

RIJKSUNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT VAN DE LANDBOUWWETENSCHAPPEN

Leerstoel voor Microbiologie



STUDIE VAN DE VOORVERPAKKING
VAN VERSE VIS MET BEHULP VAN
MIKROBIOLOGISCHE EN CHEMISCHE
OBJEKTIEVE KWALITEITSBEPALINGSMETHODEN

door

Johan DEBEVERE

Proefschrift tot het bekomen van de graad van doctor
in de Landbouwkundige Wetenschappen.

Promotor : Prof. Dr. Ir. J.P. VOETS

RIJKSUNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT VAN DE LANDBOUWWETENSCHAPPEN
Leerstoel voor Microbiologie

STUDIE VAN DE VOORVERPAKKING
VAN VERSE VIS MET BEHULP VAN
MIKROBIOLOGISCHE EN CHEMISCHE
OBJEKTIEVE KWALITEITSBEPALINGSMETHODEN

door

Johan DEBEVERE

Proefschrift tot het bekomen van de graad van doctor
in de Landbouwkundige Wetenschappen.

Promotor : **Prof. Dr. Ir. J.P. VOETS**

WOORD VOORAF

=====

Bij het voorleggen van dit proefschrift, houd ik er aan de Heer Ere-Rector Prof. Dr. Ir. A.G. BAPTIST alsmede alle Professo-
ren van de Faculteit der Landbouwwetenschappen te danken voor
de vorming die ik van hen mocht ontvangen.

Ik dank zeer oprecht mijn promotor Professor Dr. Ir. J.P. VOETS
voor de steun en de hulp, verleend bij de verwezenlijking van
dit werk.

Mijn dank gaat tevens naar de Heren Professoren Dr. N. SCHAMP
en Ir. A. WILSSENS alsook naar Dr. R. GERBAUX, directeur van
"Research en Ontwikkeling" van U.C.B. afdeling Sidac, die als jury-
leden het manuscript hebben nagezien.

Direkteur-Generaal Ir. F. LIEVENS, Voorzitter van de Commissie
T.W.O.Z., de Directie van het I.W.O.N.L., het Rijksstation voor
Zeevisserij (Dir. : Dr. P. HOVART) en de heer R. BOELS, Voorzit-
ter van de werkgroep "Voorverpakking vis", wens ik in mijn dank-
betuigingen te betrekken voor de gelegenheid die mij werd geboden
deze studie in het kader van de programma's voor zeevisserij-on-
derzoek te verwezenlijken.

Eveneens een woord van dank aan Ir. R. HEIREMANS, hoofd van de
afdeling "Research en Ontwikkeling" van U.C.B. Afdeling Sidac,
en T. Ing. H. LYCKE, omdat ze mij zeer behulpzaam waren bij mijn
eerste pogingen op het terrein van de levensmiddelenverpakking.

Tenslotte wens ik mijn erkentelijkheid uit te drukken aan het
technisch personeel voor de nauwkeurigheid waarmee de experimen-
ten uitgevoerd werden, alsook aan allen die tekst en figuren heb-
ben afgewerkt.

Gent, januari 1970

Johan DEBEVERE

INHOUD

=====

	<u>Blz.</u>
INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING	1
HOOFDSTUK 1 - LITERATUURSTUDIE	5
1.1. De microbiologie van zeewatervis	5
1.1.1. De mikroflora van vers gevangen vis	5
1.1.1.1. Kwalitatief aspekt	5
1.1.1.1.1. Normale flora	5
1.1.1.1.2. Patogene flora	5
1.1.1.1.2.1. Patogene mikro-organismen voor de mens	5
1.1.1.1.2.2. Patogene mikro-organismen voor vis	6
1.1.1.2. Kwantitatief aspekt	6
1.1.2. De flora van bedorven vis	7
1.1.2.1. Kwalitatief aspekt	7
1.1.2.1.1. Normale flora	7
1.1.2.1.2. Patogene flora	7
1.1.2.2. Kwantitatief aspekt	7
1.1.3. Wegen van bakteriëel bederf	8
1.2. De biochemische aktiviteit van de mikro-organismen en autolyse in bedervende vis	9
1.2.1. Afbraak van de proteïnefraktie	9
1.2.2. Afbraak van de proteïn - vrije fraktie	10
1.2.2.1. Het TMA en DMA	10
1.2.2.1.1. TMA	10
1.2.2.1.2. DMA	13
1.2.2.2. De door formol gebonden fraktie	13
1.2.2.2.1. Afbraak van aminozuren en aminen	13
1.2.2.2.2. Afbraak van ureum	14
HOOFDSTUK 2 - METODEN EN MATERIAAL	15
2.1. De bakteriologische methoden	15
2.1.1. Bepaling van het totaal aantal aërobe bakteriën per cm ² huid en per gram visvlees	15
2.1.1.1. Vergelijking van tien bodems	17
2.1.1.1.1. Materiaal en methoden	17
2.1.1.1.2. Resultaten en berekeningen	19
2.1.1.1.3. Bespreking van de resultaten	24
2.1.1.1.4. Besluiten	25
2.1.1.2. Gebruik van zeewater	26
2.1.1.2.1. Materiaal en methoden	26
2.1.1.2.2. Resultaten en berekeningen	27
2.1.1.2.3. Bespreking van de resultaten	30

2.1.1.3.	Bepaling van de optimale pH	30
2.1.1.4.	Bepaling van de inkubatietemperatuur en -tijd	32
2.1.1.5.	Studie van de monsterneming	34
2.1.1.5.1.	Monsterneming van de huid	34
2.1.1.5.1.1.	Metode van monsterneming	34
2.1.1.5.1.2.	Plaats van de monsterneming	35
2.1.1.5.1.2.1.	Vergelijking tussen de monsterneming voor- aan, in het midden of achteraan de vis	35
2.1.1.5.1.2.2.	Bemonstering van donkere of bleke kant bij schol onder of boven de zijlijn	36
2.1.1.5.1.3.	Invloed van de schudtijd	37
2.1.1.5.1.3.1.	Studie van de schudtijd bij de bemonstering van de vishuid bij haring	37
2.1.1.5.1.3.2.	Studie van de schudtijd bij de monsterne- ming van de vishuid bij schol	38
2.1.1.5.1.3.3.	Vergelijking tussen schudden met Ringerop- lossing met 0,1 % Tween 80 en zonder Tween 80	39
2.1.1.5.1.3.4.	Bepaling van het percentage aan bacteriën dat van de huid in suspensie overgaat	40
2.1.1.5.1.4.	Besluiten	41
2.1.1.5.2.	Monsterneming op het visvlees	41
2.1.1.5.2.1.	Metode van monsterneming	41
2.1.1.5.2.2.	Plaats van monsterneming	41
2.1.1.6.	Bepaling van de nauwkeurigheid van de oppuntge- stelde bakteriologische bepalingmethoden	43
2.1.1.6.1.	Nauwkeurigheid van de methode voor de bepaling van het aantal bacteriën op de huid	43
2.1.1.6.1.1.	Nauwkeurigheid bij een hoog aantal tellingen	43
2.1.1.6.1.2.	Nauwkeurigheid bij een laag aantal tellingen	44
2.1.1.6.2.	Nauwkeurigheid van de methode voor bepaling van het totaal aantal bacteriën per gram visvlees	45
2.1.1.6.2.1.	Nauwkeurigheid bij een hoog aantal tellingen	45
2.1.1.6.2.2.	Nauwkeurigheid bij een laag aantal tellingen	46
2.1.1.6.3.	Besluit	47
2.1.3.	De bepaling van het totaal aantal trimethylamine- oxydereduerende bacteriën of "bedervers"	47
2.1.3.1.	Testen van voedingsbodems	47
2.1.3.2.	Werkwijze	48
2.1.4.	Algemene besluiten nopens de bakteriologische kwa- liteitsbepalingmethoden	49
2.1.4.1.	Voor de bepaling op de huid	49
2.1.4.2.	Voor de bepaling in het visvlees	49
2.1.4.3.	Voor de bepaling van het totaal aantal "bedervers"	50
2.2.	Chemische methoden	50
2.2.1.	Bepaling van de TVB	50
2.2.1.1.	Metode	51

