, could be potentially as dangerous as the population explosion in a world with limited resources.

Cut-off points

The problem of standards is closely linked to that of cut-off points. We use cut-off points as a rough and ready means of separating supposedly malnourished from supposedly well nourished children. On what basis are these dividing lines drawn? In an earlier paper (Waterlow, 1973) I suggested that 80% of standard weight-for-height and 90% of standard height-for-age might be used as reasonable cut-off points for wasting and stunting. These values were chosen because in round figures they represent the reference mean minus 2 standard deviations. The coefficient of variation of weight-for-height is of the order of 10% (I ignore for this purpose the fact that the distribution is skewed) and that of height-for-age rather less than 5%. Now that we have better reference data it is preferable to express deficits in terms of standard deviation units or Z-scores (Waterlow et al., 1977). This is an improvement in precision but makes no difference to the principle. If minus 2 SD is taken as the dividing line, the cut-off points are statistical, analogous to those used by clinical chemists for identifying patients with 'abnormal' results in laboratory tests.

I think that this approach is not very satisfactory and must be regarded as provisional. I can imagine the 'hard-headed administrator' responding

as follows: 'You tell me that 30% of our children are less than 80% of expected weight-for-height; you admit that in your reference population from a rich county about 3% of children fall below that limit; you admit that these children are not necessarily abnormal but just happen to be thin. What does it matter if we have rather more thin children? I am not convinced that there is a real problem'.

It is much more convincing if a cut-off point, instead of being just a statistic, represents a definable increase in risk. This is how it is used in many medical situations. For example, we judge whether or not to treat a patient for hypertension according to the level of blood pressure. The cut-off point which many of us use is 100 mm Hg. This is the level at which, as long experience has shown, there begins to be a significant increase in risk. The concept of risk applies equally in screening, as in this example, and in community assessment. The only rational definition of a cut-off point as a guide to action is in terms of risk. The cut-off point may still be flexible, since a risk which is judged acceptable in one situation may be unacceptable in another. Nevertheless, whatever point is chosen, it should be possible to justify it objectively.

A beginning has been made with this in malnutrition. Sommer & Loewenstein (1975) showed that the risk of death was greatly increased in children in the lower centiles of arm circumference for height. Kielmann & McCord (1978) showed that in children below 1 year the risk of death rose exponentially as weight-for-age fell below 80% of the Harvard standard. However, for children between 1 and 3 years there was no significant increase in risk until weight-for-age fell below 70%. This illustrates the need for flexibility in cut-off points. Chen and co-workers (1980) in a prospective study in Bangladesh have obtained figures for the excess mortality associated with various degrees of wasting and stunting. They point out that as the cut-off point is lowered, the discrimination becomes more specific but less sensitive (see also Trowbridge & Staehling, 1980).

Death is admittedly a very crude index, although a clear-cut and convincing one. Much emphasis is now being laid on the need for research on the functional effects of less severe malnutrition - effects on disease resistance, physical activity, mental development, etc. Perhaps in the future this kind of work will provide the basis for a really convincing assessment of the severity of the nutritional problem. Until then I think the best we can do is to regard cut-off points as milestones along a road or grid-lines on a map, which simply tell us whether we have made progress or are going backwards.

The concept that risk may increase exponentially is important. It means

that a small change downwards can be very serious, but also a small improvement may be a very real gain. Perhaps, therefore, "our categories of classification are too wide to be useful.

The Gomez grade II extends all the way from 75% to 60% of expected weight-for-age. The risks attached to the two ends of this single grade must be very different. In theory it would be desirable to weight the number of children at each level deficit according to the degree of risk. The need for this kind of analysis is illustrated by a recent paper of Teller et al. (1979). These authors point out that in some Central American countries, although there has been a fall in infant and child mortality and an improvement in many social indicators, the proportion of children in Gomez grades II and III has increased. For instance, in Guatemala between 1965 and 1975 the mortality rate between 0 and 4 years fell by about 20%; at the same time the proportion of children in Gomez grades II and III rose from 26.7 to 32.4%. The authors therefore question why there should have been a deterioration in nutritional state when other indicators had improved. It seems to me that a change in numbers perhaps does not mean very much unless account is also taken of a possible change in severity. In terms of aggregate risk, 10 children at 75% of expected weight-for-age may represent a less bad state than 5 children at 60%.

Other factors which have been taken into account in making comparisons of this kind are the age distribution of malnutrition and the relative prevalence of wasting and stunting (Waterlow, 1978). This brings us on to the natural history of malnutrition.

The natural history of malnutrition

Although the crude index of weight-for-age, with arbitrary cut-off points, may be good enough for demonstrating that there is a nutritional problem, I believe that when it comes to action it is necessary to have a more accurate idea of what is happening.

It seems to me a disaster that for many years action programmes have been directed towards pre-school children from 0 to 5 years as if they were a homogeneous group.

Longitudinal studies in a number of developing countries have shown that growth in both weight and height begins to fall off at least as early as 3 months (Waterlow and Rutishauser, 1974) - a conclusion which those who believe that breast feeding must be adequate for 4 - 6 months find difficult to accept. Whatever the cause of the growth failure, in many communities there are significant numbers of children in the first year of life who, in my terminology, are wasted. Thereafter those who do not

die seem to catch up in weight more easily than in height. Thus at 3 - 4 years the picture that predominates is of children who are stunted, but of relatively normal weight-for-height or even obese. In other communities there is little or no wasting, but a lag in linear growth, by North American standards, which leads to an increasing number of children being classified as stunted as they get older. This has been well shown in a study of children in refugee camps in Jordan, in spite of excellent clinics and good food rations (United Nations, 1979).

If the proposition put forward earlier is correct, that children of all ethnic groups have roughly the same growth potential, at least in the first years of life, then we have to look to some environmental factors or factors as the cause of stunting. It has been suggested (Mata, personal communication) that in some situations stunting may be regarded as a physiological adaptation. I think we have to admit that we do not know the cause of stunting. This subject has been discussed elsewhere (Waterlos, 1978).

Whatever the cause, one thing seems clear, that the process begins early in life, possibly even before birth. The question of when stunting starts needs further investigation. As Tanner has emphasized, calculation of the velocity of growth will give a much more sensitive indication of faltering than simple measurement of attained height.

If it is true that stunting begins in the first few months of life, then efforts at prevention should be concentrated on the young child and perhaps the mother. the final question is whether such efforts are worthwhile and whether stunting matters. In Bangladesh severe stunting has been found to be associated with a higher mortality (Chen et al., 1980), and in Sri Lanka with a higher incidence of vitamin A deficiency (Brink et al., 1979). Its association with retarded mental development is well known. On the other hand, in a survey in Haiti stunting was not associated with an increased morbidity from diarrhoea (Graitcer et al., 1980). Workers in India (National Institute of Nutrition, 1979) have shown that in children who were stunted but not wasted there was no defect in the immune response, at least by the tests used. Perhaps, therefore, we should regard stunting as evidence of a social rather than a purely biological handicap. It would then be what the sociologists call a 'proxy' indicator, but however useful this may be for surveillance and planning, it remains unsatisfactory if we do not understand the mechanism by which stunting is brought about.

In conclusion, I believe that if the assessment of nutritional state in the community is to lead to effective direct action, it must describe clearly the age incidence and type of malnutrition. I have never myself had the responsibility for designing an action programme, but if I had I think that in principle I would concentrate specific nutritional activi-

ties on infants below 1 year and on pregnant and lactating women. For older children what is needed are social measures aimed at improving the quality of life.

HET VASTSTELLEN VAN DE VOEDINGSTOESTAND VAN DE BEVOLKING

Samenvatting

Voor het vaststellen van de voedingstoestand van de bevolking dienen methoden te worden gebruikt welke gerelateerd zijn aan de specifieke vraagstellingen die worden aangedragen alsmede aan de maatregelen die aan de hand van de resultaten moeten worden genomen. Het wordt als noodzakelijk en juist gezien hierbij gebruik te maken van een internationaal geaccepteerde referentie voor anthropometrische metingen.

De keuze van grenswaarden ('cut-off-points') zal flexibel dienen te zijn; het vaststellen van deze waarden zal niet uitsluitend uit statistische overwegingen moeten geschieden, maar in principe gebaseerd moeten zijn op de risico's die een buiten deze grenzen vallende waarde voor de gezondheid dan wel het minder goed functioneren met zich meebrengt.

Wanneer men het ontwikkelingsproces van ondervoeding in de Derde Wereldlanden bestudeert, is het opvallend dat de eerste verschijnselen zich reeds openbaren in de eerste maanden na de geboorte. Veel volksgezondheidsprogramma's zijn op een dwaalspoor gebracht omdat men de voedingstoestand in die eerste levensmaanden niet goed heeft onderkend.

Als één van de belangrijkste problemen, waarop toekomstig onderzoek gericht zal moeten zijn, wordt oorzaak en gevolg van het achterblijven in de groei gezien.

References

- Brink, E.W., 1979. Vitamin A status of children in Sri Lanka. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32: 84-91
- Cameron, N., 1979. The growth of London schoolchildren 1904-1966: an analysis of secular trend and intra-country variation. *Ann. Hum. Biol.*, 6: 505-525
- Chen, L.C., A Chowdhury & S. Huffmann, 1980. Classification of energy protein malnutrition by anthropometry and subsequent risk of mortality. In press
- Cone, T.E., 1961. Secular acceleration of height and biologic maturation in children during the past century. *J. Pediatr.*, 59: 736-740.
- Goldstein, H. & J.M. Tanner, 1980. Ecological considerations in the creation and use of child growth standards. *Lancet*, I: 582-585
- Graitcer, P.L. et al., 1980. Anthropometric indicators of nutrition status and morbidity. In press

- Grulich, W.W., 1958. Growth of children of the same race under different environmental conditions. *Science*, 127: 515-516
- Habicht, J.P. et al., 1974. Height and weight standards for pre-school children. How relevant are ethnic differences in growth potential? *Lancet*, i: 611-615
- International Union of Nutritional Sciences, 1971. The creation of growth standards: a committee report of a meeting in Tunis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 25: 218-220
- Kielmann, A.A. & C. McCord, 1978. Weight-for-age as an index of risk of death in children. *Lancet*, I: 1247-1250
- Mata, L., 1978. The nature of the nutrition problem. In: Ed: L. Joy. *Nutrition Planning. The state of the Art.* IPC Science & Technology Press Ltd., Surrey, England. pp. 91-99
- National Center for Health Statistics, 1977. NCHS Growth Curves for Children, Birth-18 Years. United States. US Department of Health Education and Welfare, Atlanta. Publication No. (PHS) 78-1650
- National Institute of Nutrition, Hyderabad, 1979. Annual Report for 1978. Indian Council of Medical Research. pp. 51-56
- Sen, A.K., 1973. Quoted by W. Scott, 1979 In: *Poverty Monitoring in Developing Countries.* United Nations Research Institute for Social Development, Geneva (mimeographed report)
- Sommer, A. & M.S. Loewenstein, 1975. Nutritional status and mortality: a prospective validation of the QUAC stick. *Am. J. Clin. Nutr.*, 28: 287-292
- Teller, C. et al., 1979. Population and nutrition: implications of sociodemographic trends and differentials for food and nutrition policy in Central America and Panama. *Ecol. Food Nutr.*, 8: 95-109
- Trowbridge, F.L. & N. Staehling, 1980. Sensitivity and specificity of arm circumference indicators in identifying malnourished children. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33: 687-696
- United Nations, 1979. United Nations General Assembly. Health Needs of Palestinian Refugee Children. Report of the Secretary General. United Nations. A/34/463
- Valverde, V. et al., 1978. Functional classification of undernourished populations in the Republic of El Salvador. *Food Nutr.*, 4: 8-14
- Waterlow, J.C., 1973. Note on the assessment and classification of protein-energy malnutrition in children. *Lancet*, II: 87-89
- Waterlow, J.C., 1976. Classification and definition of protein-energy malnutrition. In: Eds.: G.H. Beaton & J.M. Bengoa. *Nutrition in Preventive Medicine.* WHO, Geneva. pp. 530-555
- Waterlow, J.C., 1978. Observations on the assessment of protein-energy malnutrition with special reference to stunting. *Courrier*, 28: 455-460

- Waterlow, J.C., et al., 1977. The presentation and use of height and weight data for comparing the nutritional status of groups of children under the age of 10 years. Bull. WHO, 55: 489-498 ..
- Waterlow, J.C. & I.H.E. Rutishauser, 1974. Malnutrition in man. In: Eds: J. Cravioto, L. Hambraeus & Bo Vahlquist. Early Malnutrition and Mental Development. Swedish Nutrition Foundation Symposium no. XII. Almqvist & Wiksell, Stockholm. pp. 13-26

R.J. Egger

Instituut CIVO - Toxicologie en Voeding TNO

Samenvatting

Aan de hand van enige resultaten van twee landelijke surveys bij juvenielen en adolescenten en een interventie-onderzoek bij volwassenen wordt het meer recente epidemiologische voedingsonderzoek van de afdeling Voeding van het Instituut CIVO-Toxicologie & Voeding TNO belicht. Om inzicht te krijgen in de voedingsgezondheid van de Nederlandse bevolking kan niet volstaan worden met incidenteel onderzoek bij groepen, waar toevalligerwijs aandacht voor is en toegang kan worden verkregen. Ten behoeve van voorbereiding, begeleiding en evaluatie van een voedingsbeleid in relatie tot volksgezondheid is up-to-date informatie naar omvang en kwaliteit alsmede redelijke gedetailleerdheid gewenst omtrent voedingsgewoonten, voedingstoestand, gezondheid en ziekte bij groepen en categoriën van de bevolking. Voedingssurveillance kan deze informatie verschaffen.

Inleiding

Het gezegde "der Mensch ist was er iszt" moge overdreven klinken, het vormt echter wel de rode draad waaromheen het epidemiologisch voedingsonderzoek van de afdeling Voeding van het Instituut CIVO - Toxicologie en Voeding TNO zich gedurende de afgelopen 40 jaar heeft bewogen. Dit (tot nu toe voornamelijk descriptief) epidemiologisch voedingsonderzoek wordt zowel in Nederland als in het buitenland bij bevolkingsgroepen, in opdracht van onder andere overheid, industrie, en particuliere instanties verricht. De onderzoeken hebben tot doel inzicht te verschaffen omtrent voedingsgewoonten, voedselconsumptie en voedingstoestand (voedingsgezondheid) alsmede de veranderingen welke zich in de tijd hierin voltrekken.

Naast de descriptie en inventarisatie van voedingsproblemen houdt het epidemiologisch voedingsonderzoek zich eveneens bezig met het waarom van de waargenomen fenomenen alsmede de eraan ten grondslag liggende oorzaken. Onder andere door middel van (humane) interventiestudies bij vrijwilligers.

Gezien de zeer vele onderzoeken verricht in de 40 jaar van het bestaan van de Voedingsorganisatie TNO, is het in dit kader niet mogelijk op al deze studies in te gaan.

In het navolgende zal dan ook alleen aandacht worden besteed aan enige meer recente onderzoekresultaten.

Descriptief onderzoek bij juvenielen en adolescenten

Juvenielen

Sinds 1960 vindt iedere 3 jaar een transversaal onderzoek plaats naar de voedingstoestand van 8-jarige schoolkinderen in Nederland. Dit - in internationaal opzicht unieke - onderzoek wordt verricht ten behoeve van de Oriënteringscommissie van de Voedingsraad en met medewerking van circa 30 schoolgeneeskundige diensten gespreid over het hele land. Deze driejaarlijkse zogenaamde "oriënteringen" - waarin per onderzoek gemiddeld 1600 kinderen worden onderzocht - hebben tot doel na te gaan of zich in de ontwikkeling van de voedingstoestand van (geselecteerde groepen) 8-jarigen, tendenzen manifesteren die uit volksgezondheidskundig oogpunt beleidsbijstelling (onder andere inzake gezondheidsvoorziening en opvoeding) c.q. meer uitgebreid onderzoek wenselijk maken. Als regel wordt in deze oriënteringen de voedingsgezondheid geëvalueerd aan de hand van uitkomsten van bepalingen van lengte, gewicht, twee huidplooidikten, hemoglobinegehalte en beperkt voedingsanamnestisch onderzoek. (de Wijn & Wigbout, 1969; de Wijn, 1975; de Wijn & Pikaar, 1975; de Wijn et al., 1979).

Tijdens het zesde oriënterende onderzoek in 1973/74 werden in verband met een nationale verkenning omtrent risico-indicatoren voor atherosclerotische aandoeningen tevens bloedmonsters onderzocht op totaal serumcholesterolgehalte (de Wijn & Pikaar, 1975).

Uit de afgelopen zeven oriënteringen is wat betreft de somatometrie naar voren gekomen dat voor zowel de jongens als de meisjes sinds 1960 er een seculaire verschuiving heeft plaatsgevonden van de gemiddelde lengte van +2 à + 2.5 cm en van het gemiddelde gewicht van +1 à + 1.5. (de Wijn et al., 1979).

De lengtetoeneming is in de laatste tien jaar (1968-1977) voor de jongens met 0.7 cm en voor de meisjes 0.8 cm echter slechts de helft van die in de periode 1960-1968. In de laatstgenoemde periode was de lengtetoeneming namelijk 1.5 cm voor de jongens en 1.6 cm voor de meisjes.

In tegenstelling met wat zou mogen worden verwacht blijkt uit de onderzoeken dat somatometrische verschillen naar urbanisatiegraad en regio een persistent karakter dragen. Zo bleek uit de laatste oriëntering in 1976/77 (de Wijn et al., 1979) dat de 8-jarigen uit de grote steden (Amsterdam, Rotterdam, Utrecht, Enschede en Eindhoven) minder lang maar zwaarder waren dan hun leeftijdsgenoten uit de kleinere gemeenten in de periferie. De Noord-Nederlandse kinderen waren in 1976/77 2.5 à 3 cm

langer en 1 kg zwaarder dan de Zuid-Nederlandse. Dit verschil blijkt consistent te zijn in alle onderzoeken sinds 1960. Behalve veranderingen in lengte en gewicht zijn ook veranderingen in de dikte van de subcutane vetlaag - gemeten aan de huidplooïdikten boven de m. triceps brachii en onder de angulus inferior scapulae (Tanner, 1962) - opgetreden.

Met behulp van de regressievergelijkingen van Parizcova & Roth (1972) kon uit de som van beide huidplooïdikten worden berekend dat er in Nederland, zonder de grote steden, in 1976/77 3 % adipeuze jongens (>23 % lichaamsvet) en circa 3,5 % adipeuze meisjes (>27 % lichaamsvet) waren. Dit is wat minder dan in 1973/74; toen waren er namelijk circa 4 % adipeuze jongens en meisjes.

Opmerkelijk en strijdig met wat vaak wordt beweerd is dat op grond van de tricipitale huidplooïdikte sinds 1968 de prevalentie van adipeuze 8-jarige schoolkinderen in alle subgroepen afnemend is (de Wijn et al., 1979).

Nu pas begint deze volharding van bijna 20 jaar vruchten af te werpen in de vorm van min of meer "harde" getallen omtrent trends in het voorkomen van onder andere obesitas. Continuering van deze oriëntaties, zij het in een iets lagere frequentie, zal zeker moeten geschieden.

Uit het biochemisch onderzoek kwam naar voren dat ten aanzien van het hemoglobinegehalte van zowel de jongens als de meisjes de bevindingen uit het onderzoek 1973/74 vrijwel overeenkwamen met die van de oriënteringen uit 1965/68. (de Wijn & Pikaar, 1975). Lage hemoglobinewaarden (<7.5 mmol/l) die indicatief zijn voor lichte anaemie werden in 1973/74 slechts bij 1% van de meisjes en 1.5% van de jongens aangetroffen. In 1964/65 hadden nog circa 2.5% meisjes en jongens deze lage waarden. Het totaal serumcholesterolgehalte van de 8-jarigen uit 1973/74 bedroeg gemiddeld 5.1 mmol/l voor de jongens en 5.4 mmol/l voor de meisjes (bepaling volgens Huang et al., 1961).

Adolescenten

Reeds vanaf 1958 wordt door het CIVO-TNO onderzoek verricht naar de voeding en voedingstoestand van Nederlandse adolescenten. De populaties die werden onderzocht, betroffen voornamelijk werkende jongeren, cursisten van een sportopleiding en groepen dienstplichtige militairen. (Luyken et al., 1973; Luyken & de Wijn, 1975). De resultaten van deze studies wezen op een ongunstige ontwikkeling met betrekking tot de voeding en voedingstoestand. Aangezien deze bevindingen afkomstig waren van onderzoeken bij groepen jeugdigen die zeker niet representatief geacht mochten worden voor de Nederlandse adolescent, werd op initiatief en met financiële steun van de Voedingsraad in 1976-1977 een landelijk

onderzoek verricht bij 15-16 jarige scholieren. (Van Beem en Egger, 1979).

Doelstelling van het onderzoek was de registratie van enkele facetten van de voedingstoestand van een gedefinieerde deelpopulatie van de "gezonde Nederlandse adolescent".

In totaal werden 628 mannelijke en 607 vrouwelijke 15-16 jarige volledig dagonderwijs volgende (kaukasische) adolescenten onderzocht. Deze 1235 leerlingen vertegenwoordigden 72.5 % van de middels een (naar leeftijd, geslacht, type school, regio en urbanisatiegraad) gestratificeerde (en met een random-cluster-sampling methode geselecteerde) populatie.

Variantie-analyse toonde aan dat noch voor de jongens noch voor de meisjes duidelijke verschillen naar regio en urbanisatiegraad aanwezig waren wat betreft de gemiddelde waarden van de som van vier huidplooidikten (bicipitaal, tricipitaal, subscapulaire en supra-iliacaal). Wel werden voor de meisjes type-school-verschillen geconstateerd. De meisjes van het beroepsonderwijs (BO) bleken over significant dikkere huidplooidikten te beschikken dan die van het algemeen vormend onderwijs (AVO).

Obesitas (voor de jongens meer dan 25% lichaamsvet, voor de meisjes meer dan 35% lichaamsvet) werd aangetroffen bij ruim 10% van de jongens en bij 9 % van de meisjes. Deze waarden werden op grond van (internationaal) onderzoek verwacht. Vanuit het oogpunt van Volksgezondheid is deze situatie echter ongewenst.

Ten aanzien van de gemiddelde hemoglobinewaarden (Hb) werden voor zowel de jongens als de meisjes significante verschillen naar regio en naar type school gevonden (Fig. 1a).

Klinische anaemie (Hb <7.5 resp. <6.2 mmol/l voor jongens respectievelijk meisjes) werd bij slechts 0.5 % jongens gevonden en was bij de meisjes afwezig. Subklinische anaemie werd daarentegen bij 7.5 % van de mannelijke scholieren (Hb <8.5 mmol/l) en 1.4 % van de vrouwelijke scholieren (Hb <7.5 mmol/l) aangetroffen, echter slechts 1 % (jongens) respectievelijk 0.7 % (meisjes) van de scholieren had daarbij tevens te lage waarden voor serumijzer en ijzerverzadiging.

Zowel bij de jongens als bij de meisjes werd in hoge frequentie een lage ijzervoorraad, echter zonder anaemie, aangetroffen. De betekenis voor de Volksgezondheid van deze hoge percentages afwijkende waarden zonder begeleidende anaemie voor serumijzer (jongens circa 10 %, meisjes 5.5 %), totale ijzerbindende capaciteit (jongens 2.5 %, meisjes ruim 3.5 %) en ijzerverzadiging (jongens ruim 12 %, meisjes circa 7 %) is nog onduidelijk. Nader onderzoek naar deze fenomenen zou moeten worden verricht alvorens maatregelen voor te stellen.

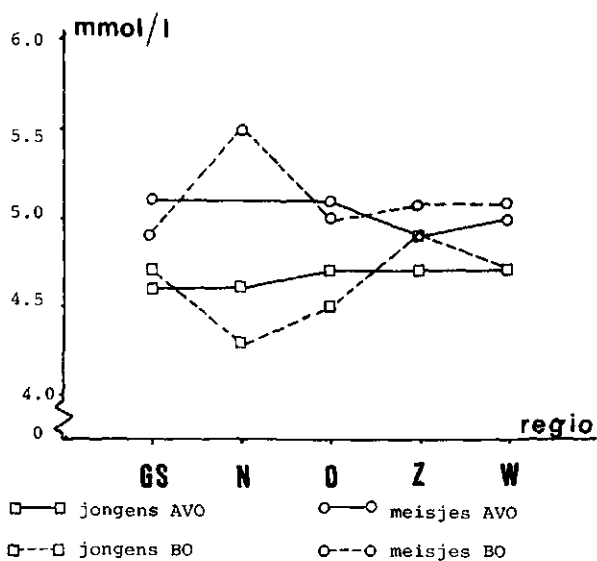
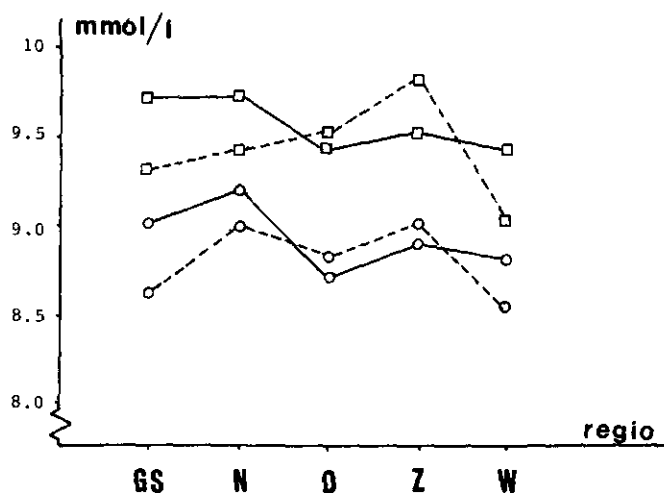


Fig. 1 Gemiddelde waarden naar sexe, regio en type school
 A : hemoglobine B: totaal serumcholesterol
 GS: de grote steden Amsterdam, Rotterdam, Den Haag en Utrecht
 N : Noord (Groningen, Friesland en Drente)
 O : Oost (Overijssel, Gelderland en IJsselmeerpolders)
 Z : Zuid (Zeeland, Noord-Brabant en Limburg)
 W : West (Noord-Holland, Zuid-Holland en Utrecht
 (uitgezonderd de grote steden))

De thiaminestatus van de adolescenten werd beoordeeld aan de hand van de bepaling van de erythrocytaire transketolase-activiteit en de in vitro-stimulering met thiaminepyrofosfaat (TPP-effect). De waargenomen lage gemiddelde erythrocyten transketolase (ETK) stimuleringswaarden (indicatief voor een gunstige cellulaire thiaminevoorziening) van zowel de jongens (1.14) als de meisjes (1.13) geven geen steun aan zekere twijfels omtrent de thiaminevoorziening bij deze groep.

In de gehele steekproef werd gemiddeld 5% van de jongens en meisjes gevonden met resultaten boven de vaak aangehouden grenswaarde voor een te hoge stimuleringswaarde (ETK-stimuleringswaarde >1.25).

Bij het beroepsonderwijs lag dit percentage voor de jongens in het Oosten en de meisjes in het Zuiden iets hoger. De betekenis voor de Volksgezondheid van deze te hoge waarden is echter niet aan te geven. Ook hier is nader onderzoek dringend gewenst.

Voor de jongens werden met betrekking tot de gemiddelde waarden van het serumcholesterolgehalte significante regionale verschillen geconstateerd; type-school-verschillen kwamen bij beide sexen niet voor. De gemiddelde waarden lagen voor de meisjes duidelijk hoger dan voor de jongens (Fig. 1b).

Dit werd verwacht op grond van ander onderzoek. Het verschil, dat in het landelijke adolescenten onderzoek geconstateerd werd, is echter groter dan in die onderzoeken werd aangetroffen. Uit tot nu toe verricht onderzoek is bekend, dat tijdens de adolescentie de meisjes over het algemeen hogere waarden vertonen dan jongens maar dat deze situatie na de adolescentie juist andersom is. De vraag dient hier gesteld te worden of het verschil tussen jongens en meisjes thans zo groot geworden is, dat ook na de adolescentie de gemiddelde waarden van de meisjes niet meer zullen dalen beneden die van jongens.

Het percentage met een waarde boven de grenswaarde van 5.9 mmol/l Huang (= 5.2 mmol/l Abell-Kendall) lag voor de meisjes hoger (14%) dan voor de jongens (5%), mede door de keuze van een gelijke grenswaarde voor beide groepen.

De hoge gemiddelde waarden alsmede de percentages te hoge waarden voor zowel jongens als meisjes zijn uit het oogpunt van Volksgezondheid ongewenst.

Uit het feit dat er géén verschillen naar urbanisatiegraad gevonden werden, maar wel voor een aantal parameters naar regio en naar schooltype, kon worden geconcludeerd, dat landelijk onderzoek nodig is ter onderkenning van de regionale problematiek en dat vervolgens de aangetroffen problematiek op regionaal niveau dient te worden bestudeerd en

aangepakt.

De bevindingen ten aanzien van obesitas en hypercholesterolemie wettigen de conclusie dat reeds op deze leeftijd gezondheidsrisico's aanwezig zijn die bijzondere aandacht vragen.

Als algemene conclusie kon worden gesteld dat voor de meeste van de onderzochte parameters de situatie bij de leerlingen van het beroeps-onderwijs minder gunstig is dan bij die van algemeen vormend onderwijs. Het is daarom gewenst een vervolgonderzoek onder schoolverlaters en werkende jongeren uit te voeren.

Interventie-onderzoek bij volwassenen

Bij 23 matig hypertensieve en 85 normotensieve vrijwilligers - gemiddelde leeftijd 35 respectievelijk 30 jaar, leeftijdsrange 20-47 jaar respectievelijk 18-48 jaar - aan boord van twee op oefening zijnde fregatten van de Koninklijke Marine, werd in de periode april t/m begin juli 1979 onderzocht óf en in hoeverre vervanging in de voeding van vetten en oliën met traditionele vetzuursamenstelling door vetten en oliën met een hoog gehalte aan linolzuur de bloeddruk kan verlagen. In het bijzonder de (onder de Nederlandse bevolking frequent voorkomende) gering en matig verhoogde bloeddruk (Egger en van de Zedde, 1980).

Voor het onderzoek is gebruik gemaakt van een twee perioden, twee behandelingen cross-over-opzet met uitwasperiode. Dat wil zeggen, na een voor beide schepen gelijke inlooperperiode van 3 weken (tijdens welke de normaal door de Koninklijke Marine verstrekte voeding, hoog in verzadigde vetzuren, werd gebruikt), volgde voor de bemanning van het ene schip een 4 weken durende periode van linolzuurrijke voeding. De bemanning van het andere schip bleef ondertussen de normale Marine voeding consumeren. Na afloop van 4 weken volgde een zogenaamde uitwasperiode van 5 weken voor beide schepen, dat wil zeggen alle vrijwilligers gebruikten nu de normale Marine voeding. Na de uitwasperiode volgde weer een proefperiode. De bemanning van het schip dat tot dan toe de normale Marinevoeding had gebruikt ging nu over op de linolzuurrijke voeding en die van het andere schip ging door met de normale Marinevoeding.

Naast bloeddrukgegevens, werden tijdens de proefperioden gegevens verzameld inzake het vetgehalte en de vetzuursamenstelling van de voeding, het totaal serumcholesterolgehalte, de urinaire 24-uurs excretie van natrium, het lichaamsgewicht en de dikte van 4 huidplooien. Deze gegevens werden geanalyseerd door middel van variantieanalyse.

Zowel ten aanzien van de systolische als van de diastolische (fase V) bloeddruk kon géén effect van een voeding met een hoger aandeel aan

cis-cis-linolzuur worden aangetoond. Wel kon het reeds meermalen beschreven effect van een linolzuurrijkere voeding op de lipidenstofwisseling worden bevestigd aan de hand van een significante daling ($P < 0.01$) van het totaal serumcholesterolgehalte met 0.4 mmol/l. In tegenstelling tot andere onderzoeken werd een significante daling ($P < 0.05$) van de urinaire 24-uurs natriumexcretie met 27.4 mmol (= 0.6 g) gevonden, terwijl de natrium/creatinine ratio eveneens een significante daling ($P < 0.05$) vertoonde.

Indien een effect op de bloeddruk al verwacht had mogen worden dan kunnen het lage zoutgebruik (gemeten als urinaire natriumexcretie), de mogelijk te geringe verschillen in linolzuurgehalte tussen de voedingsregiems, de gebruikte bloeddrukapparatuur (géén kwikmanometers in verband met de zeegang), de invloed van de zeegang op de bloeddrukmetingen en de verstorende invloed van de vele aanloophavens op de samenstelling van de voeding, alle een mogelijke (deel-) verklaring vormen voor de afwezigheid van een effect op de bloeddruk.

