

Laboratorium voor Scheikundige Analyse der Eetwaren van Dierlijke
Oorsprong, Faculteit van de Diergeneeskunde, Rijksuniversiteit Gent
Titularis Prof. Dr. R. VERBEKE

VETANALYSE NA LIPASEBEHANDELING ALS ALTERNATIEF VOOR HET BÖMERGETAL

ANALYSIS OF FAT AFTER LIPASE TREATMENT:
AN ALTERNATIVE METHOD TO THE BÖMER-VALUE

R. VERBEKE(*) en H.F. DE BRABANDER

1. INLEIDING

Vervalsing van reuzel met hardere vetten, zoals rund- en hameltalg, wordt traditioneel opgespoord door bepaling van het Bömergetal (4). Deze methode steunt op de smeltpunteigenschappen van de verzadigde triglyceriden geïsoleerd uit deze vetten. Volgens ROOS (26) zou met deze werkwijze vanaf 10 % rundvet in reuzel kunnen aangetoond worden. Deze analyse is echter tijdrovend en vergt bovendien geoefend personeel tot het verkrijgen van reproduceerbare resultaten. Daarom werd voorgesteld deze analyse te vervangen door bepaling van het verzepingsgetal (23) of de triglyceridesamenstelling (17) van de Bömertriglyceriden. Door andere auteurs wordt, tot het opsporen van reuzelvervalsing, een gaschromatografische analyse van de triglyceridevetzuren voorgesteld. Volgens PASCUCCI en PAOLINI (24) zou de verhouding van de som laurinezuur, palmitinezuur en stearinezuur tot linolzuur in reuzel schommelen tussen de waarde 4-5. Overschrijdt deze verhouding de waarde 5.5 dan is een vervalsing waarschijnlijk. GRIECO (13) beweert 5 tot 10 % rundvet in reuzel aan te tonen op basis van de gehalten $C_{15:0}$ en de vertakte $C_{15:0}$ en $C_{16:0}$ vetzuren. Bij varkensvet zou dan de som van deze gehalten lager zijn dan 0.03 % terwijl deze som bij rundvet zou schommelen tussen 0.2 en 1 %.

* Casinoplein 24, B-9000 GENT

Door BASTIJNS (3) werd echter aangetoond dat na het voederen van runderslachtafval aan varkens een aanzienlijke stijging van deze oneven en vertakte vetzuren vastgesteld wordt in het varkensvet. Een analyse gesteund op deze parameters kan dus leiden tot verkeerde besluiten.

Gezien de samenstelling van het varkensvet sterk beïnvloed wordt door de voedersamenstelling werd gepoogd varkensvet van rundvet te onderscheiden op basis van de vetzuurverdeling binnen het triglyceride. Gevonden werd dat oleïnezuur en palmitinezuur proportioneel met de vetzuurconcentratie ingebouwd worden op de 2-positie van rundvettriglyceriden. De incorporatie van oleïnezuur en palmitinezuur in varkensvet wijkt sterk af van dit waargenomen in rundvet. Dit vormt de basis voor een nieuwe, eenvoudiger methode tot het opsporen van rundvet in varkensvet.

2. OPSPOREN VAN REUZELVERVALSING DOOR BEPALING VAN HET BÖMERGETAL.

De kwaliteit van varkensvet wordt veelal beoordeeld op basis van het Bömergetal. Bij deze bepaling worden de verzadigde triglyceriden gekristalliseerd uit een oplossing van vet in diaethylether of aceton. Na een drietal omkristallisaties uit het organisch solvens wordt een gedeelte van de verzadigde triglyceriden verzeept en de wateronoplosbare vetzuren geïsoleerd en gedroogd (16). Na bepaling van het smeltpunt van de verzadigde triglyceriden (S_G) en het smeltpunt van de vetzuren (S_F) verkregen uit deze triglycerides wordt het Bömergetal berekend als:

$$\text{Bömergetal} = B = S_G + 2(S_G - S_F).$$

Voor zuivere reuzel schommelt het Bömergetal binnen relatief nauwe grenzen (72.8 - 78.2) (28); Bömerwaarden lager dan 71 wijzen op vervalsing van reuzel met geharde vetten. Principieel steunt deze methode op het feit dat de verzadigde triglyceriden van varkensvet hoofdzakelijk bestaan uit het hoogsmeltend 2-palmitodistearine (SPS) terwijl in talg vooral het laagsmeltend α -palmitodistearine (PSS) zou aanwezig zijn (1; tabel 1). Hierdoor zal het verschil in smeltpunt tussen de verzadigde triglyceriden en het overeenkomstig vetzuurmengsel bij var-

TABEL 1 :

Smeltpunten (°C) van enkele verzadigde triglyceriden en vetzuren(1)

(Melting points (°C) of some saturated triglycerides and fatty acids (1))

tripalmitine (PPP)	65.5	α -stearodipalmitine (SPP) 62.7
tristearine (SSS)	72.5	2-stearodipalmitine (PSP) 68.0
palmitinezuur (P)	62.9	α -palmitodistearine (PSS) 65.0
stearinezuur (S)	69.6	2-palmitodistearine (SPS) 68.0

kensvet aanzienlijk groter zijn dan bij talg. Na uitkristallisatie van de aether-onoplosbare triglyceriden uit rund- en varkensvet ⁽¹⁶⁾ werd door ons de samenstelling van de Bömertriglyceriden onderzocht. Analyse na lipasebehandeling laat toe de verdeling van de voornaamste triglyceriden te berekenen (tabel 2). Bij varkensvetten bestaan de Bömertriglyceriden hoofdzakelijk uit hoogsmeltend 2-palmitodistearine (SPS) naast geringere hoeveelheden α -stearodipalmitine (PPS) en tripalmitine (PPP). Het smeltpunt van dergelijk triglyceridemengsel ligt nagenoeg 5-6°C hoger dan het overeenkomstig vetzuurmengsel. Bij rundvet bestaan de aether-onoplosbare triglyceriden vooral uit een mengsel van de lagersmeltende isomeren α -stearodipalmitine (PPS) en α -palmitodistearine (PSS) naast tristearine (SSS) en tripalmitine (PPP). Naast hogervernoemde triglyceriden komt bij rundvet (zie tabel 2) ook een bepaald percentage van de hoogsmeltende isomeren SPS en PSP voor. Het smeltpuntverschil tussen de verzadigde rundvettriglyceriden en de overeenkomstige vetzuren is gering en bedraagt slechts 1°C ⁽²⁸⁾.

