

Project 505.5010

Ontwikkeling methoden van onderzoek voor verduurzaamde champignons

Rapport 87.55                      augustus 1987

BEZOEK AAN FRANKRIJK T.B.V. CHEMISCHE

CONTROLE VAN CHAMPIGNONCONSERVEN OP

TOEVOEGINGEN, 5 T/M 8 JULI 1987.

Drs H.L. Elenbaas.



Afdeling : Eiwitchemie

Medewerking: D.P. Venema

Goedgekeurd door: dr H. Herstel

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 08370-19110

Telex 75180 RIKIL

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur  
sectorhoofden  
projectbeheer  
projectleider  
circulatie  
bibliotheek  
afd. Eiwitchemie 2x  
leden van de projectgroep

EXTERN

Produktschap Groenten en Fruit, t.a.v. drs M. van 't Riet,  
C.G.M. van Leeuwen,  
Directie VKA, t.a.v. ir A.J.A. van Royen,  
Landbou wattaché in Parijs, ir A. Frijlink.  
Sprenger Instituut, t.a.v. ir E. Steinbuch.

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

INHOUD	<u>blz</u>
SAMENVATTING	II
1 INLEIDING	1
2 REISSHEMA	2
3 BEZOEK AAN DE INSTITUTEN	
3.1 INRA te Nouzilly	2
3.2 Institut Appert te Parijs	4
4 CONCLUSIES	8

## SAMENVATTING

De Franse, interprofessionele associatie van champignonproducenten (ANICC), vertegenwoordigd door de heer F. Falconnet, heeft het RIKILT de gelegenheid gegeven om twee instituten in Frankrijk te bezoeken om te zien hoe waterbindende stoffen, i.h.b. ovalbumine (kippeei-eiwit), in verduurzaamde champignons kunnen worden bepaald.

De methode om ovalbumine aan te tonen, ontwikkeld bij de INRA te Nouzilly op kosten van de ANICC, is een ELISA, die specifiek, kwantitatief en gevoelig is; 0,1% toevoeging van ovalbumine kan nog worden geanalyseerd. De methode is voor routinematig onderzoek bruikbaar en kan zonodig geautomatiseerd worden. Nadeel is de lange en vrij arbeidsintensieve analysegang. Bovendien ligt in de specificiteit de beperking van de methode: geen ander eiwit als waterbindende stof kan worden aangetoond, tenzij voor dat eiwit een antistof voorhanden is of aangemaakt kan worden.

Nu Nederland en Frankrijk overeen zijn gekomen om in het geheel geen waterbindende stoffen aan champignonconserven toe te voegen, kan ook een snellere kwalitatieve methode als screeningsmethode worden gebruikt. Zo'n methode is de dot-blot-methode die in Nederland ontwikkeld is. Deze methode is even specifiek en gevoelig en heeft dezelfde beperking als de Franse methode. De laatste zou mogelijk als referentiemethode kunnen fungeren.

De analyse van andere waterbindende stoffen dan eiwitten is bij het Instituut Appert te Parijs besproken. De verdikkingsmiddelen pectine, alginaten en xanthaangom zijn naast kippeei-eiwit de belangrijkste toevoegingen. Methodevoorschriften voor de eerste twee stoffen zijn verstrekt.

Beide methoden zijn klassiek en kwantitatief en daardoor nogal bewerkelijk. Methoden voor het bepalen van xanthaangom en guar zijn bij het CIE onbekend. Het onderzoek aan verdikkingsmiddelen met moderne scheidingsapparatuur (HPLC) staat op een laag pitje.

## 1 INLEIDING

Naar aanleiding van de moeilijkheden tussen Nederland en Frankrijk over de aanwezigheid van waterbindende stoffen in een aantal partijen geëxporteerde Nederlandse champignonconserven, is er t.b.v. het Produktschap voor Groenten en Fruit (PGF) door het Sprenger Instituut (SI) en het RIKILT een project in het leven geroepen, dat tot doel heeft methoden te ontwikkelen om deze waterbindende stoffen in verschillende verduurzaamde champignons te kunnen bepalen.

Als waterbindende stoffen komen bepaalde eiwitten, zoals kippeieiwit (ovalbumine), en polysacchariden: zetmeel en verdikkingsmiddelen (alginaten, pectinen) in aanmerking.