Voor de behandeling van de grote aantallen personen met geringe en matige verhoging van de bloeddruk is het echter van groot belang te weten in hoeverre een voeding met veel linolzuur onder anderzins "free living" omstandigheden van invloed is op de bloeddruk.

Met het oog op de bezwaren die verbonden zijn aan een grootscheepse farmacologische behandeling van bevolkingsgroepen met geringe en matige bloeddrukverhoging is het dan ook gewenst dat herhaling van het onderzoek onder meer gecontroleerde omstandigheden plaatsvindt.

CONCLUSIE

Het epidemiologisch voedingsonderzoek heeft vele doelstellingen. Belangrijk zijn echter:

- a. het opsporen van "at risk" groepen
- b. opsporen van voedingsproblemen, gerelateerd aan bepaalde nutriënten, situaties of gedragingen
- c. detecteren van trends in de tijd
- d. evalueren van interventie maatregelen

De enkele voorbeelden die in het voorgaande zijn gegeven, moeten slechts als illustratief worden beschouwd. Naast gemelde onderzoeken zijn ook surveys uitgevoerd bij onder andere de zeer kwetsbare migrantengroepen, zwangere vrouwen en dienstplichtige en vrijwillig dienende militairen.

Grote behoefte is bij ons ontstaan, en wij achten de tijd daartoe rijp, thans te komen tot een meer systematische aanpak van deze materie. Een continue surveillance van voedingsgewoonten en voedingstoestand van de Nederlandse bevolking, volgens standaard methodieken en beoordelingscriteria, dient thans de plaats in te gaan nemen van incidentele surveys bij groepen waar toevalligerwijs toegang kon worden verkregen. Tegelijkertijd zal dit nog veel basisonderzoek vergen naar de toepasbaarheid en voorspellende waarde van parameters van de voedingstoestand en methodieken van onderzoek naar voedselconsumptie en voedingsgewoonten.

Literatuur

- Beem, A. van & R.J. Egger, 1979. Onderzoek naar de voedingstoestand van 15-16 jarige scholieren in Nederland. Voedingsraad, Rapport OR 222
- Egger, R.J. & A. van de Zedde, 1980. Effect van meervoudig onverzadigde vetzuren op de bloeddruk van matig hypertensieve en normotensieve mannen. Zeist, Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek TNO. Rapport nr R. 6436
- Huang, T.C. et al., 1961. A stable reagent for the Lieberman-Burchard reaction. Anal. Chem., 33: 1405-1407
- Luyken, R. et al., 1973. De ontwikkeling van de voedingstoestand van Nederlandse adolescenten en jonge volwassenen in 1960-1970. Zeist, Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek TNO. Rapport nr. R 4045
- Luyken, R. & J.F. de Wijn, 1975. Somatometrische gegevens van Nederlandse schoolkinderen, adolescenten en jonge volwassenen van 8-25 jaar. Zeist, Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek TNO. Rapport nr. R 4842
- Parizkova, I & Z. Roth, 1972. The assessment of depotfat in children from skinfoldthickness measurements by Holtain caliper. Hum.Biol., 44: 613
- Tanner, J.M., 1962. Growth at adolescence. Blackwell Scientific Publications, Oxford
- Wijn, J.F. de & M. Wigbout, 1969. Rapport voor de Oriënteringscommissie van de VOEDINGSRAAD: Vierde oriëntering omtrent de voedingstoestand van 8-jarige schoolkinderen in Nederland (1967/68). Zeist Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek TNO. Rapport nr. R 2851
- Wijn, J.F. de, 1975. Rapport voor de ORIËTERINGSCOMMISSIE van de Voedingsraad: Zesde oriëntering omtrent de voedingstoestand van 8-jarige schoolkinderen in Nederland (1973/74). A. Somatometrisch onderzoek. Zeist, Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek TNO. Rapport nr R. 4658

Wijn, J.F. de & N.A. Pikaar, 1975. Rapport voor de ORIËTERINGSCOMMISSIE van de Voedingsraad: Zesde oriëntering omtrent de voedingstoestand van 8-jarige schoolkinderen in Nederland (1973/74) B. Hemoglobine en serum-cholesterol. Zeist, Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek TNO. Rapport nr. R 4665

Wijn, J.F. de et al., 1979. Rapport voor de Oriënteringscommissie van de Voedingsraad: Zevende oriëntering omtrent de voedingstoestand van 8-jarige schoolkinderen in Nederland (1976/77). Deel I: Somatometrisch onderzoek. Voedingsraad, Rapport OR 290

R. Luyken

Instituut CIVO - Toxicologie en Voeding TNO

Samenvatting

Voedingsonderzoek in ontwikkelingslanden is veelal gericht op onderzoek naar de voedingstoestand. Op deze wijze kunnen tekorten in de voeding worden aangegeven, mede op grond waarvan maatregelen ter verbetering getroffen kunnen worden.

Indien specifieke klinische deficiëntie-verschijnselen aanwezig zijn is een vrij zekere diagnose van tekorten in de voeding mogelijk. Om tekorten in een zo vroeg mogelijk stadium te herkennen wordt op zeer grote schaal gebruik gemaakt van antropometrische en biochemische metingen en van voedselconsumptie gegevens. Bij het interpreteren van de uitkomsten hiervan moet met vele onzekerheden rekening worden gehouden. Uitkomsten beneden of boven bepaalde grenswaarden betekenen niet altijd dat de personen in kwestie minder gezond zijn of minder goed functioneren. Het is dringend gewenst dat genoemde methodes gerelateerd worden aan uitkomsten van "gezond zijn" of optimaal functioneren. Hierbij wordt gedacht aan meting van onder andere fysisch prestatievermogen, van zintuigfysiologische functies, van de immuniteit, van het leervermogen.

Inleiding

Bij dit jubileum is het nuttig enige lacunes in onze kennis en methodieken aan te geven. Het opvullen van deze lacunes kan wellicht een deel van de taken van het CIVO in de komende jaren zijn. Dit artikel is gericht op het voedingsonderzoek in de tropen. De meeste conclusies en aanbevelingen zijn echter evenzeer van toepassing op voedingsonderzoek in Westerse landen.

Onderzoek van de voedingstoestand in ontwikkelingslanden heeft onder andere ten doel het aanwijzen van tekorten in de voeding. Het beleid kan zich dan richten op aanvulling van die tekorten.

Bij onderzoek van die voedingstoestand zijn er een aantal zekerheden, maar er zijn ook vele onzekerheden die om nader onderzoek vragen.

Vrij zeker zijn wij van klinische verschijnselen van tekorten. Marasmus (extreme vermagering), tengevolge van te weinig voedsel, kan iedereen vaststellen. Iedere tropenarts kent het klinische beeld van het eiwit-

tekort: de kwashiorkor. Ook met de klinische manifestatie van vitamine A-tekort, in de vorm van xeroftalmie en (of) keratomalacie, zijn de meeste tropenartsen vertrouwd. Hetzelfde geldt voor andere deficiëntieziekten zoals: struma tengevolge van jodiumgebrek, beri-beri, riboflavinedeficiëntie, rachitis.

Onzekerheden zijn er vooral bij het epidemiologisch onderzoek van de voedingstoestand. De bedoeling hiervan is: de tekorten in de voeding vast te stellen lang voordat het tot klinische afwijkingen komt. Dit ter preventie van de klinische ziekten en vooral van de blijvende ellendige gevolgen, zoals bijvoorbeeld cretinisme bij jodiumgebrek; blindheid tengevolge van vitamine A-tekort; verminderde intellectuele functies na vroeger doorgemaakte kwashiorkor (Winick, 1976).

Het epidemiologisch onderzoek van voedingstoestand geschiedt al sedert decennia volgens algemeen aanvaarde richtlijnen die ook in talrijke handleidingen zijn vastgelegd (Christakis, 1973; Jelliffe, 1966; ICNND, 1963).

Er wordt gewoonlijk gebruik gemaakt van vier methoden van onderzoek: klinisch onderzoek, antropometrie, biochemie, bepaling van de voedselconsumptie. Bij de drie laatstgenoemde methoden resulteren de waarnemingen in getallen die vergeleken worden met grenswaarden. Afwijkingen van die grenswaarden worden als "tekorten" (respectievelijk als "teveel") geïnterpreteerd. Het grote probleem is de onzekerheid van die grenswaarden.

Bij deze wijze van onderzoek meet men namelijk niet hoe de betreffende bevolking lichamelijk of geestelijk functioneert. Dit functioneren kan betekenen: "gezond zijn" of zich gezond voelen, een goede weerstand tegen infecties hebben, wanneer nodig in staat zijn om een behoorlijk lichamelijk prestatievermogen op te brengen, goede intellectuele functies te ontplooiën, over een behoorlijke reproducerende capaciteit te beschikken, enz. Allen zeer moeilijk meetbare eigenschappen. Toch menen wij dat toekomstig onderzoek vooral in de richting moet gaan van het zoeken naar verbanden tussen het functioneren en parameters van voedingstoestand.

In het volgende zullen enkele tekortkomingen van de genoemde methoden van onderzoek van de voedingstoestand besproken worden. Verder zal geprobeerd worden aan te tonen dat men door het meten van "functioneren" tot andere conclusies kan komen dan bij het toepassen van uitsluitend de traditionele methoden.

Op deze wijze hopen we ook enige richtlijnen en prioriteiten van voedingsonderzoek voor de naaste toekomst te kunnen aangeven.

Antropometrie

Lengte en gewicht zijn de klassieke parameters van de voedingstoestand. Als referentiewaarden worden nog steeds de Harvard-standaarden of andere Noord-Amerikaanse standaarden gehanteerd. Wij zijn er echter zeker van dat het Amerikaanse kind overvoed is. Bij strikte hantering zou men tot de conclusie komen dat wellicht zo'n 90% van de wereldbevolking ondervoed is. Aanbevolen wordt dan ook om pas bij ondervoeding te spreken bij 80% of minder van de Harvard-standaard.

De laatste decennia worden ook omtrekmaten en huidplooidikten gemeten om de lichaamssamenstelling te beoordelen. Dat zulks een duidelijke verbetering is blijkt uit een voorbeeld van eigen onderzoek in Suriname (Luyken et al., 1965). Het gewicht en de armomtrek van Surinaamse kinderen was duidelijk minder dan van Noord-Amerikaanse. Gewoonlijk wordt dit geïnterpreteerd als minder gunstig. De dikte van het onderhuidse vet van de Surinaamse kinderen was bijna eenderde van de Amerikaanse, wellicht juist een gunstige situatie. De spiermassa verschilde niet veel.

Dat het meten van lichamelijk functioneren tot een andere interpretatie kan leiden blijkt uit een recente publikatie van Ferro Luzzi (1979). Zuid-Italiaanse kinderen waren korter en lichter dan Noord-Italiaanse. Traditionele conclusie: Zuid-Italiaantjes zijn ondervoed. Echter: hun hartslagfrequentie reageerde veel gunstiger op lichamelijke belasting, wat als beter functioneren geïnterpreteerd kan worden.

Doordrongen van de ernstige gevolgen van overvoeding, zich onder andere manifesterend in dikke huidplooien, is de Westerse onderzoeker geneigd om te concluderen: hoe dunner de huidplooien hoe beter. Er is echter natuurlijk ook een ondergrens. Waar ligt die ondergrens? Relateren van huidplooidikten aan fysiek prestatievermogen, bijvoorbeeld bij vegetariërs en (of) veganisten, kan hierin wellicht inzicht geven.

Biochemie

Serumeiwit en serum albumine-gehalte zijn traditionele parameters voor de eiwitvoorziening. Reeds in 1940 konden Van Veen en medewerkers (van Veen, 1940) dat aantonen in Goenoeng Kidoel (Zuid Djocja). Hier bestond endemisch eiwittekort, zich manifesterend in oedeem bij een zeker percentage van de bevolking. Ook bij mensen uit dit gebied die (nog) geen oedeem hadden was het serumeiwitgehalte en het serum albuminegehalte veel lager dan van mensen uit streken met voldoende eiwit.

Bij minder extreme situaties zijn de uitkomsten veel moeilijker te interpreteren. Zo vonden wij bij Surinamers een hoger in plaats van een

lager serumeiwitgehalte dan bij Europeanen in Suriname. Toch bevatte hun voeding volgens Westerse maatstaven betrekkelijk weinig eiwit. Zeer recentelijk werd bij een gezamenlijk onderzoek van het Koninklijk Instituut van de Tropen en het CIVO-TNO gevonden dat bij Surinaamse 8-jarigen in Nederland de immunoglobulines A, -G en -M hoger waren dan bij vergelijkbare Nederlandertjes (zie tabel).

Tabel Gemiddelden en standaarddeviaties van serum immunoglobulines van Surinaamse en Nederlandse kinderen in de Bijlmermeer (Egger et al., 1980)

Type immonu- globuline	Ethnische groep	Jongens			Meisjes		
		N	Gem.	s.d.	N	Gem.	s.d.
IgA (I.U./ml)	Creools	23	86,9	28,7	29	95,5	33,2
	Hindoest.	23	96,1	37,8	25	89,0	30,7
	Kaukasisch (Nederlands)	50	72,5	28,0	52	82,8	30,5
IgG (I.U./ml)	Creools	23	157,0	29,0	28	162,1	27,5
	Hindoest.	23	149,2	24,0	25	169,4	29,0
	Kaukasisch	50	120,0	27,0	52	125,7	29,1
IgM (I.U./ml)	Creools	23	137,6	45,6	29	157,2	66,9
	Hindoest.	23	139,3	47,6	25	174,7	74,1
	Kaukasisch	50	123,6	47,1	52	141,2	56,3

Betekent dit dat de Surinamers in hun moederland antistoffen hebben kunnen vormen tegen een aantal (parasitaire) infecties? Of hebben wij met een erfelijk vastgelegd verschil te maken? In het eerste geval hebben zij immunologisch goed gefunctioneerd ondanks een wat minder optimale voedingstoestand.

Een nader inzicht kan verkregen worden door in de toekomst het niveau van de immunoglobines bij Surinamers te relateren aan de verblijfsduur in Nederland.

Een tweede voorbeeld: een verhoogde stimulering van het erythrocyten enzym glutathionreductase wijst op een tekort aan riboflavine (vitamine B₂). In hetzelfde bovengenoemde onderzoek van het Koninklijk Instituut van de Tropen en het CIVO kon recentelijk worden aangetoond dat bij een hoog percentage van de Hindoestaanse Surinamers in Nederland op basis van dit criterium een suboptimale voorziening met riboflavine aangenomen moest worden. Anderzijds bleek uit het onderzoek van Haralambie (1976) dat een verhoogde stimulering van genoemd enzym bij atle-

ten gepaard ging met een veranderde neuromusculaire prikkelbaarheid, wat een minder goed functioneren zou kunnen betekenen. Of een dergelijk minder goed functioneren ook bij de Surinaamse Hindoestanen in Nederland bestaat is nog onzeker.

Voedselconsumptie

Om een indruk van de aard en hoeveelheid geconsumeerde voedingsmiddelen te verkrijgen maakt men gewoonlijk gebruik van de voedingsenquête. Uit de hoeveelheden voedingsmiddelen berekent men de voedingswaarde, dat wil zeggen het gehalte aan nutriënten zoals: eiwitten, vetten, koolhydraten, mineralen, (calcium, ijzer), vitamines. Duidelijke afwijkingen van de aanbevelingen worden als een ongunstige "voedingstoestand" geïnterpreteerd.

Die aanbevelingen zijn echter niet zo zeker als men gewoonlijk aanneemt. Er zijn dan ook aanwijzingen dat bij een nutriëntenvoorziening minder dan Westerse aanbevelingen de tropenbewoner toch goed functioneert. Ook hiervan enkele voorbeelden:

De Papoea uit het Centrale Bergland van Nieuw-Guinea voedt zich uitsluitend met bataten, de zoete aardappel (*Ipomoea batatas*). Om zijn energiebehoefte te dekken consumeert hij daarvan 2-3 kg. per dag. Volgens de Westerse aanbevelingen bevat deze voeding te weinig eiwit en veel te weinig zwavelbevattende aminozuren.

Bij het uitvoeren van stikstof-balansstudies met bataten bleek het Papoea kind toch voldoende eiwit stikstof vast te kunnen houden om te groeien. Een oppervlakkige conclusie kan luiden: onze aanbevelingen zijn niet van toepassing op de Papoea's. Maar het zou wel eens kunnen blijken dat volgens andere criteria hun functioneren niet optimaal is. Er moet serieus aan gedacht worden dat de weerstand tegen infecties bij de Papoea's slecht is en verbetert bij toediening van "beter eiwit" zoals bijvoorbeeld melkeiwit.

Metten van het functioneren van het immuun-apparaat is hierbij noodzakelijk. Plannen in die richting worden in samenwerking met het Koninklijk Instituut voor de Tropen voorbereid.

Een tweede voorbeeld: Hindoestaanse Surinaamse kinderen in Nederland gebruiken minder calcium, minder riboflavine en minder vitamine D dan volgens Nederlandse aanbevelingen gewenst is. Betekent dat ook dat hun vermogen om een behoorlijk skelet te vormen minder goed functioneert? Directe studie van onder andere de mate van kalkafzetting in het skelet en andere criteria van skeletontwikkeling is noodzakelijk.

Als derde voorbeeld kan de vetconsumptie van de tropenbewoner genoemd worden. Deze is laag tot zeer laag: in Suriname bijvoorbeeld 50 g. per dag (van der Kuyp, 1963), in Indonesië 10-25 g per dag, in Nieuw-Guinea waarschijnlijk nog lager. Wederom gezien door de Westerse bril is men geneigd dit als gunstig te beschouwen. Recentelijk wordt er echter toch voor gepleit, onder andere door de WHO, om de vetconsumptie in ontwikkelingslanden te bevorderen (Srikantia, 1979). De gedachte die hier aan ten grondslag ligt is dat men anders niet aan de noodzakelijke hoeveelheid dagelijkse energie toekomt. Moet dit streven gesteund worden, of moeten wij ervoor waken dat uiteindelijk dezelfde "overvoeding" als in Westerse landen resulteert? Hierbij doelen wij niet direkt op overgewicht maar veel eerder op andere "over-voedingsverschijnselen" zoals bijvoorbeeld: hypercholesterolemie.

Conclusie

Onze gangbare criteria voor het vaststellen van de voedingstoestand van onder andere tropenbewoners dienen getoetst te worden aan het functioneren van het menselijk lichaam. Het meten van dat functioneren is niet eenvoudig. Samenwerking met andere disciplines is noodzakelijk. We denken aan: arbeidsfysiologie, zintuigfysiologie, immunologie, psychologie.

Het basisonderzoek in deze richting kan het beste in goed functionerende Instituten in Westerse landen beginnen. Immers in deze Instituten zijn de modernste methoden beschikbaar. De resultaten dienen snel op hun bruikbaarheid getoetst te worden in het veld. Er zullen permanente onderzoekseenheden gesticht moeten worden in de tropen. Een goed voorbeeld hiervan is: de Tropical Metabolic Research Unit, University of the West-Indies, Jamaica, gesteund door de British Medical Research Council. Ook in Nederland kennen we iets dergelijks: het Medical Research Centre te Nairobi, Kenya, dependance van het Koninklijk Instituut voor de Tropen. Dit centrum heeft zelfs een onderafdeling voeding, die echter van minimale omvang is. Het CIVO-TNO steunt het werk aldaar, voor zover dat in zijn vermogen is en dat is helaas maar zeer beperkt.

Het hier beschreven onderzoek wordt gewoonlijk als fundamenteel betiteld, hoewel het toe te passen methodes betreft. In wezen gaat het hier om maatschappelijk uiterst relevant onderzoek waarvan de resultaten bij toepassing van bijzonder groot belang zijn voor het welbevinden van de mensheid, vooral in ontwikkelingslanden.

Literatuur

- Christakis, G., 1973. Nutritional assessment in health programs. Am. J. Public Health, 63, November supplement
- Egger R.J., J.H. van Ee & U.H. Renquist, 1980. Voeding en voedingstoestand van 8-9 jarige Surinaamse en Nederlandse schoolkinderen in de Bijlmermeer. Koninklijk Instituut voor de Tropen, Amsterdam/Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek TNO, Zeist
- Ferro-Luzzi, A. et al., 1979. Nutrition, environment and physical performance of pre-school children in Italy. Bibl. Nutr. Dieta, 27: 85-106
- Haralambie, G., 1976. Vitamin B2-status in athletes and the influence of riboflavin administration and neuromuscular irritability. Nutr. Metab. 20: 1-8
- ICNND. Interdepartmental Committee on Nutrition for national defense, 1963. 2nd. ed. Manual for Nutrition Surveys. National Institutes of Health, Bethesda, Md. Verkrijgbaar: Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office, Washington, DC. 20402
- Jelliffe, D.B., 1966. The assessment of the nutritional status of the community, with special reference to field surveys in developing regions of the world. World Health Organ., Geneve
- Kuyp, E. van der, 1963. Dietary survey in Surinam, 1952. Voeding, 24: 175-288
- Luyken, R., F.W.M. Luyken-Koning & H.K. Oosterhuis, 1960. Studies on the physiology of nutrition in Surinam. II. Serum proteins. Trop. Geogr. Med., 12: 233-236
- Luyken, R., F.W.M. Luyken-Koning & N.A. Pikaar, 1964. Nutrition studies in New-Guinea. Am.J. Clin. Nutr., 14: 13-27
- Luyken, R. et al., 1965. Onderzoek naar de voedingstoestand van Creoolse en Hindoestaanse bevolkingsgroepen in Suriname. Zeist, Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek TNO. Rapport nr. R 1931
- Srikantia, S.G., 1979. Use of fats and oils in child feeding. Food Nutr., FAO. 5, (1): 18-22
- Veen, A.G. van, 1940. Eiwitbepalingen in bloed van voedingsoedeempatiënten. Geneesk. Tijdschr. Ned. Indië, 80: 1747-1761
- Winnick, M., 1976. Malnutrition and brain development. Oxford Univ. Press, Londen

DE INVLOED VAN VET EN VEZEL OP DE BENUTBAARHEID VAN ENKELE MINERALEN BIJ DE MENS

W. van Dokkum

Instituut CIVO - Toxicologie en Voeding TNO

Samenvatting

In drie balansstudies van ruim twee maanden met respectievelijk 10, 12, en 12 jonge mannelijke proefpersonen (20-30 jaar) werd de invloed nagegaan van de hoeveelheid vet, de aard van het vet en van voedingsvezel op de retentie van calcium, magnesium, ijzer, zink en koper. Een duidelijke invloed van de hoeveelheid vet op de balans van de gemeten mineralen bleek niet aantoonbaar. 16 energie % linolzuur in de voeding bleek een daling van de ijzerbalans tot gevolg te hebben vergeleken met 4 energie % linolzuur. Een vergrote hoeveelheid voedingsvezel uit zemelen in brood verminderde de absorptie van de extra hoeveelheid mineralen die met de zemelen werden opgenomen. Indien om overigens geldige redenen meer linolzuur en voedingsvezel in de voeding wordt aanbevolen lijkt het noodzakelijk ook meer onderzoek te verrichten naar mogelijk minder gewenste bij-effecten, zoals invloed op de mineralenbenutting. Uit de balanswaarden en de opgenomen hoeveelheden magnesium uit de voeding lijkt een hoeveelheid van 300-400 mg. magnesium per dag voor volwassenen voldoende.

Inleiding

Reeds vele jaren wordt getracht aan de hand van de aanbevolen hoeveelheid voedingsstoffen een verantwoord voedingsmiddelenpakket samen te stellen. Het is echter de vraag of de gehanteerde aanbevolen hoeveelheden voldoende steunen op goed uitgevoerd basaal onderzoek. Voor een groot aantal voedingsstoffen (vooral vitamines en mineralen) zijn bovendien te weinig gegevens bekend dan dat tot een aanbeveling zou kunnen worden besloten. De onzekerheden blijken des te duidelijker wanneer men de aanbevelingen van verschillende landen met elkaar vergelijkt. Zo worden voor calcium aanbevolen hoeveelheden aangehouden van 400 à 500 mg. per dag in Spanje, Engeland, Canada en Indonesië tot 800 mg. per dag in Zweden, Rusland, Amerika en Nederland, in alle gevallen voor volwassenen (Truswell, 1976).

Hoewel veel onderzoek wordt uitgevoerd met als doel de verschillende factoren te bestuderen, die de processen van absorptie van voedingsstof-

fen kunnen beïnvloeden, is het netto effect van die factoren samen, resulterend in een meer "realistische" waarde voor de aanbevolen hoeveelheden, nauwelijks bekend. Men ontkomt er niet aan voor de bestudering van de vele interacties van voedingsstoffen in het maagdarmkanaal van de mens, een benadering te kiezen, waarbij de invloed van afzonderlijke voedingsstoffen op de benutting (waaronder de absorptie) van andere nutriënten wordt nagegaan. Bovendien kan op deze wijze wellicht de relatieve betekenis worden aangegeven van de factoren die de absorptie van nutriënten bepalen: Hoewel lactose de absorptie van calcium lijkt te bevorderen (Condon et al., 1970) kan worden afgevraagd of dit in de dagelijkse voeding van praktische waarde is; immers vitamine D, de Ca/P verhouding, de aanwezigheid van oxaalzuur en fytinezuur in de voeding zijn evenzo factoren die de calcium benutting beïnvloeden en dan waarschijnlijk meer dan lactose.

Het hierna beschreven onderzoek was gericht op de mogelijke invloed, die de hoeveelheid vet, de aard van het vet en de hoeveelheid voedingsvezel (uit brood) elk afzonderlijk uitoefenen op de absorptie van calcium, magnesium, ijzer en (voor voedingsvezel alleen) zink en koper.

Opzet van het onderzoek en uitvoering

In totaal zijn drie experimenten uitgevoerd met respectievelijk 10, 12, en 12 gezonde mannelijke proefpersonen in de leeftijd van 20-30 jaar, die gedurende ruim twee maanden intern op het CIVO waren ondergebracht. De opzet van het onderzoek is schematisch weergegeven in tabel 1. De experimenten zijn uitgevoerd volgens de principes van het zogenaamde balansonderzoek: door het meten van de hoeveelheid mineralen die het lichaam via de voeding ingaat en de hoeveelheid die het lichaam via urine en feces verlaat kan een "balans" worden berekend, hetgeen een maat is voor de hoeveelheid mineralen, die in het lichaam achterblijft. Het betekent in de praktijk, dat voeding van constante en nauwkeurig bekende samenstelling moet worden geconsumeerd en dat tevens alle urine en feces van de proefpersonen moet worden verzameld.

Per experiment was de basisvoeding (=alle voeding buiten de te variëren voedingsstof) constant en van een gebruikelijk Nederlands patroon. In de laatste periode van experiment III werden de proefpersonen in 3 groepen van 4 onderverdeeld, teneinde de invloed van de hoeveelheid en hoedanigheid van voedingsvezel via enkele andere broodsoorten te onderzoeken. (zie tabel 1)

*

Tabel 1. Opzet van het onderzoek naar de invloed van de hoeveelheid vet,
linolzuur respectievelijk voedingsvezel op de mineralenbalans

Experiment I	Algemene	hoogvet	hoogvet	laagvet	laagvet
VET	aanpassing	aanpassing	meetperiode	aanpassing	meetperiode
(10 proef- personen)			40 en%* vet		20 en% vet
			7 en% linol- zuur		4 en% linol- zuur
aantal dagen:	7	8	20	8	20
Experiment II	Algemene	laag	laag linol-	hoog	hoog linol-
LINOLZUUR	aanpassing	linolzuur	zuur	linolzuur	zuur
(12 proef- personen)		aanpassing	meetperiode	aanpas- sing	meetperiode
			40 en% vet		40 en% vet
			4 en% linol- zuur		16 en% linol- zuur
aantal dagen:	7	8	20	8	20
Experiment III	Algemene	witbrood	grove	groeve zemelen brood	
VOEDINGSVEZEL	aanpassing	periode	zemelen	periode met 35g	
(12 proef- personen)		met 9g	brood	voed.vezel per dag	
		voedings- vezel**	periode		
		per dag	met 22 g	fijne zemelen brood	
			voedings- vezel	periode met 22g	
			per dag	voed.vezel per dag	
				volkorenbrood	
				periode met 22g	
				voed.vezel per dag	
aantal dagen:	8	20	20	20	

* en% = energie %

** uitgedruk als NDF = neutral detergent fibre volgens methode van Soest.

Aan het eind van elke (meet)periode van 20 dagen werd bloed afgenomen en geanalyseerd op enkele relevante parameters. Individuele duplo dagpor-
ties voeding alsmede per 4 dagen de urine en feces werden gehomogeni-
seerd en geanalyseerd volgens standaardmethoden. De resultaten werden
statistisch geanalyseerd met behulp van Wilcoxon's toets voor gepaarde
waarnemingen.

Resultaten

In figuur 1 zijn de balansgegevens opgenomen voor de bestudeerde mineralen. Boven de nullijn is de hoeveelheid van elk mineraal, zoals opgenomen met de voeding, uitgezet, onder deze lijn is de uitscheiding van de mineralen met resp. urine en feces weergegeven. De balanswaarde is afzonderlijk aangegeven. Boven de nullijn heeft deze de betekenis van positieve balans (datgene dat netto in het lichaam achterblijft), beneden deze lijn wordt van een negatieve balans gesproken (=hetgeen netto het lichaam verlaat). Hierbij dient te worden opgemerkt dat de eventuele uitscheiding via onder andere de huid niet in de berekeningen is opgenomen, maar wel, gegeven de constante proefomstandigheden als een constante waarde mag worden beschouwd. Het zijn hierdoor vooral de verschillen tussen de balansresultaten die voor de vraagstelling relevant zijn. De resultaten van de derde periode van experiment III (steeds betrekking hebbend op 4 personen) zijn niet in figuur 1 vermeld maar worden in de tekst besproken.

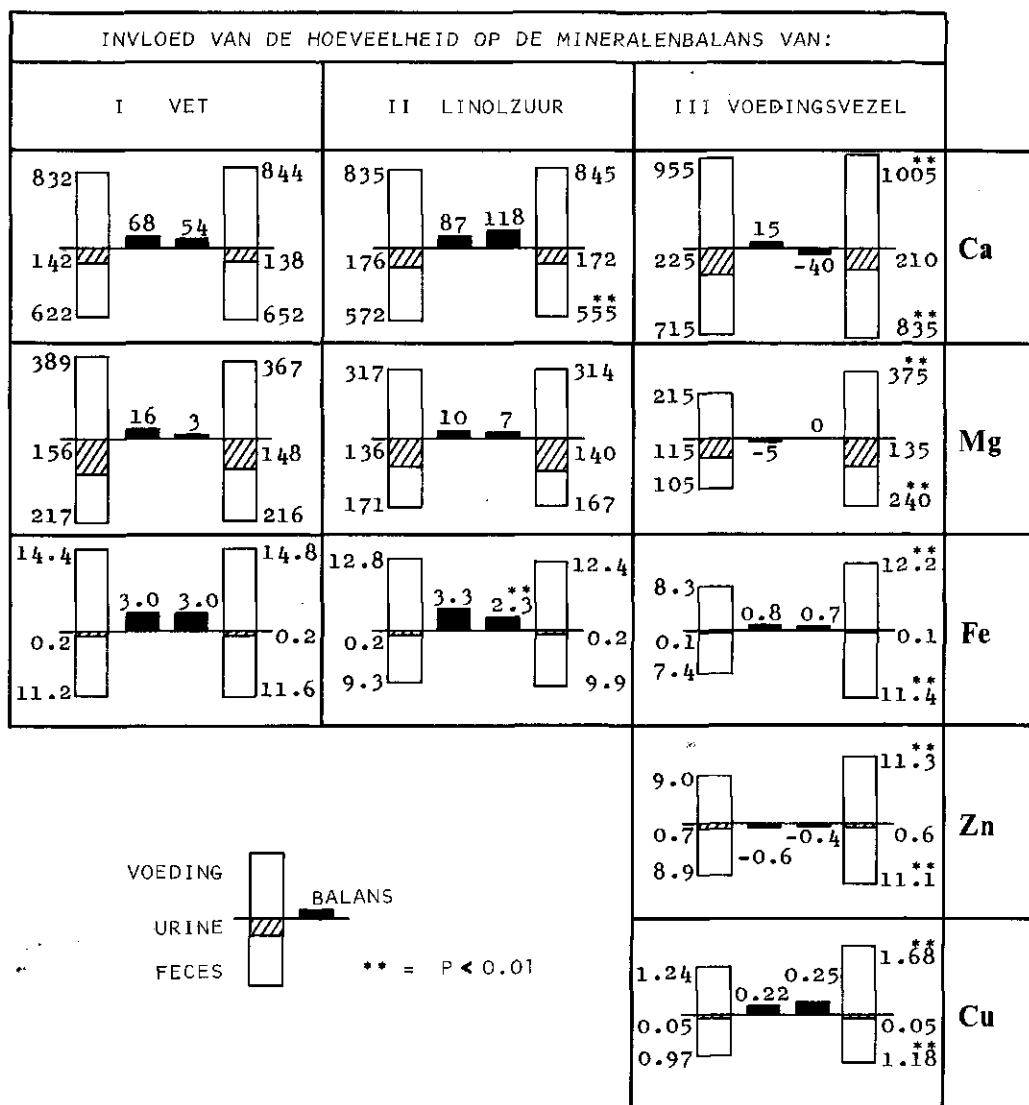
In het eerste experiment blijkt een zeer lichte, maar niet significante daling van zowel de calcium- als de magnesiumbalans op te treden bij overgang van 40 energie % vet naar 20 energie % vet in de voeding; voor calcium wordt deze daling vooral veroorzaakt door een verhoging van de hoeveelheid die met de feces wordt uitgescheiden, voor magnesium lijkt de lagere opname in de vetarme periode hiervoor verantwoordelijk. De ijzerbalans veranderde onder invloed van de hoeveelheid vet in het geheel niet.