Het Bömergetal wordt dus bepaald door 2 parameters: het smeltpunt van de verzadigde triglyceriden (S_g) en het smelt-

TABEL 2 :

Analyse van Bömertriglyceriden geïsoleerd uit rund- en varkensvet
(Analysis of Bömertriglycerides isolated from beef tallow and hog fat)

Vetzuursamenstelling (Mole %) (<i>Fatty acid composition</i>)		C _{14:0}	C _{16:0}	C _{17:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	
Rundvet (<i>Beef tallow</i>)							
triglyceride		4.0	46.5	2.2	45.5	1.7	
2-positie		6.5	50.3	2.5	39.0	2.2	
Varkensvet (<i>Hog fat</i>)							
triglyceride		1.0	41.5	0.5	56.5	0.5	
2-positie		1.6	83.0	0.0	15.0	0.0	
Bömertriglyceriden (Mole %)* (<i>Composition of Bömer-triglycerides</i>)							
		SSS	PPP	PPS	PSP	SPS	PSS
Rund (<i>Beef</i>)		12	11	30	9	15	23
Varken (<i>Hog</i>)		10	2	25	1	58	4

* Samenstelling van Bömertriglyceriden berekend door verdeling van de vetzuren tussen de onbezette 1, 3-posities van de monoglyceriden (29) volgens gegevens van Bockerhoff et al (6).

(Bömertriglyceride composition calculated by distributing the acids between the unoccupied 1, 3-positions of the monoglycerides (29) in proportions found by Bockerhoff (6)).

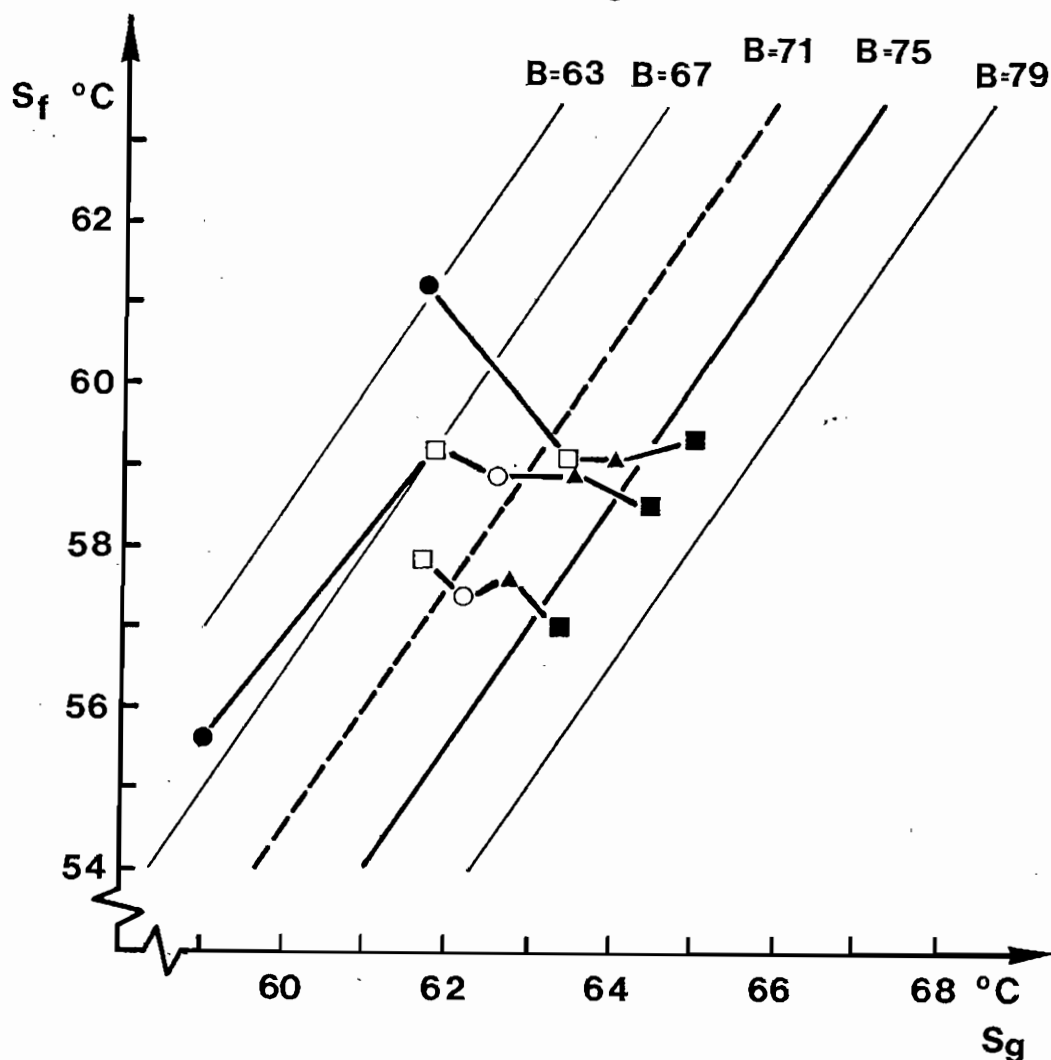
FIG 1 :

Smeltpuntsverloop van de Bömertriglyceriden (S_G) en vetzuren (S_F) bij vervalsing van enkele zuivere varkensvetten met rundvetten.

(Melting points of the Bömer triglycerides (S_G) and fatty acids (S_F) after adulteration of pork fat with increasing amounts of beef tallow).