De Franse interprofessionele instelling ANICC (Association Nationale Interprofessionnelle du Champignon de Couche) heeft vanaf het begin van de moeilijkheden bij de import van Nederlandse verduurzaamde champignons laten weten de omstreden toevoegingen met eigen ontwikkelde analysemethoden te kunnen aantonen. In december vorig jaar is al een kleine delegatie, waaronder ondergetekende, naar Frankrijk afgereisd om over het chemische onderzoek aan champignonconserven van gedachten te wisselen, in het bijzonder over de methode om toegevoegde ovalbumine te bepalen. De coördinator van GISCC (Groupement d'Intérêt Scientifique du Champignon Cultivé) de heer F. Falconnet beloofde toen dat de Franse methoden, die het eigendom van de ANICC zijn, omstreeks maart 1987 zouden worden vrijgegeven (RIKILT-verslag 86.117). Echter pas na de overeenkomst tussen het PGF en de ANICC in juni van dit jaar om nationaal en in EEG-verband maatregelen te treffen die het gebruik van ingredienten en/of toevoegingen, die een waterbindend effect hebben, voor de gehele productie van conserven van champignons te verbieden, hebben de Fransen hun bepalingmethoden ter beschikking gesteld. De (communautaire) regelingen zullen volgens de afspraak nl. moeten steunen op de controle van het eindproduct, waarbij gemeenschappelijke analysemethoden worden toegepast.

Na het vrijkomen van de Franse methoden van onderzoek heeft de directie van het RIKILT besloten om ondergetekende en zijn assistente mw. D. Venema naar Frankrijk te sturen om de Franse methoden, in het bijzonder de kwantitatieve analyse van ovalbumine, te bestuderen en zo mogelijk eigen te maken. Inmiddels had het RIKILT al een kwalitatieve methode voor ovalbumine ontwikkeld. Deze methode is gebaseerd op publicaties van Janssen (RKvW Zutphen).

## 2 REISSHEMA

In overleg met Falconnet werd het volgende programma vastgesteld:

- mw Venema en ondergetekende brengen op maandag 6 en dinsdag 7 juli een bezoek aan het Institut National de Recherche Agricole (INRA) te Nouzilly waar de methode voor de kwantitatieve bepaling van het kip-  
peei-eiwit zal worden gedemonstreerd;
- woensdagochtend bezoekt ondergetekende het Institut Appert in Parijs, waarbij met dr Biton over de analyse van andere waterbindende verbindingen dan eiwitten zal worden gesproken.

## 3 BEZOEK AAN DE INSTITUTEN

3.1 Institut National de Recherche Agricole (INRA) te Nouzilly, 37480 Monnaie; Laboratoire d'Immunologie - Pathologie Porcine.

Wij zijn in het laboratorium van dr. A. Paraf ontvangen en begeleid door dr. Christel Breton. Mw. Breton is door de ANICC speciaal aange-  
trokken om onder de hoede van Paraf een kwantitatieve methode voor de  
bepaling van kippeei-eiwit (ovalbumine) in verduurzaamde champignons  
te ontwikkelen.

De analyse van ovalbumine is doorgesproken en stap voor stap aan  
ons gedemonstreerd, waarbij als monster zowel een blik champignons van  
de GISCC als een blik van het SI, waaraan 1% ovalbumine was toegevoegd,  
is genomen. De demonstratie verliep (gelukkig) niet vlekkeloos waar-  
door de punten in de methode, die gemakkelijk tot onjuiste handelingen  
kunnen leiden, aan het licht kwamen.

De methode is, zoals we al wisten, gebaseerd op de enzym-immunoche-  
mische techniek (ELISA). Deze techniek is specifiek en zeer gevoelig;  
enkele milligrammen eiwit per kilogram monster kunnen worden aange-  
toond. Dat betekent, dat een toevoeging van 1% ovalbumine goed kan  
worden bepaald. Let wel: volgens het onderzoek van mw Breton blijft van  
de 1% toegevoegde ovalbumine maar ongeveer 50 milligram aan 1 kg uit-  
gelekte champignon kleven; bij toevoeging van 5% ovalbumine blijft ca  
260 mg/kg plakken. Omgekeerd kan uit het geanalyseerde gehalte ovalbu-  
mine in de champignonmassa worden berekend hoeveel % ovalbumine aan de  
conserven is toegevoegd. De aan champignonconserven toegevoegde hoe-  
veelheid ovalbumine, die nog bepaald kan worden, wordt geschat op

0.1%; de ondergrens van de methode. Zo'n geringe hoeveelheid ovalbumine geeft zeer waarschijnlijk geen rendementverbetering meer. Mogelijk wel in combinatie met kleine hoeveelheden andere stoffen, b.v. verdikkingsmiddelen.