2.2.1.2. Reagentia	51
2.2.1.3. Apparatuur	51
2.2.1.4. Werkwijze	51
2.2.1.5. Duur van de destillatie	51
2.2.1.6. Nauwkeurigheid van de methode	53
2.2.2. Bepaling van het TMA	54
2.2.2.1. Methode	55
2.2.2.2. Reagentia	55
2.2.2.3. Apparatuur	56
2.2.2.4. Werkwijze	56
2.2.2.5. Bepalen van de maximale golflengte en opstellen van de ijkcurve	56
2.2.2.5.1. Bepalen van maximale golflengte	56
2.2.2.5.2. Opstellen van de ijkcurve	56
2.2.2.5.2.1. Bereiding van de stockoplossing	56
2.2.2.5.2.2. Bereiding van de verdunningsreeks	56
2.2.2.5.2.3. Uitvoering en bespreking	56
2.2.2.6. "Recovery-test" voor de bepaling van het TMA	66
2.2.2.7. Bepalen van de nauwkeurigheid van de methode	68
HOOFDSTUK 3 - TECHNOLOGISCHE VERWEZENLIJKINGEN	71
3.1. Bederfcurve in functie van de zuurstofdoorlaatbaarheid van de films	71
3.1.1. Proefomstandigheden	71
3.1.1.1. Grondstof	71
3.1.1.2. Verpakkingsmaterialen	71
3.1.1.3. Behandelingsprocessen	72
3.1.1.4. Laboratoriumanalysen	74
3.1.2. Resultaten	74
3.1.3. Bespreking van de resultaten	75
3.2. Invloed van de temperatuur op de bederfcurve	78
3.2.1. Proefomstandigheden	78
3.2.2. Resultaten	78
3.2.2.1. Resultaten van de bewaringsproef bij 3° C	78
3.2.2.2. Resultaten van de bewaringsproef bij 6° C	78
3.2.3. Bespreking van de resultaten	78
3.3. Toepassingsmogelijkheden van de bederfcurve	83
3.3.1. Verpakkingsproeven op kabeljauwfilets	84
3.3.1.1. Proefomstandigheden	84
3.3.1.1.1. Grondstof	84
3.3.1.1.2. Verpakkingsmaterialen	84
3.3.1.1.3. Laboratoriumanalysen	85
3.3.1.2. Resultaten	85
3.3.1.3. Bespreking van de resultaten	85
3.3.1.4. Besluiten	88
3.3.2. Verpakkingsproeven op schol	89
3.3.2.1. Proefomstandigheden	89

3.3.2.1.1. Grondstof	89
3.3.2.1.2. Verpakkingsmaterialen	89
3.3.2.1.3. Behandelingsprocessen	89
3.3.2.1.4. Laboratoriumanalysen	89
3.3.2.2. Resultaten	89
3.3.2.3. Besprekingen	89
3.3.3. Besluit	95
3.4. Invloed van het krimpen	95
3.4.1. Proefomstandigheden	96
3.4.1.1. Grondstof	96
3.4.1.2. Verpakkingsmaterialen	96
3.4.1.3. Behandelingsprocessen	96
3.4.1.4. Laboratoriumanalysen	96
3.4.2. Resultaten	97
3.4.3. Bespreking van de resultaten	97
3.5. Invloed van het verpakken	102
3.5.1. Proefomstandigheden	103
3.5.1.1. Grondstof	103
3.5.1.2. De verpakkingsmaterialen	103
3.5.1.3. Behandelingsprocessen	103
3.5.1.4. Laboratoriumanalysen	103
3.5.2. Resultaten	103
3.5.3. Bespreking van de resultaten	103
3.5.4. Telling van het totaal aantal aërobe bacteriën en het totaal aantal "bedervers"	107
3.6. Invloed van enkele bewaarstoffen op de kwaliteit van voorverpakte vis	109
3.6.1. Invloed van citroenzuur	110
3.6.1.1. Proefomstandigheden	110
3.6.1.1.1. Grondstof	110
3.6.1.1.2. De verpakkingsmaterialen	110
3.6.1.1.3. De behandelingsprocessen	110
3.6.1.1.4. Laboratoriumanalysen	110
3.6.1.2. Resultaten van de proefnemingen	111
3.6.1.2.1. Resultaten van de bacteriologische analyses	111
3.6.1.2.2. Resultaten van de chemische analyses	111
3.6.1.3. Bespreking van de resultaten	111
3.6.1.3.1. Ten aanzien van de bacteriologische bepalingen	111
3.6.1.3.2. Ten aanzien van de chemische bepalingen	111
3.6.1.3.3. Ten aanzien van de presentatie van het produkt	115
3.6.2. Vergelijkende proef tussen kaliumsorbaat en ci- troenzuur	115
3.6.2.1. Proefomstandigheden	116
3.6.2.2. Resultaten	117
3.6.2.3. Bespreking van de resultaten	117
3.6.3. Invloed van de beginkwaliteit van de vis op het gebruik van 0,3 % kaliumsorbaat	121

3.6.3.1. Proefomstandigheden	121
3.6.3.2. Resultaten	121
3.6.3.3. Bespreking van de resultaten	121
3.6.4. Invloed van de zuurstofpermeabiliteit van de ver- pakkingsfilm op de kwaliteit van de met kaliumsor- baat behandelde kabeljauwfilets	125
3.6.4.1. Proefomstandigheden	125
3.6.4.2. Resultaten	125
3.6.4.3. Bespreking van de resultaten	127
3.6.5. Algemene besluiten van de proeven met bewaarstoffen	127
SAMENVATTING EN BESLUITEN	129
LITERATUUR	135
SUMMARY	141

INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING

=====

In de distributie- en verwerkingssector van vis en visserijprodukten leveren de verpakking en de presentatie van de produkten nog steeds bijzondere moeilijkheden op, voornamelijk omdat de koopgewoonten en de koopeisen van de verbruiker van voedingswaren sterk evolueren. De konsument stelt steeds hogere eisen ten aanzien van de kwaliteit, de presentatie en het assortiment en hij gaat uitzien naar snelle aankoopmogelijkheden van bij voorkeur 'panklare' produkten.

Een en ander is oorzaak en gevolg van de opkomst van zelfbedieningszaken en van de verkoop van voorverpakte produkten. Voor diverse voedingsmiddelen bestaat reeds een uitgebouwd stelsel van voorverpakking. Verse vis en visserijprodukten blijven op deze stroming enigszins achter, hoewel in vele landen - en ook in België - meer en meer pogingen worden ondernomen om ook voor deze produkten de voorverpakking ingang te doen vinden.