Ook in de gemeten parameters in bloed (serum), die in tabel 2 zijn weergegeven, vinden nagenoeg geen veranderingen plaats onder invloed van de hoeveelheid vet.

Een verhoging van de hoeveelheid linolzuur en dientengevolge een verlaging van het verzadigd vet in de voeding - experiment II - geeft geen statistisch significante verandering van de magnesiumbalans te zien. De hoeveelheid calcium in de feces neemt significant af. De stijging van de calciumbalans in de hoog-linolzuurperiode kan hier voor een deel door verklaard worden, maar is niet significant.

Ten aanzien van ijzer wordt een significante daling van de balans onder invloed van meer linolzuur in de voeding waargenomen. Een parallel optredende significante daling van het hemoglobinegehalte (Tabel 2) is hierbij opvallend.

Van de gemeten mineralen in experiment III blijken de balanswaarden van magnesium, ijzer, zink en koper vrijwel niet te veranderen bij meer voedingsvezel (uit brood) in de voeding. Voor calcium blijkt een niet significante daling op te treden van de balans, indien meer voedingsvezel wordt geconsumeerd. De significante toename van de hoeveelheid



Figuur 1. Balansgegevens van de vijf bestudeerde mineralen in de experimenten I (N=10 proefpersonen), II (N=12) en III (N=12). Gemiddelden in mg/dag.

mineralen in de feces is waarschijnlijk voor een belangrijk deel te verklaren door een vergrote "consumptie" van de mineralen uit zemelen in brood.

In de zemelenbroodperiode met 35 g. voedingsvezel per dag blijkt, behalve voor koper, een daling van de balans op te treden ten opzichte van 22 g. voedingsvezel per dag in periode 2 (de balanswaarden voor Ca, Mg, Fe, Zn en Cu worden resp. -30, -5, -2.9, -0.6 en 0.49 mg. per dag gemiddeld). Het effect van het malen van de zemelen heeft een "verbetering" van de balans tot gevolg, vergeleken met de ongemalen zemelen broodperiode, beide perioden met een gelijke hoeveelheid voedingsvezel van 22 g. per dag. De consumptie van volkorenbrood geeft ten aanzien van de mineralenbalans geen consistent beeld vergeleken met het zemelenbrood met gelijke hoeveelheid voedingsvezel. Buiten een niet eenvoudig te verklaren significante stijging van het hemoglobinegehalte tijdens de witbroodperiode en een verdere (niet significante) stijging gedurende de zemelenbroodperiode zijn de andere parameters in bloed (serum) goed constant te noemen. Het is tenslotte opmerkelijk dat de uitscheiding van de mineralen met de urine in de meeste gevallen (in de drie experimenten) vrij constant is.

Tabel 2. Enkele klinisch-chemische bepalingen in bloed(s serum); gemiddelden voor experiment I (N=10 proefpersonen), II (N=12) en III (N=12).

Parameter in mmol per liter	I Invloed hoeveelheid vet			II Invloed hoeveelheid linolzuur			III Invloed hoeveelheid voedingsvezel		
	vòòr	na	na	vòòr	na	na	vòòr	na	na
	28 dg	28 dg	28 dg	28 dg	28 dg	28 dg	20 dg	20 dg	20 dg
	hoog- vet	hoog- vet	laag- vet	laag- linol- zuur	laag- linol- zuur	hoog- linol- zuur	wit- brood	wit- brood	zemelen brood
hemoglobine	9,7	9,7	9,8	9,4	9,6	9,1**	9,3	9,6**	9,8
serum-ijzer	19	22	22	19	20	21	21	17	18
serum-calcium	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,40	2,45	2,45
serum-magnesium	-*	-	-	-	-	-	0,99	0,91	0,85
serum-koper	-	-	-	-	-	-	17.10^{-3}	17.10^{-3}	16.10^{-3}
serum-zink	-	-	-	-	-	-	17.10^{-3}	15.10^{-3}	18.10^{-3}

* - = niet gemeten

** sign. verandering (P < 0.01) t.o.v. de "vorige" periode

Discussie

De verandering van de hoeveelheid vet gaat bij een iso-energetische voeding en een constante hoeveelheid eiwit (11 energie %) gepaard met een verandering van de hoeveelheid koolhydraten. Daar van de koolhydraten alleen van lactose een min of meer duidelijke calcium-absorptie bevorderende invloed gemeld wordt (Condon et al., 1970) en de hoeveelheid lactose in de voeding laag en constant was, lijkt zowel de hoeveelheid vet als de hoeveelheid koolhydraten geen invloed uit te oefenen op de mineralenbalans. Gegeven de vrij constante uitscheiding van de mineralen met de urine kan wellicht gesteld worden dat de balans de mineralenabsorptie reflecteert. Gegevens uit de literatuur zijn over de interactie vet-mineralen nogal tegenstrijdig en niet steeds vergelijkbaar met onze proef. (Steggerda & Mitchell, 1951; National Dairy Council, 1966; Agnew & Holdsworth, 1971; Monsen & Cook, 1979).

Uit experiment II kan worden geconcludeerd dat de verhoogde hoeveelheid linolzuur in de voeding vooral een verminderde absorptie van ijzer tot gevolg lijkt te hebben. De significante verlaging van de hoeveelheid calcium in de feces tijdens de hoog-linolzuurperiode (16 energie % linolzuur is overigens een waarde die iets boven de door de Voedingsraad aanbevolen hoeveelheid van 10 à 13 energie % ligt) wijst daarentegen op een gunstige invloed op de calciumabsorptie. Hoewel de verlaging van het hemoglobinegehalte niet goed te duiden is, dient wél te worden opgemerkt dat tot tweemaal toe uit dierexperimenteel onderzoek op het CIVO is gebleken dat ook bij ratten het hemoglobinegehalte significant daalde onder invloed van meer linolzuur in de voeding. De voordelen van linolzuur in de voeding zullen dan ook moeten worden gezien in het licht van de mogelijk minder gewenste bij-effecten. Meer onderzoek is nodig naar de hier waargenomen invloed op de ijzerhuishouding. Over de relatie linolzuur-mineralenabsorptie in een "gebruikelijke" voeding zijn ons geen literatuurgegevens bekend. De balansgegevens van experiment III ("voedingsvezel") bevestigen de indruk dat de extra hoeveelheden mineralen die met een vergrote hoeveelheid zemelen in brood worden geconsumeerd ófwel nodig zijn om de balans op peil te houden ófwel niet beschikbaar zijn voor absorptie. Hierbij kan gedacht worden aan een binding van de mineralen aan de voedingsvezel of een insluiting van de mineralen door de macrostructuur van voedingsvezel. Voor calcium wordt de verhoogde uitscheiding waarschijnlijk niet geheel gecompenseerd door een toename van de opgenomen hoeveelheid met de voeding, zodat de balans negatief kan worden. Daar alle balanswaarden, behalve voor koper, in de laatste periode van 20 dagen waarin 35 g. voedingsvezel is geconsumeerd (meer) negatief worden, moet ook het propageren van veel voedingsvezel (uit brood) met enige relativisering worden gezien. Voor personen met een

marginale mineralenstatus lijken de genoemde effecten uiteraard minder gewenst. De invloed van voedingsvezel op de mineralenbalans bij een marginale status is ons echter niet bekend. De gevonden resultaten zijn in overeenstemming met gegevens uit de literatuur (Reinhold et al., 1975; Sandstead et al., 1978). Wel kan worden afgevraagd of op de lange duur - in onze proef is slechts sprake van een effect na 20 dagen - een adaptatie van het lichaam ten aanzien van het absorptiemechanisme kan optreden. Opgemerkt dient te worden dat vooral in de voedingsvezelproef interacties van de mineralen onderling voor een deel de waargenomen effecten zouden kunnen verklaren. Hierbij kan zowel sprake zijn van invloed tijdens de vertering (competitie-effect in de "bio-availability") als tijdens de eigenlijke absorptiestap (competitie ten aanzien van transport door de darmwand). Uit het gehele onderzoek blijkt tenslotte dat een waarde van 300 à 400 mg. magnesium per dag voldoende lijkt voor het handhaven van een balanswaarde in de buurt van het evenwicht (nulwaarde).

Literatuur

- Agnew J.E. & C.D. Holdsworth, 1971. The effect of fat on calcium absorption from a mixed meal in normal subjects, patients with malabsorptive disease and patients with a partial gastrectomy. *Gut*, 12: 973-977
- Condon J.R. et al., 1970. Calcium and phosphorus metabolism in relation to lactose tolerance. *Lancet*, I: 1027-1029
- Monsen, E.R. & J.D. Cook, 1979. Food iron absorption in human subjects, V Effects of the major dietary constituents of a semisynthetic meal. *Am.J. Clin. Nutr.*, 32: 804-808
- National Dairy Council 1966. Fat and mineral metabolism. Dairy Council Digest, 37: 31-34
- Reinhold, J.G. et al., 1975. Fibre vs. Phytate as determinant of the availability of calcium, zinc and iron of breadstuffs. *Nutr. Rep. Int.*, 12: 75-85
- Sandstead, H.H. et al., 1978. Influence of dietary fiber on trace element balance. *Am.J.Clin. Nutr.*,: S180-S184
- Steggerda, F.R. & H.H. Mitchell, 1951. The calcium balance of adult human subjects on high- and low-fat (butter) diets. *J.Nutr.*, 45: 201-211
- Truswell, A.S., 1976. A Comparative look at recommended nutrient intakes. *Proc. Nutr. Soc.*, 35: 1-14

W. Schreurs

Instituut CIVO - Toxocologie en Voeding TNO

Samenvatting

Vitaminen zijn micronutriënten en essentieel voor een goed verloop van stofwisselingsprocessen. De laatste jaren zijn de bepalingstechnieken voor vitaminen in voedingsmiddelen en lichaamsvloeistoffen sterk verbeterd. Goede methoden zijn beschikbaar om de vitaminestatus bij de mens vast te stellen.

In Nederland komen nog veel vitaminetekorten voor als gevolg van verschillende ziektebeelden, door onvoldoende opname uit het voedsel, bij chronisch alcoholisme en als gevolg van medicijn-gebruik. Ook bestaan er bevolkingsgroepen met een verhoogd risico voor het ontwikkelen van hypovitaminosen. Dit blijkt niet altijd uit de berekende vitaminegehalten van het geconsumeerde voedsel, terwijl daarnaast dikwijls geen duidelijke klinisch herkenbare symptomen optreden.

Het is van belang om betrouwbare gegevens te verzamelen omtrent vitaminegehalten in de verschillende voedingsmiddelen -ook na de toebereiding - en goede methoden te ontwikkelen om vitaminetekorten bij de mens in een vroeg stadium te herkennen. Daarnaast dient onderzoek verricht te worden bij verschillende bevolkingsgroepen; enerzijds om vast te stellen in hoeverre vitaminetekorten daadwerkelijk optreden, anderzijds om na te gaan wat een chronisch niet-optimale vitaminestatus betekent vooral voor de gezondheid van bejaarden en welke relaties er bestaan tussen verschillende ziektebeelden en vitaminetekorten.

Inleiding en definities

Vitaminen zijn, in tegenstelling tot vetten, eiwitten en koolhydraten, een heterogenen groep van verbindingen. Er is geen enkele onderlinge overeenkomst in chemische structuur. Toch worden vitaminen als één groep beschouwd, omdat het alle organische verbindingen zijn, die in geringe hoeveelheden essentieel zijn voor een goed verloop van stofwisselingsprocessen bij mens en dier. Bovendien moeten zij in het voedsel aanwezig zijn, daar het lichaam niet - of niet in voldoende mate -in staat is deze verbindingen zelf te synthetiseren of te benutten.

De biochemische functies van verschillende vitaminen zijn niet geheel duidelijk. De vertegenwoordigers van de B-groep zijn in het algemeen coënzymen of een belangrijk deel daarvan en op die manier verantwoord-

lijk voor bepaalde specifieke biochemische, enzymatische reacties in het stofwisselingsproces.

Over de functies van de vetoplosbare vitaminen en vitamine C bestaat nog niet voldoende kennis. Vooral in het geval van vitamine D zijn de laatste jaren geheel nieuwe inzichten naar voren gekomen (De Luca, 1979) omtrent het functioneren van dit vitamine in de calcium- en fosfaat stofwisseling, waarbij het werkingsmechanisme grote overeenkomst vertoont met dat van bepaalde hormonen. Van de andere vetoplosbare vitaminen is wel bekend bij welke biochemische processen ze een rol spelen, maar hun exacte functie is nog niet duidelijk. De vitaminen vervullen zeer belangrijke sleutelposities in het lichaam en nemen in het algemeen via coënzymen een onmisbare plaats in als katalysatoren in het metabolisme van koolhydraten, vetten en eiwitten; ze zijn zodoende zeer nauw betrokken bij de energievoorziening en opbouw van het lichaam.

Behalve vitaminen bestaan er verbindingen, die zelf geen vitamineactiviteit bezitten maar eerst in het lichaam in vitaminen moeten worden omgezet. Deze noemt men provitaminen. Bekende voorbeelden zijn -caroteen, en tryptofaan, die in het lichaam worden omgezet in respectievelijk vitamine A en nicotinezuur. Ook dehydrocholesterol, dat in de huid voorkomt en zelf geen vitamineactiviteit bezit, kan in het lichaam onder invloed van zonlicht worden omgezet in vitamine D₃. Een andere wijze waarop vitaminen in het lichaam gevormd worden, is de produktie door bacteriën in het darmkanaal. Dit is vooral van toepassing op een aantal B-vitaminen en vitamine K. Deze vitaminen zijn voor de mens in het algemeen nauwelijks of niet beschikbaar voor resorptie en leveren geen bijdrage aan de vitaminevoorziening van het lichaam.

Vitaminoiden

Naast vitamine en provitamine komen ook vitaminoiden voor. Hieronder worden verstaan, op de wijze van vitaminen werkende verbindingen, die voor groei en stofwisseling essentieel en ook reeds in lage concentraties actief zijn. Ze worden ook wel partiële of halfvitaminen genoemd. De vitamine P-groep bestaat onder andere uit flavonverbindingen zoals citrine, rutine, hesperidine en quertine. Deze komen voor in citroenen en eucalyptus. Mesoinositol, een suiker, komt in fosfolipide vorm in het weefsel voor en is betrokken bij het kationentransport door celmembranen, de innervatie van zenuwen en bij de stofwisseling van de mitochondriën.

Tot de vitamine F groep behoren de essentiële vetzuren linolzuur en linoleenzuur en arachidonzuur. Deze vetzuren zijn als fosfolipiden een onderdeel van de celmembranen, nemen deel aan de oxydatieve fosforyle-

ring in mitochondriën en zijn de voorlopers van de prostaglandines, die een belangrijke functie vervullen bij het regelen van de bloeddruk, de spiertonus, het centrale zenuwstelsel en de bij mobilisatie van vetzuren. Vaak wordt voor vitaminoïden toch nog de naam vitamine gebruikt, hetgeen arbitrair is en in vele gevallen onjuist (voorbeelden pangaminezuur en laetrile). Kleine veranderingen in de chemische structuur van vitaminen kunnen leiden tot verlies aan biologische activiteit. Ook kan hierdoor een antagonistische werking ontstaan ten opzichte van het bewuste vitamine. Een vitamine-antagonist ontwikkelt zijn werking door de omzetting van het vitamine in zijn (actieve) coënzymvorm te storen ofwel door te concurreren met het coënzym voor de beschikbare bindingsplaatsen op het apoënzym. Hierdoor wordt het betreffende enzymstelsel geheel of gedeeltelijk geïnactiveerd, afhankelijk van de affiniteit van het antivitaminen ten opzichte van het apoënzym of wordt de reactiekinetiek ongunstig beïnvloed, wat uiteindelijk kan resulteren in een toestand van een schijnbare vitaminedeficiëntie. Isonicotinezuurhydrazide (INH), dat bij tuberculostatische therapie wordt gebruikt. Deze verbinding werkt als antivitaminen tegen niacine en vitamine B₆, waardoor klinische symptomen van vitamine B₆ en nicotinedeficiëntie kunnen optreden. Een ander voorbeeld is dicumarine, dat vitamine K verdringt uit het enzymstelsel, dat verantwoordelijk is voor de protrombinesynthese. Het enzym wordt hierdoor onwerkzaam en de stolling vermindert, waardoor bloedingen kunnen optreden.

Aangezien coënzymen een belangrijke rol spelen in het cellulaire metabolisme, worden antivitaminen soms gebruikt voor therapeutische doeleinden ter behandeling van cellulaire woekering bij maligne processen. Behalve bij gebruik van bepaalde foliumzuurantagonisten bijvoorbeeld amethopterine bij de behandeling van leukemie, zijn de resultaten in de praktijk niet geweldig. Sommige antivitaminen komen in de natuur voor, zoals avidine in het rauwe eiwit van het ei, dat met biotine een complex vormt, waardoor de resorptie van biotine onmogelijk wordt. Andere natuurlijke antivitaminen zijn onder andere het enzym thiaminase, dat voorkomt in rauwe vis en schaaldieren en het enzym ascorbase, dat vooral wordt aangetroffen in kool. De antivitaminenactiviteit berust op enzymatische afbraak van het vitamine.

Van alle nutriënten zijn de vitaminen bij bewerken of bewaren van voedingsmiddelen het meest kwetsbaar en zeer gevoelig voor externe invloeden zoals pH, warmte, licht en zuurstof. Bij de wateroplosbare vitaminen (B-groep) kunnen bovendien tengevolge van uitlogen grote verliezen optreden. Nicotinezuur is één van de meest stabiele vitaminen, terwijl thiamine en ascorbinezuur als regel de grootste verliezen opleveren.

In het algemeen is het niet mogelijk vitamineverliezen tijdens de bereiding en verwerking van voedingsmiddelen nauwkeurig te voorspellen. Hierbij spelen verschillende omstandigheden een rol zoals soort hoeveelheid en fijne of grove verdeling van het voedingsmiddel, de hoeveelheid water, die bij de bereiding is gebruikt en het type apparaat. Bij processen als hittesterilisatie, blancheren, braden en koken van voedingsmiddelen komen vaak grote verliezen voor. Verliezen van 40 à 60% of nog meer van de vitaminen B en C zijn hierbij niet ongewoon (Lassche et al., 1976).

Bepalingsmethoden van vitaminen

De vraag naar het voorkomen van vitaminen en hun concentraties in de meest uiteenlopende voedingsmiddelen heeft sinds het begin van het vitamineonderzoek een zeer belangrijke rol gespeeld. De eerste vitaminebepalingen berustten op biologische methoden, waarbij het verdwijnen of optreden van storingen in de fysiologische functies bij dieren als maatstaf dienden.

Bij de meer moderne kwantitatieve bepalingsmethoden wordt onder meer gebruik gemaakt van spectrofotometrische, fluorimetrische, gaschromatografische en radiochemische technieken. B-vitaminen worden nog vaak microbiologisch bepaald, waarbij voornamelijk gebruik wordt gemaakt van melkzuurbacteriën (*Lactobacilli*) die voor hun groei, die evenredig is met de concentratie van het betreffende vitamine, een aantal B-vitaminen nodig hebben.

Gedurende de laatste 5 à 10 jaar zijn de bepalingsmethoden voor de verschillende vitaminen in voedingsmiddelen, farmaceutische preparaten en biologisch materiaal enorm verbeterd door ontwikkelingen op het gebied van de hogedrukvlloeistofchromatografie en de radiochemie. Voor de bepalingen van bijna alle vitaminen in zeer uiteenlopend materiaal zijn in het algemeen zeer goede methoden voorhanden. Bij de analytische technieken ligt de nadruk op radiochemische methoden (radioimmunoassays en competitive proteïne bindingsassay) en op de hogedrukvlloeistofchromatografie met fluorimetrische detectie. Voor het vaststellen van de vitaminestatus bij de mens wordt veelal de vitamineconcentratie in het bloed (plasma) bepaald ofwel de vitamine-excretie in de urine. Daarnaast worden meer functionele testen toegepast, onder andere belastingstesten en enzymstimuleringsstesten, waarbij gekeken wordt naar de beschikbaarheid en het functioneren van het vitamine op cellulair niveau. Bij deze enzymstimuleringsstesten wordt van een bepaald enzymstelsel, aanwezig in erythrocyten, waarbij een bepaald vitamine als coënzym is betrokken, de enzymactiviteit, vóór en na verzadiging van het in-vitro meetsysteem, bepaald om een indruk te krijgen van de in de weefsels beschikbare

hoeveelheid coënzym. Dit type testen voor het vaststellen van de vitaminesstatus werd voor het eerst toegepast bij de bepaling van de erythrocytaire transketolase (ETK-)activiteit voor en na in-vitro stimulering met thiaminedifosfaat (TDP) als maat voor de vitamine B₁-status (Lonsdale & Shamberger, 1980). Later zijn de glutathionreductase (EGR-) stimuleringstest voor de vitamine B₂-status (stimulering met flavineadeninedinucleotide) (Glatzle et al., 1970) en de transaminase (EGOT) stimuleringstest voor de vitamine B₆-status (stimulering met pyridoxalfosfaat) beschreven (Stanulovic et al., 1967) en op grote schaal toegepast. Na het beschikbaar komen van goede bepalingsmethoden voor vitaminen is het mogelijk om de Nederlandse voedingsmiddelen-tabel uit te breiden en aan te vullen. Momenteel worden de in deze tabel opgegeven vitaminegehalten door velen gebruikt terwijl bekend is dat:

- de vitaminengehalten niet altijd even betrouwbaar zijn als gevolg van minder nauwkeurige bepalingstechnieken in het verleden,
- geen spreiding wordt opgegeven rond het opgegeven gehalte. Deze kan wel meer dan 100% bedragen,
- geen of onvoldoende rekening is gehouden met verliezen die optreden tijdens bereiding, opslag en distributie,
- het opgenomen pakket aan voedingsmiddelen niet geheel representatief en volledig is voor de gebruikte voedingsmiddelen in deze tijd,
- de tabel onvolledig is wat betreft de verschillende vitaminen.

Ondanks deze bezwaren worden de gegevens uit de voedingsmiddelen-tabel, vaak aangevuld met gegevens uit andere tabellen, zeer veelvuldig en kritiekloos toegepast in voedingsonderzoeken bij de vaststelling van de geconsumeerde hoeveelheid vitaminen. Onderzoekers zullen er vaak geen idee van hebben hoe nauwkeurig hun schattingen zijn.

De vitaminevoorziening uit het "Gemiddelde Dieet"

De vraag of door de Nederlandse bevolking voldoende vitaminen uit de gemiddeld geconsumeerde voeding worden opgenomen wordt vaak positief beantwoord. Uit de jaarlijks door het Ministerie van Landbouw gepubliceerde gemiddelde (berekende) consumptiecijfers kan worden afgeleid, dat voor vrijwel alle nutriënten de door de Voedingsraad aanbevolen dagelijkse hoeveelheden vrijwel geheel of zelfs ruimschoots gedekt worden. Ook in het recent uitgebrachte advies van de Voedingsraad inzake het gebruik van multivitamine preparaten wordt op basis van beschikbare onderzoekgegevens geconcludeerd, dat in het algemeen de voorziening met de in het onderzoek betrokken, vitaminen voldoende tot ruim voldoende is. Het lijkt echter voorbarig en zelfs onjuist hieraan de conclusie te verbinden, dat dus elk individu, of het grootste deel van de Nederlandse bevolking een adequate vitaminevoorziening heeft.

Definities voor een gemiddeld dieet en een normaal gezond mens worden niet gegeven, terwijl daarnaast een voldoende gevarieerd of een goed uitgebalanceerd dieet waarschijnlijk slechts door een kleine groep van onze bevolking werkelijk geconsumeerd wordt. Het merendeel is immers waarschijnlijk niet geïnteresseerd en weet niet wat een goed uitgebalanceerd dieet is, dat ook nog voldoende verschillende vitaminen bevat. Ook zijn er condities waarbij de opname verlaagd of gestoord is. Duidelijk zijn ook bevolkingsgroepen aan te wijzen die vitaminen consumeren beneden de aanbevolen hoeveelheid. Hierbij valt te denken aan groepen bejaarden, mensen met eenzijdige eetgewoonten en resorptiestoornissen. Een ander belangrijk punt is, dat deze gemiddelde opnamecijfers veelal berekend worden met behulp van tabellen (bijvoorbeeld de Nederlandse voedingsmiddelen-tabel), waarbij geen rekening gehouden wordt met bereidings- en opslagverliezen en variatie in vitaminegehalte per produkt. Dat hierdoor een overschatting van de werkelijke opname kan optreden, wordt onder meer geïllustreerd door een onderzoek uitgevoerd door het Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne omtrent de nutriënten-opname in Nederland (Anon., 1975), waarbij de gemeten vitamineinhoud, van een gemiddelde warme maaltijd vooral voor vitamine B₆, duidelijk lager was dan berekend. Aangaande de individuele vitaminebehoefte mag uit het voorafgaande duidelijk zijn dat onder bepaalde condities en voor bepaalde groepen de behoefte verhoogd is, bijvoorbeeld voor zwangeren, adolescenten en alcoholgebruikers. Op basis van deze overwegingen is het daarom zeer wel denkbaar dat zich ook in de Nederlandse samenleving risicogroepen bevinden, voor het ontwikkelen van hypovitaminosen. Inderdaad worden bij onderzoeken van geselecteerde groepen, in tal van westerse landen, aanwijzingen gevonden voor biochemisch aantoonbare (multi) vitaminetekort (Baker & Frank, 1968). Het probleem is, dat dergelijke hypovitaminosen door klinici vaak niet herkend worden door het ontbreken van specifieke symptomen. Ook uit de praktijk van met name neurologen en cardiologen komen dergelijke aanwijzingen.

Samenvattend kunnen we zeggen, dat rekening houdend met verschillende bevolkingsgroepen, eetgewoonten, onwetendheid omtrent het goed uitgebalanceerd dieet en verliezen tijdens bereiding en vóór consumptie het vitamineaanbod bij waarschijnlijk grote groepen in de bevolking voor bepaalde vitaminen marginaal en onvoldoende is en dat tekorten aan vitaminen en hypovitaminen veelvuldig voorkomen, zonder duidelijk herkenbare klinische aspecten.

Onvoldoende is nog bekend wat de consequenties zijn van een langdurige marginale vitaminestatus. Onderzoek hieromtrent maar ook op het gebied van de vroege diagnostiek van vitamine-tekorten is daarom noodzakelijk. Uitspraken over het al dan niet zinvol en wenselijk zijn van vitamine-suppletie, bijvoorbeeld via (multi-)vitaminepreparaten, lijken op dit moment daarom ook onvoldoende onderbouwd.

Inadequate voedselopname of onvoldoende voedselaanbod, waardoor vaak bij verschillende bevolkingsgroepen vitaminetekorten ontstaan zijn, gerelateerd aan: armoede, onwetendheid, slechte toebereiding, voedselapathie, chronische ziekten, anorexie, voedseltaboes en verkeerde voedingsgewoonten.

Naast genoemde zijn ook slechte vertering of onvoldoende resorptie belangrijke redenen tot het ontstaan van hypovitamineuze en vitaminedeficiënties. De vitaminen worden grotendeels in het voorste deel van het darmkanaal (duodenum en jejunum) geresorbeerd. De opname van deze vitaminen in de bloedbaan is afhankelijk van het resorptievermogen van het darmslijmvlies en de darmpassage snelheid. Resorptiestoornissen kunnen gemakkelijk veroorzaakt worden door ontstekingen, allergische en toxische beschadigingen van het slijmvlies, zoals bij amyloïdose, diverticulitis en maag- of darmresectie. Stoornissen bij de resorptie van de vetoplosbare vitaminen kunnen daarnaast ook veroorzaakt worden door leverziekten, ziekten aan de gal en pancreas, waarbij de productie van galzure zouten en pancreasenzymen afneemt. De gal is immers als emulgator van vetten en vetoplosbare vitaminen noodzakelijk voor een goede resorptie. Bij sommige leverziekten kan vitaminedepletie optreden als gevolg van een verminderde opslagcapaciteit van het betreffende vitamine. Ook treden bij bepaalde leveraandoeningen stoornissen op in de omzetting van het vitamine in zijn biologisch actieve vorm zoals bijvoorbeeld de vorming van pyridoxalfosfaat (PLP) uit vitamine B₆ en de vorming van flavineadeninedinucleotide (FAD) uit vitamine B₂. Vitamine B₁₂ wordt geresorbeerd in het ileum, echter alleen in aanwezigheid van de zogenaamde "intrinsic factor", een mucoproteïne, dat in de maagwand wordt gesynthetiseerd. De meeste vitaminetekorten ontstaan door resorptiestoornissen als gevolg van pathologische aandoeningen van het maagdarmkanaal (onder andere spruw, idiopathische steatorrhea, pancreasfibrose), door hyperperistaltiek, parasitaire infecties, alcoholisme, leverziekten en behandeling met farmaca, die een antivitaminewerking bezitten. Bij ouderen of bejaarden zijn er nog bijkomende oorzaken, die kunnen bijdragen tot een verminderde resorptie en benutting van vitaminen. In dit geval kunnen genoemd worden slechte masticatie, verminderde secretie van verteringsenzymen in het maagdarmkanaal en minder goede bloeddorstrooming en circulatie in de verschillende organen. Behalve door inadequate voedselopname en resorptiestoornissen kunnen ook vitaminetekorten ontstaan als gevolg van een verhoogde behoefte die kan optreden onder andere bij lichamelijke inspanning, snelle groei, infectieziekten, zwangerschap en lactatie, bepaalde samenstelling van het dieet, overmatige verliezen, alcoholgebruik, gebruik van anticonceptiepil en behandeling met farmaca.

Gedurende de laatste jaren is steeds duidelijker geworden dat vitamine-deficiëntie en hypovitaminosen frequent voorkomen onder andere als gevolg van behandeling met farmaca. Verandering of aantasting van de normale darmflora door behandeling met sulfapreparaten en antibiotica leidt tot verlaagde vitamineconcentraties in bloed. Aangezien de door de darmflora (bijvoorbeeld *Escherichia coli*) geproduceerde vitaminen niet door het menselijk lichaam benut kunnen worden, is het waarschijnlijk dat de veranderde darmflora zelf meer vitamine opneemt en verbruikt, zodat de behoefte stijgt. Slechte resorptie van vitaminen en antivitaminewerking treden vaak op bij gebruik van farmaca zoals antacida, laxantia, antibiotica, antituberculeuze preparaten, hypoglycaemisch werkende preparaten, antipyretica, anticonvulsiva, anticonceptiva en antiparkinson preparaten. Ook bij iatrogene hyperexcretie is de kans op het ontstaan van vitaminetekorten zeer groot. Behalve het gebruik van farmaca leidt overmatig gebruik van alcohol eveneens tot ernstige vitaminetekorten, vooral vitamine B, onder meer als gevolg van een verminderde opname uit de voeding en optredende leverpathologie wat uiteindelijk kan leiden tot de ziekte van Wernicke, Syndroom van Korsakow en perifere neuropathie. In het jaar 1979 werden op het Instituut CIVO - Toxicologie en Voeding TNO te Zeist vitamineonderzoek uitgevoerd in het bloed van ongeveer 20.000 patiënten, onder wie rond 3.000 patiënten met klinische symptomen van vitaminedeficiëntie als gevolg van overmatig alcoholgebruik. Bij meer dan de helft van deze 3.000 alcoholici werd een hypovitaminose of vitamine B₁-deficiëntie in bloed vastgesteld. De vraag rijst dan ook hoe de vitamine B₁-status zal zijn van de in Nederland zeer grote groep gewoontedrinkers.