Mw Breton gebruikt zuiver antiserum, dat door het laboratorium zelf bereid is. Zuiveren van het antiserum geeft een grotere gevoeligheid aan de methode en gebeurt door affiniteitschromatografie. Ongezuiverd antiserum is commercieel te verkrijgen, ook in Nederland.

Het antiserum behoeft geen antiserum tegen verhit (gesteriliseerd) ovalbumine te zijn. Integendeel, gezuiverde antilichamen tegen natief ovalbumine blijken actiever te reageren (hebben een hogere aviditeit) met verhit, en dus min of meer gedenameerd ovalbumine dan met de native verbinding. Ook deze anomalie is ons getoond.

Mw Breton heeft geen kruisreacties van de gezuiverde antilichamen, of antiserum, met champignons waargenomen. Ook ingredienten van het geconserveerde produkt of andere waterbindende stoffen, zoals zetmeel en alginaten, geven geen aanleiding tot kruisreacties door pseudo-peroxidase-activiteit. Dat wil zeggen, dat een positieve reactie alleen veroorzaakt wordt door ovalbumine in het monster.

Een ander soort eiwit als waterbindende stof kan met deze ELISA-techniek ook worden bepaald, mits antiserum tegen dat soort eiwit wordt gebruikt. Volgens mw Breton zou tot nu toe alleen erwteneiwit als toevoeging in aanmerking komen. Antiserum tegen dit eiwit wordt nog niet door de INRA geproduceerd.

Een andere vondst van mw Breton en Paraf is de kwantitatieve extractie van het ovalbumine, dat aan de champignons gekleefd zit. (Het meeste eiwit schijnt aan de lamellen van de hoed en aan de onderkant van de steel geplakt te zijn). De extractie gebeurt met 0.1 M NaOH + NaCl bij 4°C, maar duurt ten minste twee dagen. Nu echter de afspraak gemaakt is, dat in het geheel geen rendementverhogende stoffen mogen worden toegevoegd, heeft een kwantitatieve extractie geen zin meer.

Er bestaan detectietechnieken die sneller zijn dan de ELISA, namelijk de immunoblotting- en de dot-blot-techniek zoals Janssen en De Baaij die hebben beschreven (rapport RKvW Zutphen, 15 mei 1987; Ware(n) 15(1985)42).

De methode van Janssen met een snellere extractie mag dan niet geheel kwantitatief zijn, de detectie kan net zo gevoelig voor ovalbumine zijn als de methode van Mw Breton mits hetzelfde zuivere antiserum wordt gebruikt. Mw Breton beaamde, dat de snelle dot-blot-methode zeer geschikt is voor screening van monsters hitteverduurzaamde champignons. Het RIKILT heeft een eigen dot-blot-methode ontwikkelt, die geschikt is voor de analyse van ovalbumine in zowel het eindprodukt als in de evacuatievloeistof.

Recapitulerend: met de Franse methode kan een groot aantal monsters tegelijkertijd kwantitatief op een laag gehalte aan ovalbumine onderzocht worden. De uitkomsten laten echter enkele dagen op zich wachten. Daarentegen is de dot-blot-methode veel sneller, even gevoelig en kan ook heel wat monsters per keer aan, maar is kwalitatief. Echter voor beide methoden geldt, dat geen andere eiwitten als toevoeging kunnen worden aangetoond, tenzij voor die eiwitten antiserum te verkrijgen is. Hoe zuiverder het antiserum, des te gevoeliger de methode. Zoals eerder vermeld, dienen bij een communautaire regeling gemeenschappelijke analysemethoden worden vastgesteld. Een mogelijkheid is, om de dot-blot-methode als screeningsmethode en de methode volgens mw Breton als referentiemethode te aanvaarden, waarbij het antiserum volgens de immunoblottingmethode op kruisreacties getoetst moet worden. Ten afscheid heeft mw Breton ons nog enkele blikjes champignonconserven met ovalbumine, en twee manuscripten over het onderzoek meegegeven. Eén van de twee zal begin 1988 in de Journal of Food Science gepubliceerd worden.