Zuiver varkensvet (■) ; + 5 % talg (▲) ; + 10 % talg (○) ; + 20 % talg (□) ; zuiver talg (●)

(Pure pork fat (■) ; + 5 % tallow (▲) ; + 10 % tallow (○) ; + 20 % tallow (□) ; pure tallow (●))



punt van de vetzuren uit deze triglyceriden (S_F). Bijmenging van 5 tot 20% rundvet aan varkensvet resulteert vooral in een daling van het triglyceridesmeltpunt (S_G) terwijl het smeltpunt van de triglyceridevetzuren niet aanzienlijk verandert (fig. 1). De daling van het Bömergetal bij reuzelvervalsing wordt dus veroorzaakt door de hoeveelheid en het soort onoplosbare triglyceriden welke in deze vetten voorkomen. Gezien normaal rundvet een 2 tot 4 maal hoger gehalte bezit aan verzadigde

triglyceriden dan varkensvet ⁽²⁵⁾ kan een bijmenging van 20% rundvet aan reuzel triglyceriden opleveren welke voor de helft afkomstig zijn uit rundvet. Hierdoor zal bij 5-10% reuzelvervalsing het triglyceridesmelpunt dalen hoewel de vetzuursamenstelling van de Bömertriglyceriden (en dus het smelpunt S_F) niet noemenswaardig verandert. Dit is zelfs het geval bij reuzelvervalsing met rundvetten met zeer verschillende eigenschappen (zie fig. 1).

Door ROOS ⁽²⁶⁾ werd, bij Nederlandse exportreuzel, een goede correlatie ($r = 0.72$) gevonden tussen het smelpunt van de aetheronoplosbare triglyceriden en het smelpunt van de vetzuren. Het gemiddeld Bömergetal voor exportreuzel bedroeg 74.6 ± 0.6 (s). Bij reuzel met 10% toegevoegd talg bleken de smeltpunten van triglyceriden en vetzuren weinig gecorreleerd ($r = 0.28$) waardoor het Bömergetal van dit mengsel een aanzienlijker variatie vertoonde: 71.4 ± 1.10 (s). Door de grenswaarde voor reuzel te stellen op een waarde van 72.8 zou, volgens ROOS ⁽²⁶⁾, nagenoeg 84% van de monsters welke met 10% talg vervalst werden als dusdanig kunnen erkend worden.

Bij deze benadering werd echter impliciet aangenomen dat de variabiliteit binnen éénzelfde laboratorium gelijk is aan de variabiliteit tussen de laboratoria. Dit blijkt, zelfs in strict genormaliseerde omstandigheden, geenszins het geval. Vergelijkend onderzoek, uitgevoerd binnen het kader van de ISO-kommissie (International Standard Organisation), heeft aangetoond dat de variatie tussen de onderscheiden laboratoria, bij onderzoek van twee vetten met een Bömergetal van resp. 71 en 75, nagenoeg 0.8 bedraagt ⁽¹⁵⁾. Rekening houdend met de interlab-variatie en de variatie op exportreuzel zou de grenswaarde (bij $p < 0.001$) $74.6 - 3 \times \sqrt{0.6^2 + 0.8^2} = 71.6$ bedragen. Men kan berekenen dat bij een grenswaarde van 71.6 slechts 56% van de monsters vervalst met 10% reuzel als positief zullen bevonden worden. Indien de gebruikelijke grenswaarde van 71 aangenomen wordt dan zal minstens 15% rundvet aan reuzel moeten toegevoegd worden vooraleer in 84% der gevallen een reuzelvervalsing kan aangetoond worden.

3. OPSPOREN VAN REUZELVERVALSING OP BASIS VAN VETZUURVERDELING BINNEN DE TRIGLYCERIDEN

1. *Incorporatie van vetzuren in triglyceriden van rund en varken:*

Door analyse van zoogdiertriglyceriden met behulp van pancreaslipase werd sinds lang aangetoond dat de vetzuurincorporatie op plaats 2 niet kon toegeschreven worden aan een toevalsproces ⁽¹⁴⁾. In deze studies werd herhaaldelijk aangetoond

dat bij het varken - en dit in tegenstelling tot andere zoogdieren - plaats 2 van het triglyceride vooral ingenomen wordt door palmitinezuur. Later werd door BROCKERHOFF een stereospecifieke analyse ontwikkeld waarbij de vetzuurverdeling over elk van de 3 plaatsen van het glycerolmolecule bepaald werd (⁵, ⁸). Bij toepassing van deze analyse op zoogdiervetten bleek dat verzadigde vetzuren bij voorkeur op plaats 1, de onverzadigde vetzuren op plaats 2 en de langere vetzuren ($C > 18$) vooral op plaats 3 terechtkomen (⁶). Voor varkensvet zou nagenoeg dezelfde volgorde gelden indien rekening gehouden wordt met de preferentiële incorporatie van palmitinezuur op plaats 2. Verestering van vetzuren op plaats 1 en 3 van het glycerolmolecule bleek, in tegenstelling met hetgeen vroeger verondersteld werd, zeer verschillend van een toevalsverdeling (random distribution) (⁷).

Het mechanisme volgens hetwelk de vetzuren op een stereospecifieke wijze over de onderscheiden veresteringsplaatsen van het glycerolmolecule verdeeld worden is, ook bij zoogdieren, niet bekend. Dat lijkt verwonderlijk gezien de triglyceridebiosynthese voor deze soorten eenzelfde weg zou volgen nl. via α -glycerolfosfaat, fosfatidinezuur en diglyceride tot het triglyceride (¹⁸). Verondersteld wordt dat, voor een gegeven diersoort, de specificiteit voor esterificatie op een gegeven plaats van het triglyceridemolecule zou bepaald worden door de affiniteit van het betreffend acetyltransferase (²⁷). Een ongelijke vetzuurverdeling over de onderscheiden plaatsen van het triglyceride zou ook tot stand kunnen komen door een ongelijke vetzuurverdeling over gecompartmentiseerde acetylatiesystemen. Uit deze hypothesen volgt dat de incorporatie van het vetzuur op elke plaats van het triglyceride recht evenredig zal zijn met de totale vetzuurconcentratie in het triglyceride. Dit blijkt het geval met $C_{22:6}$ (docosahexaeenzuur) en $C_{22:5}$ (docosapentaeenzuur) in het vet van zeezoogdieren (¹⁹). Gelijkaardige verdelingen voor andere vetzuren in dierlijke triglyceriden werden tot hertoe niet gevonden (¹⁹).