De detailverkoop van vis en visserijprodukten is momenteel niet langer meer uitsluitend de zaak van de gevestigde viswinkels, de leurhandel en de openbare vismarkten; in de jongste jaren is immers ook een aanzienlijk percentage van de verkoop aan de sektor van de grootwarenhuizen en zelfbedieningszaken ten deel gevallen. De ontwikkeling van de diepvriesindustrie voor vis gaf de eerste stoot tot deze evolutie.

De tweede stap werd gezet door de modernisering van de verkoopvormen, waaronder als voornaamste het systeem van de voorverpakking te vermelden valt.

De idee van de voorverpakking van vis is ingegeven door de behoefte van de voedingsafdeling van zelfbedieningsbedrijven, in de afdeling vis, produkten aan te bieden die door de klanten kunnen worden gekozen en gekocht zonder de hulp van voor vis gekwalificeerd personeel. Het is dan ook begrijpelijk dat de belangstelling van zelfbedieningswinkels en grootwarenhuizen naar voorverpakte vis uitgaat.

Nu kan de voorverpakking zowel kwantitatief, als kwalitatief de visserijsector ten goede komen. Het visverbruik ligt in België eerder op een laag niveau, zodat alles wat ertoe kan leiden om de

vis nader tot de konsument te brengen, in een gunstige zin werkt; het vermenigvuldigen van de verkooppunten en -vormen vergroot de kansen tot koopimpulsen. Verder kan de voorverpakking tot een betere presentatie van het produkt bijdragen, zodat de valorisatie van de vis in betekenis gaat winnen. Deze kwantitatieve en kwalitatieve ontplooiing van de markt vormt trouwens een algemeen punt van aktie. Met de stijging van het inkomen daalt normaliter het percentage van het inkomen dat aan voedingswaren wordt besteed, zodat naar methoden wordt gestreefd om de uitgaven voor voedingsmiddelen te doen stijgen. Deze methoden hebben o.m. betrekking op de verbetering van de kwaliteit, de service, de verwerking en de verpakking.

Er kan worden vooropgesteld dat het voorverpakkingssysteem van vis aan de volgende eisen kan voldoen :

- de vis wordt hygiënisch en afdoende beschermd (bv. tegen stof, aanraking met handen), hetgeen het vertrouwen van de koper verhoogt,
- de klant kan vrij kiezen en hoeft niet te wachten op bediening,
- de prijs en het gewicht zijn vooraf bekend en het ruime assortiment is aan de eisen van de koper ten aanzien van soort, gewicht, grootte enz... aangepast,
- de voorverpakte vis biedt een nette aanblik, geeft geen geur en vocht af en kan met andere waren in een boodschappentas worden geborgen,
- de voorverpakte vis vormt een gemakkelijk en vlug verkoopbaar produkt en laat een betere personeelsbezetting en/of een personeelsbesparing toe.

Het voorverpakken van vis roept echter een gehele problematiek op die te wijten is aan de diversiteit van het verpakkingsmateriaal, de verscheidenheid van de grondstof en de gevoeligheid van de bewaaromstandigheden. Deze drie factoren oefenen vanzelfsprekend een wisselwerking op elkaar uit, waarbij dan kruciaal is, de kennis van de interactie tussen verpakkingsmateriaal en grondstof in functie van de bewaaromstandigheden.

Een uitgebreide marktstudie heeft uitgewezen dat tal van films voor het voorverpakken van voedingswaren worden aangewend. De meest voorkomende verpakkingsfolies voor vis zijn de cellofaan

en de polyvinylchloride (PVC). De PVC wordt als krimpfilm en als rekfilm gebruikt. Al deze films hebben een lage waterdampdoorlaatbaarheid die, gezien het hoge vochtgehalte van vis, geen belangrijke rol zal spelen gedurende het visbederf. De gaspermeabiliteit daarentegen is sterk verschillend en is tevens een primerende faktor gedurende het bewaren van voorverpakte vis.

De doelstelling van deze studie ligt dan ook in het opstellen van een bederfcurve van de vis in functie van de gaspermeabiliteit van de films en in functie van de bewaringstemperatuur. Vervolgens wordt de toepassingsmogelijkheid van de bederfcurve uitgetest op enkele verpakkingsfilms die verschillen van deze die worden aangewend voor het opmaken van de bederfcurve.

De film die door de bederfcurve als best geschikte is aangegeven wordt in het onderzoek verder gebruikt om de invloed van het krimpen, de invloed van de verpakkingsfilm en de toevoeging van enkele bewaarstoffen te bestuderen.

Gans dit onderzoek geschiedt met het oog op het verzamelen van normen waaraan de film moet voldoen ten einde als 'best geschikte' te kunnen worden vooropgesteld voor het voorverpakken van verse vis. Deze gegevens zijn dienstig voor de opbouw van een optimaal verpakkingsprofiel en het uitwerken van het optimale kwaliteitspatroon van de grondstof.

Om de kwaliteit van de voorverpakte vis te kunnen beoordelen moet beroep worden gedaan op objektieve kwaliteitsbepalingsmethoden. Gedurende deze studie worden 3 bakteriologische methoden en 2 chemische methoden toegepast. Als scheikundige analysemethoden wordt het doseren van de totale hoeveelheid vluchtige basische stikstof (TVB) en van het trimethylaminegehalte (TMA) aangewend. Deze chemische bepalingen worden veelvuldig toegepast in onderzoekingen betreffende de kwaliteit van vis en visserijprodukten. Niettemin worden deze methoden nogmaals uitgetest op hun toepassingsmogelijkheden in de studie over het voorverpakken van vis.

De bakteriologische activiteit heeft een bijzondere betekenis in het bederf van vis en menig onderzoeker is van oordeel dat een nauwkeurige kennis van de bacteriën en hun werking in het visvlees als een goede kwaliteitsindex kan dienen.

Over de bakteriologische methoden bestaat er bij de verschillende onderzoekers weinig eenvormigheid wat betreft de voedingsbodem, de zuurtegraad, de inkubatietemperatuur en -tijd, de techniek en de plaats van monsterneming. Sommige onderzoekers gebruiken methoden die echter op beperkt onderzoek zijn gesteund. Anderen gebruiken methoden die worden toegepast bij het mikrobiologisch onderzoek van melk, vlees of water. Bijgevolg is het dan ook van uitzonderlijk belang dat deze bakteriologische bepalingsmethoden op punt worden gesteld. In dit proefschrift worden de bepalingen van het totaal aantal aërobe bacteriën per cm^2 huid, van het totaal aantal aërobe bacteriën per gram visvlees en van het totaal aantal trimethylamineoxydereducerende bacteriën op punt gesteld en toegepast gedurende de studie over de voorverpakking van vis.

HOOFDSTUK 1 - LITERATUURSTUDIE

=====
In de literatuur zijn tal van gegevens terug te vinden aangaande de microbiologie van zeewatervis en de biochemische processen die plaats grijpen gedurende het bederf van vis. Over voorverpakken van vis zijn echter geen literatuurgegevens teruggevonden, gezien het recent karakter van deze verkoopsvorm.