### 3.2 Institut Appert, 44 rue d'Alésia, 75682 Paris Cedex 14.

Het institut Appert is een van de drie instellingen die op bovenstaand adres gevestigd zijn en te zamen als CIE worden aangeduid. De C van Centre techniques des conserves de produits agricoles (CTCPA), de I van Institut Appert (Institut national de la conserve) en E van Ecole d'application des techniques de conservation des produits alimentaires (ETCPA). De activiteiten van CIE schijnen alle aspecten van verduurzamingstechnieken voor voedingsmiddelen te bestrijken, inclusief de techniek van doorstraling. (Vooral kant-en-klaar-maaltijden ("cooked dishes") en fruit worden doorstraald.) Het Franse Ministerie



van Landbouw heeft het rijkstoezicht over CIE.

Het CTCPA houdt zich voornamelijk bezig met:

- het opstellen van standaarden die na goedkeuring door het Ministerie van Landbouw, een officiële status hebben en gebruikt worden bij gedingen;
- de controle bij de industriële bereiding van verduurzaamde producten, d.w.z. dat inspecteurs en specialisten de conservenindustrie informeren en adviseren en ter plaatse de kwaliteit van de producten toetsen of monsters nemen voor een chemische analyse, die door het Instituut Appert worden uitgevoerd;
- het management van een drietal proefstations in de periferie. De proefstations houden zich bezig met experimenten voor zowel de landbouw als de industrie, waarbij één station zich alleen wijdt aan onderzoek ten behoeve van "foie gras"!

Het Instituut Appert bestaat uit drie afdelingen:

1. Controle en analyse van producten.

In deze afdeling wordt de kwaliteit nagegaan van zowel conserven afkomstig van de inlandse markt en de industrie (getrokken door het CTCPA) als conserven bestemd voor de export. De certificering voor export ligt bij het Ministerie van Landbouw, dat zich echter richt op de resultaten van het instituut. Ook ter informatie van de conservenfabrikanten voert de afdeling chemische, bacteriologische en histologische analyses uit.

2. Documentatie en informatie.

De afdeling heeft naast de functie van bibliotheek ook de taak om:

- op aanvraag literatuuronderzoek met de computer, die ook op twee literatuurbestanden in de VS aangesloten is, uit te voeren;
- samenvattingen te geven over technische en wetenschappelijke publicaties, reglementen en normalisatievoorschriften uit binnen- en buitenland in de vorm van een bulletin, dat maandelijks verschijnt;
- vragen te beantwoorden van allerlei aard, technisch, wetenschappelijk, regelgevend; betreffende conserveringsprocessen en de (uitgangs) producten, additieven inbegrepen;
- te adviseren hoe de eindproducten, bestemd voor de binnenlandse en buitenlandse markt, te etiketteren.

### 3 Technische research en bijstand

Deze afdeling is in feite een proeffabriekje met een aantal sterilisatiesimulatoren, waarmee onderzoek betreffende het gehele sterilisatieproces wordt uitgevoerd:

- opstellen van sterilisatietijden en -temperaturen voor alle conserven, in het bijzonder vlees- en pluimveeconserven voor de VS en andere produkten waarvoor de FDA verantwoordelijk is;
- uitvoeren van thermisch-bacteriologische studies om de kwaliteit van de behandelde produkten te verhogen;
- helpen van conservenfabrieken bij het invoeren van bijzondere technieken.

Een groot gedeelte van het onderzoek wordt door promovendi en stagiair(e)s op universitair niveau gedaan.

Het pakket van produkten, dat door de drie instellingen van CIE wordt bekeken omvat: groenten (inclusief tomaten en champignons), truffels, wild en gevogelte, ganzelever, slakken en kant-en-klaar maaltijden, te zamen met gedehydrateerde groenten, geconserveerd en diepgevroren fruit, vlees en vis. Ook kruiden en babyvoeding zitten in het pakket.