Tussen de onderscheiden zoogdiersoorten bestaat er wellicht geen kwalitatief doch een kwantitatief verschil in affiniteit van de verschillende acetylatiesystemen voor bepaalde vetzuren. Het is bovendien niet uitgesloten dat, bij een gegeven diersoort bepaalde acetylatiesystemen selectief geremd worden door interactie met een hogere concentratie aan een bepaald vetzuur. Gezien het complex gegeven hebben wij, voor het varken en het rund, het verband bestudeerd tussen de incorporatie van palmitinezuur of oleïnezuur op plaats 2 van het triglyceride en het overeenkomstig gehalte van deze vetzuren in het totaal triglyceride. Op basis van deze resultaten hebben wij een methode ontwikkeld tot het opsporen van reuzelvervalsing met talg.

1. *Werkwijze tot het bepalen van de vetzuursamenstelling op plaats 2 van het triglyceride resp. totaal triglyceride.*

Voorbehandeling van rund- en varkensvetten :

Ongeveer 50 g gemalen vetweefsel werd afgesmolten boven een filter bij 80°C. Het helder vet werd overgebracht in een gesloten recipiënt en bewaard in diepvries (—20°C) tot analyse.

Reagentia :

- lipase oplossing : 30 mg pancreaslipase (E.C. No 3.1.1.3 ; Sigma type II crude from hog pancreas) wordt gehomogeniseerd met 1 ml 1M tris-buffer pH = 8.2. Aan deze oplossing wordt 25 µl 40 % CaCl₂ oplossing toegevoegd.
- Natriummethylaat oplossing 0.025N : ± 60 mg natrium metaal laten reageren met 100 ml droge methanol.
- vetoplossing : 80 mg vet oplossen in 1 ml n-hexaan.
- dunnelaagplaten silicagel 60 (Merck 5721) 0.25 mm.

Werkwijze :

Lipasebehandeling van triglyceriden en isolatie van 2-monoglyceriden : modificatie van de methode van DUTTA et al (12).

Met een pedersen pipet wordt 200 µl lipase oplossing als een band op een silicagelplaat aangebracht. De plaat wordt gedroogd met een koude haardroger tot het meeste vocht verdampt is. Met een andere pedersen pipet wordt 100 µl vetoplossing (= 8 mg vet) zo homogeen mogelijk over de lipasestroom uitgestreken. De dunnelaagplaat wordt onmiddellijk, met de silicalaag naar onder gekeerd, op ± 2 cm boven het wateroppervlak van een warmwaterbad (40°C) aangebracht. Na 10 min wordt de plaat uit het bad genomen en gedroogd onder een warme luchtstroom. De plaat wordt drie maal ontwikkeld met diethylether, telkens tot ± 2 cm boven de bovenste rand van de lipasestroom. De lipasestroom wordt hierna verwijderd door het afsnijden van dit plaatgedeelte. De plaat wordt ontwikkeld in hexaan-diethylether (50:50, V/V) over ± 12 cm. Na drogen worden de verschillende fracties zichtbaar gemaakt met jodiumdampen. De monoglyceridefractie wordt van de plaat afgekrabt en in een pasteurpipet, vooraf voorzien van een prop glaswol, overgebracht. De monoglyceriden worden van de silicagel geëluëerd door elutie met 2, 1 en 1 ml vers gedestilleerde en droge diethylether. De ether wordt volledig ingedampt en de monoglyceriden worden getransesterificeerd door opname in 200 µl natriummethylaat oplossing. De triglyceriden worden op analoge wijze omgeësterd (20).

Gaschromatografische analyse van methylesters :

De gebruikte gaschromatograaf was een Hewlett-Packard 5750 uitgerust met een vlamionisatiedetector (F.I.D.). Een glazen capillair van 100 meter lengte en 0,5 mm diameter belegd met SILAR 10 C werd met krimp-

teflon aan glazen injector- en detectorinserts bevestigd. Als dragergas werd H_2 gebruikt met een debiet van 5 ml/min. De kolom-, injector- en detectortemperatuur was respectievelijk 180, 210 en 220°C.

3. *Vetzuurverdeling binnen rund- en varkensvetten : resultaten en bespreking.*

In totaal werden 10 rund- en 10 varkensvetten verzameld van zeer verscheiden herkomst. De gemiddelde analyseresultaten van deze vetten vóór en na lipasebehandeling (= plaats 2 van het triglyceride) zijn weergegeven in tabel 3. Uit deze tabel blijkt bij varkensvet $80 \pm 3.7\%$ van het totaal palmitinezuur geïncorporeerd te worden op plaats 2 van het triglyceride terwijl deze proportie in positie 2 voor rundvet slechts $23.9 \pm 2.8\%$ bedraagt. Omgekeerd wordt slechts $9.6 \pm 1.5\%$ van het oleïnezuur geïncorporeerd op plaats 2 van varkensvet terwijl deze proportie bij rundvet $48.3 \pm 4.4\%$ bedraagt.

Regressie-analyse, waarbij tevens betrouwbare literatuurgegevens verwerkt worden, toont aan dat het palmitinezuurgehalte in het 2-monoglyceride, ontstaan door lipasebehandeling van het vet, lineair afhankelijk is van het totaal palmitinezuurgehalte (fig. 2). Dit verband is zowel bij reuzel ($r = 0.92$; $p < 0.001$) als bij talg ($r = 0.81$; $p < 0.001$) zeer significant. Voor rundvet is het verband tussen deze 2 parameters praktisch recht evenredig (intercept niet significant). Voor varkensvet is het intercept significant ($p < 0.01$) waardoor het % incorporatie van palmitinezuur op plaats 2 daalt bij stijgend gehalte in het triglyceride.

Tussen het oleïnezuur + linolzuurgehalte in het triglyceride en de incorporatie van oleïnezuur + linolzuur op plaats 2 bestaat een zeer significante lineaire betrekking voor reuzel ($r = 0.88$; $p < 0.001$) en talg ($r = 0.90$; $p < 0.001$). Zowel rundvet als varkensvet vertonen dezelfde richtingscoëfficiënt (beide lijnen verlopen parallel; fig. 3) waaruit mag besloten worden dat de enzymsystemen dezelfde affiniteit hebben voor hogervernoemde vetzuren bij deze diersoorten. Bij rundvet is de incorporatie van oleïnezuur + linolzuur op plaats 2 echter nagenoeg evenredig met het overeenkomstig gehalte in het triglyceride terwijl dit voor varkensvet niet het geval is.