Slotopmerking

Samenvattend kan gesteld worden dat hypovitaminose waarschijnlijk veelvuldig onder de Nederlandse bevolking voorkomt. De invloed van deze vitaminetekorten op lange termijn op het ontwikkelen van ziekten op latere leeftijd is onbekend en dient nader te bestudeerd te worden. Uitgebreide voorlichting over goede voeding en over de wijze hoe de dagelijks aanbevolen hoeveelheden nutriënten geconsumeerd kunnen worden is voor de verschillende bevolkingsgroepen noodzakelijk. Het gebruik van laag gedoseerde multivitaminepreparaten dient niet afgeraden te worden, echter ook niet reclame als alternatief voor een minder goede voeding aangeprezen te worden. Onderzoek is noodzakelijk op de volgende gebieden:

- het ontwikkelen van nieuwe en betere methoden te ondersteuning van de diagnostiek van hypovitaminose, zodat in een vroeg stadium te herkennen zijn

- de rol en het effect van vitamine bij verschillende ziektebeelden
- de gevolgen van niet optimale vitaminevoorziening op de lange termijn
- longitudinale studies over de vitamineconsumptie en status bij verschillende bevolkingsgroepen en het vaststellen van normen
- de Nederlandse voedingsmiddelen-tabel wat betreft vitaminen aanvullen uitbreiden en aanpassen, zodat deze voldoet aan de eisen die in deze tijd gesteld worden aan het voedingsonderzoek.

LITERATUUR

- Anon., 1975. Nutrient intake in the Netherlands. Verslagen, Adviezen Rapporten 4, Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Leidschendam
- Baker, H. & O. Frank, 1968. Clinical Vitaminology. Interscience Publishers, New York, 177-192
- De Luca, H.F., 1979. Recent advances in our understanding of the vitamin D endocrine system. J. Steroid Biochem., 11: 35-52
- Glatzle, D. et al., 1970. Method for the detection of a biochemical riboflavin deficiency. Int. J. Vitam. Res., 40: 166-183
- Lassche, J.B., W.H.P. Schreurs & A.A.M. Colen, 1976. Onderzoek naar de kwaliteit van de voeding in een verpleegtehuis Deel II, Zeist, Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek TNO, Rapport Nr 5219
- Lonsdale, D. & R.J. Shamberger, 1980. Red cell transketolase as an indicator of nutritional deficiency. Am. J. Clin. Nutr., 33: 205-211
- Stanulovic, M., D. Miletic & A. Stock, 1967. The diagnosis of pyridoxine deficiency based on the estimation of the erythrocytic aspartate aminotransferase and its stimulation in vitro with pyridoxal-5-phosphate. Clin. Chim. Acta., 17: 353-362

R.J.J. Hermus

Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO

Samenvatting

Na het tijdperk van de vaststelling van de minimale behoefte aan nutriënten op basis waarvan de aanbevolen hoeveelheden werden geformuleerd is de Voedingsleer thans aangekomen in het tijdperk van de vraag, welke voeding is optimaal? Met als doel vooral: welke voeding maakt optimaal functioneren mogelijk? Op grond van de huidige beperkte voedingskennis worden aanbevelingen gehanteerd voor de gehele bevolking. Ingegaan wordt op de aanvaardbaarheid van deze werkwijze. Aan de hand van voorbeelden als energie, zout en cholesterol wordt aannemelijk gemaakt dat in werkelijkheid slechts beperkte segmenten uit de bevolking baat zullen hebben van de aanbevelingen. Er blijkt een enorme variabiliteit in de response op voedingsstimuli te bestaan. Nagegaan zal moeten worden of in alle gevallen er consistente hypo- en hyperresponders bestaan, welke mechanismen hier spelen en of er opsporings- en specifieke interventiemogelijkheden zijn. Dit zal tot een besparing van adviezen kunnen leiden, alsmede tot een gerichtere, effectievere en reëelere benadering van degenen die een advies werkelijk nodig hebben.

Inleiding

De voedingsleer heeft de laatste 80 jaar een duidelijke evolutie doorgemaakt. De eerste 40 jaar werden vooral gekenmerkt door het zoeken naar de onmisbare voedingsstoffen als vitamines en mineralen alsmede naar de minimale hoeveelheden hiervan die gebreksziekten konden voorkomen. Door invoering van een veiligheidsmarge die in feite aansloot op de praktische haalbaarheid, werd verondersteld dat de overgrote meerderheid van de bevolking bij gebruik van deze hoeveelheid, goed en voldoende zou zijn voorzien. Verschillen tussen individuen waren in dit opzicht niet interessant, noch van belang. De marge tussen deze aanbevolen hoeveelheden, zoals ze genoemd werden, en toxische dosis was voldoende ruim. De laatste 40 jaar, maar vooral de laatste 20 jaar is de aandacht echter steeds sterker gegaan in de richting van een vaststelling van de optimale voeding. Het bleek dat het voor de voedingstoestand van de mens niet onverschillig was of de energie in het voedsel geleverd werd door vet of door koolhydraten. Tevens bleek al snel ook niet alle vet identiek. Er was hard en zacht vet; volgens sommigen was de dierlijke of

plantaardige herkomst relevant; uiteindelijk bleek slechts de vetzuursamenstelling van wezenlijk belang. Bepaalde vetzuren bleken de precursor voor een soort hormonen te kunnen zijn. Een overeenkomstige ontwikkeling deed zich voor op het terrein van de koolhydraten waar sterk verguisde oligo-sacchariden worden geplaatst tegenover eerlijk natuurlijk zetmeel.

Bijzondere interesse is ook ontstaan voor een aantal verbindingen zonder duidelijke voedingswaarde, doch met interessante fysiologische eigenschappen, zoals cholesterol, natrium en voedingsvezel.

Deze ontwikkelingen zijn parallel verlopen met wijzigingen in het sterf-
tepatroon in Nederland en met gewijzigde inzichten omtrent de rol van voeding bij een groot aantal van de belangrijkste volksgezondheidsproblemen. Het gevolg is geweest dat een aantal aanbevelingen zijn uitgebracht door organen als Voedingsraad en Gezondheidsraad, bestemd voor de gehele Nederlandse bevolking en bedoeld om bij naleving ervan de sterfte aan de grote "Killers" terug te dringen.

Individualiteit

Men moet zich evenwel afvragen of men hiermee op de goede weg zit. Immers de baat die alle leden van een gemeenschap potentiëel hebben bij naleving van deze preventieve adviezen is sterk verschillend. Wat voor de een een levensnoodzaak is, is voor de ander een lastig inconvenient. Wat voor een, soms betrekkelijk kleine groep geldt, die in speciale mate risico loopt, behoeft daarom nog niet automatisch óók te gelden voor de hele bevolking. Té gemakkelijk wordt gesteld dat waar een hele frequentieverdeling voor een risico indicator naar hogere waarden is verschoven, daarom de interventiestrategie ook zou moeten bestaan uit het weer in zijn geheel terugdringen van de frequentieverdeling naar lagere waarden. Beïnvloeding van de vorm van deze verdeling wordt nauwelijks overwogen of relevant geacht. Niettemin moeten we constateren dat een groot deel van de populatie onder de distributiecure nauwelijks (verhoogd) risico loopt, dus ten onrechte wordt geadviseerd tot gedragsverandering. Anderzijds blijken er personen voor te komen in het lagere deel van de curve die toch aan een ziekte ten prooi vallen en dus ten onrechte zouden zijn gerustgesteld. Tenslotte is er nog de complicatie dat er een groep is die, niettegenstaande het navolgen van alle adviezen, niettemin een verhoogd risico blijft behouden. Het onderscheidend vermogen van de meeste risico-indicatoren is dermate laag dat we niet in staat zijn op grond van een screening van een populatie de high risk gevallen met enige betrouwbaarheid te identificeren.

Erfelijkheid versus gedrag

Vrijwel alle gezondheidsproblematiek waarmee de Westerse wereld kampt sinds de tweede helft van de 20e eeuw en welke een voedingsdimensie bezit kan worden gekarakteriseerd als de resultante van een proces met multifactoriële etiologie, gesuperponeerd op een erfelijk bepaalde predispositie.

In schema weergegeven:



Het is in dit verband een wat academische discussie welke factor overheerst: de erfelijkheid of het gedrag. In een zeer homogene, "high risk" omgeving zullen verschillen in erfelijkheid doorslaggevend zijn met betrekking tot het ontstaan van complicaties. In een "low risk" omgeving zal zelfs een grote genetische gevoeligheid niet tot expressie (kunnen) komen. Het onderlinge gewicht van beide risicodeterminanten, erfelijkheid en omgeving of gedrag, wordt bepaald door het algemene niveau van beide, en dus het algemene risico niveau óf door contrasten binnen c.q. tussen populaties wat betreft zowel erfelijkheid als risico beïnvloedend gedrag.

Een voorbeeld moge een en ander verduidelijken. Wanneer men het cholesterolgebruik met de voeding wil relateren aan het serumcholesterolgehalte dan blijkt dit niet te lukken in bijvoorbeeld de V.S. of Nederland. Onderzoekt men evenwel, zoals Connor deed een zeer homogene groep Indianen met stabiele voedingsgewoonten en voldoende contrast in hun cholesterolgebruik dan vond hij een correlatie tussen cholesterolgebruik en serumcholesterol van 0.898.

Evenzo vindt men binnen de Nederlandse bevolking géén relatie tussen vetgebruik en serumcholesterolgehalte. Echter bij vergelijking tussen populaties, zoals in het 7-landen onderzoek (Keys, 1970), bestaat er een zeer sterke correlatie van ca. 0.8-0.9. Tenslotte, bij vergelijking van populaties met een uiteenlopend natriumgebruik blijkt er een duidelijke relatie met de hoogte van de bloeddruk, de stijging van de bloeddruk met de leeftijd en de prevalentie van hypertensie. Evenwel binnen een populatie kon deze relatie niet aangetoond worden. Wanneer echter de genetische achtergrond van de populatie homogener werd gemaakt ontstond er wel een effect. Indien slechts personen met een positieve familie-anam-

nese voor hypertensie werden onderzocht vonden Pietinen et al. (1979) een sterke correlatie ($r = 0.71$) tussen natrium-uitscheiding in de urine en hoogte van de bloeddruk. Deze relatie was er niet bij een negatieve familie-anamnese.

Variabiliteit

Een verdere complicatie bij het bestuderen van de relaties tussen gedrag/erfelijkheid enerzijds en risicoprofiel en ziekte anderzijds wordt gevormd door de geringe stabiliteit van zowel gedragingen als risico-indicatoren.

Dit gevoegd bij de, om onnaspeurbare redenen gegroeide praktijk iemand op grond van één enkel interview of meting te willen karakteriseren kan niet anders dan teleurstellingen opleveren. Pas recent begint er meer aandacht te komen voor deze methodologische problematiek (Beaton et al., 1979), hoewel Balogh et al. (1971) reeds in 1971 rapporteerden dat, wil men voor 90% van de onderzoekspopulatie een schatting hebben van nutriëntegebruik, die ligt binnen $\pm 20\%$ van de werkelijke consumptie met een betrouwbaarheid van 95%, er tussen 10 en 45 random dagen moet worden geënquêteerd. Mag men dan verwachten dat er een correlatie wordt gevonden tussen één 24-uurs recall enquête en een risico indicator als cholesterol? Toch zal vergroting van het aantal dagen waarover de voeding wordt geënquêteerd niet meteen leiden tot betere correlaties. Balogh et al. (1971) berekenden een correlatie tussen verzadigd vetgebruik en serumcholesterol van 0,000 op basis van een "diet history", van 0,00 op grond van twee 24-uur "recalls", van -0,06 op vier en van -0,06 op acht recalls! Dit geeft nauwelijks aanleiding veel te verwachten van opvoering van de meetnauwkeurigheid van de gebruikte voeding. Hier dient meteen aan toegevoegd dat ook de cholesterolbepaling aan dag tot dag variaties onderhevig is en dat het tenminste even belangrijk is ook aan deze kant van de vergelijking voor herhaling te zorgen. Het gaat er immers om een individu op zijn juiste plaats in de frequentie distributie van een populatie te plaatsen. Tussen herhaalde cholesterolmetingen is de correlatie in de orde van grootte van 0,6. In een onderzoek in Chicago (Stamler et al., 1972) werden op grond van éénmalig onderzoek 227 personen in een hoge risicogroep (cholesterol > 275 mg) ingedeeld. Echter indien op grond van 10 jaarlijkse metingen werd ingedeeld, voldeden nog slechts 98 van de 227 personen aan dit criterium. Hoewel een tamelijk stabiele eigenschap werd zelfs voor obesitas, bij een 10-jaars follow-up studie door Garn et al. (1980) gevonden dat slechts 32% van de dikken dik bleef, de zogenaamde harde kern. Elk onderzoek naar lange termijn effecten zal met dit soort spontane verbeteringen rekening moeten houden en herhalingsmetingen in dienen te bouwen.

Tenslotte moet er op gewezen worden (het moge overbodig lijken, doch de praktijk bewijst helaas anders), dat de meeste risico-indicatoren multifactoriëel zijn. Dit wil zeggen dat een groot aantal factoren uit de omgeving inclusief de voeding invloed uitoefenen op de hoogte van een risico-indicator. Ook de voeding per se is weer multifactoriëel. Elke poging relaties te leggen tussen één voedingsfactor en een risico-indicator is vrijwel gedoemd te mislukken door de ruis veroorzaakt door de overige factoren. Er moet daarom een experimentele opzet worden gekozen waarbij de ruis minimaal of tenminste constant is. Enerzijds neemt men dan zijn toevlucht tot laboratorium-studies onder min of meer gecontroleerde omstandigheden, anderzijds gebruikt men statistische technieken om de invloed van de zogenaamde "effect modifiers" te verdisconteren of te corrigeren. Een typerend voorbeeld van dit laatste werd onlangs door Kay et al., (1979) gerapporteerd. Met monovariante regressierekening vonden zij bij een groep personen een significante correlatie tussen voedingsvezel en serumcholesterol. Echter met multivariate regressierekening bleek het verzadigd vet gecorreleerd hetgeen beter in overeenstemming is met de resultaten van gecontroleerde voedingsproeven. Het gevaar van het vinden van schijn correlaties bij toepassing van monovariante regressierekening is levensgroot aanwezig.

Variaties in energetische efficiëntie

Een welhaast paradoxale situatie doet zich voor bij obesitas. Men zou mogen verwachten dat obesitas het gevolg is van een positieve energiebalans. Lange tijd is voetstoots aangenomen dat obesen (relatief) te veel zouden hebben gegeten. Resultaten van onderzoek steunen deze veronderstelling niet. Integendeel uit vrijwel alle onderzoek komt naar voren dat de grotere eters de mageren zijn en de obesen de kleinere eters (zie overzicht Baecke & van Staveren, 1980). Widdowson (1962) heeft reeds in 1947 gewezen op de enorme verschillen in voedselopname tussen individuen, kinderen of volwassenen. Deze kan een factor twee schelen bij eenzelfde lichaamsgewicht en lichamelijke activiteit. Pas recentelijk breekt enig inzicht door dat personen met aanleg voor de ontwikkeling van obesitas een metabolisme bezitten dat nogal verschillend wordt gereguleerd van dat van mageren. Met name thermogenese en catecholamine reacties spelen hierbij een rol. Men mag zich óók afvragen of de lage energetische behoefte van de gepredisponeerde obese, in combinatie met een leefwijze met zeer geringe lichamelijke activiteit niet juist iemand extra als risicodragers bestempelt. Immers zowel uit epidemiologisch als dierexperimenteel onderzoek is gebleken dat de eetlustregulering bij dit noodgedwongen lage consumptie-niveau gaat falen. Het regelsysteem voor lichaamsgewicht werkt blijkbaar eerst goed

wanneer het tenminste boven een bepaald minimum belast wordt. Een en ander kan belangrijke gevolgen hebben voor adviezen met betrekking tot handhaving van een gezond gewicht. Men kan niet doorgaan aan diegenen die toch al minimale hoeveelheden consumeren steeds minder toe te staan. Indien ergens, dan is juist ten aanzien van gewichthandhaving geïndividualiseerd advies noodzakelijk.

Variaties in gevoeligheid voor cholesterol

Onder gecontroleerde voedings- en leefomstandigheden kan het serumcholesterolgehalte van proefpersonen worden beïnvloed door de hoeveelheid cholesterol in de voeding. Dit effect lijkt aanzienlijk groter indien de voeding het in Nederland gangbare vet bevat dan indien een gebalanceerde vetsamenstelling aanwezig is met betrekking tot verzadigd en onverzadigd vet (Bronsgest-Schoute et al., 1979a, b). Echter indien men aan mensen die gewend zijn eieren te eten vraagt dit een aantal weken niet meer te doen, zonder hun voeding overigens te wijzigen, dan ziet men nauwelijks een effect op het serumcholesterol (Bronsgest-Schoute et al., 1979c). Het blijkt dat het voedingscholesterol-effect dus gemoduleerd wordt door het begeleidende vet in de voeding maar ook door de overige leefomstandigheden. Tenslotte bleken ook de individuele effecten sterk gespreid. Op de linolzuurrijke voeding was het cholesterol effect ca. 11 ± 11 mg/100 ml. Op de normale vetvoeding 26 ± 20 mg/100 ml. De daling bij de habituele eieren-eters bedroeg na weglating van het ei -6 ± 16 mg/100 ml.

Een nadere beschouwing van deze getallen leert dat het effect van het opnemen in of weglaten van cholesterol uit eieren in de voeding sterk individueel verschillende resultaten oplevert. Dit is geïllustreerd in figuur 1.

Alvorens enige verdere conclusie hieruit te trekken zal moeten worden onderzocht of (1) het gemiddelde effect reproduceerbaar is (2) of de individuele effecten reproduceerbaar zijn dan wel of gesproken moet worden van een random verdeling van de effecten.

Bij verschillende diersoorten (ratten, konijnen en apen) is het verschijnsel van de hypo- en hyperrespondding aangetroffen en er zijn geen dwingende argumenten waarom het fenomeen niet ook bij de mens zou optreden.

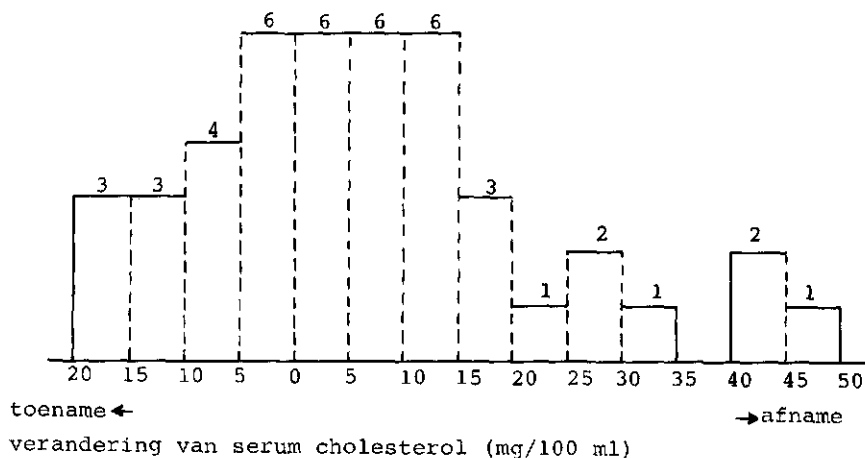


Fig. 1. Frequentie-verdeling van individuele veranderingen van serum cholesterol na weglating van gemiddeld ruim 1 ei per dag uit de voeding (Bronsgest-Schoute et al., 1979c)

Slotbeschouwing

In het voorgaande is ingegaan op de aanwezigheid van verschillende bronnen van variaties in de reactie van de mens op zijn voeding. Voor een effectieve voedingsadvisering zal het steeds harder nodig blijken méér geïndividualiseerd advies te formuleren. Als 70 à 80% van de mensheid nauwelijks een effect ondervindt van voedingscholesterol op zijn serumcholesterol moet men zich de vraag stellen of dan een algemeen advies tot beperking wel effectief, gerechtvaardigd en aanvaardbaar is. Hier komt bij dat het algemene advies al reeds een zodanig compromis is dat het voor degenen die werkelijk gevoelig zijn wellicht nog te liberaal is terwijl het voor degenen die vrij ongevoelig zijn een onnodige beperking inhoudt.

Evenzo doet een aanbeveling om ter vermindering van obesitas toch vooral minder te eten wat ongeloofwaardig aan bij al degenen die al beneden de 2000 kcal (8,4 MJ) consumeren. Succes blijft dan ook gegarandeerd uit. Er zal nog veel onderzoek nodig zijn naar de mechanismen achter de processen die aan de relatie voeding-voedingstoestand ten grondslag liggen alvorens we op causaliteit gerichte adviezen kunnen geven, gebaseerd op inzicht in de pathologische processen en afgestemd op individuele behoeften. Dit vormt de uitdaging voor de komende 20 jaar. Het ontwikkelen van testen voor de identificatie van individuen met bijzondere gevoeligheid voor de Westerse leefwijze zal het directe gevolg zijn van dit onderzoek naar mechanismen. Samenspel van epide-

miologisch, klinisch, dierexperimenteel en laboratoriumonderzoek is hier een vereiste. Voor het gebied van de voedingsmiddelen kan dit betekenen dat er grotere behoefte zal ontstaan aan produkten met specifieke eigenschappen voor risicodragers, naast de bestaande. Tevens zal de behoefte aan herkenbaarheid van produkten en informatie omtrent de samenstelling toenemen.

Literatuur

- Baecke, J.A.H. & W.A. van Staveren, 1980. Voedselconsumptie en het ontstaan van obesitas. *Hart Bulletin*, 11: 31-36
- Balogh, M., H.A. Kahn & J.H. Medalie, 1971. Random repeat 24 hours dietary recalls. *Am. J. Clin. Nutr.*, 24: 304-310
- Beaton, G.H. et al., 1979. Sources of variance in 24-hour dietary recall data: implications for nutrition study design and interpretation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32: 2546-2559
- Bronsgest-Schoute, D.C., J.G.A.J. Hautvast & R.J.J. Hermus, 1979a. Dependence of the effects of dietary cholesterol and experimental conditions on serum lipids in man. I. effects of dietary cholesterol in linoleic acid rich diet. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32: 2183-2187
- Bronsgest-Schoute, D.C. et al., 1979b. Idem. II. Effects of dietary cholesterol in a linoleic acid poor diet. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32: 2188-2192
- Bronsgest-Schoute, D.C. et al., 1979c. Idem. III. The effect on serum cholesterol of removal of eggs from the diet of free living habitually egg-eating people. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32: 2193-2197
- Garn, S.M., S.M. Bailey & P.E. Cole, 1980. Approaches to the analysis of fatness changes and continuity. *Ecol. Food Nutr.*, 9: 59-62
- Kay, R.M., A. Csima & Z. Sabry, 1979. Relationship of fat and fibre intake to serum lipids. Vth, Intern. Symp. Atherosclerosis, Houston. Abstr. 261
- Keys, A, 1970. Coronary Heart Disease in Seven Countries: The Diet. Amer. Heart Ass. Monograph, 29: 162-183 New York
- Pietinen, P.I., O. Wong & A.M. Altschul, 1979. Electrolyte output, blood pressure, and family history of hypertension. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32: 997-1005
- Stamler, J., D.M. Berkson & H.A. Lindberg, 1972. Risk factors: their role in the etiology and pathogenesis of the atherosclerotic diseases. In: R.W. Wissler & J.C. Geer: The pathogenesis of atherosclerosis p 41-119, The Williams and Wilkins Cy, Baltimore
- Widdowson, E.M., 1962. Nutritional individuality. *Proc. Nutr. Soc.*, 21: 121-128

SESSIE 4

Voorzitter: Dr. A.P. de Groot

Motto: Toxicologisch onderzoek van voedingsmiddelen, veiligheid in de voeding



NUTRITION AND CANCER IN MAN: EXPERIMENTAL APPROACHES

John H. Weisburger, Bandaru S. Reddy, Neil E. Springarn,
Leonard A. Cohen, Abraham Rivenson, Jerald Silverman, Gary M. Williams

American Health Foundation, Naylor Dana Institute for Disease
Prevention, Valhalla, New York 10595 (U.S.A.)

Abstract

Except for the tobacco-related lung cancer, cancers in the gastrointestinal tract and the endocrine-sensitive organs such as the breast and prostate are among the most important human cancers. In the last 30 years, animal models were developed which faithfully mimic specific human cancers such as those in the stomach, colon, and breast. These models, in turn, have permitted study on the mechanisms of their induction, and importantly, to develop information on the role of modifying factors such as nutritional influences. Thus, the role of dietary fat in enhancing colon and breast carcinogenesis and of dietary fiber in inhibiting colon carcinogenesis has been elucidated. These efforts are useful to complement information derived from epidemiology and metabolic epidemiology, and provide a sound scientific basis to eventually develop recommendations to reduce cancer risks.

Introduction

In the last 80 years there have been sizable changes in the incidence of the premature killing diseases in the Western world. Many of the infectious diseases are now under control, mainly through preventive approaches, and infant mortality has been reduced substantially. All of the factors together have yielded a sizable increase in the average lifespan.

As a result, however, other chronic premature killing diseases have assumed increasing importance. Thus, at this time, coronary heart disease, cancer, hypertension, and stroke account in large measure for premature mortality. (America Cancer Society, 1980)

The word "cancer" actually represents an important set of diverse diseases, rather than a single disease entity. The sole common characteristic of neoplastic diseases is that the mechanisms of growth control and differentiation of normal cell systems have been altered, and either do not operate in neoplastic cells or have different quantitative opera-

ting parameters. Thus, cancer represents uncontrolled growth of cells derived from a specific organ or tissue. However, the causes and modifying elements for diverse cancers can be and, in fact, are different (Weisburger & Williams, 1981).

In terms of incidence, and not counting lung cancer, four of the most important types of cancer are: cancer of the stomach, large bowel, breast, and prostate. Current views are that they may be associated with nutrition, in general, and specific dietary items in particular (Reddy et al., 1980).

What basis do we have for the conclusion that nutrition plays a major role in the aforementioned cancers.

Contemporary concepts stem from multidisciplinary research efforts and are based on 3 major approaches and lines of evidence (Cutler & Young, 1975; Berg, 1977; Wynder & Gori, 1977; Weisburger et al., 1977; Doll, 1979; Higginson, 1979). First, is a consideration of time trends each type of cancer exhibits in different parts of the world. Second, is the line of evidence derived from international comparisons in mortality and incidence which show a specific type of cancer as a function of areas of residence, and in migrant populations. The third consists of detailed and carefully conducted studies in laboratory experiments, i.e. in vitro systems and animal models.

The purpose of this document is to briefly review the human data and concentrate on experimental models as a reliable approach to validate or test concepts. Brief examples of the two epidemiological lines of investigation are shown by the following. Whenever a carcinogen is introduced into the human environment, there is a change in incidence as a function of time (Weisburger et al., 1977). When cigarette smoking became popular in men at the time of World War I, and in women during World War II, about 20 years later there was an upward change in the incidence of lung cancer. This large scale introduction of a carcinogen from smoking resulted in a striking increase in neoplastic disease. On the other hand, cancer of the stomach has declined impressively in the United States over the last 50 years while remaining constant, until recently, in a country such as Japan. Colon, breast, and prostate cancer have shown a small upward trend in incidence in the United States in the last 40 years (Cutler & Young, 1975; Devesa & Silverberg, 1978). This infers that the environmental changes in the 40 years, namely, industrial pollution, food additives, and food contaminants, are not associated with the development of these 3 types of cancer in man in the United States and the Western world. In contrast, Japan which historically had a low incidence of these 3 types of cancer despite a high degree of industrialization, has recently shown an increasing trend, apparently

associated with the progressive westernization of the Japanese dietary intake since 1945 (Oiso, 1975; Hirayama, 1979; Wynder, 1979). The epidemiology of migrants provided data on risk factors for colon and breast cancer. Colon cancer risk increases in the first generation of migrants from low-risk Japan to higher risk United States (Berg, 1977; Reddy et al., 1980). On the other hand, for breast cancer, the incidence increases only in the second or third generation (MacMahon et al., 1976; Wynder et al., 1976; Weisburger, 1979).

A worldwide correlation between colon and breast cancer incidence and total fat consumption has been established (Carroll & Khor, 1975). An exception was Finland, where total fat consumption is similar to the United States, but the colon cancer rate is lower. This opened the question of dietary fiber in relation to intestinal diseases, particularly colon cancer. It was, indeed, found that the diet of rural Finnish peoples studied incorporated more fiber in the form of whole grain cereals and breads than the United States diet. The additional fiber resulted in an increased stool bulk. It has been postulated that fiber might have a protective effect.

Epidemiologic studies, then, suggest that key elements with respect to differences in diet between low-risk countries and high-risk countries for cancers of the colon, breast, and prostate is the amount of dietary fat and fiber.

Use of Animal Models

To verify the suspicions obtained from human epidemiologic and metabolic epidemiologic data and the hypotheses drawn therefrom, animal models are necessary. Experimental animal models are important in furthering our understanding of environmental factors involved in cancer. Most significantly, animal models are used to provide a description and understanding of the mechanisms involved which can further be used as sound bases for recommendations for prevention. Only in animal models, can we obtain information under highly controlled, exacting conditions. Endogenous elements, such as genetics or sex, in relation to cancer development, can be evaluated by prospective studies which manipulate the exogenous environment. Such studies can not easily be done in man. Animal models also permit investigation of dietary elements such as macro- and micronutrients which may be important influences on tumor production. Experimentally induced tumors can be utilized to develop better models for chemotherapy, immunotherapy, surgery, and other treatments, or may assist in the development of improved diagnostic tools such as enzymes or antigen assays.

Stomach Cancer

Because of the high incidence of gastric cancer in many areas of the world, there have been many attempts to establish animal models. Until recently, such efforts were relatively fruitless. While treatment of rodents, particularly mice, with certain classic carcinogens, such as polycyclic aromatic hydrocarbons, yields tumors of the forestomach, this lesion may not be a good model for human disease which generally originates in the glandular stomach.

The best way of causing glandular gastric cancer reliably in many species was first discovered by Sugimura & Fujimura in 1967 (see Sugimura & Kawachi, 1978) who gave N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) to rats by adding it to drinking water at concentrations ranging from 33-120 mg/l. Other alkyl nitrosamides were likewise capable of inducing this neoplasm. Druckrey (1975) showed that N-methyl-N'-acetyl-nitrosourea, nitrosobiuret, and similar substances also have the property of inducing cancer of the glandular stomach in rats. It may be that the molecular features of alkyl nitrosamides can cause cancer of the glandular stomach. Interestingly, the most frequent site of gastric involvement in these experimental models was the antrum as it appears to be in human pathology (Bralow & Weisburger, 1976). There was marked variability in the susceptibility of various rat strains. Salt intake in rats (Tatematsu et al., 1975), and in man (Joossens, 1980) has a promoting effect.

Inasmuch as alkyl nitrosoureas are effective across species lines and that these compounds are organ-specific, inducing gastric cancer in areas of gastric mucosa with intestinalization as is seen in man, the question can be asked whether gastric cancer in man might also be caused by exposure to this type of chemical. Many of the data obtained in animal models are consonant with this concept. The *in vivo* nitrosation of certain amines and amides at stomach pH could lead to the formation of nitrosamines and nitrosamides in human gastric juices. Weisburger & Rainieri (1975) have studied the formation of nitrite from nitrate, the conditions controlling the nitrosation of alkylamides, and the methods of inhibition of the nitrosation reactions. Endogenous or added nitrate in food (deliberately added or present as a result of geochemistry or agricultural practice) was converted in substantial amounts to nitrite when this food was stored at room temperature, but not when refrigerated. Less nitrite was formed when ascorbic acid was present in high amounts. (See also Mirvish, 1975.) Extracts of Sanma fish, borscht, and beans, staple foods in some high-risk countries showed mutagenic activity upon treatment with nitrite. Ascorbic acid prevented the formation of the mutagens in nitrite-treated foods. Weisburger et al. (1980) reported that an extract of nitrite-treated Sanma fish, when fed to Wistar rats,

induced tumors mainly in the glandular stomach. None of the animals fed the fish extract without the nitrite showed any tumors. Identification of the mutagenic (presumptive carcinogenic) agents in nitrosated food requires additional study.