De ETCPA, de school met filialen in Parijs en in de regio, organiseert cursussen van verschillend niveau op het gebied van de voedingsmiddelentechnologie, waarbij niet alleen de techniek, maar ook de financiële, administratieve, sociale en commerciële situaties worden behandeld.

Bij het bezoek aan CIE is ondergetekende niet door dr Biton ontvangen, zoals de afspraak was, maar door de heer Christian Divin, Chargé de mission van het CTCPA. Divin had een wetenschappelijk medewerker bij zich, dr Lucas, die me alles kon vertellen over analysemethoden van verdikkingsmiddelen in champignonconserven.

Volgens Lucas bezit het CTCPA voor de meest bekende verdikkingsmiddelen een kwantitatieve bepalingmethode: voor alginaten, pectinen, zetmeel, (carboxy)methylcellulose en difosfaten! De methoden voor de laatste drie middelen zijn echter niet effectief genoeg, d.w.z. ze zijn kwalitatief en niet geschikt voor die lage gehalten die in champignonconserven kunnen voorkomen.

Voor alginaten en pectinen zijn methoden voorhanden, die wel effectief zijn. Beide methoden zijn klassieke en daardoor tijdrovende, colorimetrische methoden. De methode voor pectine is een officiële methode van de AFNOR: NF V 05-128, 1984. Die voor alginaten is een eigen methode, gebaseerd op de ons bekende methode van Graham, geschikt gemaakt voor andere produkten dan melk. De analysevoorschriften van beide methoden werden mij ter hand gesteld. Het gebruik van xanthaangom en carragenen bij verduurzaamde produkten, i.h.b. champignons, was hun onbekend. Falconnet vertelde me bij een eerdere ontmoeting en verzekerde me later, dat xanthaangom en in bepaalde gevallen ook carragenen als waterbindende middelen in champignonconserven worden toegepast. Zetmeel, (carboxy)methylcellulose en difosfaten worden niet meer gebruikt.

Vloeistofchromatografische (HPLC) methoden blijkt het CTCPA niet te bezitten. Het had tot voor kort wel met deze scheidingstechniek onderzoek verricht, maar de onderzoekers stuitten op problemen die ze niet op korte termijn konden oplossen. De problemen waren geen volledige extractie en isolatie van de alginaten. Eveneens waren de onderzoekers door de slechte zuivering niet in staat om de vloeistofchromatogrammen juist te interpreteren. De chromatografie zelf was alleen met polaire kolommen uitgevoerd: een diol- en een aminopropyl(NH<sub>2</sub>)-kolom. Daar mijn gesprekspartner niet geheel op de hoogte van de recente ontwikkelingen op kolomchromatografisch gebied bleek te zijn, waren mijn verwijzingen naar enkele artikelen en kolommen welkome tips.

Verder is nog gesproken over andere activiteiten van CIE, in het bijzonder over doorstraling van voedingsmiddelen en de houding van overheid en consument t.o.v. deze conserveringstechniek, en over de Nederlandse veilingen van groenten en fruit, die zo'n grote invloed hebben op de prijzen in Europa.

Tot slot van het bezoek werd een rondleiding door het CTCPA en Instituut Appert gemaakt. Daarbij viel me op hoe beperkt het chemisch onderzoek t.o.v. het bacteriologisch onderzoek was.

#### 4 CONCLUSIES

- Het bezoek zowel aan de INRA als aan CIE is, in tegenstelling tot de eerste reis, succesrijk verlopen en is niet alleen van belang voor de controle van champignonconserven, maar ook voor andere verduurzaamde voedingsmiddelen.
- De Franse methode om kippeei-eiwit (ovalbumine) in verduurzaamde champignons te bepalen, zoals die door de INRA is ontwikkeld, is een goede, bruikbare, maar langdurige analysemethode.
- De Franse conservenindustrie beschikt verder over redelijke, kwalitatieve analysemethoden voor pectinen en alginaten.
- Als waterbindende stoffen komen volgens de Fransen alleen in aanmerking: het kippeei-eiwit, het heelei-eiwit, mogelijk ook het erwten-eiwit en de verdikkingsmiddelen: pectinen, alginaten, xanthaangom, guar en in bepaalde omstandigheden carragenen met het accent op de eerste drie middelen.