1.1. De microbiologie van zeewatervis

1.1.1. De mikroflora van vers gevangen vis.

1.1.1.1. Kwalitatief aspekt.

1.1.1.1.1. Normale mikroflora

De normale flora van zeewatervis is hoofdzakelijk samengesteld uit 'water-bodem' types (REAY en SHEWAN 1949; TARR 1954) die zich ontwikkelen bij lagere optimumtemperatuur dan de patogene bakteriën m.a.w. het zijn psychrofiele bakteriën (CASTELL et al. 1948; REAY en SHEWAN 1949; HESS 1950; SHEWAN 1961; MASUROVSKY 1963; SCHOLEN en SHEWAN 1964).

De aërobe flora is voornamelijk samengesteld uit Achromobacter-, Pseudomonas-, Flavobacterium-, Micrococcus-, Corynebacterium-, Sarcina-, Proteus- en Bacillussoorten (REED en SPENCE 1929; TARR 1954; GEORGALA 1958). Deze samenstelling kan variëren naar gelang het seizoen (GEORGALA 1958).

Strikt anaëroben komen alleen in de ingewanden voor (SHEWAN 1938). Ze spelen echter geen belangrijke rol in het visbederf. Door SHEWAN (1938)(1949) worden sommige Clostridia-soorten uit ingewanden van vis geïsoleerd. SHEWAN (1961) vermeldt in een literatuuroverzicht dat PREVOT en HUET, DOBROWSKY, BUROVA en NASLIDESHEVA, KUHNER en MOREINIS eveneens Clostridia-soorten uit vis afzonderen.

1.1.1.1.2. Patogene flora.

1.1.1.1.2.1. Patogene mikro-organismen voor de mens.

Voedsel vergiftigende mikrobensoorten kunnen in verse vis voorkomen. Deze besmetting kan gebeuren via besmette waters (SHEWAN 1962a). Zo vinden GULASEKHARAM, VELAUDAPILLAI en NILES (1956), Salmonella terug in vis die in Ceylon op de markt kwam. Wanneer

een besmetting door verontreinigde waters wordt veroorzaakt vindt men de pathogenen alleen in de ingewanden terug (BUTTIAUX 1962). Wanneer echter pathogenen op de huid worden aangetroffen moet dit aan sekondaire besmetting worden toegeschreven (BUTTIAUX 1962). Door SCHOOP (1936) wordt tevens vastgesteld dat het pathogeen mikro-organisme *Erysipelothrix insidiosa*, de wonden aantast van visbewerker die zich verwond hadden aan de stekels van rode zeebaars.

Pathogene mikro-organismen voor de mens komen echter zelden voor aangezien deze bacteriën vlug verdwijnen wanneer ze in het zee-water terecht komen. CARLUCCI en PRAMER (1959) stellen vast dat het ontbreken van deze bacteriën te wijten is aan een reeks fysiokochemische en biologische verschijnselen waaronder :

- a) de adsorptie van de bacteriën aan anorganische en organische deeltjes en een daaropvolgende sedimentatie,
- b) de dodende werking van het zonlicht,
- c) het gebrek aan de nodige voedingsbestanddelen,
- d) de aanwezigheid van giftige bestanddelen in het zeewater,
- e) het voorkomen van bacteriofagen,
- f) de voeding van protozoa met bacteriën en
- g) het antagonisme met andere mikro-organismen.

1.1.1.1.2.2. Pathogene mikro-organismen voor vis.

Organismen behorende tot de *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Haemophilus*, *Mycobacterium*, *Myxobacterium*, *Corynebacterium* en *Streptomyces* groepen kunnen volgens GRIFFIN (1953) en RUCKER, EARP en ORDAL (1953) pathogeen zijn voor vis.

1.1.1.2. Kwantitatief aspect.

Bij vers gevangen vis zijn vlees en lichaamsvocht steriel (SHEWAN 1961). Slijm, kieuwen en ingewanden kunnen zwaar besmet zijn. Zo worden door SHEWAN (1949), LISTON (1956) en GEORGALA (1958) 10^2 tot 10^7 bacteriën per cm^2 huid met aanklevend slijm geteld. In het ingewandsvocht vinden deze onderzoekers 10^3 tot 10^8 bacteriën per ml, terwijl er per gram kieuwweefsel 10^3 tot 10^6 bacteriën worden geteld.

Dezelfde auteurs stellen vast dat het totaal aantal bacteriën bovendien onderhevig is aan seizoeninvloeden. Dit heeft voor ge-

volg dat bij tong, rog en kabeljauw de besmetting gedurende de late lente en de herfst het hoogst is. Dit is vooral waarneembaar in de kieuwen en de ingewanden. Op het slijm daarentegen vindt men deze variaties minder goed terug door het wrijven van de vis tegen het net, de zeebodem en tegen andere vissen gedurende het vangen, zodat de oorspronkelijke besmetting moeilijk kan worden bepaald.

1.1.2. De flora van bedorven vis.

1.1.2.1. Kwalitatief aspect.

1.1.2.1.1. Normale flora.

Gedurende het bederf van de vis sterven sommige mikrobensoorten af. Achromobacter, Pseudomonas en Flavobacterium blijven over (STEWART 1932; ASCHEHOUG en VERSTERHUS 1943; REAY en SHEWAN 1949). Uiteraard zijn het dan ook deze gram-negatieve staafjes die verantwoordelijk zijn voor het visbederf. In 1948 tonen CASTELL en ANDERSON (1948) aan dat Pseudomonas de meest actieve visbederver is.

1.1.2.1.2. Patogene flora

Patogene mikro-organismen kunnen in de vis voorkomen door de diverse behandelingsprocessen die aan boord en aan land plaats grijpen.

1.1.2.2. Kwantitatief aspect.

Het totaal aantal bacteriën in het visvlees kan stijgen tot 10^7 à 10^8 per gram visvlees (SHEWAN 1961; DEBEVERE 1967) terwijl het totaal aantal bacteriën per cm^2 huid van 10^3 tot 10^7 à 10^8 kan oplopen (DEBEVERE 1967). Gedurende het bederf neemt het gehalte aan Pseudomonassoorten toe en kan 60 à 90 % van de totale flora bedragen (SHEWAN 1961).

Er dient echter opgemerkt dat zowel het kwalitatief als het kwantitatief beeld van de flora van bedervende vis door diverse behandelingsprocessen (zoals sorteren, fileren, stockeren en vervoeren) kan worden beïnvloed.

De temperatuur heeft eveneens een grote invloed op de mikroflora (HESS 1932; BEDFORD 1933; ZOBELL 1934; HESS 1934a; HESS 1934b; KISER 1944). Verder dient nog rekening te worden gehouden met de

zuurtegraad (COYNE 1932; COYNE 1933). Volgens REAY en SHEWAN (1949) ligt het optimum voor de ontwikkeling tussen pH 6,5 en 7,5.

1.1.3. Wegen van bacteriëel bederf.

In 1907 stelt ANDERSON (1907) mikroskopisch vast, dat de bacteriën in gegutte vis, van de nieren naar het visvlees migreren via de hoofdader die zich onder de ruggegraat in het achterste gedeelte van de vis bevindt. Eenmaal in deze hoofdader terechtgekomen, breken ze de bloedlichaampjes af, doorboren de ader en komen zo in het visvlees terecht. Dit verschijnsel veroorzaakt een rode kleur langs de ruggegraat.