Thus, reliable animal models for gastric cancer suggested a mechanism for human gastric cancer etiology, which could be tested and validated in animal models. On the basis of this sequence of approaches, a proposal can be made for the reduction of this important cancer type, or rationale established for the considerable decrease in incidence in the United States. In turn, establishment of prospective studies, to evaluate the laboratory finding that vitamin C and vitamin E inhibit the formation of gastric carcinogens, should eventually demonstrate that gastric cancer in man can be prevented by the regular intake of protective foods containing vitamin C and vitamin E, and by lowering salted food consumption.

Colon Cancer

Research as to the mechanisms of cancer causation in the large bowel has been greatly assisted over the last 2 decades by several excellent animal models that mimic the disease in man. These models are: (1) induction of large-bowel cancer in rats through chemicals such as 3-methyl-4-aminobiphenyl, or 3-methyl-2-naphthylamine, and analogs; (2) derivatives and analogs of cycasin and methylazoxymethanol (MAM) such as azoxymethane (AOM) and 1,2-dimethylhydrazine (DMH), which work well in rats, hamsters, and mice of select strains; (3) compounds such as diketopropyl nitrosamine and related compounds, the only kinds of nitrosamines effecting the large bowel, except for a putative "proximate" agent related to dimethylnitrosamine (itself never a colon carcinogen), acetoxymethyl-methylnitrosamine; (4) intrarectal administration of direct-acting carcinogens of the type of alkyl nitrosoureas, such as methyl-nitrosourea (MNU) or N-methyl-N'-nitrosoguanidine (MNNG), which lead to cancer of the descending large bowel in every species tested so far; and (5) the oral administration of large doses of 3-methylcholanthrene, which leads to large-bowel cancer in select strains of hamsters (Bralow & Weisburger, 1976; Pour, 1978).

Through epidemiology, we have learned that high fat and lack of fiber may be involved in the genesis of this disease. Animal models provide important evidence for an association between colon cancer and high dietary fat levels and low dietary fiber.

Fat:

A number of investigators have studied the role of fat in rodent models for colon cancer (Reddy et al., 1980). For example, Nigro et al.

(1975) using rats on a high beef diet versus those fed a normal diet, with AOM-induced tumors, found that animals on a high fat diet developed more intestinal tumors. Reddy et al. (1980) exposed animals for 2 generations to high fat (20% lard or corn oil) and low fat (5% lard or corn oil) diets. Animals on the high fat diet were more susceptible to colon tumor induction by DMH. It seemed unimportant whether the fat was saturated or unsaturated. Just as is true in man, the animals on a high fat diet excreted more bile acids and neutral sterols than comparable animals on a low fat diet (Reddy et al., 1980).

Further studies (Nigro et al., 1973; Narisawa et al., 1978; Reddy et al., 1980) show that in the animal model, certain specific bile acids can serve as promoters and enhance colon tumor formation. Raising the level of bile secretion, and thus of biliary metabolites, through administration of bile acids to rats increases the rate of colon cancer (Reddy et al., 1980).

The findings, under highly controlled conditions in animal models, reinforce the human data and provide a mechanism accounting for the enhancing effect of high fat intakes, typical of that of Western diets, in colon cancer induction and development.

Fiber:

Following the line of inquiry opened up by metabolic epidemiologic data from Finland, animal models have been used to prove the relationship between dietary fiber consumption, bile acids, and colon cancer. Sprague-Dawley rats fed a diet containing 20% corn oil, or beef fat, and 20% wheat bran had fewer DMH-induced colon tumors than those on a control diet containing 20% fat and no bran (Wilson et al., 1977). Recently, Freeman et al., (1978) found cellulose ingestion to have a protective effect in reducing the number of animals with colonic neoplasia as well as reducing total number of tumors. Fleiszer et al., (1978) indicated that colon tumor incidence decreases as dietary fiber increases. In another study, Cruse et al. (1978) reported that a diet containing 20% wheat bran had no effect on DMH-induced colon carcinogenesis in rats. However, in this experiment, the DMH dose levels were so high that any protective effect of bran might be difficult to note. One important concern in a study of the effect of diet on chemical carcinogenesis is to avoid too high a level of carcinogen for a prolonged period of time, as this may obscure more subtle changes induced by certain dietary modifications.

Results of other studies in animals (Watanabe et al., 1979; Nigro et al., 1979) show that the protective effect depends on the source of the fiber and the type of carcinogen. The inhibition of tumor formation by dietary fiber may be due to dilution of promoters such as bile acids by

the additional bulk that fiber contributes to the stool. Thus, these animal studies yield results parallel to those seen in international human settings. These findings mutually reinforce each other and provide support for the working hypotheses generated on the relative roles of dietary fat and fiber in colon carcinogenesis in man and in animals.

Breast Cancer

Because one can control variables such as age, sex, time, dose of carcinogen, and diet, experimental model systems are uniquely suited to an analysis of the effect of nutrition on breast carcinogenesis.

Some of the first studies suggesting a dietary role in breast carcinogenesis were reported by Tannenbaum (1942) who, in his classical pioneering studies on mammary carcinogenesis, used the spontaneous mouse mammary tumor model, the C3H strain of female mice, who develop mammary carcinoma spontaneously as a result of the presence of the mammary tumor virus (Bittner factor). Tannenbaum noted that mice on a high fat diet developed breast cancer in higher yields than those on a low fat diet. Also, a greater incidence of tumors was noted when the high fat diet was initiated at an earlier age. Further, the fat effect was separate from and independent of the influence of either caloric restriction or obesity. Increased fat intake in the absence of obesity also induced a greater frequency of mammary cancer incidence suggesting that dietary fat per se enhanced mammary carcinogenesis through mechanisms which even now remain unclear. Varying the protein level at the same fat level had a minor effect (Tannenbaum & Silverstone, 1957). Soluble simple carbohydrates gave a slightly greater tumor yield than complex starches (Hoehn & Carroll, 1979).

A number of chemicals can be used to reliably induce breast cancer in rats. Among these, the model initially discovered by Shaw and developed further and studied in detail by Huggings (1961), involved the administration of even a single dose of the polycyclic hydrocarbon 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) in an edible oil to prepubertal female rats. The age appeared important, for younger or older rats were much less sensitive, perhaps because a tissue with active tissue growth and DNA biosynthesis during puberty is more sensitive to carcinogens. This is in line with the evidence from epidemiology where it was the second or third generation among Japanese migrants that showed increased incidence.

Using the DMBA model, Carroll & Khor (1975) confirmed the earlier studies on the enhancing effect of high levels of dietary fat. In addition, this system has been particularly useful since it permits a dis-

inction between events which occur prior to, or during, the initial carcinogenic event (initiation) and those which occur after carcinogen administration (promotion). The fat effect operates mainly in the promotion phase. Using this model, Carroll and co-workers have shown that high levels (20% by weight or 40% of calories) of dietary fat of different types, particularly polyunsaturated fatty acids, but not coconut oil, increase breast cancer development. The mechanism distinguishing unsaturated oils from saturated fats may rest on biosynthetic production and availability of prostaglandins, but more information is necessary (Reddy et al., 1980).

Experiments in ovariectomized rats indicate that a high fat diet has a tumor enhancing effect in the absence of normal periodic ovarian secretions. After an initial tumor regression following ovariectomy, the tumors regrew at a faster rate and greater incidence in the rats on the high fat diet (Cohen et al., 1980).

Gullino (1975) described a method of inducing mammary adenocarcinomas in rats with the use of NMU (N-nitrosomethylurea). The NMU-induced tumors apparently exhibit properties that have more in common with human breast cancer than does the DMBA tumor system, such as, higher invasiveness, and associated hypercalcemia. Sprague-Dawley rats were more sensitive than F344 rats. However, regardless of strain, tumors developed in greater number and with a shorter latent period in animals fed a high fat diet compared with animals fed a low fat diet (Reddy et al., 1980). The F344 rats exhibited a more pronounced difference between groups fed high fat and low fat diets and were, therefore, used for hormone analyses. In the group fed a high fat diet, prolactin levels and total estrogen levels (at the metestrus-diestrus stage) were significantly higher than those in the group fed a low fat diet. All in all, our data indicate that NMU-initiated rats fed HF diets exhibited increased incidence of breast cancer and associated increase in serum prolactin, estrogen, and P/E ratio. It still remains to be determined whether a direct causal relationship exists between high fat intake, increased P/E ratios, and enhanced development of mammary tumors.

The concepts derived from laboratory animal studies that both high fat intake and elevated prolactin concentrations are positively correlated with increased risk for breast cancer has led to human studies to discover whether the laboratory animal findings have any relevance in man. Studies in women by Hill and co-workers (1976), reviewed by Armstrong (1979) have corroborated the findings in rats, that is, higher plasma prolactin concentrations were found in women fed a typical high fat "western" diet and when such women switched to low fat vegetarian diets, their prolactin levels decreased. However, the role of prolactin in human breast cancer is not yet fully documented (Nagasawa, 1979).

Prostate Cancer

At present, there is no reliable laboratory animal model, as is the case for breast and colon cancer (Rivenson & Silverman, 1979). A small proportion of rats that reached old age, especially kept in a germfree environment, showed invasive prostatic adenocarcinoma. Some of these neoplasms were transplantable. A model developed by Fingerhut & Veenema (1977) using castrated rats and high dose intravenous carcinogen administration has a high animal mortality and has not been reproducible in our laboratory, nor in that of Dr.R. Kroes of the TNO.

Approaches to an Understanding of the Carcinogens Responsible for Breast, Colon, and Stomach Cancer.

In this paper so far, we reviewed the use of animal models to delineate the mechanisms whereby nutrition and, in particular, fat are associated with breast and colon cancer. It was found that the level of dietary fat is essentially involved in the development of these kinds of neoplasms through a promoting process. This, then, raises the question as to the carcinogens responsible for these cancers, and also for stomach cancer. New developments in the understanding of the mechanisms of carcinogenesis has suggested that carcinogens can be broadly divided into two classes: those which operate via a genotoxic mechanism, that is, they affect DNA which, in turn, is a link between mutagenicity and carcinogenicity, and those which operate via epigenetic mechanisms (Weisburger & Williams, 1980b). Genotoxic carcinogens, thus, can be indentified through newer technology such as the Ames test, involving bacterial systems, and the Williams test, involving mammalian systems, and utilizing several types of indicating endpoints.

With such tests, we (Weisburger et al., 1980a) as well as Correa et al. (1979), have provided some leads on agents responsible for gastric cancer, as is discussed in this paper.

In relation to breast and colon cancer, we have proposed that the mutagens discovered by Sugimura's group, namely, those found in the charred surface of fried beef, may possibly be the relevant carcinogens (Weisburger, 1977). A number of groups are currently concerned with this area. Although the nature of the mutagens and the relationship between mutagenicity and carcinogenicity, to be established, the chemical structure of one compound isolated from the pyrolysis of the essential amino acid tryptophan, a γ -carboline derivative or a heterocyclic o-methylarylamine (Sugimura et al., 1977) is similar to a synthetic o-methylarylamine 2',3-dimethyl-4-aminobiphenyl which in animal models induced colon and breast cancers.

New evidence suggest that the principles in fried meat are similar to, but yet quite distinct from the agents obtained in the pyrolysis of amino acids (Spingarn et al., 1980). Spingarn separated the mutagens from fried beef into two main components. One of these is one of the most potent mutagens known in the *Salmonella typhimurium* TA 98 (with S-9) assay. It has a molecular weight of 198, formula $C_{11}H_{10}N_4$, for which there are 5 possible isomeric structures. The actual identity of this and related mutagens in fried food are under active investigation. As described above, under stomach cancer, we have described laboratory studies involving mutagenicity testing plus rodent model systems to validate concepts on the etiology of human gastric cancer.

Conclusions

For colon and breast cancer, the correlation between fat intake and colon mortality indicated by epidemiologic data has been supported by experimental evidence from animal models. Animals on high fat diets consistently have shown higher tumor incidence. Animal models have provided information on mechanisms, namely, an increased concentration in the gut of bile acids stemming from a high fat diet, and having a promoting effect on colon cancer development. This effect can be inhibited by intake of specific fibers such as whole grain cereals or wheat bran leading to a lower concentration of bile acids in the gut by adding bulk to the stool.

For breast cancer also, animal model systems are providing clues as to the mechanisms involved including the role of hormones, such as prolactin and estrogen, and their relationship to a high fat diet. The lower tumor recurrence rate in ovariectomized animals on a low versus a high fat diet lends itself to an recommendation for a possible prevention of recurrence in breast cancer patients through dietary manipulation of foods.

Due to the evidence derived from epidemiology, metabolic epidemiology and the convincing support derived from concordant carefully constructed animal studies, recommendations towards the prevention of colon and breast cancer may now be made. The risk for colon cancer may be appreciably decreased by lowering intake of total dietary fat (and also cholesterol) and by increasing the intake of natural fibers. For breast cancer, a lower daily intake of total fat may also be beneficial. In occupational carcinogenesis, where specific chemicals have induced specific kinds of cancer in man, these diseases have been reproduced relatively faithfully in animal models. If this condition holds true for colon and stomach cancer, it may be that the chemicals used to induce

tumors in the animals models may be structurally similar to unidentified carcinogens for these diseases.

In animal models, alkyl nitrosoureas are specific inducers of glandular stomach cancer as seen in man. Since refrigeration of food rich in nitrate prevents nitrite formation, such chemicals can form by reaction of nitrite with certain substrates found in some foods such as fish, and since vitamin C inhibits the nitrosation reactions by preferential interaction with nitrite, those two facts can be utilized for prevention. Thus, limiting intake of foods preserved by salting, pickling, and smoking, and increasing daily intake of fresh fruits and vegetables, are essential steps in prevention of gastric cancer.

The question of the mode of cooking of foods, particularly frying and especially of meats, is open as regards intestinal tract cancer. Mutagenicity studies may eventually lead to possible carcinogens which can then be validated in animal models and, thus, the role of frying in the causation of human colon or breast cancer elucidated.

Animal models have been used traditionally to discover whether suspected environmental agents were associated with a risk for human cancer. Thus, much of the knowledge of structure-activity relationships in chemical carcinogenesis was acquired beginning in the 1930's one specific pure chemical such as benzo(a)pyrene were identified as the active principle in coal tar (Weisburger, 1976). With the exception of arsenic and benzene, all other known human carcinogens, whether they are pure chemicals such as 2-naphthylamine or complex products such as tobacco tar, have induced cancer in various animal models. In general, they do so relatively rapidly and in high yield. Thus, the conclusion is made that, where the bioassay of a chemical with unknown biological properties yields cancer in rodent models quickly and in high yield, it is presumed that such a chemical might be a human cancer risk (Weisburger & Williams, 1980). This is especially sure if collateral tests in the rapid bioassay systems, such as mutagenicity testing and DNA repair assays, show such chemicals to be genotoxic. Whether chemicals, which provide weak evidence of carcinogenicity at high dose level and lifetime testing, constitute human cancer risks is a controversial problem.

In recent years, some of us have utilized laboratory models for specific cancers, as described in this paper, to delineate risk factors associated with such human cancers. The models were also used to develop information on the relevant mechanisms. Thus, there is a sizable amount of hard facts on the role of dietary fat and dietary fiber in the development of colon and breast cancers. Yet, curiously, authorities who would loudly proclaim the need to ban Red Dye #2 or saccharin on the basis of very weak animal experiments, are not motivated and impressed enough to even consider taking some public action to lower the impact of current

dietary practices in the Western world, such as high levels of dietary intake of total fat or the relative absence of dietary fiber.

It is undeniable, however, that animal models and other laboratory technology such as testing environmental agents for genotoxicity will prove invaluable for evaluating risk factors relative to important human kinds of cancer. It is hoped that eventually our colleagues as well as the public at large will find this evidence sufficiently impressive to develop public activities designed to lower human cancer risk with respect to kinds of diseases affecting hundreds of thousands of people.

VOEDING EN KANKER BIJ DE MENS: EXPERIMENTELE BENADERING

Samenvatting

Naast longkanker waarvan het vóórkomen in verband staat met het roken van tabak, zijn kanker van het maagdarmkanaal en kanker van hormoon-afhankelijke organen zoals de melk- en prostaatklier de belangrijkste vormen van kanker bij de mens.

Gedurende de laatste 30 jaar zijn er proefdiermodellen ontwikkeld, die een getrouwe nabootsing zijn van bepaalde vormen van kanker bij de mens. Voorbeelden ervan zijn maag-, colon- en borstkanker.

Deze modellen hebben het mogelijk gemaakt onderzoek te doen naar het mechanisme dat ten grondslag ligt aan het ontstaan van deze vormen van kanker. Bovendien konden met behulp van deze modellen gegevens worden verzameld over de rol die modifierende invloeden, zoals bijvoorbeeld voedingsfactoren, bij het kankerproces spelen.

Op deze wijze is inzicht verkregen in de bevorderende werking van voedingsvetten op het ontstaan van colon- en borstkanker alsmede in de remmende invloed van voedingsvezel op de vorming van colonkanker. Dergelijk experimenteel onderzoek is een goede aanvulling op de informatie die werd verkregen uit epidemiologisch en metabool epidemiologisch onderzoek. Resultaten van dit onderzoek vormen een degelijke wetenschappelijke basis om uiteindelijk te komen tot aanbevelingen met betrekking tot het terugdringen van het kanker risico.

References

In the main, references include reviews or recent summaries in order to limit the number of citations.

American Cancer Society. 1980. Cancer Facts and Figures. American Cancer Society. New York. 31 pp

Armstrong, B.K. 1979. Diet and hormones in the epidemiology of breast and endometrial cancers. Nutr. Cancer, 1:90-95

- Berg, J.W., 1977. World-wide variations in cancer incidence as clues to cancer origins. In: H.H. Hiatt, J.D. Watson & J.A. Winsten: Origins of Human Cancer, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. pp 15-19
- Bralow, S.P. & J.H. Weisburger, 1976. Experimental carcinogenesis in the digestive organs. In: P. Sherlock & N. Zamcheck: Clinics in Gastroenterology. W.B. Saunders, London. pp 527-542
- Carroll, K.K. & H.T. Khor, 1975. Dietary fat in relation to tumorigenesis. Prog. Biochem. Pharmacol., 10:303-353
- Cohen, L.A., P.C. Chan & E.L. Wyder, 1980. A high-fat diet enhances the development of mammary tumors in ovariectomized rats. Cancer 00: in press
- Correa, P. et al., 1979. The gastric microenvironment in populations at high risk to stomach cancer. Natl. Cancer Inst. Monogr., 53:167-170
- Cruse, J.P., M.R. Lewin & C.G. Clark, 1978. Failure of bran to protect against experimental colon cancer in rats. Lancet 2: 1278-1280
- Cutler, S.J. & J.I. Young, 1975. Demographic patterns of cancer incidence in the United States. In: J.F. Fraumeni, Jr.: Persons at High Risk of Cancer. Academic Press, New York. pp 307-342
- Devesa, S.S. & D.T. Silverberg, 1978. Cancer incidence and mortality trends in the United States: 1935-1974 J. Natl. Cancer Inst., 60:545
- Doll, R., 1979. Epidemiological enquiry: power and limitations. In: P. Emmelot & E. Kriek: Environmental Carcinogenesis. Elsevier/No. Holland, Amsterdam. pp. 381-400
- Druckrey, H., 1975. Chemical carcinogenesis on N-nitroso derivatives. GANN, 17: 107-132
- Fingerhut, B. & R. Veenema, 1977. An animal model for the study of prostatic adenocarcinoma. Invest. Urol., 15:42
- Fleischer, D. et al., 1978. Protective effect of dietary fibre against chemically induced bowel tumors in rats. Lancet, 2: 552-553
- Freeman, H.J., G.A. Spiller & Y.S. Kim, 1978. A double-blind study on the effect of purified cellular dietary fiber on 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colonic neoplasia. Cancer Res., 38: 2912-2917
- Gullino, P.M., H.M. Pettigrew & F.H. Grantham, 1975. N-Nitrosomethylurea as mammary gland carcinogen in rats. J. Natl. Cancer Inst., 54: 410-414
- Higginson, J. 1979. Environmental carcinogenesis: A global perspective. In: P. Emmelot & E. Kriek: Environmental Carcinogenesis. Elsevier/No. Holland, Amsterdam. pp 9-24
- Hill, P. & E.L. Wynder, 1976. Diet and prolactin release. Lancet 2: 806-807
- Hirayama, T., 1979. Diet and Cancer. Nutr. Cancer, 1: 67-81

- Hoehn, S.K. & K.K. Carroll, 1979. Effects of dietary carbohydrate on the incidence of mammary tumors induced in rats by 7, 12-dimethylbenz(a)-anthracene. *Nutr. Cancer*, 1: 27-30
- Huggins, C., L.C. Grand & F.P. Brillantes, 1961. Mammary cancer induced by a single feeding of polycyclic hydrocarbons and its suppression. *Nature*, 189: 204-207
- Joossens, J.V., 1980. Trends in cardiovascular mortality. *Acta Cardiologica*. In press
- MacMahon, B., P. Cole & J. Brown, 1973. Etiology of human breast cancer: A review. *J. Natl. Cancer Inst.*, 50: 21-42
- Mirvish, S.S., 1975. Blocking the formation of N-nitroso compounds with ascorbic acid in vitro and in vivo. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 258: 175-180
- Nagasawa, H., 1979. Prolactin and human breast cancer: A review. *Europ. J. Cancer*, 15: 267-279
- Narisawa, T., B.S. Reddy & J.H. Weisburger, 1978. Effect of bile acids and dietary fat on large bowel carcinogenesis in animal models. *Gastroenterol. Jpn.*, 13: 206-212
- Nigro, N.D., N. Bhadrachari & C.C. Chomchai, 1973. A rat model for studying colonic cancer - effect of clolestyramine on induced tumors. *Dis. Colon Rectum*, 16: 438
- Nigro, N.D. et al., 1975. Effect of dietary beef fat on intestinal tumor formation by azoxymethane in rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 54: 439-442
- Nigro, N.D. et al., 1979. Effect of dietary fiber on azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 62: 1097-1102
- Oiso, T., 1975. Incidence of stomach cancer and its relation to dietary habits and nutrition in Japan between 1900 and 1957. *Cancer Res.*, 35: 3254-3258
- Pour, P., 1978. A new and advantageous model for colorectal cancer. *Cancer Lett.*, 4: 293-298
- Reddy, B.S. et al., 1980. Nutrition and its relationship to cancer. *Adv. Cancer Res.*, 32: 237-345
- Rivenson, A. & J. Silverman, 1979. The prostatic carcinoma in laboratory animals. *Invest. Urol.*, 16: 468-472.
- Spingarn, N.E. et al., 1980. Formation of mutagens in cooked foods. III. Isolation of a potent mutagen from beef. *Cancer Lett.*, oo. In press
- Sugimura, T, et al., 1977. Mutagenic principles in tryptophan and phenylalanine pyrolysis products. *Proc. Jpn. Acad.*, 53: 58-61
- Sugimura, T. & T. Kawachi, 1978. Experimental stomach carcinogenesis. In: M. Lipkin & R.A. Good: *Gastrointestinal Tract Cancer*. Plenum, New York. pp 327-341
- Tannenbaum, A., 1942. The genesis and growth of tumors. III. Effect of a high fat diet. *Cancer Res.* 2: 468-475

- Tannenbaum, A. & H. Silverstone, 1957. Nutrition and the genesis of tumors. In: R.W. Raven: Cancer, Vol. 1. Butterworth, London. pp 306-334
- Tatematsu, M. et al., 1975. Effects in rats of sodium chloride on experimental gastric cancers induced by N-methyl-N'-nitrosoguanidine or 4-nitroquinoline-1-oxide. J. Natl. Cancer Inst., 55: 101-104
- Watanabe, K. et al., 1979. Effect of dietary alfalfa, pectin, and wheat bran in azoxymethane or methylnitrosourea induced colon carcinogenesis in F344 rats. J. Natl. Cancer Inst., 63: 141-145
- Weisburger, J.H., 1976. Bioassays and tests for chemical carcinogens. In: C.E. Searle: Chemical Carcinogens. ACS Monogr. 173. American Chemical Society. New York. pp 1-23
- Weisburger, J.H., 1977. Current views on mechanisms concerned with the etiology of cancers in the digestive tract. In: E. Farber et al.: Pathophysiology of Carcinogenesis in Digestive Organs. Univ. of Tokyo Press., Japan. pp 1-20
- Weisburger, J.H., 1979. Mechanism of action of diet as a carcinogen. Cancer, 43: 1987-1995
- Weisburger, J.H. & R. Rainieri, 1975. Dietary factors and the etiology of gastric cancer. Cancer Res., 35: 3469-3474
- Weisburger, J.H., L.A. Cohen E.L. & Wynder, 1977. On the etiology and metabolic epidemiology of the main human cancers. In: H.H. Hiatt, J.D. Watson & J.A. Winston: Origins of Human Cancer, Cold Spring Harbor Lab., New York. pp 567-602
- Weisburger, J.H. et al., 1980. Induction of cancer of the glandular stomach in rats by an extract of nitrite-treated fish. J. Natl. Cancer Inst., 64: 163-167
- Weisburger, J.H. & G.M. Williams, 1980. Chemical carcinogenesis. In: J. Doull, C. Klaassen, & M. Amdur: Toxicology: The Basic Science of Poisons, 2nd ed. Macmillan. New York. In press
- Weisburger, J.H. & G.M. Williams, 1981. Chemical carcinogenesis. In: J.F. Holland & E. Frei: Cancer Medicine, 2nd ed. Lea & Febiger. Phila. In press
- Wilson, R.B., D.P. Hutchinson & L. Wideman, 1977. Dimethylhydrazine induced colon tumors in rats fed diets containing beef fat or corn oil with and without wheat bran. Am. J. Clin. Nutr., 30:176
- Wynder, E.L., 1979. Dietary habits and cancer epidemiology. Cancer, 43: 1955-1961
- Wynder, E.L. et al., 1976. Nutrition and the etiology and prevention of breast cancer. Cancer Detec. Prev., 1: 293-310
- Wynder, E.L. & G.B. Gori, 1977. Contribution of the environment to cancer incidence: An epidemiologic exercise. J.Natl. Cancer Inst., 58: 825-832

M.I. Willems, B.J. Spit en J.P. van Hees*

Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO

Samenvatting

Er wordt een onderzoek beschreven naar de vroege effecten van tin (als stannochloride) op pancreas en dunne darm van de rat. Na 4 weken voeding van 500 of 1000 ppm tin in een semisynthetisch basisvoer, waren gewicht en lengte van de dunne darm toegenomen en was de darm verwijd en sterk gekronkeld; in de 1000 ppm groep was de celturnover van het darm-epitheel duidelijk verhoogd. In de exocriene pancreas werden bij 1000 ppm tin vanaf 4 weken beker-vormige mitochondriën en vanaf 6 weken degeneratie en atrofie waargenomen. Macroscopische darmveranderingen werden al na 2 weken tinvoeding gezien. De pancreasveranderingen waren reversibel: de mitochondriumveranderingen verdwenen snel, maar de ernstige degeneratieve veranderingen veel langzamer, na stopzetten van de tintoediening.

Inleiding

Orale opname van tin in de vorm van verschillende stanno-zouten is voor ratten schadelijker dan vroeger werd aangenomen (De Groot et al., 1973). Behalve in groeivertraging, verlaagd voerrendement en bloedarmoede komt de schadelijkheid ook tot uiting in degeneratie en necrose van de exocriene pancreas, geringe leververanderingen en verschijnselen van darm-irritatie.

Groeivertraging, verlaagd voerrendement en bloedarmoede treden op bij tindoseringen in het voer van 500 ppm tin en hoger (De Groot, 1973). Darm-, lever- en pancreasveranderingen, die uitvoerig zijn beschreven door Dreef-van der Meulen et al. (1974), worden pas bij hogere tindoseringen waargenomen.

In deze publicatie worden een drietal experimenten met tinchloride bij ratten beschreven. Het doel ervan was meer inzicht te krijgen in de vroege effecten van tin op darm en pancreas en het eventuele herstel van de pancreasveranderingen na stopzetten van de tinchloride toediening.

* Het darmonderzoek werd uitgevoerd als een zes-maandsonderzoek in het kader van de doctoraalstudie in de biologie aan de Landbouwhogeschool te Wageningen.

Methoden

Een drietal experimenten werd uitgevoerd met pasgespeende mannelijke Wistar ratten. Voor de bereiding van de verschillende tinvoeren werd $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Analar BDH Chemicals Ltd) gemengd door semisynthetisch basisvoer met 10 ppm Cu en 50 ppm Fe. Voor de voersamenstelling zie De Groot (1973). Om te sterke groeivertraging te voorkomen, werd de hoeveelheid tin in de hogere doseringsgroepen (de 1000 en 1000-3000 ppm tingroepen) geleidelijk opgevoerd. Voer en water werden ad libitum verstrekt. Lichaamsgewichten, voerverbruik en hemoglobine-gehalte (Hb) van het bloed werden regelmatig bepaald.

De experimenten 1 en 2 bestonden uit een proefperiode (respectievelijk 7 en 6 weken) gevolgd door een 4-weekse herstelperiode. Gedurende de proefperiode kregen 3 groepen ratten voer met 1000, 500 of 0 ppm tin. Om eventuele effecten op te sporen die niet primair door de tin, maar door de groeivertraging werden veroorzaakt, werd in experiment 1 een extra controle groep ingezet, die semisynthetisch basisvoer kreeg met wisselende hoeveelheden cellulose. De hoeveelheden cellulose werden steeds zo gekozen dat de groeivertraging in de cellulosegroep zoveel mogelijk overeenkwam met die in de 1000 ppm tingroep. Gedurende de herstelperiode kregen alle dieren basisvoer zonder tin of cellulose. In experiment 1 werden aan het eind van de proefperiode en de herstelperiode 5 dieren per groep voor onderzoek opgeofferd door decapiteren; in experiment 2 werden iedere 2 weken 20 dieren per groep opgeofferd. Bij de sectie werd van ieder dier pancreasweefsel verzameld voor licht- en elektronenmicroscopisch (LM- en EM-) onderzoek.

Om de invloed van tin op de uitstoting van de zymogeen granula te bestuderen, werden in experiment 2 aan het eind van week 6 vijf dieren van iedere groep intraveneus ingespoten met pilocarpine nitraat. Onder invloed van pilocarpine, stoten de exocriene acinair cellen van de pancreas, een groot deel van hun zymogeen granula uit. Na $1\frac{1}{2}$ uur werden de dieren opgeofferd door decapiteren. De pancreas werd verzameld en verwerkt tot $1\ \mu\text{m}$ dikke coupes in Epon 812. In deze coupes werd het percentage van het oppervlak bepaald dat bezet was door zymogeen korrels.

In experiment 3 kregen 4 groepen ratten (10 ♂ per groep) gedurende 4 weken voeren met 1000 - 3000, 1000, 500 of 0 ppm tin. Op dag 28 werden alle dieren, met uitzondering van de dieren bestemd voor het autoradiografisch onderzoek, na een nacht vasten, gedood door middel van decapitatie. Maag en dunne darm werden gewogen. Van ieder dier werden maag- pancreas- en dunne darm-weefsel voor LM-onderzoek en 4 stukjes

dunne darm voor stereomicroscopisch onderzoek verzameld in gebufferde formaline. Voor de bepaling van het percentage gelabelde cellen en de migratiesnelheid van de villus-epitheelcellen in de dunne darm, werden 4 dieren van de controlegroep en van de 1000 ppm tingroep ingespoten met getritieerd thymidine. Vier en twintig uur daarna werden de dieren opgeofferd en werden op gestandaardiseerde wijze 6 stukjes dunne darm verzameld en verwerkt tot paraffine coupes voor autoradiografisch onderzoek. In het voorste deel van de dunne darm werd het oppervlak van de villus-epitheelcellen bepaald volgens een methode beschreven door Mansbach (1978).