Niettegenstaande het geringer aantal waarnemingen en de relatief grotere fout bij de bepalingen werden zowel bij rund als bij varken gelijkaardige, significante correlaties gevonden tussen de totale concentratie vetzuur ($C_{16:1}$ of $C_{14:0}$) en de incorporatie op plaats 2 van het triglyceride.

De richtingscoëfficiënten van deze lineaire regressies (b) geven aan hoeveel van het vetzuur terecht komt op positie 2

TABEL 3 :

Vergelijking van de gemiddelde vetzuursamenstelling op plaats 2 tot dit van
de totale triglyceriden bij enkele rund- en varkensvetten*

(Mean fatty acid composition in position 2 and in the corresponding total triglycerides from pork and beef)*

Vetzuur (Fatty acid)	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:(1+2)}
Varken (Pork) ; n = 10					
mole % in triglyceride	1.9 ± 0.2	29.4 ± 1.2	3.2 ± 0.4	14.1 ± 1.8	51.4 ± 2.5
mole % in pos. 2	4.6 ± 0.7	70.6 ± 3.5	4.3 ± 0.9	5.2 ± 1.1	14.8 ± 2.5
proportie in pos. 2 ^a	82 ± 17	80.0 ± 3.7	45 ± 11	12.5 ± 2.8	9.6 ± 1.5
Rund (Beef) ; n = 10					
mole % in triglyceride	4.2 ± 0.4	31.7 ± 2.7	1.6 ± 0.6	27.9 ± 4.3	32.2 ± 3.8
mole % in pos. 2	8.3 ± 0.9	22.6 ± 2.3	3.0 ± 1.4	18.1 ± 2.8	46.4 ± 4.5
proportie in pos. 2 ^a	66 ± 7	23.9 ± 2.8	62 ± 5	21.6 ± 2.0	48.3 ± 4.4

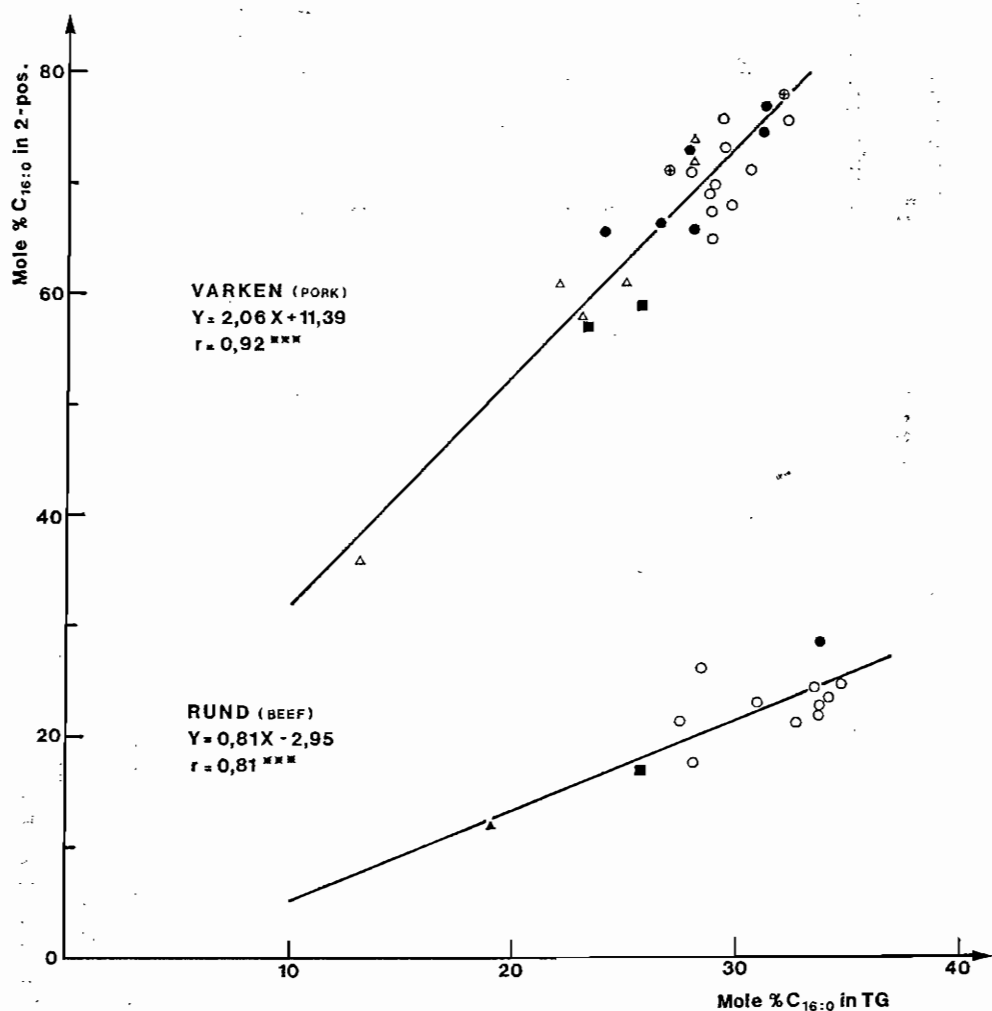
*Gemiddelden ± standaardafwijking (Means ± standard error)

^a proportie in pos 2 = $\frac{\text{mole \% in pos. 2}}{3 \times \text{mole \% in triglyceride}} \times 100$

Verband tussen het totaal palmitinezuurgehalte van rund- en varkensvet en de incorporatie van palmitinezuur in de 2-positie van deze triglyceriden.

(Relation between the palmitic acid contents of pork and beef fat and its incorporation into the 2-position of the corresponding triglycerides).

Gegevens uit : ● (10,11) ; ○ dit werk ; ⊕ (2) ; ▲ (14) ;
(Data from) △ (22) ; ■ (9) ; □ (31).