REAY en SHEWAN (1949) beweren dat het visvlees van pas gevangen vis steriel is, terwijl de huid, de ingewanden en de kieuwen besmet zijn. Deze onderzoekers leiden hieruit af dat de besmetting van het visvlees voorkomt uit de kieuwen en de nieren via het bloedvatenstelsel, alsook rechtstreeks door de huid en door het buikvlies.

Het tijdstip waarop de bacteriën in het steriele visvlees dringen blijkt wisselvallig. Volgens SHEWAN (1962b) zou bij ongegutte vis het buikvlies zo lang steriel blijven tot de maagwand en de ingewanden geperforeerd zijn. Dit heeft plaats na 7 à 8 dagen bewaren bij 0° C.

De snelheid waarmee de bacteriën door de huid treden is eveneens verschillend. Sommige onderzoekers beweren dat het visvlees gedurende 10 dagen steriel blijft (DYER et al. 1946) terwijl andere gevonden hebben dat de besmetting korte tijd na de dood kan aanvangen (LUECKE en FRERCKE 1940; MALTSCHESKY en PARTMANN 1950). SHEWAN (1962) beweert dat in ongegutte kabeljauw, na 2 dagen stockeren bij 0° C, bacteriën in het visvlees worden teruggevonden. Het is voornamelijk de zone langs de zijlijn die besmet is. Tevens stelt hij vast dat na 3 tot 4 dagen aanzienlijke hoeveelheden mikro-organismen in het visvlees aanwezig zijn.

De graad en verloop van het bacteriëel bederf wordt bepaald door het proteolytisch karakter van de mikroflora, door de beginbesmetting, door het vermenigvuldigingsvermogen en door de diffusiemogelijkheden in het visvlees (SOUDAN 1965).

1.2. De biochemische aktiviteit van de mikro-organismen en autolyse in bedervende vis.

Door de ontwikkeling van de mikro-organismen gedurende het bewaren van verse vis en door autolyse worden vetten, koolhydraten en stikstofbestanddelen afgebroken. In dit proefschrift wordt alleen de afbraak van enkele stikstofsubstraten behandeld.

De bakteriële afbraak wordt door menig onderzoeker uitvoerig bestudeerd en veel gegevens hierover zijn reeds gekend. Over de autolyse is echter nog steeds weinig geweten. Meestal is het zo dat men niet met zekerheid kan besluiten of een afbraakprodukt uitsluitend autolytisch dan gedeeltelijk of geheel bakteriëel wordt gevormd. Om de aktiviteit van de endogene enzymen te kunnen volgen, moet het bakteriëel bederf volledig worden geremd. Volgens JONES (1962) kan dit geschieden door het gebruik van toluen of chloroform, van antibiotika, van ioniserende stralen of door het uitsnijden van steriele blokken visvlees. LERKE et al. (1963)(1965), ADAMS et al. (1964) en SHAW en SHEWAN (1968) gebruiken steriel visvocht. Deze twee laatstgenoemde onderzoekers vriezen ook visvlees droog en behandelen het met ethyleenoxyde volgens een methode die door HERBERT en HAIGHT (1967) wordt voorgesteld. Al deze technieken hebben het nadeel dat de verschijnselen die worden bestudeerd niet in 'natuurlijke' omstandigheden plaats grijpen.

De meeste auteurs die diverse soorten vissen onderzocht hebben, geven aan dat bij 0° C de autolyse gering is (SIGURDSSON 1947; PROCTOR et al. 1950; HODGKISS en JONES 1955; LISTON 1965; PARTMANN 1966).

De stikstoffraktie van vis kan worden ingedeeld in een proteïne-fraktie en in een proteïn-vrije fraktie. Bij verse vis bestaat de proteïne-fraktie uit eiwitten en hoogmoleculaire polypeptiden, terwijl de proteïn-vrije fraktie hoofdzakelijk is samengesteld uit laag moleculaire stikstofverbindingen zoals trimethylamineoxyde (TMAO), peptiden, aminozuren enz. (LERKE et al. 1967).

1.2.1. Afbraak van de proteïne-fraktie.

In studies betreffende vlees, gevogelte en vis wordt er aangenomen dat eitwitafbraak een beginstadium van bederf is (LERKE et al. 1967). Langzamerhand wordt bij vis gekonstateerd dat proteolyse een ver-

der gevorderd stadium van bederf is. Volgens BEATTY en COLLINS (1939) zou proteolyse optreden na de fase van de TMAO-reduktie. LERKE, FARBER en ADAMS (1967) tonen aan dat in het begin van de bederfperiode de proteïnefraktie van vissap praktisch niet wordt afgebroken door bacteriën die uit bedervende vis werden geïsoleerd.

1.2.2. Afbraak van de proteïn-vrije fraktie.

De afbraak van TMAO, peptiden en aminozuren is echter de grootste oorzaak van visbederf. Deze bestanddelen kunnen door bacteriën worden afgebroken met vorming van bederfprodukten (BENOIT en NORRIS 1945). Vroeger dacht men dat de peptiden en aminozuren eindprodukten zijn van de proteolyse. Doch aangezien proteïnen in het begin van het bederf praktisch niet worden aangetast kan er worden aangenomen dat het verbindingen zijn die ontstaan zijn in het metabolisme. De afbraak van deze bestanddelen geeft aanleiding tot de vorming van een hoeveelheid vluchtige basen. Deze totale hoeveelheid vluchtige basen of TVB kan in 4 groepen worden onderverdeeld nl. ammoniak, primaire, secundaire en tertiaire aminen (BEATTY 1938). Aangezien de ammoniak en de primaire aminen door formol worden gebonden, terwijl de secundaire en tertiaire aminen overblijven, kan de totale hoeveelheid vluchtige basen bijgevolg in 2 groepen worden ingedeeld, nl. 1) de tertiaire en secundaire aminen, 2) de door formol gebonden fraktie. Als tertiair amine komt voornamelijk het trimethylamine (TMA) voor, en als secundair amine het dimethylamine (DMA).

1.2.2.1. Het TMA en DMA.

1.2.2.1.1. TMA.

Door SUWA (1909) wordt het TMAO uit het vlees van hondshaai geïsoleerd. Tevens stelt hij voor het eerst vast dat het TMAO door bacteriën gereduceerd wordt tot TMA. Het TMAO komt in grotere hoeveelheden in zeewatervissen voor, terwijl in zoetwatervissen weinig of geen TMAO voorkomt (DYER 1952). BEATTY (1939), BEATTY en COLLINS (1940a) en NORRIS en BENOIT (1945) konstateren dat in alle zeevissen TMAO onder verschillende kwantiteiten voorkomt. RONOLD en JAKOBSEN (1947) stellen een verandering in TMAO-gehalte vast in functie van het seizoen, de vissoort en visgrond. SHEWAN en JONES (1957) tonen aan dat er een optimale hoeveelheid TMAO in de maanden

juni-juli waar te nemen valt en een minimum in september-oktober. Het verschil volgens de vissoort wordt eveneens vastgesteld door DYER (1952) die bij de Clupeidae gemiddeld 40 mg N % terugvindt, terwijl bij de Gadidae en bij de Elasmobranchii respectievelijk + 90 mg N % en + 200 mg N % worden teruggevonden.