Resultaten

De tinvoeren induceerden een duidelijke groeivertraging en een verlaagde voedselopname en voerefficiëntie. In de met tin gevoerde groepen was het Hb-gehalte van het bloed lager dan bij de controles. Na stoppen met de tinvoeding herstelde de groei en het Hb-gehalte zich, maar lichaamsgewicht en Hb-gehalte van de tindieren bleef lager dan dat van de controledieren. Met uitzondering van de eerste 2 weken, lag het gemiddelde lichaamsgewicht van de cellulose dieren tussen dat van de 500 en 1000 ppm tingroepen in. Het Hb-gehalte van de cellulosegroep was verhoogd gedurende de proefperiode, wat kan worden toegeschreven aan de groeivertraging in deze groep (Dairman, 1978).

Dunne darm: gewicht, lengte, morfologie en celkinetiek.

De dunne darm gewichten namen toe met oplopende tindoseringen. Vergeleken met de controle was het absolute gewicht in de hoogste doseringsgroep met 56%, in de middelste doseringsgroep met 45% en in de laagste doseringsgroep met 28% toegenomen. De absolute maaggewichten in controle- en proefgroepen waren volledig vergelijkbaar (experiment 3). Uit de resultaten van experiment 2 bleek dat al vanaf 2 weken, zowel bij 500 ppm als bij 1000 ppm tin de dunne darm sterk verwijd en gekronkeld was. Het slijmvlies leek iets verdikt. Ernst en frequentie van deze veranderingen waren duidelijk gerelateerd aan de tindosis en waren maximaal na 4 weken.

In experiment 3 traden soortgelijke, doch minder duidelijke veranderingen op. Het stereomicroscopisch onderzoek liet zien dat de darmvlokken bij de met tin gevoerde dieren vaak verbreed, en soms zelfs walvormig waren (Fig. 1).

De toppen van de villi waren stomper dan bij de controledieren; bovendien was het oppervlak van de villi vaak onregelmatiger. Deze verschijn-

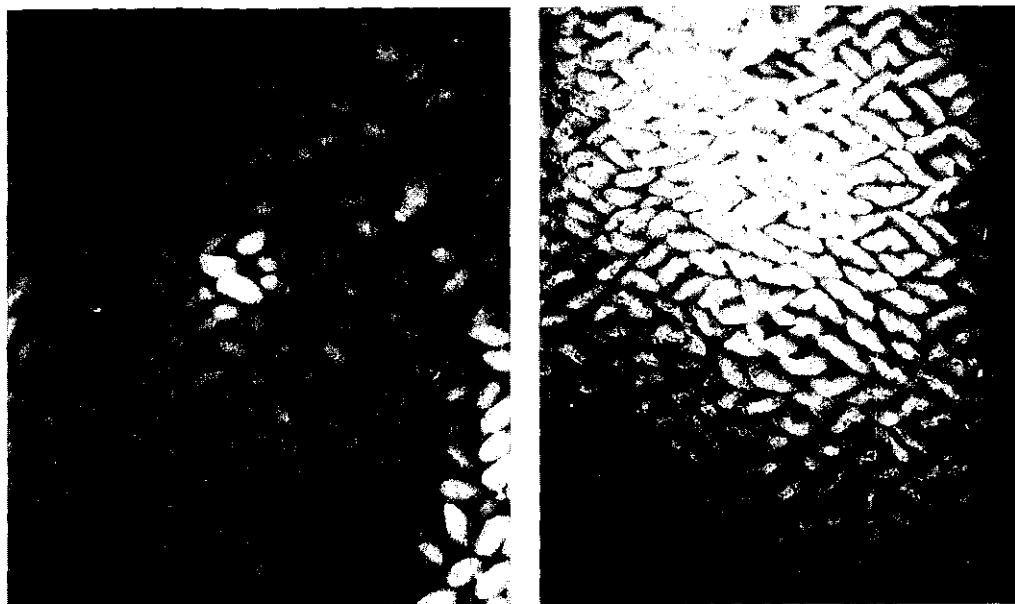


Fig. 1. Stereomicroscopische foto's van darmvlokken van het eerste deel van de dunne darm. Links: controle, rechts: 500 ppm tin, de villi zijn verbreed (pijl) en het oppervlak van de villi is onregelmatiger geworden. 115 x

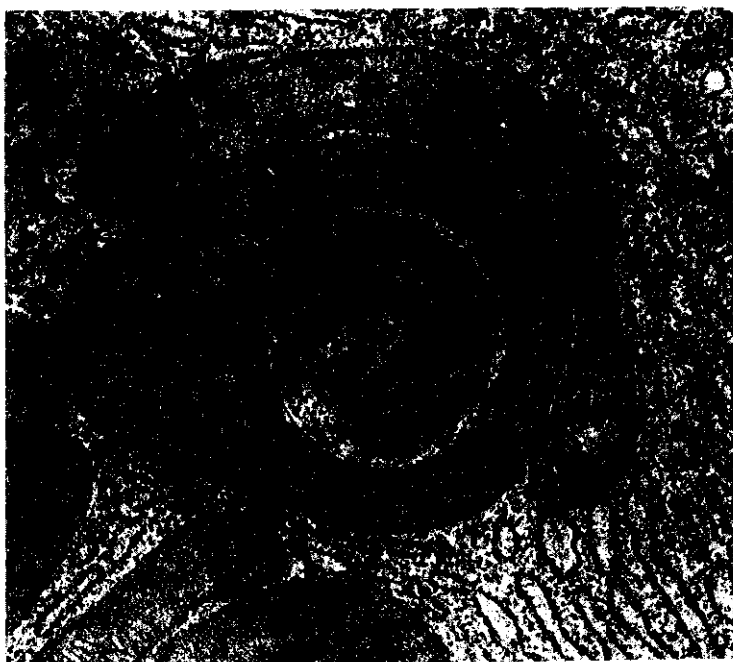


Fig. 2. Prototype van het bekervormige mitochondrium in de pancreas van een rat na 4 weken voeding van 1000 ppm tin. 40.000 x

selen werden in wisselende mate waargenomen in elk van de 4 darmstukken; er was geen waarneembare dosis-effect relatie.

Het percentage gelabelde epitheelcellen en de migratiesnelheid van deze cellen waren statistisch significant toegenomen in de 1000 ppm tingroep. De sterkste toename werd gevonden in de voorste helft van de dunne darm. Het gemiddelde aantal epitheelcellen per villus en de gemiddelde hoogte van de villi waren niet veranderd onder invloed van tin. Noch uit het LM-onderzoek noch uit de celoppervlaktmetingen van het voorste deel van de dunne darm bleek dat de grootte van de epitheelcellen was veranderd door de tin in het dieet.

Pancreas: lichtmicroscopische waarnemingen.

In alle 5 dieren op voer met 1000 ppm tin werden na 7 weken de volgende pancreasafwijkingen gevonden: toename van diffuus verspreide individuele celnecrose, proliferatie van bindweefselachtige cellen in het interstitium en vervanging van pancreasweefsel door vetweefsel. Na de proefperiode werd geen verschil gezien tussen de pancreassen van de 500 ppm groep, en die van de cellulose- en de controle-groep.

Na de herstelperiode werd echter in beide tingroepen vervanging van pancreasweefsel door vetweefsel gevonden, en wel in 2 van de 5 dieren van de 500 ppm groep en in 3 van de 5 dieren van de 1000 ppm groep (experiment 1). In het tweede experiment werden soortgelijke veranderingen pas aan het einde van de 6-weekse proef- en ná de herstelperiode gevonden in de 1000 ppm tingroep. De frequentie van voorkomen en de ernst van de afwijkingen waren geringer dan in het eerste experiment.

Pancreas: Ultrastructuur.

Pancreassen van de 1000 ppm tingroep, waarin lichtmicroscopisch vetatrofie werd gezien, vertoonden verbrede bindweefselzones tussen de acini. Deze zones bevatten veel collageen, cellen, bloedvaten, afvoergangen en necrotisch materiaal. De lumina van de resterende acini waren vergroot en vertoonden verlies van microvilli. De eindfase van het pancreasverval werd gekenmerkt door een stapeling van vetcellen, die bestonden uit een grote vetvacuole, een opzij gedrukte kern en een geringe hoeveelheid cytoplasma. De eilandjes van Langerhans bleven onveranderd.

Behalve deze veranderingen werden in de exocriene cellen van de dieren in de beide tingroepen uit het eerste experiment een drietal afwijkingen gevonden: verwijde cisternae van het ruwe endoplasmatische reticulum (RER), een onregelmatig verwijde perinucleaire ruimte en afwijkende mitochondriën. Aangezien verwijd RER en verwijde perinucleaire ruimten ook, en in dezelfde mate voorkwamen in de acinaircellen van dieren waarbij met cellulose in het dieet groeivertraging was geïnduceerd,

werden deze veranderingen niet aan tin toegeschreven. De meest opvallende mitochondriumverandering was het kelk- of bekervormig worden van de mitochondriën (Fig. 2). In de beker werden verschillende cytoplasma-componenten als RER, mitochondrium en zymogeenkorrel aangetroffen. Soms waren in dit type mitochondrium de christae gebundeld.

In het tweede experiment bleek dat de frequentie waarmee deze mitochondriën voorkwamen, duidelijk gerelateerd was aan de dosis.

Zo werden in de 1000 ppm tingroep na 4 en 6 weken veel van deze mitochondriën gevonden, terwijl er in de 500 ppm groep na 6 weken slechts weinig werden waargenomen. Bij de hoge dosering kwamen na twee weken ook mitochondriën voor met insluitingen en een vlekkerige lichte matrix.

Aan het einde van de twee-weekse herstelperiode waren in de 1000 ppm tindieren de bekervormige mitochondriën nagenoeg verdwenen. Bij uitzondering werd een autophagosoom met een opgenomen mitochondrium waargenomen.

Pancreas: uitstoten zymogeengranula.

In de controle en de 1000 ppm tindieren was respectievelijk 48% en 42% van het celoppervlak bezet met zymogeengranula, terwijl dit na de injectie met pilocarpine respectievelijk 15% en 29% bedroeg. Het verschil na injectie met pilocarpine bleek statistisch significant te zijn ($P < 0,001$; chi-kwadraattoets); dit wijst erop dat de tinvoeding het vermogen van de cel om zijn zymogeenkorrels uit te stoten, had verminderd.

Discussie

Uit de beschreven experimenten blijkt dat orale toediening van tin-chloride bij doseringen vanaf 500 ppm duidelijke veranderingen in dunne darm en pancreas van de rat introduceert.

De dunne darm was verwijd en sterk gekronkeld, gewicht en lengte waren toegenomen en de villi waren verbreed. Na een toedieningsperiode van 4 weken waren deze veranderingen duidelijk aanwezig in elk van de 3 doseringsgroepen van experiment 3 (500, 1000 en 3000 ppm tin). Macroscopisch waren er echter aanwijzingen dat deze veranderingen ook al na 2 weken aanwezig waren zowel in de 500 als in de 1000 ppm groep (experiment 2). In vroegere onderzoeken werden ook veranderingen in de dunne darm gezien, evenwel pas bij tindoseringen van 4000 ppm en hoger. Naast algemene verschijnselen van slijmvliesirritatie werd ook een vergroting en een toename van het aantal epitheelcellen gevonden (Dreef-van der Meulen et al., 1974; Fritsch et al., 1977). Dit type veranderingen is in onze experimenten niet waargenomen. Wel was de delingsactiviteit en de migratiesnelheid van de epitheelcellen verhoogd in de 1000 ppm tingroep.

Omdat echter het aantal cellen per villus niet was toegenomen, duidt dit alleen op een verhoogde celturnover.

Naast de reeds bekende effecten van tin op de pancreas, die uitvoerig zijn beschreven door Dreef-van der Meulen et al. (1974) werden in dit onderzoek typische mitochondriumveranderingen gevonden in de exocriene acinair cellen van de pancreas. Deze afwijkende mitochondriën vielen vooral op door hun bekervorm. Het optreden van zowel bekervormige mitochondriën als ernstige pancreas degeneratie was dosis- en tijdafhanke-lijk. Bovendien werden de bekervormige mitochondriën eerder en bij lagere tindsoseringen waargenomen dan degeneratie en necrose van de acinair cellen.

Bij de gekozen toedieningsperiode bleek de mitochondriumverandering reversibel te zijn. De focale pancreasatrofie herstelde veel minder snel. In experiment 1 leek het erop dat deze afwijking niet reversibel was en werd zelfs de suggestie gewekt dat het tineffect tijdens de herstelperiode nog doorwerkte. Deze waarneming werd echter niet bevestigd in experiment 2, waar het aantal afwijkende pancreassen na de herstelperiode juist lager was dan aan het einde van de proefperiode. De frequentie en de ernst van de pancreasschade was in experiment 1 duidelijk hoger dan in experiment 2. Het is niet uitgesloten dat het verschil in reversibiliteit hiermede verband houdt en dat derhalve bij een te radicale atrofie geen herstel meer mogelijk is.

Degeneratie, necrose en atrofie van de exocriene pancreas zijn weinig specifiek. Deze kunnen door deficienties aan eiwitten, aminozuren en sporenelementen, maar ook door toediening van aminozuuranalogen, stoffen die de eiwitsynthese blokkeren en door pancreasstimulantia, of door hongeren worden geïnduceerd (Willems et al., 1975).

In tegenstelling hiermee lijken de mitochondriumveranderingen specifiek. In de rattenpancreas worden normaal geen bekervormige mitochondriën gevonden, ook niet als begeleidend verschijnsel of voorstadium van pancreasatrofie. Jamieson en Palade (1968) vonden morfologisch vergelijkbare mitochondriën in exocrien pancreasweefsel van de cavia na incubatie van dit weefsel met Antimycine A, een stof die de mitochondriale ademhaling remt door de elektronenoverdracht tussen de cytochromen b en c te blokkeren. In analogie met deze bevindingen zou het mogelijk zijn dat ook tin direct of indirect invloed heeft op de mitochondriale respiratie en dus op de energievoorziening van de cel. Deze mogelijkheid sluit aan bij de waarneming dat de uitstoting van zymogeengranula onder invloed van pilocarpine afgenomen is in de 1000 ppm tin-groep. Uitstoting van zymogeengranula is een proces waarvoor mitochondriale energie nodig is. En ook de bevindingen van Kappas en Maines (1976) dat orale toediening van stannochloride aan ratten de hoeveelheid mitochondriale cytochromen in de nier, met bijna 35% verlaagde, onderstreept deze hypothese.

Of er een samenhang is tussen de beschreven pancreas- en darmveranderingen is vooralsnog onduidelijk. Bekend is, dat darm en pancreas elkaar sterk beïnvloeden bij de uitoefening van hun functie. Deze functionele wisselwerking zou ook morfologisch tot uiting kunnen komen. Uit onderzoek van Yamaguchi et al. (1979) is gebleken dat stannochloride de opname van calcium uit de dunne darm remt en het is dan ook de vraag of de effecten op de pancreas primair veroorzaakt zijn door tin of het gevolg zijn van een gestoorde resorptie van stoffen die essentieel zijn voor het goed functioneren van de exocriene pancreas.

Dankwoord

De auteurs zijn dank verschuldigd aan dhr. M.C. Bosland voor zijn medewerking aan het autoradiografisch onderzoek.

Literatuur

- Dairman, W., 1978. A subacute study in the rat on graded levels of restricted food consumption and its effect on tissue to body weight ratios, serum clinical chemistry and hematological parameters. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 45: 253-254
- Dreef-van der Meulen, H.C., V.J. Feron & H.P. Til, 1974. Pancreatic atrophy and other pathological changes in rats following the feeding of stannous chloride. *Pathol. Eur.*, 9: 185-192
- Fritsch, P., G. de Saint Blanquat & R. Derache, 1977. Etude nutritionnelle et toxicologique, chez le rat, d'un contaminant alimentaire: l'étain. *Toxicology*, 8: 165-175
- Groot, A.P. de, 1973. Subacute toxicity of inorganic tin as influenced by dietary levels of iron and copper. *Food Cosmet. Toxicol.*, 11: 955-962
- Groot, A.P. de, V.J. Feron & H.P. Til, 1973. Short term toxicity studies on some salts and oxides of tin in rats. *Food Cosmet. Toxicol.*, 11: 19-30
- Groot, A.P. de, 1976. Toxicologische aspecten van verontreinigingen met tin. *Voeding*, 37: 87-97
- Jamieson, J.D. & G.E. Palade, 1968. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. *J. Cell Biol.*, 39: 589-603.
- Kappas, A. & M.D. Maines, 1976. Tin: A potent inducer of heme oxygenase in kidney. *Science*, 192: 60-62
- Mansbach, C.M., 1978. Enterocyte turnover and content in fat-fed hamsters. *Dig. Dis. Syst.*, 23: 486-492
- Willems, M.I., B.J. Spit & C.A. van der Heijden, 1975. Ultrastructuur en reversibiliteit van pancreas-afwijkingen geïnduceerd door stannochlo-

ride. Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek TNO. Rapport

Nr. R 4808

Yamaguchi, M., Y. Kubo & T. Yamamoto, 1979. Inhibitory effect of tin on intestinal calcium absorptium in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 47: 441-444

DE INVLOED VAN KORTDURENDE EN LANGDURENDE VOEDERING VAN LYSINOALANINE OP DE NIEREN VAN RATTEN

R.B. Beems, L. van Beek en B.J. Spit
Instituut CIVO - Toxicologie en Voeding TNO

Samenvatting

Voeding van lysinoalanine (LAL) induceert in ratten nephrocytomegalie; een nierafwijking die gekenmerkt wordt door de aanwezigheid van vergrote epitheelcellen met grote, vaak onregelmatig gevormde kernen, in de pars recta van de proximale niertubuli. Bij een kortdurende (14 dagen) proef bleek dat LAL ook een acuut toxisch effect op de nieren heeft. Na enkele dagen trad uitgebreide necrose op die werd gevolgd door een proces van regeneratie. Het geregenereerde epitheel is kennelijk relatief resistent tegen de schadelijk werking van LAL. Nephrocytomegalie kwam zowel in het oorspronkelijke als in het geregenereerde epitheel voor. Een begin van nephrocytomegalie werd reeds na 40 uur blootstelling waargenomen. In een chronische (2,5 jaar) proef met LAL werden bij 5 van de 50 behandelde mannelijke ratten niertumoren gevonden, tegen geen enkele in de controle groep. Mede gezien de lage achtergrondsincidentie van niertumoren bij de gebruikte rattestam wijst deze bevinding op een carcinogeen effect van LAL.

Een aantal factoren, zoals onder andere het feit dat LAL in de Ames test niet mutageen is, maakt het echter aannemelijk dat LAL niet als een direct werkend carcinogeen, maar eerder als een co-carcinogeen moet worden beschouwd.

Inleiding

In de moderne levensmiddelen technologie wordt alkalische behandeling van eiwitten toegepast ter verbetering van de technologische eigenschappen. Deze behandeling kan echter ook nadelige gevolgen hebben zoals racemisering en destructie van aminozuren en vorming van ongewone aminozuren zoals lysinoalanine (LAL) en ornithinoalanine. Bij voeding van alkalisch behandeld eiwit aan ratten bleek een eigenaardige nierafwijking geïnduceerd te kunnen worden. Deze afwijking is gekarakteriseerd door de aanwezigheid van grote epitheelcellen met vergrote, vaak onregelmatig gevormde kernen in de pars recta van de proximale tubuli en is voor het eerst door Woodard en Alvares (1967) beschreven en aangeduid als "(nephro)cytomegalie". LAL bleek verantwoordelijk te zijn voor de afwijking (Woodard & Short, 1973, 1975).

LAL als vrij aminozuur toegediend bleek veel actiever te zijn wat betreft het induceren van cytomegalie dan in eiwit gebonden LAL.

Bij het toxicologisch onderzoek van alkalisch behandelde eiwitten en LAL is ondermeer aandacht besteed aan de "no-toxic-effect-level" bij de rat en effecten bij andere proefdiersoorten dan de rat (De Groot et al., 1976), en aan reversibiliteit van cytomegalie en vergelijking van de effecten van verschillende stereoisomeren van LAL (Feron et al., 1978). Ook werden vele experimenten gedaan met verschillende soorten alkalisch behandeld eiwit en werd het metabolisme van LAL onderzocht (Finot et al., 1977; Leegwater, 1978).

In deze publicatie worden twee voederproeven met synthetisch LAL in ratten beschreven, namelijk een kortdurende (14-dagen) proef ter bestudering van de histogenese van cytomegalie en een langdurig (2,5 jaar) experiment, ter bestudering van de chronische effecten op de nier.

Materiaal en methode

Voor beide experimenten werden albino ratten (Cpb: WU; Wistar random) gebruikt. In de kortdurende proef werd normaal basisvoer gegeven waaraan 500 of 1000 ppm synthetisch LAL werd toegevoegd, gedurende perioden die varieerden van 16 uur tot 14 dagen. De nieren werden lichtmicroscopisch, electronenmicroscopisch en enzymhistochemisch (barnsteenzuurdehydrogenase, alkalische en zure fosfatase en glucose-6-fosfaatdehydrogenase) onderzocht. In het chronische experiment werden twee groepen van elk 50 mannelijke en 50 vrouwelijke ratten gevoederd met normaal basisvoer waaraan 250 ppm synthetisch LAL was toegevoegd. Na 2,5 jaar werd op de overlevende ratten sectie uitgevoerd. Een groot aantal organen en de macroscopisch waargenomen tumoren van alle dieren werden verzameld voor lichtmicroscopisch onderzoek.

Resultaten

Kortdurende proef

Lichtmicroscopie

Na 16 uur: In de pars recta van de proximale tubuli was het cytoplasma in het basale gedeelte van de epitheelcellen relatief helder en bleek en soms licht gevacuoliseerd. In de 500 ppm groep waren de veranderingen minimaal

Na 40 uur: De epitheelcellen van de pars recta waren nu duidelijk schuimig en vergroot, de kernen waren bleek en hadden geprononceerde nucleoli

en wandstandig chromatine. Cytomegalie kwam slechts in lichte mate voor in de 1000 ppm groep.

Na 64 uur: De veranderingen waren in ernst toegenomen, doch bleven gelokaliseerd in de pars recta van de proximale tubuli. Er was nu sterke vacuolisatie, verdwijnen van de borstelzoom en individuele cel necrose. Deze veranderingen kwamen in beide proefgroepen voor maar waren aanzienlijk ernstiger in de 1000 dan in de 500 ppm groep.

Na 88 uur: De dieren uit de 1000 ppm groep vertoonden uitgebreide necrose in het proximale gedeelte van de pars recta. Het meer distale gedeelte van de pars recta was gedilateerd en bekleed met basofiel kubusepitheel dat lichte tot matige cytomegalie vertoonde. In de gehele pars recta was de borstelzoom verdwenen. In de medulla waren de lissen van Henle gevuld met eosinofiel en necrotisch materiaal. De meeste nieren van de ratten uit de 500 ppm groep vertoonden lichte cytomegalie en in enkele gevallen kwam matige necrose van pars recta epitheel voor.

Na 7 dagen: Het beeld werd beheerst door uitgebreide regeneratie van tubulus epitheel. Het gedeelte van de pars recta waar na 88 uur uitgebreide necrose te zien was, vertoonde nu vele verwijde tubuli die bekleed waren met sterk basofiele afgeplatte epitheelcellen. De borstelzoom was nog steeds afwezig.

Na 14 dagen: Het regeneratieproces had zich verder voortgezet. De na 7 dagen nog afgeplatte epitheelcellen bevatten nu een grotere hoeveelheid cytoplasma. De cytomegalie was in het algemeen matig.

Enzymhistochemie

Gedurende de eerste 16 uur vertoonde alleen de alkalische fosfatase activiteit een lichte daling in beide doseringsgroepen. Daarna nam de activiteit van elk van de onderzochte enzymen snel af, vooral in het proximale deel van de pars recta.

Na 88 uur was de activiteit van alle onderzochte enzymen minimaal in het proximale deel en gering in het distale deel van de pars recta. Na 14 dagen waren de enzymactiviteiten nog steeds minimaal tot gering. In andere delen van de nieren, met name in de pars convoluta, waren de enzymactiviteiten niet zichtbaar beïnvloed door LAL.

Electronenmicroscopie

Onderzocht werd nierweefsel van dieren na 40 en 88 uur en 7 en 14 dagen uit de 1000 ppm groep.

Reeds na 40 uur kwamen in de pars recta van de proximale tubuli veel necrotische cellen voor, gekenmerkt door een intacte kern en verspreide mitochondriën met gezwollen cristae en restanten vlokkerig cytoplasma. De aangrenzende cellen waren soms plat met verspreide strangen ruw endoplasmatisch reticulum (RER). Nog intacte cellen hadden kernen met

een verwijde perinucleaire ruimte en grote "blebs" gevormd door het buitenste kernmembraan. Deze kernen bevatten doorgaans grote nucleoli die centraal, maar ook dikwijls tegen het kernmembraan, lagen. Over de gehele cel verspreid kwamen blaasjes voor, waarin vlokkelig materiaal lag. De blaasjes waren door een glad membraan omgeven. Slechts zelden werden enkele ribosomen aan dit membraan gevonden. Er kwamen veel polysomen voor. De mitochondriën hadden een elektronen dichte matrix met verwijde cristae.

Na 88 uur waren deze verschijnselen ernstiger en uitgebreider en kwamen er in het cytoplasma grote membraan begrensde vacuolen voor. Tegen het membraan lagen in de vacuolen klompjes elektronendicht materiaal. De microvilli lagen los van het luminale celoppervlak.

Na 7 dagen werd een duidelijk regeneratie van de tubulus cellen waargenomen. De kernen waren meer of minder gestulpt, maar zonder "blebs", de borstelzoom was deels aanwezig en verdubbeling van het basaalmembraan werd frequent aangetroffen.

De mitochondriën hadden een lichte matrix en waren soms omringd door een streng ruw endoplasmatisch reticulum.

Na 14 dagen was de verdubbeling van het tubulaire basaalmembraan nog duidelijker. Het buitenste basaalmembraan was gegolfd en verdikt en langs de vernieuwde tubuluscellen liep een dun basaalmembraan.

Chronische proef

Microscopisch onderzoek van de dieren die gedurende 2,5 jaar met LAL waren gevoerd gaf cytomegalie van de nieren te zien, die in ernst en omvang vergelijkbaar was met de cytomegalie die bij eerdere experimenten na 1 jaar werd waargenomen. In de LAL-groep werden bij mannetjes 5 niertumoren gevonden. Hiervan waren er 3 van epitheliale oorsprong (2 adenocarcinomen en 1 ongedifferentieerde epitheliale tumor) en 2 van mesenchymale oorsprong (beide lipomateuse tumoren).

De ongedifferentieerde epitheliale tumor werd reeds na 1 jaar aangetroffen bij een in moribunde status gedood dier. Bij mannetjes kwamen in de controlegroep geen niertumoren voor. Bij vrouwtjes kwam in de LAL-groep een lipomateuse tumor en in de controlegroep een fibrosarcoma voor. Verder werden er in de nieren geen tekenen van atypische hyperplasie of andere mogelijke preneoplastische veranderingen gezien.

Discussie

Uit de 14-daagse proef blijkt dat synthetisch LAL in doseringen van 500 en 1000 ppm al na 16 uur lichte veranderingen, en na enkele dagen uitge-

breide necrose veroorzaakt in de pars recta van de proximale niertubuli. De necrose wordt gevolgd door een proces van tubulaire regeneratie. Het toxisch effect van LAL doet denken aan dat van andere nephrotoxische stoffen zoals bijvoorbeeld HgCl_2 , waarbij eveneens eerst necrose en vervolgens regeneratie optreedt (Prescott & Nasari, 1969). Het werkingsmechanisme is echter niet identiek, daar bij andere stoffen in het algemeen geen cytomegalie voorkomt.

Al na 40 uur voeding van LAL werd cytomegalie waargenomen; dit is voordat uitgebreide necrose optreedt. In het geregenereerde tubulusepitheel komt eveneens cytomegalie voor. Hieruit blijkt dat zowel de oorspronkelijke epitheelcellen als die van volgende generaties gevoelig zijn voor het ontwikkelen van cytomegalie.

Na 40 uur werd electronenmicroscopisch sterke "bleb" vorming van het buitenste kernmembraan en een groot aantal cytoplasmatische blaasjes gezien. Beide verschijnselen zijn uit de literatuur bekend bij de embryonale ontwikkeling van cellen (Emura, 1978). De blaasjes ontstaan uit de "blebs" en zijn stadia van glad en ruw ER, maar kunnen ook leiden tot de vorming van z.g. "annulate" lamellen. De laatste zouden een rol spelen bij de vorming van het kernmembraan. Aangezien bij kernvergroting (karyomegalie) ook het kernmembraan in oppervlak toeneemt, kunnen "bleb"- en blaasjesvorming beschouwd worden als morfologische voorstadia van karyomegalie die een essentieel onderdeel is van cytomegalie.

Reyniers et al. (1974) toonden aan dat het karyoplasma van de vergrote kernen een grotere hoeveelheid DNA en kerneiwitten bevatte. De vergrote nucleoli, dikwijls liggend tegen het kernmembraan en de blaasjes waaraan vermoedelijk in een later stadium ribosomen hechten, duiden op een verhoogde celactiviteit, met onder andere een verhoogde eiwitsynthese. De vergroting van de kern en zijn DNA-inhoud en de verhoging van de celactiviteit zouden kunnen samenhangen met een veranderde functionele status van de cel.

De verdubbeling van het tubulaire basaalmembraan die na 7 en 14 dagen optrad is een kenmerk van regeneratie van epitheliale cellen (Romen & Mäder-Kruse, 1978). Het oorspronkelijke basaalmembraan verdikt en komt gekronkeld vrij te liggen van de epitheelcellen. Plaatselijk wordt een nieuw, dun basaalmembraan gevormd.

De afname van de PAS-positiviteit en van de alkalische fosfatase activiteit correspondeert met het verdwijnen van de borstelzoom, waarin deze reacties zijn gelokaliseerd. Opmerkelijk is echter dat na 7 dagen de borstelzoom weer gedeeltelijk aanwezig is, doch dat zowel alkalische fosfatase als PAS zelfs na 14 dagen zowel in geregenereerde gebieden als in de overlevende cellen nog geheel afwezig waren. De daling van de diverse enzymactiviteiten die zich in de eerste dagen van blootstelling aan LAL voltrekt, wijst erop dat het normale metabolisme van de pars

recta cellen al na korte tijd ontregeld raakt.

Op grond hiervan is het aannemelijk dat ook onder andere de resorptie van aminozuren uit de pre-urine, een belangrijke functie van het pars recta epitheel, gestoord zal zijn.

Resumerend kan worden gesteld dat er enerzijds sprake is van een verstoring van het normale celmetabolisme terwijl anderzijds de morfologische veranderingen wijzen op een verhoogde activiteit van de cellen. Dit is een aanwijzing dat cytomegalie kan worden geïnterpreteerd als de morfologische expressie van adaptatie van pars recta cellen aan een verstoord metabolisme.

Bij het evalueren van eventuele carcinogeniteit van LAL is vooral de karyomegalie van belang. Uit de literatuur blijkt dat het ontstaan van niertumoren na toediening van bepaalde stoffen wordt voorafgegaan door karyomegalie in de proximale tubuli (Gould & MacGregor, 1977). In dit licht gezien is het voorkomen van 5 niertumoren bij mannetjes uit de proefgroep, tegen geen enkele niertumor bij de controle mannetjes opmerkelijk, temeer daar de achtergrondsincidentie van niertumoren laag is bij de gebruikte rattestam. In een aantal recente life-span experimenten met deze rattestam werden bij 1030 onderzochte mannelijke ratten 4 epitheliale en 2 mesenchymale niertumoren gevonden. (respectievelijk 0,4 en 0,2%). Het aantal van 5 niertumoren in een groep van 50 ratten is derhalve exceptioneel hoog. Bovendien werd één van de tumoren reeds na een jaar aangetroffen. Dit zijn sterke aanwijzingen dat de aanwezigheid van niertumoren in de behandelde mannelijke ratten verband houdt met het toedienen van LAL. Anderzijds dient het volgende overwogen te worden:

- a) Bij vrouwtjes werd geen verhoogde tumorincidentie aangetroffen.
- b) Er werden geen preneoplastische veranderingen of atypische hyperplasieën in de nieren aangetroffen, waarbij er uiteraard van wordt uitgegaan dat cytomegalie niet tot dit soort veranderingen dient te worden gerekend.
- c) Cytomegalie is niet persistent. Uit de literatuur (Feron et al., 1978; Struthers et al., 1978) blijkt dat na het beëindigen van LAL-voeding de mate van cytomegalie in de loop van enkele maanden vermindert.
- d) LAL blijkt in de Ames test niet mutageen te zijn (Willems, 1980). Deze feiten zouden erop kunnen wijzen dat LAL niet direct verantwoordelijk is voor de inductie van de tumoren, maar dat de door LAL geïnduceerde megalocyten een verhoogde gevoeligheid hebben voor achtergrondscarcinogenen die aanwezig zijn in het voedsel of in het milieu. In dat geval zou LAL niet moeten worden beschouwd als een volledig, direct werkend carcinogeen maar als een indirect carcinogeen of co-carcinogeen. De aanwezigheid van cytomegalie zou dan een noodzakelijke voorwaarde zijn voor het ontstaan van niertumoren.