(Δ pos. 2) bij verestering van 3 moles vetzuur met glycerol ($3\Delta TG$). Deze richtingscoëfficiënten zijn dus evenredig met de *relatieve proporties* van het vetzuur hetwelk geïncorporeerd wordt in positie 2 bij *toename* van 3 moles vetzuur in het triglyceride.

$$\text{Relatieve proporties pos. 2} = \frac{\Delta \text{pos. 2}}{3\Delta TG} \times 100 = \frac{b}{3} \times 100$$

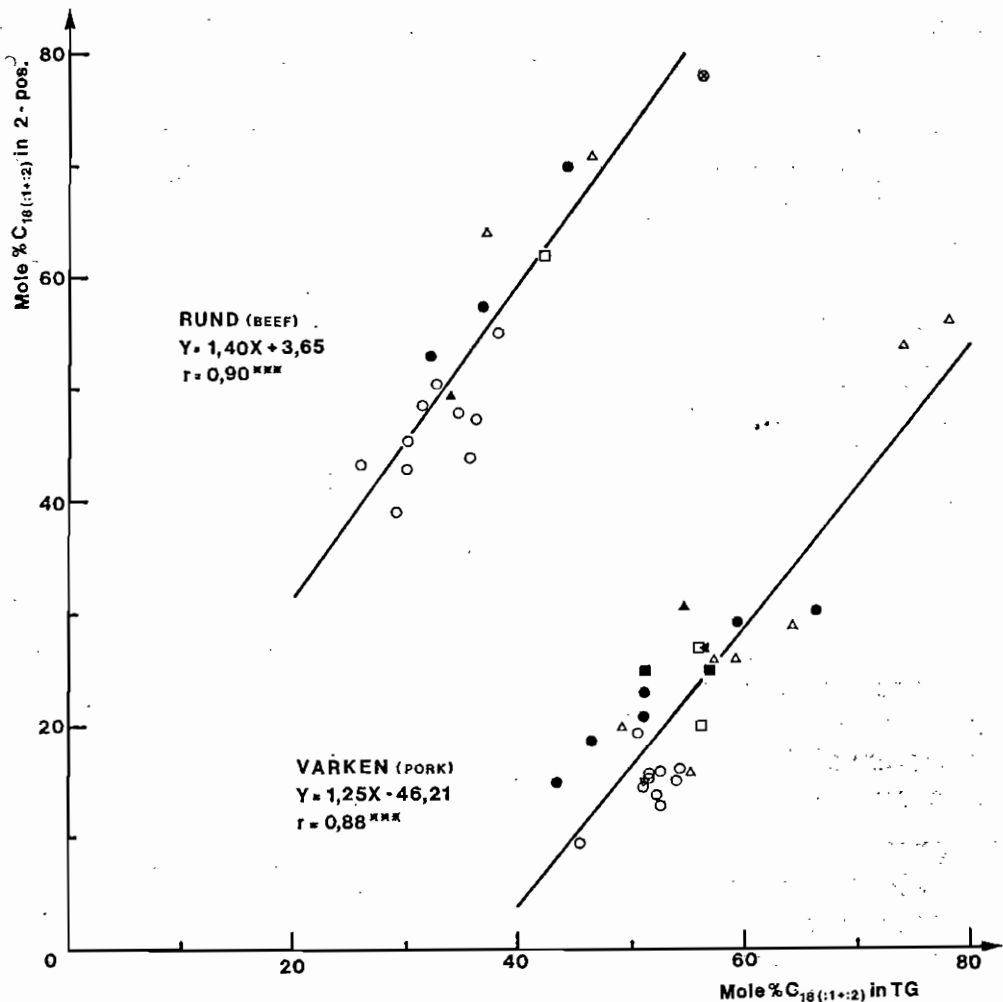
De relatieve proportie van het vetzuur hetwelk op plaats 2 geïncorporeerd wordt is een maat voor de relatieve affiniteit

FIG 3 :

Regressiecurven tussen het percent oleïnezuur + linolzuur in varkens- en rundvet en het percent van deze zuren geïncorporeerd op de 2-positie van deze triglyceriden.

(Regression between the oleic + linolic acid contents of pork and beef fat and its incorporation into the 2-position of the corresponding triglycerides).

Gegevens uit : ● (10,11) ; ○ dit werk ; ⊕ (29) ; ▲ (14) ;
(Data from) △ (22) ; ■ (9) ; □ (31).



van de 2-acyltransferasen. Vergelijken wij de relatieve proporties, verkregen in deze analyses, dan blijkt dat in reuzel nagenoeg 2/3 van het palmitinezuur, ongeveer 42-48% van het oleïne- + linolzuur, palmitoleïnezuur of myristinezuur en slechts een gering percentage van het totaal stearinezuur geïncorporeerd wordt op plaats 2 van het molecule. Voor rundvet wordt daarentegen nagenoeg 3/4 van het palmitinezuur, 42% van het oleïne- + linolzuur of myristinezuur en slechts 20% van het totaal stearinezuur ingebouwd op plaats 2 van het molecule (relatieve proporties).

Met uitzondering van palmitinezuur is de relatieve affiniteit van vetzuurincorporatie voor plaats 2 gelijklopend tussen rund- en varkensvet. Nochtans dient opgemerkt dat de incorporatie van de verschillende vetzuren op plaats 2 van rundvet proportioneel verloopt met hun overeenkomstige concentratie in het totaal triglyceride. Varkensvet vertoont onder dit oogpunt een afwijkend gedrag: waarschijnlijk wordt palmitinezuur bij geringere concentraties (0-5 g%) praktisch totaal geïncorporeerd op plaats 2 van het triglyceride. Bij hogere concentraties aan palmitinezuur ontstaat dan een benaderend lineair verband tussen de bestudeerde parameters (fig. 2). Indien oleïnezuur en linolzuur preferentieel een bepaald aantal van de 1, 3-plaatsen op de glycerolmolecule zouden bezetten vooraleer op plaats 2 te incorporeren zou het intercept verkregen met deze zuren bij varkensvet kunnen verklaard worden (fig. 3).