Over de functie en de vorming van het TMAO bestaat nog geen volledige zekerheid. Volgens DYER (1952) bezit het TMAO een osmoregulerende functie. BALDWIN (1960) beweert dat TMAO voor 20 tot 25 % tussenkomt in dit deel van de osmotische druk van het inwendig medium die niet aan zouten te wijten is. Het TMAO zou eveneens instaan voor de eliminatie van de overtollige ammoniak door transmethylering en oxydatie in de lever en in de donkere spieren van sommige dieren. Bij kraakbeenvissen komt het TMAO in het bloed voor. Dit is echter niet het geval bij beenvissen (BENOIT en NORRIS 1945; DYER 1952). Bijgevolg kan dit er op wijzen dat bij de kraakbeenvissen het TMAO een essentiële metabolische functie bezit.

Volgens BENOIT en NORRIS (1945), HASHIMOTO en OKAICHI (1958) en OKAICHI, MANABE en HASHIMOTO (1959) kan het TMAO ook van exogene oorsprong zijn daar het uit het voedsel kan worden opgenomen.

DYER (1952) en BILINSKI (1962) stellen vast dat het TMAO uit choline ontstaat. Laatstgenoemde onderzoeker vindt eveneens dat TMAO door oxydatie van het TMAO wordt gevormd. Dit verschijnsel werd reeds eerder vastgesteld bij mens en zoogdieren (TARR 1941; NORRIS en BENOIT 1945).

BEATTY en GIBBONS (1937) tonen aan dat het tijdens het bederf van vis gevormde TMA uitsluitend van bacteriële oorsprong is, aangezien het in steriel vissap niet wordt gevormd. Later stellen NICKERSON, GOLDBLITH en PROCTOR (1950) en KAWABATE (1953) vast dat bij aseptische inkubatie van donker visvlees kleine hoeveelheden TMAO worden gereduceerd. Tevens bemerken BEATTY en GIBBONS (1937) dat de stijging van het trimethylamine in het visvlees parallel met de graad van afbraak verloopt. BEATTY (1938) stelt daarenboven vast dat 95 % van het gevormde TMA van TMAO afkomstig is.

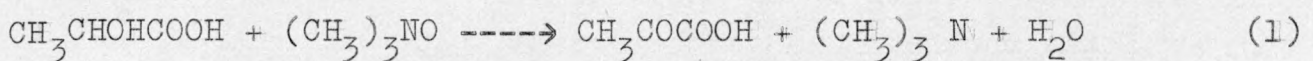
SOUDAN (1965) vermeldt in een literatuurstudie dat door HANES, SHEWAN en DYER 0,05 tot 43 % mikro-organismen op de vis werden gevonden die in staat zijn TMAO te reduceren. Deze bacteriële

omzettingen geschieden volgens TARR (1940) onder invloed van het 'triamineoxydase'. Hij bestudeert de specificiteit van dit enzyme t.o.v. talrijke substraten en konkludeert dat het TMAO, alsook het TMA en tri-n-propylamine worden gereduceerd, doch de $(\text{CH}_3)_3 \text{N} \begin{array}{l} \text{O}^- \\ \diagup \\ \text{C} \equiv \end{array}$ groep van betaïne, choline, acetylcholine en ergothionine worden niet geactiveerd, evenmin trouwens als de $(\text{CH}_3)_2 \text{N} \begin{array}{l} \text{O}^- \\ \diagup \\ | \\ \text{CH} = \end{array}$ van stachydrine.

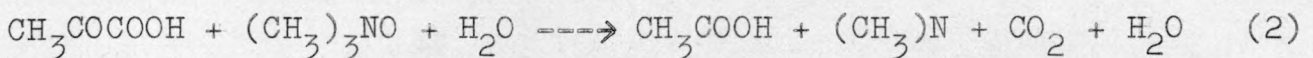
Nochtans zouden volgens DYER en WOOD (1947) en TAKADA en NISHIMOTO (1958) in afwezigheid van TMAO kleine hoeveelheden TMA bacteriëel uit choline worden gevormd. Volgens DYER en WOOD (1947) echter zouden de hiervoor verantwoordelijke bacteriën geen TMA uit betaïne vormen.

De reductie van TMAO tot TMA geschiedt niet door het triamineoxydase alleen; ook een dehydrogenase is noodzakelijk. Melkzuur dat ontstaat door glykogenolyse is de voornaamste waterstofdonor. Naast melkzuur kunnen ook glukose, glykogeën en pyruvaat als waterstofdonor optreden (WATSON 1939b; NEILANDS 1945).

Na een studie van de reductie van TMAO in aanwezigheid van melkzuur met een reinkultuur van een Achromobacter-soort geeft WATSON (1939b) de reactie als volgt weer in aëroob milieu :

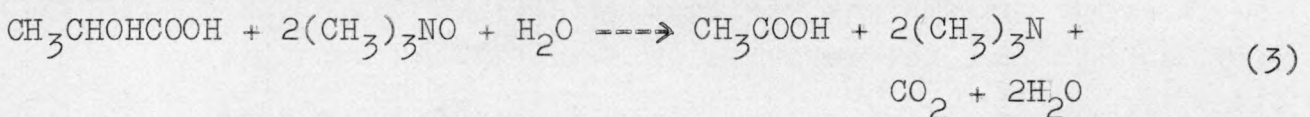


Het gevormde pyrodruivenzuur wordt echter onmiddellijk verder geoxydeerd volgens :



Dit gebeurt sneller dan de oxydatie van het melkzuur. Volgens KREBBS (1937) zou H_2O aan de reactie deelnemen met vorming van een intermediair TMAO-hydraat. De zuurstof van het TMAO wordt echter niet aan de ketogroep van het pyrodruivenzuur gebonden, maar het neemt de waterstof van het hydraat op om één molekule H_2O te vormen.

De totale reactie wordt dan ook :



Het gevormde TMAO bedraagt 95 % van de fraktie die niet door formol wordt gebonden (BEATTY 1938).

De vorming van TMAO geschiedt bij voorkeur in anaërobe omstandigheden (BEATTY en COLLINS 1940b) zelfs in aanwezigheid van zuurstof heeft de vorming van het TMAO een anaëroob karakter (COLLINS 1941). Dit bederf is de eerste fase van het bederfproces van vis. De reductie van het TMAO geschiedt hoofdzakelijk door een fakultatief anaërobe respiratie (WATSON 1939a; SOUDAN 1965).

1.2.2.1.2. DMA.

In 1940 tonen BEATTY en COLLINS (1940b) het DMA aan gedurende het bederf van kabeljauwsap. Na 8 dagen bewaren bij 5° C vinden ze 0,5 à 0,6 mg DMA-N per 100 ml vissap terug, terwijl er 90 mg TMA-N per 100 ml vissap aanwezig zijn. Ze vinden eveneens dat de vorming van DMA gelijklopend is met de vorming van TMA.

1.2.2.2. De door formol gebonden fraktie.

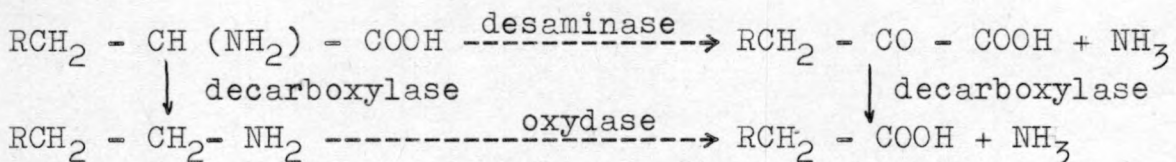
Deze fraktie is samengesteld uit ammoniak en primaire aminen.