Voor zover bekend is de rat het enige proefdier dat bijzonder gevoelig is voor het ontwikkelen van cytomegalie. Bij de muis kan geringe cytomegalie alleen worden geïnduceerd door extreem hoge LAL doseringen (Feron et al., 1978, Karayiannis et al., 1979). Bij syrische goudhamsters, honden, Rhesus apen, konijnen en Japanse kwartels kon tot dusver geen cytomegalie worden geïnduceerd (De Groot et al., 1976). Dit verschil in gevoeligheid voor LAL gaat waarschijnlijk gepaard met een verschil in metabolisme. Bij de rat wordt namelijk een metaboliet in de urine aangetroffen die niet voorkomt bij de (ongevoelige) hamster (Leegwater, 1978).

Het is niet bekend of de mens gevoelig is voor het ontwikkelen van cytomegalie door LAL.

De vraag is wat de relevantie is van de resultaten van de chronische proef voor de mens. Mogelijk is LAL een co-carcinogeen dat ten gevolge van het metabolisme zoals dat specifiek bij de rat voorkomt, alleen bij deze diersoort het ontstaan van niertumoren bevordert. In dat geval zou LAL voor de mens niet als een co-carcinogene stof moeten worden beschouwd.

Verder onderzoek is nodig en zou zich moeten richten op:

- a) bevestiging van de resultaten van de huidige chronische ratteproef,
- b) het mechanisme van de co-carcinogene werking van LAL bij de rat, en
- c) de chronische effecten van LAL in een proefdiersoort waarbij LAL geen nephrocytomegalie induceert.

Literatuur

- Emura, M., 1978. Morphological studies on the development of tracheal epithelium in the Syrian golden hamster IV Electron microscopy: blebbing of nuclear membrane. Z. Versuchstierk., 20: 163-170
- Feron, V.J. et al., 1978. Toxicological aspects of alkali treatment of food proteins. In: J. Adler-Nissen et al.: Biochemical aspects of new food proteins. FEBS-Symp., 44, A3-pag. 139-147
- Finot, P.A., E Bujard & M. Arnaud, 1977. Metabolic transit of lysinoalanine (LAL) bound to protein and of free radioactive (^{14}C)-lysinoalanine. In: M. Friedman: Protein crosslinking: Nutritional and medical consequences. Adv. Exp. Med. Biol. 86B, pag. 51-71 Plenum. Press, New York
- Gould, D.H. & J.T. MacGregor, 1977. Biochemical effects of alkali treated protein and lysinoalanine: An overview. In: M. Friedman: Protein crosslinking: Nutritional and medical consequences. Adv. Exp. Med. Biol. 86B, pag. 29-48. Plenum Press, New York

- Groot, A.P. de et al., 1976. Effects of alkali-treated proteins: Feeding studies with free and protein-bound lysinoalanine in rats and other animals. *J. Nutr.*, 106: 1527-1538
- Karayiannis, N.I., J.T. MacGregor & L.F. Bjeldanes, 1979. Biological effects of alkali-treated soya protein and lactalbumin in the rat and mouse. *Food Cosmet. Toxicol.*, 17: 591-604
- Leegwater, D.C., 1978. The nephrotoxicity of Lysinoalanine in the rat. *Food Cosmet. Toxicol.*, 16: 405
- Prescott, L.F. & S. Ansari, 1969. The effects of repeated administration of mercuric chloride on exfoliation of renal tubular cells and urinary glutamic-oxaloacetic transaminase activity in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 14: 97-107
- Reyniers, J.P., J.C. Woodard & M.R. Alvarez, 1974. Nuclear cytochemical alterations in α -protein-induced nephrocytomegalia. *Lab. Invest.*, 30: 582-588
- Romen, W. & I. Mäder-Kruse, 1978. The basement membrane of the atrophic kidney tubule. An electron microscopic study of changes in rats. *Virchows Arch. B.*, 26: 307-319
- Struthers, B.J., D.T. Hopkins & R.R. Dahlgren, 1978. Reversibility of nephrocytomegaly in rats by lysinoalanine [N^{ϵ} -(DL-2-amino-carboxy-ethyl)-L-lysine]. *J. Food Sci.*, 43: 616-618
- Willems, M.I., 1980. Evaluation of four stereoisomers of lysinoalanine in the Ames test. CIVO Report nr. R 6485
- Woodard, J.C., 1969. On the pathogenesis of alpha protein induced nephrocytomegalia. *Lab. Invest.*, 20: 9-16
- Woodard, J.C. & M.R. Alvarez, 1967. Renal lesions in rats fed diets containing alpha protein. *Arch. Pathol.*, 84: 153-162
- Woodard, J.C. & D.D. Short, 1973. Toxicity of alkali-treated soy protein in rats. *J. Nutr.*, 103: 569-574
- Woodard, J.C. & D.D. Short, 1975. Renal toxicity of N^{ϵ} -(DL-2-amino-2-carboxyethyl)-L-lysine (lysinoalanine) in rats. *Fed. Proc.*, 34: 929
- Woodard, J.C. & D.D. Short, 1977. Renal toxicity of N^{ϵ} -(DL-2-amino-2-carboxyethyl)-L-lysine (lysinoalanine) in rats. *Food Cosmet. Toxicol.*, 15: 117-119

KORTDURENDE SCREENINGSTESTEN TER AANTONING VAN MOGELIJKE CARCINOGENITEIT: MOGELIJKHEDEN EN BEPERKINGEN

R. Kroes

Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO

Samenvatting

Een kort overzicht wordt gegeven van de meest bekende en best geëvalueerde kortdurende screeningstesten ten aanzien van hun vermogen om mogelijk carcinogene verbindingen te herkennen. Bij de bespreking van de voorspellende waarde van deze testen wordt de aandacht gevestigd op het verschil in werkingsmechanisme van carcinogene stoffen. In de kortdurende screeningstesten zullen de genotoxisch werkende carcinogenen niet worden onderkend. Aangegeven wordt dat in vitro cel transformatietesten in deze mogelijk een breder onderscheidend vermogen kunnen hebben. Het gebruik van een batterij van testen zal over het algemeen de gevoeligheid voor het aantonen van genotoxische carcinogenen doen toenemen. Het metabool activeringssysteem dat in de testen wordt gebruikt, dient nog verder te worden geoptimaliseerd zodat het optreden van vals negatieven door het ontbreken van het juiste enzymstelsel wordt uitgesloten. Tenslotte wordt de noodzaak benadrukt om te beschikken over kortdurende in vitro en/of in vivo testen die een co-carcinogene werking aantonen.

Inleiding

De explosieve groei van het aantal kortdurende screeningstesten in de laatste jaren was het logische gevolg van nieuwe inzichten in de chemische carcinogenese. Met name het baanbrekende werk van het echtpaar Miller (1969) die met hun nu wel haast klassieke experimenten aantoonde, dat de overeenkomst van werking van chemische carcinogenen moest worden gezocht in het ontstaan van een reactieve metabool ("electrophile") lag ten grondslag aan de geboorte van de zogenaamde somatische mutatie-theorie. Deze theorie houdt in dat binding van de electrophiele verbinding aan DNA een genmutatie veroorzaakt, die irreversibel is en op dochtercellen kan overgaan. Het leek voor de hand te liggen om, ter aantonen van mogelijke carcinogeniteit, de mutagene werking van deze stoffen aan te tonen, waartoe vooral de aandacht zich zou richten op bacteriën. Het ontbreken van de noodzakelijke enzymsystemen in deze bacteriesystemen om de chemische verbindingen om te zetten in hun ac-

tieve vorm, hield echter het gebruik van zulke bacteriesystemen aanvankelijk tegen.

Het is de verdienste van Ames et al. (1975) geweest, het bacterie-mutatiesysteem bruikbaar te maken door in deze test een metabool-active-ringssysteem te bouwen door toevoeging van microsomale (lever-) enzymen. De eerste berichten van dit later genoemde "Ames-systeem" waren zeer veelbelovend, maar later bleek in verschillende centra toch, dat de voorspellende waarde voor bepaalde groepen van stoffen niet zo goed was. In dit artikel zal een aantal testsystemen worden geëvalueerd. Aange-toond zal worden, dat de kortdurende screeningstesten naast goede mogelijkheden ook hun beperking hebben.

Voorts zal blijken, dat een goede evaluatie van dergelijke testen slechts mogelijk is, als het begrip carcinogeen beter gedefinieerd is, met name met betrekking tot het werkingsmechanisme van de kankerverwekkende stof.

Carcinogenen: definitie en klassifikatie

Bij alle correlaties die worden onderzocht tussen het kankerverwekkend zijn en positieve kortdurende screeningstesten, is het van belang dat de term carcinogeen goed wordt gedefinieerd. De Commissie ter beoordeling van de Carcinogeniteit van chemische stoffen (Anon, 1979) adviseert de volgende definitie te hanteren: "Een carcinogene stof is een stof die kwaadaardige gezwellen kan doen ontstaan". Belangrijk hierbij is dus, dat het biologisch eindresultaat het uiteindelijke criterium is waarop een stof de kwalifikatie carcinogeen verkrijgt of niet. Hieruit moge onmiddellijk blijken dat het werkingsmechanisme van de stof niet bepalend is, immers zowel stoffen die carcinogeen zijn door hun genotoxische werking (dus stoffen die een irreversibel, zich zelf replicerend effect veroorzaken in het gen) als stoffen waarvan carcinogene werking blijkt te berusten op een indirect mechanisme (irritatie, stimulatie, immuno-inhibitie en -stimulatie, hormonale evenwichtsverschuivingen, cocarcinogene- en promotorwerking) vallen onder deze definitie.

Bovengenoemde commissie stelde daarom voor verschillende klassen carcinogenen te onderscheiden, waarvan de complete (genotoxische) carcinogenen en initiatoren worden onderscheiden van carcinogenen waarbij de carcinogene werking kan worden verklaard door een ander (indirect) werkingsmechanisme. Met betrekking tot de extrapolatie van dierexperimentele onderzoekgegevens naar de mens, is deze classificatie van belang omdat bij de indirect werkende carcinogenen een 'no effect level' kan worden vastgesteld, terwijl dit voor de genotoxische verbindingen niet mogelijk is (Kroes, 1979). Ook in het buitenland is een dergelijk onderscheid gemaakt (Weisburger & Williams, 1978).

Zoals hieronder moge blijken zijn de meeste kortdurende screeningstesten gebaseerd op de detectie van veranderingen in het gen (mutaties) dan wel het aangaan van interacties met het DNA. Duidelijk is dat dergelijke testen slechts genotoxische carcinogenen kunnen aantonen.

Kortdurende screeningstestsystemen

De kortdurende screeningstesten ter aantoning van mogelijke carcinogeniteit kunnen globaal worden verdeeld in drie typen testen:

- testen voor het aantonen van mutagene werking
- testen die DNA-schade vaststellen.
- testen die maligne transformatie in in vitro cellcultures aantonen.

Kortdurende testen ter aantoning van mutageniteit

Dit soort testen kan worden uitgevoerd met prokaryoten (voornamelijk bacteriën) en eukaryoten (schimmels, gisten, insecten en zoogdiercellen in vitro).

Aangetoond worden zogenaamde genmutaties, waarbij op moleculair niveau twee typen kunnen worden onderscheiden: de basepaarsubstitutie (vervanging van een basepaar door een ander) en de "frame-shift" mutatie (het toevoegen of verloren gaan van één of meer baseparen). Testen die structurele en numerieke chromosoomafwijkingen (ook mutaties) aantonen, worden als kortdurende screeningstest minder frequent gebruikt, vooral vanwege hun minder grote gevoeligheid (Anon, 1980). Ten slotte kan een mutagene werking worden aangetoond bij intacte dieren, de zogenaamde in vivo modellen. Deze testen kunnen echter niet meer onder de term 'kortdurend' vallen.

De meest gebruikte prokaryoten zijn verschillende Salmonella teststammen, ontwikkeld door de groep van Ames, en enkele E. colistammen. De bacteriestammen zijn speciaal gevoelig gemaakt door de celwand beter permeabel te maken en de stammen zijn ook repairdeficiënt gemaakt zodat de mutagene activiteit sneller is aan te tonen. Wat de eukaryoten betreft is in de laatste jaren veel werk verricht met gisten (Saccharomyces cerevisiae en Schizosaccharomyces) en schimmels (Neurospora crassa en Aspergillus nidulans). Deze systemen zijn gewild omdat ze als eukaryoten beter vergelijkbaar zijn met zoogdieren dan bacteriën. Binnen de eukaryoten is Drosophila (Bananevlieg) genetisch het beste onderzocht. Hieraan heeft de groep van Sobels in Nederland een zeer belangrijke bijdrage geleverd. Voordeel van dit systeem is de grote verscheidenheid van genetische effecten die kunnen worden gedetecteerd.

Testen voor het aantonen van mutaties in zoogdiercellen in vitro worden voornamelijk uitgevoerd met cellijnen (de aneuploïde lijnen CHO, V79 van de Chinese Hamsters, L5178 van de muis en diploïde cellen van de mens: longepitheelcellen en huidfibroblasten). Aangetekend dient te worden, dat bij alle bovengenoemde systemen, het Drosophilasysteem uitgezonderd, altijd een metabool activeringssysteem moet worden toegepast, omdat anders de mutagene werking van omzettingsprodukten die in vivo kunnen ontstaan, niet kan worden aangetoond. Uiteraard dient het systeem ook zonder metabole activering te worden gebruikt.

Testen die DNA-schade vaststellen

Deze testen zijn als screeningssysteem van belang omdat carcinogenen in hun actieve vorm in staat zijn het DNA in celsystemen te beschadigen. Hoewel verschillende soorten schade kunnen worden veroorzaakt, resulteren ze alle in een verhoogde DNA-repair. Zowel de DNA-schade als de DNA-repair kunnen de parameters zijn die in de test worden gemeten. Het aantonen van schade wordt met behulp van de alkalische elutietechniek uitgevoerd, terwijl repair wordt gemeten door de mate van inbouw van radioactief thymidine in het genoom, welke inbouw autoradiografisch of door middel van vloeistofscintillatietelling van geïsoleerd DNA kan worden gemeten. Een groot aantal celsystemen is in gebruik en het betreft zowel menselijke cellijnen, menselijke primaire cellcultures als cellijnen afkomstig van muis, rat en hamster. Het meest belovende systeem lijkt het Williams' primaire hepatocytsysteem (Williams, 1977, 1979). Uitgezonderd in het laatstgenoemde systeem dient in deze testen ook gebruik te worden gemaakt van een metabole activering.

In vitro cel transformatie testen

In deze testen gebruikt men zoogdiercelcultures waarin kwaadaardige transformatie onder invloed van chemische stoffen is aan te tonen. Als criteria voor transformatie gelden morphologische karakteristieken ("criss-cross pattern" en "piling up"), groei in softagar of tumorgroei in syngene gastheer of nude muis. In geen van de tot nu toe ontwikkelde systemen worden epitheliale cellijnen gebruikt. Dit is een nadeel omdat de meeste kwaadaardige tumoren voorkomend bij mens en dier juist van epitheliale oorsprong zijn.

De meest bekende systemen zijn het Syrische hamster embryo celsysteem, de C₃H 10T_{1/2} cellijn, de BALB/c 3T3 cellijn en de hamster BHK 21 cellijn:

De C₃H 10T $\frac{1}{2}$ cellijn is een systeem dat gemiddeld pas na 5 tot 6 weken proefduur tot resultaat leidt, terwijl dit voor de andere systemen maximaal 3 weken duurt. Sommige systemen kunnen uit zichzelf bepaalde typen carcinogenen omzetten in hun actieve metaboliet, maar alle systemen moeten, indien mogelijk, met en zonder metabolisch activeringssysteem worden gebruikt.

Voorspellende waarde van de kortdurende screeningssystemen

Wanneer men de waarde van de resultaten van kortdurende screeningstesten wil evalueren, is het van belang te weten hoe vaak een carcinogene stof in zo'n test 'gemist' zou worden, terwijl anderzijds niet-carcinogene stoffen niet tot een positief resultaat zouden mogen leiden. Bij deze evaluatie maakt men gebruik van de volgende begrippen (Cooper 1979, De Serres, 1980):

- de gevoeligheid (sensitivity): het aantal carcinogenen dat tot positieve resultaten leidt ten opzichte van het totaal aantal onderzochte carcinogenen.
- de specificiteit (specificity): het aantal niet-carcinogenen dat tot negatieve resultaten leidt ten opzichte van het totaal aantal onderzochte niet-carcinogenen.
- de nauwkeurigheid (accuracy): het aantal correcte bevindingen ten opzichte van het totaal aantal onderzochte stoffen.

Nogmaals dient erop gewezen te worden, dat bij de beoordeling van deze begrippen het van uitermate groot belang is een goede definitie te hanteren voor het begrip carcinogeen.

Zoals hieronder zal blijken, leidt het feit dat indirect werkende carcinogenen per definitie negatief dienen te zijn in mutageniteits- en DNA-repairtesten tot een vertroebeling van het waardeoordeel over deze testen.

De voorspellende waarde van mutageniteitstesten

Van de mutageniteitstesten zijn verreweg de meeste gegevens bekend over het zogenaamde Ames-testsysteem. In tabel I is een overzicht gegeven van een aantal onderzoeken door verschillende groepen uitgevoerd. Eveneens zijn in deze tabel de resultaten verwerkt, die met andere prokaryoten en eukaryoten werden verkregen.

Tabel 1. De voorspellende waarde van een aantal mutageniteitstesten

<u>Systeem</u>	<u>Auteur</u>	<u>Sensitivity</u>		<u>Specificity</u>		<u>Accuracy</u>	
			%		%		%
S. Typhimurium (Ames-systeem)	McCann et al '75,'76	172/191	90	96/109	87	268/300	89
	Brown et al '79	37/44	84	6/8	75	43/52	83
	Rinkus et al '79	210/271	77	-	-	-	-
	Rosenkranz et al '79	40/66	61	14/21	67	54/87	62
	Simon '79a	44/69	64	15/20	75	59/89	66
	Dunkel '80	13/17	76	6/9	67	19/26	73
	Bartch et al '80	62/82	76	4/7	57	66/89	74
E. Coli Pol A	Kawachi et al '80	33/51	65	48/64	75	81/115	70
	Rosenkranz et al '79	49/66	74	15/21	70	64/87	73
	Leifer et al in voorbe- reiding	-	82	-	48	-	75
Neurospora	Brown et al '79	13/15	87	1/1	100	14/16	87
Saccharomyces	IARC '79	55/76	79	-	-	-	-
	Simon '79b	38/68	56	15/21	71	53/89	60
	Loprieno '80	20/25	80	13/17	76	33/42	79
Drosophila	Brown et al '79	19/23	83	3/6	50	21/29	72
	Vogel '80	85/107	79	-	-	-	-
Zoogdiercelmutatie	IARC '80	47/50	94	12/16	75	95/61	89
	Bartch et al '80	15/21	71	-	-	-	-

Uit deze tabel blijkt dat de gevoeligheid in de verschillende testen varieert van 56% tot 95%. De specificiteit varieert van 50% tot 87% en de nauwkeurigheid van 60% tot 89%. Het valt op, dat de zo hoopgevende percentages van McCann et al. later nooit meer konden worden bereikt. Ook het Drosophila-systeem lijkt goede resultaten te geven (Vogel, 1980). Men dient zich echter te realiseren dat het systeem voor met name de polycyclische koolwaterstoffen en de aromatische amines weinig gevoelig is. De gevoeligheid is beter wanneer men niet alleen, zoals gebruikelijk, de recessief lethale mutatie in dit systeem bestudeert, maar ook gebruik maakt van de larven, waarbij somatische mutaties kunnen worden onderzocht.

Interessant is het ook in een aantal gevallen te evalueren, welke carcinogenen in de Ames-test tot een negatieve response leidden. In tabel 2 is daarvan een (onvolledig) overzicht gegeven.

Tabel 2. Enkele carcinogenen die in het S. Typhimurium systeem geen mutagene activiteit vertonen (Bartch et al., '80, Brown '79, Dunkel '80, Kawachi '80 & Simon '79)

Epoxide 201	Diethylstilboestrol
Benzeen	Ethynyloestradiol
N-N'Dinitrosoethambutol	Testosteronpropionaat
N-Nitrosodiphenylamine	Progesteron
N-Nitroso-N-methyl-N-phenylamine	Reserpine
1-1-dimethylhydrazine	Thioureum
1-2-dimethylhydrazine	Aminotriazol
1(4-methylphenyl)-3,3-dimethyltriazene	Patuline
1(4-methoxyphenyl)-3,3-dimethyltriazene	Penicilinezuur
Brilliant Blue FCF	DDD
Fast Green FCF	DDE
Ethionamide	DDT
Ethionine	Kelthaan
3-Hydroxyanthranilinezuur	Tetrachloorethyleen
Indigokarmijn	β -BHC
N-2 fluorenylacetamide	γ -BHC
Auramine	NTA
p-rosaniline	Urethaan
o-toluidine	Acetamide
p-toluidine	Thioacetamide
Aspirine	Saccharine
Cinnamylanthranilaat	Amarant

In deze opsomming is een flink aantal stoffen aanwezig, die als een niet-genotoxisch carcinogeen kunnen worden beschouwd. Als voorbeeld hiervan kunnen de hormonen en antihormonen worden genoemd. Anderzijds zijn in deze tabel enkele stoffen te herkennen, die zeker een genotoxische werking hebben, maar waarvan het niet-mutageen-zijn kan worden verklaard door het niet aanwezig zijn van het juiste enzymstelsel om de stof om te zetten in een reactieve metabool. In dit verband is het onderzoek van Rinkus & Legator (1979) interessant, die de 465 verbindingen, welke zij uit de literatuur verzamelden, enerzijds in categorieën indeelden op basis van hun chemische structuur, en anderzijds in een aantal groepen waaruit de carcinogene activiteit zou moeten blijken.

De resultaten van dit onderzoek (Tabel 3) duiden erop, dat de vijftien structuurcategorieën van verbindingen, die een sterke carcinogene activiteit bezitten, ook zeer goed correleren met de uitgevoerde Ames-testen.

Tabel 3. Overzicht van de mutagene activiteit in het Ames-systeem van 465 bekende of verdachte carcinogenen

<u>Carcinogene</u> <u>activiteit</u>	<u>Structuur</u> <u>categorieën</u>		<u>Aantal carcinogene</u> <u>verbindingen</u>		<u>Aantal positieve</u> <u>verbindingen t.o.v.</u> <u>aantal onderzochte</u>	
Niet te evalueren	13	(33)*	38	(8)	1/12	(8)
sterk	15	(38)	312	(67)	188/199	(94)
matig	4	(10)	34	(7)	12/23	(57)
gering	7	(18)	81	(17)	8/37	(22)
totaal	39	(100)	465	(100)	210/271	(77)

* () = percentages

(Naar Rinkus & Legator, 1979)

Naarmate de carcinogene activiteit minder is, wordt ook de correlatie met de Ames-test minder goed. In zijn algemeenheid kan men stellen, dat juist onder de verbindingen met geringe carcinogene activiteit vele aanwezig zijn, waarbij de carcinogene werking (bij vaak hoge doseringen) berust op een niet-genotoxisch (dus indirect) werkingsmechanisme.

De voorspellende waarde van DNA-repairtesten

Stich et al. (1976) vonden met hun primaire fibroblasten dat 43/69 onderzochte carcinogenen (63%) zonder metabolisch activeringssysteem een verhoogde DNA-repair veroorzaakten. Met Hela cellen vonden Martin et al. (1978) 34/38 (89%) positieve resultaten, wanneer met een metabolisch activeringssysteem werd gewerkt. Het systeem van Williams (1977, 1979 en 1980) heeft het grote voordeel dat een optimaal metabool activeringssysteem van intacte levercellen reeds in het testsysteem aanwezig is. Van de 47 carcinogene verbindingen werden 40 in deze test gedetecteerd, terwijl geen enkele van de 16 niet-carcinogene structuurgerelateerde verbindingen positief was (gevoeligheid 86%, specificiteit 100%, nauwkeurigheid 89%). Williams (1980) testte in een later stadium ook enkele stoffen die een inductie van de microsomale leverenzymen veroorzaken. Bekend is, dat deze stoffen (onder andere phenobarbital, DDT, DDE, diel-drin, endrin en heptachloor) bij muizen levertumoren kunnen doen ont-

staan. Al deze stoffen bleken echter in het DNA-repairsysteem negatief, hetgeen de reeds vaak geuite veronderstelling, dat ook deze carcinogenen niet genotoxisch zijn, onderschrijft. Uiteraard zijn in het HPC/DNA-repair systeem nog slechts een beperkt aantal stoffen onderzocht. De onderzochte stoffen vertegenwoordigen echter verschillende structuur-categorieën. Hoewel nog meer ervaring met dit systeem zal moeten worden opgedaan, wordt dit systeem terecht een belangrijk supplement genoemd op de bacteriële mutageniteitstesten.

De voorspellende waarde van in vitro cel transformatietesten

Hoewel het ook hier een veelbelovend systeem betreft, is tot op heden slechts een beperkte ervaring opgedaan. De belangrijkste reden hiervoor moet worden gezocht in de slechte reproduceerbaarheid van de testen. De uit te voeren assays blijken zo gevoelig, dat reproductie op verschillende laboratoria nauwelijks mogelijk is. Slechts in de handen van de oorspronkelijke onderzoeker, die het systeem heeft ontwikkeld, blijkt het te werken.

Pienta (1980) heeft met enig succes getracht het Hamster embryocelsysteem zoveel mogelijk te optimaliseren en "onderzoeker onafhankelijk" te maken. Tevens is met dit systeem de meeste ervaring opgedaan. In tabel 4 staan enkele resultaten met dit systeem en het BALB/c 3T3 systeem weergegeven (Sivak & Tu, 1980).

Tabel 4. De voorspellende waarde van in vitro cell transformatietesten

<u>Systeem</u>	<u>Auteur</u>		<u>Sensitivity</u>		<u>Specificity</u>		<u>Accuracy</u>	
			%		%		%	
Syrische Hamster								
Embryo Celsysteem	Pienta	'80	76/81	93	28/29	96	104/110	95
BALB/c 3T3	Sivak & Tu	'80	14/16	87	4/4	100	18/20	90

De testen blijken, mits uitgevoerd in een groep met voldoende ervaring, uitstekende resultaten te geven. Interessant is om de vals negatieve gevallen te vergelijken met de resultaten van het Ames-systeem. Hierbij blijkt, dat saccharine, ethinyloestradiol, progesteron, phenobarbital en polychloorbifenyyl in beide systemen negatief zijn. Daarentegen blijken dat aceetamide, thioacetamide, ethionine, pararosalinine, aminotriazol, diethylstilboethol, urethaan en auramine in het Pientasysteem positief, terwijl ze in het Ames-systeem negatief waren. De aanvankelijk voor de

hand liggende verklaring voor het in de Ames-test negatief zijn van enkele van deze stoffen (niet-genotoxische werking) wordt nu door deze resultaten wel schade aangedaan.

Mogelijk kunnen in vitro cel-transformatiesystemen naast het aantonen van genotoxische stoffen onder bepaalde omstandigheden ook niet genotoxische carcinogenen detecteren.

Het combineren van een aantal testen in een batterij

Wanneer een kortdurende screeningstest zelf niet voor 100% discrimineert, lijkt het voor de hand te liggen om de discriminatie te verbeteren door enkele testen naast elkaar uit te voeren. Het gebruik van een batterij zal over het algemeen de "sensitivity" doen toenemen. De specificiteit echter zal aanzienlijk verminderen met als gevolg ook een achterblijven in "accuracy". Tabel 5 toont dit fenomeen aan de hand van enkele bacterietesten.

Tabel 5. De voorspellende waarde van bacteriële mutageniteitstesten, uitgevoerd als enkelvoudige test of in een batterij (in %)

<u>Systeem</u>	<u>Auteur</u>	<u>Sensitivity</u>	<u>Specificity</u>	<u>Accuracy</u>
Ames	McCann et al. '75, '76	90	87	89
Ames	Rosenkranz & Poirier '79	61	67	62
E. Coli Pol A	Rosenkranz & Poirier '79	74	70	73
E. Coli Pol A	Leifer et al. '80	82	48	75
B. Subt.	Leifer et al. '80	89	50	81

Combinaties

Ames + E. Coli Pol A	75	55	70
Ames + B. Subt.	81	38	70
E. Coli Pol A + B. Subt.	77	33	66
Ames + E. Coli Pol A + B. Subt.	91	33	73

(Naar Rosenkranz 1980)

Combinatie van in wezen verschillende testen lijkt de sensitivity en de accuracy op te voeren, zoals uit tabel 6 moge blijken.

Tabel 6. De voorspellende waarde van een combinatie van verschillende testen (in %)

<u>Systeem</u>	<u>Auteur</u>		<u>Sensitivity</u>	<u>Specificity</u>	<u>Accuracy</u>
Ames	Simon	'79	64	75	66
E. Coli Pol A	Rosenkranz & Poirier	'79	74	70	73
S.H.E.C.	Pienta	'80	93	96	95
<u>Combinatie</u>					
Ames + E. Coli Pol A + S.H.E.C.			96	67	90

Dit hoopvolle resultaat moet echter worden gezien tegen andere, meer tegenvallende resultaten zoals onder andere uit de resultaten van het International Program for the Evaluation of short-term tests for Carcinogenicity (de Serres, 1980) bleek. Naarmate men door het combineren van verscheidene testen het aantal vals-negatieve resultaten verkleinde, groeide het aantal positieve gevallen.

Mogelijkheden en beperkingen van de kortdurende screeningstesten

Bij al deze evaluaties speelt, zoals eerder gesteld, de vraag mede of het genotoxische carcinogenen betreft of niet - een vraag waarmee tot nu toe in alle internationaal in gang zijnde evaluatieprogramma's geen enkele rekening is gehouden. Dit maakt het des te moeilijker om de mogelijkheden en beperkingen van de systemen aan te geven. Globaal kan echter worden vastgesteld, dat een aantal bacteriële testen voldoende geëvalueerd is om betrouwbaar toe te passen, wanneer binnen een laboratorium reproduceerbare resultaten kunnen worden verkregen. Het Ames-systeem zowel als het E. Coli Pol A (repair) systeem lijken geschikt als eerste screeningssysteem, terwijl het systeem, ontwikkeld door Mohn (1980) niet alleen als screeningssysteem van belang is, maar ook voor de verificatie en de kwantificering van de mutaties op de verschillende genen kan worden gebruikt. Zowel de mutageniteitstesten als de DNA-repairtesten tonen uitsluitend de genotoxische carcinogenen aan. Dit behoeft geen nadeel te zijn: gezien hun werking (het veroorzaken van een irreversibel, zichzelf replicerend effect) is het zelfs als een voordeel te beschouwen, dat in het bijzonder deze stoffen kunnen worden herkend mits in het systeem de noodzakelijke enzymsystemen aanwezig zijn om de aangeboden stoffen in hun actieve metaboliet om te zetten. Aangetoond is echter, dat het metabolisch activeringssysteem dat tot nu toe wordt gebruikt (S9 fractie van met Aroclor 1254 geïnduceerd leverweefsel) in deze soms tekortschiet.