Bij het rund zou de incorporatie van vetzuren in het glycerolmolecule bepaald worden door de relatieve affiniteit van de acyltransferasen voor de onderscheiden vetzuren. Bij varkens zouden de transacylasesystemen eerst een beperkt aantal plaatsen van het glycerol bezetten met bepaalde vetzuren (bv palmitinezuur op plaats 2; oleïne- + linolzuur op plaats 1 + 3). De overblijvende plaatsen van het glycerol zouden dan, ook bij het varken, ingevuld worden zoals waargenomen bij rundvet.

4. *Bepaling van het percent reuzelvervalsing door rundsvet*

Bepaling van het percent vervalsing op basis van het procent palmitinezuurincorporatie in plaats 2 van het triglyceridemolecule zou, volgens berekening uit onze resultaten, minstens een 30% talgvervalsing toelaten indien rekening gehouden wordt met de normale spreiding van deze analyse.

Het procent vervalsing kan echter nauwkeuriger berekend worden steunend op het correlatief verband tussen oleïnezuur + linolzuur in het triglyceride en de incorporatie van deze vetten op plaats 2 van het molecule (fig. 3). Het verband tussen deze 2 parameters kan voor varkensvet en rundvet beschreven worden door twee evenwijdige rechten met een significant verschil in elevatie (intercept: significant verschillend). Vervalsing van één van deze vetten door het andere zal resulteren in een reeks evenwijdige rechten gelegen tussen deze van reuzel en talg. Het procent vervalsing kan dan eenvoudig geschat worden door berekening van het verschil in elevatie tussen reuzel, resp. talg. Door aanpassing van de discriminant analyse kan op deze wijze, uit het correlatief verband tussen de parameters oleïnezuur- + linolzuurgehalte in triglyceride (X) en gehalte van deze vetzuren op plaats 2 van het triglyceride (Y), volgende vergelijking berekend worden:

$$U = 0.0694X - 0.0479Y$$

Door toepassen van de vergelijking op de gemiddelde oleïne- + linolzuurgehalten (zie tabel 3) wordt voor reuzel de waarde $U_V = 2.857$ en voor talg de waarde $U_T = 0.010$ berekend. Percentage vervalsing van een onbekend reuzelmonster wordt berekend uit de U-waarde van dit monster (U_X) :

$$\text{Vervalsingspercentage} = V\% = \frac{U_X - U_V}{U_V - U_T} \times 100 = \frac{U_X - 2.857}{2.847} \times 100$$

Berekening van vervalsingspercentages steunend op oleïne- + linolzuurgehalten leveren voor de rundvetten een gemiddeld percentage ($\pm$ standaardafwijking) $99.5 \pm 6.3\%$ en voor varkensvetten $-0.15 \pm 5.5\%$. Volgens de correlatieanalyse zou de standaardafwijking 4.9% bedragen ; de gevonden spreiding komt hiermede goed overeen. Volgens deze werkwijze zouden alle normale reuzelmonsters ($p < 0.001$) binnen het $0-15\%$ vervalsingsbereik liggen. Toevoeging van 20% talg aan reuzel zou in 84% van de gevallen als positief bevonden worden.

Op analoge wijze als voor oleïne- + linolzuur kan het vervalsingspercentage uit het palmitinezuurgehalte op plaats 2 (Y) en het palmitinezuur van het totaal triglyceride (X) berekend worden volgens de vergelijking

$$P = 0.143X - 0.087Y$$

Voor reuzel bedraagt de P-waarde : $P_V = -1.96$ terwijl deze voor talg $P_T = +2.55$. Het vervalsingspercentage van reuzel wordt dan berekend uit de P_X -waarde van het vet :

$$\text{Vervalsingspercentage} = V\% = \frac{P_X - P_V}{P_T - P_V} \times 100 = \frac{P_X - 1.96}{4.51} \times 100$$

Op basis van de correlatie tussen het palmitinezuurgehalte in het totaal triglyceride tot dit gevonden op plaats 2 van het vet zou varkensvet een gemiddeld vervalsingspercentage van $0.0 \pm 5.9\%$ vertonen terwijl dit percentage voor rundvet $100 \pm 8.3\%$ zou bedragen.

De nauwkeurigheid van bovenbeschreven werkwijzen werd experimenteel getoetst door smelten van een bepaalde hoeveelheid reuzel met opklimmende hoeveelheden talg (zie tabel 4). De palmitinezuur- evenals de oleïnezuur- + linolzuurgehaltes van de triglyceriden en van de hieruit verkregen 2-monoglyceriden der mengvetten werden gaschromatografisch bepaald. Na berekening blijkt een reuzelervalsing vanaf 10% talg consistent en reproduceerbaar aantoonbaar.

Combinatie van de vervalsingspercentages berekend uit de oleïnezuur + linolzuurverdeling binnen het vet met deze gevonden voor palmitinezuur resulteert in een geringere standaardafwijking ($s = 3.0\%$) dan indien de vervalsing afzonder-

TABEL 4 :

Vervalsingspercentages berekend na analyse van reuzel en talg mengsels

(Percentage adulteration of pork fat calculated from analysis of mixtures of pork fat with tallow)

Vetzuurgehalte in mengsels (Fatty acid content in mixture)					
	C _{16:0}		C _{18:(1+2)}		Berekend vervalsingspercentage (% adulteration of pork fat)
	in TG	op 2-pos.	in TG	op 2-pos.	
100% reuzel (pure pork fat)	30	70.3	52.1	17.2	+ 2.2 — 2.4 — 0.1
talg/reuzel mengsels (mixtures tallow/pork fat)	29.5	68.3	51.7	18.6	+ 4.9 + 5.7 + 5.3
	30.4	69.6	49.8	16.9	+ 5.0 + 7.4 + 6.2
	30.1	65.5	50.1	18.4	+ 12 + 9.2 + 10.7
	30.7	63.9	49.4	20.3	+ 17 + 14 + 15.5
	30.9	59.5	48.5	22.7	+ 26 + 20 + 23
100% talg (pure tallow)	37	22	31.3	50	+118 +111 +115

lijk geschat wordt. Wil men het risico uitsluiten om onvervalste vetmonsters ten onrechte als vervalst te verklaren (fout eerste orde) dan moet een vertrouwensinterval gelijk aan drie-maal de standaardafwijking ($p < 0.001$) genomen worden. Varkensvetten met een vervalsingspercentage vanaf 12% (= grenswaarde) zullen dus met een zeer grote kans (0.1%) werkelijk vervalst zijn. Varkensvet met 15% talgvervalsing zou, rekening houdend met de spreiding, in 84% van de gevallen als vervalst aanzien worden.