Ammoniak kan in vis worden gevormd door desaminering van aminozuren en verwante verbindingen, door oxydatie van aminen, door afbraak en nucleïnebasen en door afbraak van ureum.

Vrije ammoniak treedt in de levende vis ook op ten gevolge van de normale desaminering van het celmetabolisme. Bij pas gevangen vis die uiteraard nog niet aan bacteriëel bederf onderhevig is aangezien het visvlees steriel is, worden er hoeveelheden gevonden die variëren van 6 - 36 mg N % (REAY 1935; SIMIDU en OISI 1951; SOUDAN 1965; DEBEVERE 1967).

1.2.2.2.1. Afbraak van aminozuren en aminen.

De bacteriële afbraak van aminozuren en aminen kan als volgt worden geschetst (SOUDAN 1965) :



Een deel van de aminozuren kan worden gedesineerd met vorming van ketozuren en lagere vetzuren, terwijl een ander deel kan wor-

den gedecarboxyleerd met vorming van aminen. Naarmate het bederf vordert, waardoor het midden meer alkalisch wordt, worden deze aminen onder invloed van een oxydase omgezet tot vetzuur en ammoniak.

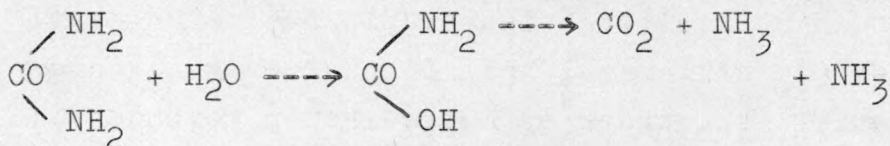
Bij de afbraak van de aminozuren is de oxydatieve desaminering de voornaamste stap. Volgens DYER en MOUNSEY (1945) en HUGHES (1958) treedt decarboxylering in veel mindere mate op en slechts in de latere stadia van het bederf.

BEATTY en COLLINS (1939) stellen vast dat de desaminering plaats grijpt na de vorming van TMA. Dit is de tweede stap in het bederfproces van vis en dit heeft een uitgesproken aëroob karakter.

1.2.2.2.2. Afbraak van ureum.

Bij de kraakbeenvissen maakt het ureum ca 45 % van de proteïnvrije stikstoffractie uit. Bij de beenvissen echter komt weinig ureum voor. Ureum wordt tot ammoniak afgebroken onder invloed van een enzym, de urease. SIMIDU en OISI (1951a)(1951b) tonen aan dat dit enzym praktisch uitsluitend van bacteriële oorsprong is; zij vinden slechts sporen urease in de spierweefsels van de haaiachtigen.

WANG en TARR (1955) bestuderen de hydrolyse van ureum met behulp van een isotopentechniek en beschrijven de reactie als volgt :



De afbraak van ureum gaat gepaard met een parallele stijging van de hoeveelheid ammoniak (SIMIDU en OISI 1951a).

HOOFDSTUK 2 - METODEN EN MATERIAAL

=====

2.1. De bakteriologische methoden

In dit onderzoek worden de bepalingen van het totaal aantal aërobe bacteriën per cm^2 huid en per gram visvlees alsook de telling van het totaal aantal trimethylamineoxydereducerende bacteriën of 'bedervers' als bakteriologische methoden aangewend.

2.1.1. Bepaling van het totaal aantal aërobe bacteriën per cm^2 huid en per gram visvlees.

In 1948 voert ELLIOTT (1948) een vergelijkende studie uit tussen een aantal bodems die tot dan toe werden aangewend voor de bepaling van het totaal aantal aërobe bacteriën in vis. Tevens bestudeert hij de optimale zuurtegraad van het medium en de optimale inkubatietemperaatuur en -tijd. Hij stelt vast dat het medium van NEWTON (1924) en van ZOBELL (1941) de hoogste tellingen geeft. Deze bodem heeft de volgende samenstelling : 3 g beef extract; 5 g peptone; 15 g agar; 1 liter zeewater en $\text{pH} = 7$. Voor de optimale pH vindt ELLIOTT (1948) een pH -waarde tussen 6 en 7. De inkubatietemperaatuur bedraagt 20 tot 25°C , terwijl de beste inkubatietid 4 à 7 dagen duurt.

Sedert de studie van ELLIOTT (1948) echter worden door tal van onderzoekers andere bodems aangewend. De keuze van de bodem is echter gesteund op beperkt onderzoek of is gebaseerd op bodems die worden gebruikt voor het mikrobiologisch onderzoek van andere voedingswaren zoals melk en vlees. Er worden eveneens verschillende waarden voor pH en temperatuur aangewend terwijl geen eenvormigheid bestaat wat betreft de inkubatietid. Over het al dan niet gebruik van zeewater voor de bereiding van het medium bestaan twijfels. Daarenboven zijn er in de literatuur geen gegevens over een verantwoorde plaats van monsterneming terug te vinden.

Om deze redenen wordt vooreerst een onderzoek verricht dat volgende elementen omvat : het uitzoeken van de best geschikte voedingsbodem, het al dan niet gebruiken van zeewater voor het bereiden van de bodem, de bepaling van de optimale zuurtegraad, het vastleggen van de inkubatietemperaatuur en -tijd en de techniek van de verantwoorde monsterneming. Aan de hand van deze elementen worden

analyses uitgevoerd en de resultaten van de ontledingën worden op hun nauwkeurigheid nagegaan.

Als proefplan wordt genomen :

1. Vergelijking van tien voedingsbodems door :

- een telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 3 dagen inkubatie bij een pH = 7,
- een telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 3 dagen inkubatie bij een pH, zoals in de literatuur weergegeven,
- een telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 5 dagen inkubatie bij een pH = 7,
- een telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 5 dagen inkubatie bij een pH, zoals in de literatuur, geciteerd,
- een telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 6 dagen inkubatie bij een pH = 7,
- een telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 6 dagen inkubatie bij een pH, zoals in de literatuur vermeld.

Voor de statistische verwerking van de resultaten wordt beroep gedaan op de methode van de vergelijking van meerdere gemiddelden (BAUER 1960). Hierdoor is het mogelijk op te sporen of er al dan niet een wezenlijk verschil tussen de verschillende tellingen bestaat. Om deze test te kunnen toepassen, moet vooreerst worden aangetoond dat de varianties homogeen zijn. Dit geschiedt bij middel van de test van HARTLEY (1950).

2. Gebruik van zeewater : de meest geschikte uit de reeks van tien uitgeteste bodems wordt bereid met gewoon water en met zeewater van vier verschillende samenstellingen. Deze vijf bodems worden dan onderling vergeleken.

3. Bepaling van de optimale pH : met de meest geschikte bodem wordt de pH-waarde die het grootst aantal tellingen geeft, bepaald.

4. Bepaling van de inkubatietemperatuur en-tijd; de bepaling wordt verricht door platen, die met dezelfde hoeveelheid inokulum zijn geënt, bij verschillende temperaturen te laten inkuberen en om de 24 u te tellen.

5. Monsterneming nl. monsterneming van de huid en monsterneming van het visvlees.

6. Bepaling van de nauwkeurigheid van de bakteriologische methoden ; de nauwkeurigheid wordt nagegaan voor hoge en lage tellingen, bij de bepaling van het totaal aantal aërobe bacteriën per cm^2 huid en per gram visvlees.