Het HPC/DNA-repair-systeem kan juist in deze gevallen uitstekend complementair werken. Wanneer een stof zowel in de bacterie-mutatietest als in de HPC/DNA-repairtest positieve resultaten geeft, lijkt de kans groot dat we inderdaad met een genotoxische carcinogeen te maken hebben. Het daarnaast ook nog uitvoeren van een in vitro cel transformatietest zal in deze gevallen waarschijnlijk weinig additionele informatie geven. Beter ware het, indien gewenst, op dat moment een langdurige dierproef uit te voeren om de carcinogeniteit te bewijzen en een indruk te krijgen over de carcinogene potentie in het zoogdierstelsysteem. De resultaten met de in vitro cel transformatietesten, op zich veelbelovend, geven ook aan, dat enkele verbindingen, waarvan men op het eerste gezicht zou aannemen, dat ze niet tot de genotoxische carcinogenen behoren, toch positieve resultaten geven. Het zal in de toekomst zeker de moeite waard zijn om dit verder te onderzoeken: zeker wanneer zou blijken, dat bepaalde modificaties in zo'n in vitro cel transformatiesysteem zouden kunnen leiden tot een systeem, dat naast genotoxisch werkende carcinogenen ook indirect werkende carcinogenen (promotoren en dergelijke) zou aantonen. Immers, met de huidige kennis van zaken zal men moeten erkennen, dat juist voor deze groep van stoffen de zo noodzakelijke kortdurende screeningstesten ontbreken. Meer aandacht zal derhalve ook moeten worden besteed aan de ontwikkeling van kortdurende in vivo testen, die de mogelijke promoverende werking van stoffen kunnen aantonen. In de laatste 5 jaar zijn enkele grote hindernissen genomen. Er staan echter nog enkele voor ons. Een uitdaging voor de onderzoeker!

Literatuur

- Anon., 1979. Advies inzake carcinogene stoffen, Gezondheidsraad. Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Leidschendam, Nederland
- Anon., 1980. Advies inzake mutageniteit van chemische stoffen, Gezondheidsraad. In voorbereiding
- Ames, B.N., J. McCann & E. Yamasaki, 1975. Methods for detecting carcinogens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31: 347-364
- Bartch, H. et al., 1980. Bacterial and mammalian mutagenicity tests: Validation and comparative studies on 180 chemicals. *IARC Sci. Publ.*, 27: 179-228
- Brown, M.M. et al., 1979. Literature survey of Bacterial, Fungal and Drosophila Assay Systems used in the evaluation of selected chemical compounds for mutagenic activity. *J. Nat. Cancer Inst.*, 62: 841-871
- Cooper, J.A., R. Saracci & P. Cole, 1979. Describing the validity of carcinogen screening tests. *Br. J. Cancer*, 39: 87-89

- Dunkel, V.C. & V.F. Simon, 1980. Mutagenic activity of chemicals previously tested for carcinogenicity in the National Cancer Institute Bioassay Program. IARC sci. Publ., 27: 283-302
- IARC, 1980. IARC monographs on the evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Supplement 2, Long-term and short-term screening assays for carcinogens: a critical appraisal - Lyon. In druk
- Kawachi, T. et al., 1980. Cooperative programme on short-term assays for carcinogenicity. IARC Sci. Publ., 27: 323-330
- Kroes, R., 1979. Animal Data, Interpretation and Consequences. In: P. Emmelot and E. Kriek: Environmental Carcinogenesis: Elsevier/North-Holland: 287-302
- Leifer, Z. et al. Mutat. Res.: in voorbereiding
- Loprieno, N., 1980. Evaluation and relevance of yeast and moulds in the screening tests for carcinogenicity. In: G.M. Williams and R. Kroes: The predictive value of in vitro short-term screening tests in carcinogenicity evaluation: Elsevier/North-Holland. In druk
- Martin, C.N., A.C. McDermid & R.C. Garner, 1978. Testing of known carcinogens and non carcinogens for their ability to induce unscheduled DNA-synthesis in HeLa cells. Cancer Res., 38: 2621-2627
- McCann, J. et al., 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome tests: assay of 300 chemicals. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 72: 5135-5139
- McCann, J. & B.N. Ames, 1976. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome tests: assay of 300 chemicals: discussion. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.; 73: 950-954
- Miller, J.A. & E.C. Miller, 1969. In: E.D. Bergmann and B. Pullman: Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry Vol. 1: Physicochemical Mechanisms of Carcinogenicity. Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem: 237-261
- Mohn, G.R., 1980. Persoonlijke mededeling
- Pienta, R.J., 1980. Evaluation and relevance of the Syrian hamster embryo cell system In: G.M. Williams and R. Kroes: The predictive value of in vitro short-term screening tests in carcinogenicity evaluation: Elsevier/North-Holland. In druk
- Rinkus, S.J. & M.S. Legator, 1979. Chemical characterization of 465 known or suspected carcinogens and their correlation with mutagenic activity in the Salmonella typhimurium system. Cancer Res., 39: 3289-3318
- Rosenkranz, H.S. & L.A. Poirier, 1979. Evaluation of the mutagenicity and DNA-modifying activity of carcinogens and non carcinogens in microbial systems. J. Nat. Cancer Inst., 62: 873-892

- Rosenkranz, H.S., 1980. The Salmonella mutagenicity and the E. Coli Pol A⁺/Pol A⁻ repair assays: Evaluation of relevance to carcinogenesis. In: G.M. Williams & R. Kroes: The predictive value of in vitro short-term screening tests in carcinogenicity evaluation: Elsevier/North-Holland. In druk
- Serres, F.J., de, 1980. The international program for the evaluation of short-term tests for carcinogenicity. In: G.M. Williams and R. Kroes: The predictive value of in vitro short-term screening tests in carcinogenicity evaluation: Elsevier/North-Holland. In druk
- Simon, V.F., 1979a. In vitro mutagenicity assays of chemical carcinogens and related compounds with Salmonella typhimurium: J. Nat. Cancer Inst., 62: 893-899
- Simon, V.F., 1979b. In vitro assays for recombinogenic activity of chemical carcinogens and related compounds with Saccharomyces cerevisiae D 3. J. Nat. Cancer Inst., 62: 901-909
- Sivak, A. & A.S. Tu, 1980. Factors influencing neoplastic transformation by chemical carcinogens in BALB/c - 3T3 cells. In: G.M. Williams and R. Kroes: The predictive value of in vitro short-term screening tests in carcinogenicity evaluation: Elsevier/North-Holland. In druk
- Stich, H.F. et al., 1976. DNA-fragmentation and DNA-repair as an in vitro and in vivo assay for chemical procarcinogens, carcinogens and carcinogenic nitrosation products. IARC Sci. Publ., 12: 617-636
- Vogel, E. et al., 1980. Some current perspectives of the application of Drosophila in the evaluation of carcinogens. In: G.M. Williams and R. Kroes: The predictive value of in vitro short-term screening tests in carcinogenicity evaluation: Elsevier/North-Holland. In druk
- Weisburger, J.H. & G.M. Williams, 1978. Decision point approach for carcinogen testing. In: I.M. Asher and C. Zervos: Structural correlation of carcinogenesis and mutagenesis: The office of Science FDA, Rockville: 45-52
- Williams, G.M., 1977. The detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA-synthesis in rat liver primary cell cultures, Cancer Res., 37: 1845-1851
- Williams, G.M., 1979. Review of in vitro test system using DNA damage and repair for screening of chemical carcinogens. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 62: 857-863
- Williams, G.M., 1980. Persoonlijke mededeling

MUTAGENITEITSONDERZOEK VAN LEVENSMIDDELEN

J.H. Koeman en J.C.M. van der Hoeven

Vakgroep Toxicologie Landbouwhogeschool, Wageningen

Samenvatting

De mutagene eigenschappen van levensmiddelen zijn vooral van betekenis voor de gezondheid van de mens in verband met de omstandigheid dat sommige mutagenen tevens carcinogeen zijn. Mutagene stoffen zijn aangetoond in vlees en vis, plantaardige voedingsmiddelen, zuivelprodukten en genotmiddelen. Van sommige stoffen is de carcinogene werking aangetoond (polycyclische aromaten, nitrosaminen, sommige mycotoxinen). Andere zijn op het punt van de mogelijke carcinogeniteit nog onvoldoende onderzocht (onder andere flavonolen, anthrachinonen, furo-coumarines en de pyrolyseprodukten van onder andere tryptofaan en glutaminezuur). Van grote interesse is de waarneming dat vooral in plantaardige voedingsmiddelen stoffen met antimutagene en/of carcinogene aktiviteit voorkomen. Het onderzoek naar de toxicologische betekenis van voedingsmiddelmutagenen en antimutagenen bevindt zich thans nog in een exploratieve fase. Bij voortgezet onderzoek zal veel aandacht dienen te worden besteed aan lange termijn proeven met laboratorium proefdieren en epidemiologisch onderzoek bij de consument.

Inleiding

Dat voedingsmiddelen over mutagene eigenschappen kunnen beschikken werd voor het eerst aangetoond in het begin van de veertiger jaren toen de onderzoekster Charlotte Auerbach ontdekte, dat allylisoithiocyanaat, mosterdolie, mutageen is voor *Drosophila*, (Auerbach, 1944). Het allylisoithiocyanaat ontstaat bij de verwerking van mosterdzaad tot mosterd en vormt het aglycon van het thioglucoside sinigrine. Deze waarneming heeft destijds echter niet geleid tot een uitgebreid onderzoek naar de gezondheidsrisico's van mosterd door de mens en tot op de huidige dag is hierover weinig bekend. Wellicht kan dit ten dele worden verklaard uit de wetenschappelijke ontoegankelijkheid van het probleem ofwel op grond van de menselijke eigenschap wat minder kritisch te zijn als gezondheidsrisico's betrekking hebben op zaken waaraan men verknocht is, denk aan roken en het overmatig eten en drinken. Misschien ook was de afstand tot het risico te groot, immers, zo dacht men tot voor kort, mutagene risico's komen pas tot uiting bij volgende generaties. De recentere

ontdekking, dat mutagene stoffen soms tevens carcinogeen kunnen zijn, heeft hierin echter verandering gebracht. Kanker, ofschoon eveneens een lange termijn risico, vormt kennelijk een zodanige bedreiging voor de gezondheid, dat aan onderzoek naar de mogelijke oorzaken een relatief hoge prioriteit wordt gegeven. Dit vormt tevens de verklaring voor de toegenomen belangstelling voor onderzoek naar mutagene factoren in levensmiddelen.

Het zou overigens onjuist zijn te concluderen, dat de betekenis van levensmiddelen voor het kankerrisico uitsluitend zou worden bepaald door de daarin aanwezige mutagene stoffen met kankerverwekkende eigenschappen.

Ten eerste zijn zeer waarschijnlijk niet alle mutagene stoffen carcinogeen. Bovendien heeft de voeding een eigen intrinsieke invloed op de ziekte (calorische waarde in relatie tot de voedselopname, nutriënten samenstelling) en kan zij chemische stoffen bevatten met een modificerende invloed op de kankerverwekkende factoren. (bijvoorbeeld Young, 1978). Bij het mutageniteitsonderzoek van levensmiddelen verdienen deze 'modificerende' factoren extra aandacht. Tenslotte dient rekening te worden gehouden met interacties met andere chemicaliën en factoren die kanker veroorzaken of voor de etiologie van de ziekte van belang zijn, zoals bepaalde soorten straling (röntgen, zonlicht en dergelijke), geneesmiddelen, industriële stoffen via beroepsexpositie, bepaalde ziekten, zoals virus hepatitis in verband met leverkanker, en andere.

Mutagene factoren in levensmiddelen

Vlees en vis

Het braden, roosteren en roken van vlees en vis maakt deze voedingsmiddelen mutageen. Er worden onder andere polycyclische aromaten gevormd, zoals het 3,4-benzpyreen. Deze stoffen ontstaan uit radicalen van 1,2 en meer koolstofaromaten, die tijdens de verhitting vrijkomen. Behalve mutageen zijn verscheidene vertegenwoordigers van de polycyclische aromaten, waaronder de hierboven genoemde stof, tevens carcinogeen. De benzpyreengehaltes liggen in de orde van 5 tot 50 µg per kg. Inmiddels is echter gevonden dat dit niet de enige mutagene factoren zijn. De mutageniteit van verhitte vlees en viswaren blijkt veelal hoger te zijn dan op grond van het polycyclische aromatengehalte mocht worden verondersteld.

Gevonden is inmiddels dat tijdens de verhitting van vlees- en visproducten pyrolyseproducten ontstaan uit aminozuren die sterk mutageen zijn.

Het gaat hierbij vooral om de aminozuren tryptofaan en glutaminezuur. Onderzoek naar de mogelijke carcinogene eigenschappen wordt momenteel uitgevoerd in Japan.

Uit dezelfde aminozuren ontstaan ook pyrolyseprodukten, die niet mutageen zijn, maar wel co-mutageen, dat wil zeggen dat ze de mutageniteit van andere mutagenen versterken ofwel bewerkstelligen, dat niet mutagene stoffen als mutageen reageren. De co-mutagene werking zou vooral berusten op een beïnvloeding van de metabole activatie. Bij dit soort mutageniteitsonderzoek wordt voornamelijk gebruik gemaakt van microbiële mutageniteitstoetsen, zoals de Salmonella microsoomtoets volgens Ames, onder toevoeging van geactiveerd leverhomogenaat. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen of hier tevens sprake is van co-carcinogeniteit.

Vlees en vis dragen belangrijk bij tot de vorming van nitrosaminen, waarvan er velen carcinogeen zijn. De nitrosaminen ontstaan uit nitriet en amines. De reactie voltrekt zich in de produkten zelf, alsook in de maag van de consument. Het zure milieu in dit orgaan bevordert de reactie.

Nitrosaminevorming treedt vooral op in vlees en visprodukten die ter conservering met nitriet zijn behandeld. Bij de reactie in de maag wordt het nitriet geleverd via het nitraat dat met de plantaardige voedingsmiddelen en soms met drinkwater wordt opgenomen. De nitrietgehalten in speeksel vertonen een duidelijke correlatie met de nitraatopname. Stephany & Schuller (1977) namen waar, dat de nitriet concentratie bij mens na consumptie van postelein binnen enkele uren kan toenemen van 5 mg/kg naar 200 mg/kg. Andere factoren zijn van invloed op het reactiemechanisme, zo zou vitamine C overwegend remmend werken, terwijl bepaalde polyfenolen zoals het chlorogeenzuur (belangrijke bronnen: aardappels en koffie) de nitrosoproduktvorming bevorderen (Challis & Bartlett, 1975). De nitrosamineopname laat zich tot dusver moeilijk kwantificeren daar in het bijzonder de endogene vorming geacht mag worden sterk te variëren afhankelijk van de samenstelling van het menu. De via de voeding opgenomen hoeveelheid wordt geschat op 5 µg per week. Er wordt thans, internationaal gezien, zeer veel onderzoek uitgevoerd naar de vorming en toxicologische betekenis van nitrosaminen.

Plantaardige voedingsmiddelen

In de meeste consumptiegewassen zijn inmiddels mutagene stoffen aangetoond. In bladgroenten en sommige fruitsoorten kunnen glycosiden waarvan de aglyconen worden gevormd door flavonolen waaronder quercetine, kaempferol en isó-rhamnetine. Deze stoffen zijn mutageen bevonden in de Ames-test en SCE-toetsen (SCE = Sister Chromatid Exchange) met behulp

van zoogdiercellen (Van der Hoeven, 1980). Tabel 1 geeft een overzicht van de mutageniteit van een aantal slarassen (Van der Hoeven, 1980). De mutageniteit wordt hier voornamelijk bepaald door de aanwezigheid van quercetine-glycosiden. De mutageniteit wordt eerst aangetoond nadat extracten afkomstig van de darmflora (DFE) worden toegepast. Door deze extracten worden de aanwezige glycosiden gesplitst in de respectievelijke aglyconen en suikers.

Tabel 1. De mutageniteit van methanolextracten van enige slarassen voor stam TA98

Slaras	Hoeveelheid gevriesdroogd uitgangsmateriaal per plaat (mg)	RMF-waarde [*]	
		-DFE	+DFE
Sonate	226	0,77	5,41
Ravel	170	0,39	1,27
Renate	134	0,70	8,69
Dandy	200	0,43	7,35
Deci Minor	189	0,77	3,41

* RMF-waarde wil zeggen relatieve mutatiefrequentie hetgeen inhoudt dat het gevonden aantal revertanten per plaat wordt verminderd met het spontane aantal revertanten, waarna de aldus verkregen waarde wordt gedeeld door het aantal spontane revertanten. Indien een RMF-waarde wordt gevonden, die groter is dan 1, spreekt men van een significante verhoging.

Tabel 2 verschaft informatie over de mutagene eigenschappen van rabarber (Van der Hoeven, 1980). Hier kan het gaan om glycosiden waarvan het aglycon gedeelte bestaat uit anthrachinonen en/of wederom flavonolen. De anthrachinonen reageren eveneens positief zowel in de Amestest als in de SCE-zoogdier cellen test (Van der Hoeven, 1980).

Tabel 2. De mutageniteit van enige rabarberrassen voor teststam TA98

Rabarberras [*]	RMF-waarde	
	-DFE	+DFE
Paragon	0,76	2,58
Goliath	0,48	0,24
Timperley Earley	1,13	3,65
Champagne rood	0,07	0,35

* Voor alle rassen is 132 mg gevriesdroogd uitgangsmateriaal per plaat toegepast.

In onder andere peterselie, selderij, dille en venkel komen furo-coumarines voor waaronder het mutagene en zeer waarschijnlijk carcinogene 8-methoxypsoralen (8-MOP). Het 8-MOP wordt toegepast bij de zogenaamde PUVA therapie van psoriasis patiënten waarbij 8-MOP wordt toegediend in combinatie met kortgolvig UV-licht. Deze fotochemotherapie geeft aanleiding tot een verhoogde incidentie van huidtumoren (Stern et al., 1973).

Een carcinogene plant die hier en daar in de wereld, maar niet in Nederland, als groente wordt geconsumeerd (Australië, de Verenigde Staten en Japan) is de adelaarsvaren. De kankerverwekkende eigenschappen zijn getoond bij runderen in Turkije en Schotland. Onlangs is uit de adelaarsvaren een mutagene fractie geïsoleerd (Van der Hoeven & Van Leeuwen, 1980). In tabel 3 is weergegeven dat de mutagene stof(fen) vrijkomt(en) dan we gevormd wordt(en) onder alkalische omstandigheden.

Tabel 3. De invloed van de pH op de mutageniteit van een methanolextract van de adelaarsvaren

pH van de waterfase voor extractie	Aantal revertanten per plaat		*, **
	TA 98	TA100	
2	0	0	
5	8	60	
7	19	80	
8	30	200	
10	120	570	

* Verminderd met het spontane aantal mutanten

** Steeds is een hoeveelheid extract overeenkomend met 120 mg gevries-droogd materiaal plaat toegevoegd.

De mutagene extracten van adelaarsvaren geven een zeer hoge inductie van SCE's in zoogdiercellen.

Van grote interesse is de ontdekking dat in verscheidene gewassen stoffen met antimutagene en soms anticarcinogene eigenschappen voorkomen. De werking van de mutagene pyrolyseprodukten van tryptofaan kan bijvoorbeeld worden geïnactiveerd door toevoeging van extracten van onder andere koolsoorten, groene peper, appels, ananas en gember. (Kade et al., 1978). Groentesap bereid uit onder andere erwten, tomaten, sla, kool, alsook melk heeft een remmend effect op de mutagene activiteit van bepaalde nitrosaminen, daar zij de afbraak van deze stoffen bewerkstel-

ligen (Yano, 1979). De veelvuldig in plantaardige voedingsmiddelen voorkomende steroïdeverbinding β -Sitosterol blijkt onder experimentele omstandigheden bescherming te bieden tegen colonkanker (Raicht et al., 1980).

Zuivelprodukten

De mutagene eigenschappen van zuivelprodukten zoals melk en kaas worden voornamelijk bepaald door de eventuele aanwezigheid van mycotoxinen. Daarnaast zijn incidenteel ook nitrosaminen in kaas aangetoond. Van de mycotoxinen zijn de aflatoxinen en het sterigmaticystine de belangrijkste. Verscheidene malen is in Nederland het aflatoxine M_1 aangetoond in melk. Dit is een metaboliet van het aflatoxine B_1 dat wordt gevormd door de schimmel Aspergillus flavus die als contaminant op onder andere aardnoten en sojabonen kan voorkomen. Deze produkten worden gebruikt als veevoedergrondstoffen, hetgeen verklaart dat dit mycotoxine als contaminant in zuivelprodukten terecht komt. Ook pindakaas is nogal eens in opspraak gekomen in verband met de sporen aflatoxine die daarin af en toe worden gevonden. Behalve mutageen zijn zowel aflatoxine B_1 als M_1 sterk carcinogeen. Ook het sterigmatocystine is carcinogeen. Deze stof, die onder andere wordt gevormd door de schimmel Aspergillus versicolor, is verscheidene malen aangetoond in de buitenste laag van sommige oude kaassoorten. De gehalten varieerden van 5 tot 600 $\mu\text{g/kg}$. (Norholt et al., 1980).

Van belang is verder de vorming van ethylcarbamaat (Urethaan) in levensmiddelen waaronder zuivelprodukten zoals yoghurt, waarvan de bereiding via fermentatie plaatsvindt. Urethaan wordt er van verdacht een initiator van het kankerproces te zijn (Ough, 1976).

In gebieden waar vee extensief graast zoals dat buiten Nederland regelmatig voorkomt komen diverse plantaardige toxinen in zuivelprodukten terecht. Dit is onder andere vastgesteld voor de carcinogene component uit de hiervoor reeds besproken adelaarsvaren.

Genotmiddelen

De mutagene en carcinogene eigenschappen van tabaksprodukten zijn algemeen bekend. De hiervoor verantwoordelijke stoffen zijn zeer waarschijnlijk nog niet volledig geïdentificeerd. Men vindt in tabaksrook condensaten, polycyclische aromaten, pyrolyseprodukten van tryptofaan zoals het norharman alsook fracties met promotor eigenschappen, dat wil zeggen met een bevorderend effect op de kankerinductie onder invloed van andere factoren.

Ook in koffie en thee komen mutagene stoffen voor. Nagao et al. (1979) becijferen zelfs, dat de mutageniteit van één kop thee of koffie groter is dan die van het rookcondensaat van één sigaret. Het gaat hierbij niet om stoffen zoals cafeïne, theophylline of theobromine, daar deze niet-mutageen zijn in de Salmonella toets. Ook bleek cafeïne vrije koffie even mutageen te zijn als gewone koffie. Zowel koffie als thee zijn direct mutageen, dat wil zeggen, zonder dat metabole activatie via leverhomogenaat toevoeging nodig is. Wanneer leverhomogenaat wordt toegevoegd neemt de mutageniteit van koffie zelfs sterk af ten teken dat de stof(fen) metabool of door binding aan eiwitten worden geïnactiveerd. Wordt aan thee behalve leverhomogenaat tevens hesperidinase toegevoegd dan wordt een aanzienlijke toename in mutagene activiteit gevonden, hetgeen wijst op de aanwezigheid van flavonol-glycosiden.

Bier is recent in de belangstelling gekomen in verband met de daarin aangetoonde relatief hoge concentraties aan nitrosoprodukten. Deze ontstaan bij het eeten van het mout. Bij biergebruikers vormt deze drank de voornaamste exogene nitrosamine bron in de voeding.

Een schatting van de risico's

Ten aanzien van dit aspect moet worden geconcludeerd dat het onderzoek zich in een exploratieve beginfase bevindt. Slechts in een beperkt aantal gevallen kunnen dominerende voedingscomponenten, al of niet in relatie tot bepaalde leefgewoonten, worden aangewezen als belangrijkste oorzaak van een bepaalde vorm van kanker. Eén van die voorbeelden betreft het tabaksgebruik dat in de westerse wereld verantwoordelijk is voor 80 tot 85% van de longkankerincidentie. Het roken wordt geacht tot circa 50% bij te dragen aan het voorkomen van blaaskanker. Ook het koffiegebruik levert hieraan zeer waarschijnlijk een bijdrage. Suggestief is de associatie van maagkanker met de endogene vorming van nitrosoverbindingen in dit orgaan zoals nitrosaminen. Dit volgt uit onderzoek in onder andere Japan, Hongarije en Zuid-Amerika (bijvoorbeeld Montes et al., 1979). De hoge incidentie van leverkanker in sommige tropische gebieden kan ten dele worden verklaard uit bijvoorbeeld relatief hoge opname van mycotoxinen, in het bijzonder aflatoxine, via de voeding. De consumptie van veel alcohol, gevaarlijk in combinatie met roken ('tobacco-alcohol category') is geïndiceerd als belangrijke oorzaak voor kanker van de mondholte, slokdarm en lever.

Uit epidemiologisch onderzoek is bekend geworden dat regelmatige consumptie van koolsoorten bescherming kan bieden tegen het ontstaan van

colonkanker (Graham et al., 1978). Dit sluit aan op de eerder geciteerde bescherming van β -sitosterol bij experimentele colonkanker.

Voor het overige zijn er slechts vage aanwijzingen over de relaties tussen de levensmiddelenbestanddelen en leefgewoonte enerzijds en het voorkomen van kanker anderzijds. Een sobere leefwijze en vegetarisme, eigenschappen die onder andere kenmerkend zijn voor de in dit verband veelvuldig geciteerde 7e dagsadventisten in de V.S., gaan gepaard met een opvallend lage kankerincidentie. Houdt dit verband met het feit dat deze mensen niet worden blootgesteld aan de mutagene en comutagene bestanddelen uit vlees, vis en koffie, profiteren zij van de antimutagene factoren uit hun vegetarisch dieet, maken zij wellicht minder nitrosoprodukten in hun maag of is het deze combinatie van omstandigheden waaraan zij hun bescherming ontleen.

Deze vragen mogen ongetwijfeld worden beschouwd als belangrijke richtlijnen voor het toekomstig onderzoek.

Het is te vroeg nu reeds voedingsadviezen op te stellen ter beperking van de kankerincidentie, behalve waar het gaat om de rookgewoonte. Men behoeft zich voor éézijdige maatregelen tegen bepaalde produkten waarin mutagene en/of carcinogene stoffen zijn aangetoond. Het risico wordt in de meeste gevallen bepaald door combinaties van factoren. Het toekomstig onderzoek zal gericht dienen te zijn op de herkenning van deze riskante combinaties. Wellicht zal men eens het advies onder ogen moeten zien, dat de consumptie van vis alleen dan acceptabel is wanneer dit niet wordt gecombineerd met nitraatrijke groenten. Dit teneinde de eigen nitrosoproduktvorming zoveel mogelijk terug te dringen. Ook moet het niet denkbeeldig worden geacht dat ten aanzien van levensmiddelen met antimutagene c.q. anticarcinogene eigenschappen te zijner tijd voorkeursadviezen zullen worden uitgebracht.

Alvorens in dit verband voedingsrichtlijnen op te kunnen stellen zal het nodig zijn meer informatie te verzamelen over de eigenschappen van de stoffen en factoren waarvan nu een globaal inzicht is verkregen. Langs experimentele weg zal bijvoorbeeld moeten worden nagegaan welke mutagenen carcinogeen zijn en welke invloed de modificerende factoren op het proces van carcinogenese hebben. Daarnaast dienen de mogelijkheden voor epidemiologisch onderzoek zo volledig mogelijk te worden geëxploreerd.

Literatuur

- Auerbach, C. & J.M. Robson, 1944. Production of mutations by allylthiocyanate. *Nature*, 154: 81
- Challis, B.C. & C.D. Bartlett, 1975. Possible cocarcinogenic effects of coffee constituents. *Nature*, 254: 532-533
- Graham, S. et al., 1978. Diet in the epidemiology of cancer of the colon and rectum. *J. North. Cancer Inst.* 61: 709-714
- Van der Hoeven, J.C.M. & F.E. van Leeuwen, 1980. Isolation of a mutagenic fraction from bracken (*Pteridium aquilinum*). *Mutation Research*. In druk
- Van der Hoeven, J.C.M., 1980. Mutagenicity of vegetable extracts and compounds occurring in vegetables in prokaryotic and eukaryotic test systems. In voorbereiding
- Kada, T.; K. Morita & T. Inoue, 1978. Anti-mutagenic action of vegetable factor('s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutation Research*, 53: 351-353
- Montes, G. et al., 1979. Mutagenic activity of gastric juice. *Cancer Letters*, 7: 307-312
- Nagao, M. et al., 1979. Mutagens in coffee and tea. *Mutation Research*, 68: 101-106
- Northolt, M.D. et al., 1980. Fungal growth and the presence of sterigmatocystin in hard cheese. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63: 115-119
- Ough, C.S., 1976. Ethylcarbamate in fermented beverages and foods: Naturally occurring ethylcarbamate. *J. Agric. Food Chem.*, 24: 233
- Raicht, R.F. et al., 1980. Protective effect of plantsterols against chemically induced colon tumors. *Cancer Research*, 40: 403-405
- Stephany, R.W. & P.L. Schuller, 1977. Some new data on the intake of nitrate, nitrite and volatile N-Nitrosamines and on the occurrence of volatile N-Nitrosamines in human urine and vealcalves. Paper presented at 5th Meeting on analysis and formation of N-Nitroso compounds. Durham, U.S.
- Stern, R.S. et al., 1979. Risk of cutaneous carcinoma in patients treated with oral methoxsalen photochemotherapy for psoriasis. *The New England J. of Med.*, 300: 809-813
- Sugimura, T. & M. Nagao, 1979. Mutagenic factors in cooked foods. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 6: 189-209
- Yano, K., 1979. Effect of vegetable juices and milk on alkylating activity of N-Methyl-N-Nitrosurea. *J. Agric. Food Chem.*, 127: 456-458
- Young, V.R., 1978. Nutrition and aging. In *Pharmacological intervention in the aging proces*. *Advances in experimental medicine and biology*. Vol. 97. Ed.: J. Roberts, R.C. Adelman & V.J. Christofalo. Plenum Press New York and London

AUTEURSREGISTER EN ADRESSEN*

Beek, L. van. Zie Beems, R.B.	225
Beems, R.B. Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO, Zeist	225
Bosveld, P. Zie Graveland, A.	70
Cohen, L.A. Zie Weisburger, J.H.	201
Dokkum, W. van Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO, Zeist	174
Dukel, F. Instituut CIVO-Analyse TNO, Zeist	26
Egger, R.J. Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO, Zeist	157
Graveland, A. Instituut voor Graan, Meel en Brood TNO, Wageningen	70
Groenen, P.J. Instituut CIVO-Analyse TNO, Zeist	57
Harrewijn, G.A. Instituut CIVO-Analyse TNO, Zeist	46
Hees, J.P. van. Zie Willems, M.I.	216
Hermus, R.J.J. Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO, Zeist	191
Hoeven, J.C.M. Zie Koeman, J.H.	247
Houwing, H. Instituut CIVO-Technologie TNO, Afd. Instituut voor Visserijprodukten TNO, IJmuiden	88
Koeman, J.H. Vakgroep Toxicologie, Landbouwhogeschool, Postbus 8129, 6700 EV Wageningen	247
Köster, E.P. Psychologisch Laboratorium, Rijksuniversiteit Utrecht, Varkenmarkt 2, 3511 BZ Utrecht	135
Kroes, R. Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO, Zeist	233
Lichtendonk, W.J. Zie Graveland, A.	70
Land, D.B. University of Wisconsin, 1605 Linden Drive, Madison, Wisconsin 53706, USA	83
Luten, J.B. Instituut CIVO-Technologie TNO, Afd. Instituut voor Visserijprodukten TNO, IJmuiden	36
Luyken, R. Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO, Zeist	167
Marseille, J.P. Zie Graveland, A.	70
Meijs, C.C.J.M. van de. Directie Voedings- en Kwaliteitsaangelegenheden, Ministerie van Landbouw en Visserij, Postbus 20401, 2500 EK 's-Gravenhage	15
Moerman, P.C. Instituut CIVO-Technologie TNO, Zeist	115
Moonen, J.H.E. Zie Graveland, A.	70
Reddy, B.S. Zie Weisburger, J.H.	201
Rivenson, A. Zie Weisburger, J.H.	201
Schreurs, W. Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO, Zeist	182
Silverman, J. Zie Weisburger, J.H.	201

* Adressen van de instituten van de Hoofdgroep Voeding en Voedingsmiddelen zijn vermeld op blz. 11.

Sinkeldam, E.J. Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO, Zeist	
Sluimer, P. Instituut voor Graan, Meel en Brood TNO, Wageningen	101
Springarn, N.E. Zie Weisburger, J.H.	201
Spit, B.J. Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO, Zeist	216, 225
Spreekens, K.J.A. van. Zie Houwing, H.	88
Tinbergen, B.J. Zie Moerman, P.C.	115
Vreeken, J.W. Zie Luten, J.B.	36
Waterlow, J.C. Dept. of Human Nutrition, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Keppel Street, London WC1E 7HT, UK	147
Weisburger, J.H. American Health Foundation, Naylor Dana Institute for Disease Prevention, Dana Road, Valhalla, New York 10595, USA	201
Willems, M.I. Instituut CIVO-Toxicologie en Voeding TNO, Zeist	216
Williams, G.M. Zie Weisburger, J.H.	201
Wijsman, J.A. Instituut CIVO-Technologie TNO, Zeist	126