4. BESLUIT

De voorgestelde methode laat toe reuzelvervalsing met talg ondubbelzinnig en met dezelfde graad van statistische zekerheid als door bepaling van het Bömergetal op te sporen.

De voorgeschreven werkwijze is echter eenvoudiger, sneller en minder gevoelig voor foutenbronnen dan de Bömerbepaling. De vetzuurverdeling binnen het vet levert bovendien een kwantitatieve schatting van de vetvervalsing terwijl uit het Bömergetal slechts kan besloten worden of een reuzelvervalsing door talg al dan niet een bepaalde grens overschreden heeft. Reuzelvervalsing door laagsmeltend talg is met de Bömermethode praktisch niet op te sporen. Dit geldt ook voor bijmenging met geharde of omgeësterde vetten⁽²⁸⁾. De hier voorgestelde methode kent deze limitering niet gezien de vervalsing berekend wordt uit het species-specifiek verband van de vetzuurverdeling binnen de triglyceriden.

SAMENVATTING

De betekenis en de gevoeligheid van de Bömerbepaling tot het opsporen van reuzelvervalsing door talg wordt kritisch besproken. De auteurs tonen aan dat er bij varkens- of rundvet een duidelijk onderscheiden doch sterk correlatief verband bestaat tussen het percentage oleïne- + linolzuur resp. palmitinezuur van het vet tot het gehalte van deze zuren op de 2-positie van het triglyceride. Op basis van deze regressievergelijkingen kan, na gaschromatografische analyse van het vet en de monoglyceriden verkregen uit dit vet na lipasebehandeling, het percentage vervalsing van reuzel door talg berekend worden. Uit de resultaten blijkt dat reeds 10 % bijmenging van talg aan reuzel relatief nauwkeurig kan geschat worden. De detectiegrens voor reuzelvervalsing is met deze methode minstens even gevoelig als deze verkregen met de Bömerbepaling.

SUMMARY

The importance and sensitivity of the Bömer-value in detecting an adulteration of pork fat with tallow is critically examined. The authors show that the contents of oleic + linolic acids in pork and beef fat are

highly correlated to its incorporation into the 2-position of the triglycerides. A similar relation was observed with palmitic acid. On basis of the different regressions obtained for pork and beef fat, the percentage adulteration of pork fat with beef tallow may be calculated. The method involves gaschromatographic determination of the triglyceride fatty acids and analysis of the fatty acid content in the monoglycerides obtained after lipase treatment of the fat. The results indicate that mixing pig fat with 10 % beef tallow may be accurately estimated. This alternative method is at least as sensitive the Bömermethod in detecting adulteration of pork fat.

DANKWOORD

Wij danken de Heer D. VERYSER voor de hulp verleend bij de gaschromatografische analyse van de vetmonsters.

LITERATUUR

1. BALTES, J. (1975) "Gewinnung und Verarbeitung von Nahrungsfetten" Verlag Paul Parey, Berlin.
2. BARETT, C.B., DALLAS, M.S.J., PADLEY, F.B. (1963) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 40, 580-584.
3. BASTIJNS, L.J. (1968) *Chem. & Ind.* 87, 721-722.
4. BÖMER, A. (1963) *Z. Unters. Nahrungs u. Genussmittel* 26, 539.
5. BROCKERHOFF, H. (1965) *J. Lipid Res.* 6, 10-15.
6. BROCKERHOFF, H., HOYLE, R.J. & WOLMARK, N. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 116, 67-72.
7. BROCKERHOFF, H. (1966) *Comp. Biochem. Physiol.* 19, 1-12.
8. BROCKERHOFF, H. (1967) *J. Lipid Res.* 8, 167-169.
9. BROCKERHOFF, H., HOYLE, R.J., HWANG, P. & LITCHFIELD, C. (1968) *Lipids* 3, 24-29.
10. COLEMAN, M.H. (1961) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 38, 685-688.
11. COLEMAN, M.H. (1963) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 40, 568-571.
12. DUTTA, J., DAS, A.Kr., SAHA, S. (1978) *J. Chromatogr.* 154, 39-50.
13. GRIECO, D. (1964) *Riv. Ital. Sost. Grasse* 41, 261.
14. HILDITCH, T.P. & WILLIAMS, P.N. (1964) "The chemical constitution of natural fats" 4th Ed. Chapman & Hall, London.
15. International Standard Organization (1968): Comparative tests. ISO/TC 34/SC 6/W 63. 1-9.
16. International Standard Organization (1974) ISO/DIS 3577, 1-5.
17. KAUFMANN, H.P. (1959) *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 61, 523-631.
18. KENNEDY, E.P. (1957) *Ann. Rev. Biochem.* 26, 119.
19. LITCHFIELD, C. (1968) *Lipids* 3, 417-419.
20. LOURY, M. (1967) *Rev. Fr. Corps. Gras.* 14, 386.
21. MATTSON, F.H. & LUTTON, E.S. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 868-890.
22. MATTSON, F.H., VOLPENHEIN, R.A., LUTTON, E.S. (1964) *J. Lipid Res.* 5, 363-365.

23. Official and tentative methods of the Am. Oil Chem. Soc. AOCS Off. Methods Ch. 5, 40.
24. PASCUCCI, E. en PAOLINI, F. (1964) *Riv. Ital. Sost. Grasse* 41, 315.
25. QUIMBY, O.T., WILLE, R.L. & LUTTON, E.S. (1953) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 30, 186-190.
26. ROOS, J.B. (1962) *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 64, 303-308.
27. SLAKEY, P.M. & LANDS, W.E.M. (1968) *Lipids* 3, 30-36.
28. TOLLENAAR, F.D., VAN 'GEND, H. & HOCKMANN, H. (1962) *Fette Seifen, Anstrichmittel* 64, 303-308.
29. VAN DER WAL, R.J. (1960) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 37, 18-20.
30. YOUNGS, C.G. (1959) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 36, 664-667.
31. YOUNGS, C.G. (1961) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 38, 62-67.