De resultaten van deze proefnemingen zullen toelaten de methoden voor de bepalingen van het totaal aantal aërobe bacteriën per cm^2 huid en per gram visvlees vast te leggen.

2.1.1.1. Vergelijking van tien bodems.

2.1.1.1.1. Materiaal en methoden.

Voor deze studie wordt beroep gedaan op tien verschillende samenstellingen. Deze voedingsbodems komen het meest in de literatuur voor.

De bodems hebben volgende samenstelling :

- Bodem 1 : Tryptone glucose extract agar (T.G.E.A.) (Difco Manual 1953)

Beef extract 3 g; tryptone 5 g; dextrose 1 g; agar 15 g; water 1.000 ml; pH 6,5.

Deze bodem wordt opgegeven in de standaardmethode voor het bacteriologisch onderzoek van vis in Canada (Standard methods of bacteriological analysis for use in fish inspection laboratories : department of fisheries of Canada 1964). LERKE, ADAMS en FARBER (1963) gebruiken T.G.E.A. in een studie over het bacteriologisch bederf in kabeljauwfilets terwijl CARROLL, REESE en WARD (1968) dezelfde bodem aanwenden voor de bepaling van het totaal aantal bacteriën in garnalen.

- Bodem 2 : Bakto marine agar (B.M.A.) (ZOBELL 1941; Difco supplementary literature 1966).

Peptone	: 5,0 g	Yeast extract	: 1,0 g
Agar	: 15,0 g	IJzer citraat	: 0,1 g
NaCl	: 19,45 g	MgCl ₂	: 8,8 g
Na ₂ SO ₄	: 3,24 g	CaCl ₂	: 1,8 g
KCl	: 0,55 g	NaHCO ₃	: 0,16 g

HBO ₃	: 0,022 g	Na ₂ SiO ₃	: 0,004 g
NaF	: 0,0024 g	NH ₄ NO ₃	: 0,0016 g
Na ₂ HPO ₄	: 0,008 g	KBr	: 0,08 g
SrCl ₂	: 0,034 g	Water	: 1.000 ml
		pH	: 7,4

- Bodem 3 : (SPENCER 1961a)

Beef extract Lab Lemco 10 g; peptone 10 g; agar 15 g; water 250 ml; zeewater 750 ml; pH 7,6.

- Bodem 4 : (COLWELL 1962)

Nutrient broth 8 g; yeast extract 5 g; agar 15 g; zeewater 1.000 ml; pH 6,1.

- Bodem 5 : (TRETSEVEN 1963)

Beef extract 3 g; peptone 5 g; agar 15 g; NaCl 15 g; water 1.000 ml; pH 7,1.

- Bodem 6 : (GEORGALA 1957; GEORGALA 1958)

Beef extract Lab Lemco 5 g; peptone 10 g; agar 15 g; zeewater 1.000 ml; pH 7,4.

- Bodem 7 : (DYER 1947)

Peptone 2 g; beef extract 2 g; yeast extract 2 g; glucose 1 g; NaCl 5 g; K₂HPO₄ 1 g; agar 15 g; water 1.000 ml; pH 7,2.

- Bodem 8 : (GUNKEL et al. 1961)

Casein hydrolysaat 5 g; K₂HPO₄ 0,05 g; FePO₄ 0,01 g; agar 15 g; water 250 ml; zeewater 750 ml; pH 7,4.

- Bodem 9 : (ELLIOTT 1948)

Beef extract 3 g; peptone 5 g; agar 15 g; zeewater 1.000 ml; pH 7,0.

- Bodem 10: (APPLEMAN et al. 1964)

Beef extract Lab Lemco 10 g; peptone 10 g; NaCl 5 g; agar 15 g; water 1.000 ml; pH 6,1.

In de meeste gevallen wordt natuurlijk gefiltreerd zeewater aangewend na al (ZOBELL 1946; ELLIOTT 1948; OPPENHEIMER 1952; LISTON 1956; GEORGALA 1957; GEORGALA 1958; SPENCER 1959; GUNKEL et al. 1961; COLWELL 1962; LEWIS en CORPE 1964; CAROLL et al. 1968) of niet (MacLEOD et al. 1954; COLWELL en LISTON 1960; SPENCER 1961a, 1961b; PFISTER en BURKHOLER 1965) bewaren in het donker. Deze bewaring heeft als doel de organische bestanddelen

af te breken, ten einde aan het zeewater dat van verschillende plaatsen afkomstig is dezelfde samenstelling te geven (ZOBELL 1946; ELLIOTT 1948), alsook de bakteriostatische eigenschappen van het zeewater op te heffen (ZOBELL 1946; LISTON 1956; COLWELL 1962).

Sommige auteurs, waaronder TOMLINSON (1957), LEIFSON (1963) en LEWIS (1964), doen zelfs beroep op kunstmatig zeewater om bacteriologische voedingsbodems voor mariene bacteriën te bereiden. Volgens MacLEOD, ONOFREY en NORRIS (1954) mag het artificieel zeewater gebruikt worden in plaats van natuurlijk zeewater.

In deze studie wordt dan ook kunstmatig zeewater aangewend.

Als samenstelling voor dit artificieel zeewater wordt de formule gebruikt, voorgesteld door DIFCO in het samengestelde marine agar medium (B.M.A.) (ZOBELL 1941; Difco supplementary literature 1966).

Een eerste reeks proeven wordt in vijfdubbel met de tien opgegeven bodems aangelegd; eenzelfde zuurtegraad nl. pH = 7 wordt ingesteld. Een tweede reeks proeven wordt eveneens in vijfdubbel uitgevoerd, met dezelfde reeks bodems, doch met een zuurtegraad zoals in de literatuur wordt aangegeven. Wanneer de pH niet in de literatuur is opgegeven, wordt de pH na sterilisatie genoteerd. De bakteriënsuspensie wordt verkregen door schudden van een stuk uitgesneden vishuid van schol van 18 cm² in ^{een}verlenmeyer van 500 ml met 180 ml steriele Ringeroplossing gedurende 30 minuten. Het uitsnijden geschiedt met behulp van een steriel aluminium raampje met gekende afmetingen en van een steriele skalpel. Voor de telling wordt beroep gedaan op de klassieke plaatmethode. De inkubatietemperatuur bedraagt 22°C en de tellingen geschieden na 3, 5 en 6 dagen.

2.1.1.1.2. Resultaten en berekeningen.

- a. Telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 3 dagen inkubatie bij een pH = 7.

Tabel 1 vermeldt de resultaten van de tellingen per ml inokulum die op de tien verschillende media worden uitgevoerd.

TABEL 1 - Resultaten van de tellingen na 3 dagen inkubatie bij een pH = 7.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	108	98	8	45	106	44	108	145	94	122
	102	108	10	31	100	42	102	151	109	112
	117	91	10	44	102	47	108	143	90	118
	115	103	10	68	101	41	98	132	112	114
	110	106	17	45	104	43	113	140	96	111
Σ	552	506	55	233	513	217	529	711	501	577
\bar{X}	110,4	101,2	11,0	46,6	102,6	43,4	105,8	142,2	100,2	115,4
R	15	17	9	37	6	6	15	19	22	11

De test op de homogeniteit van de varianties (V) (Hartley test) wijst op een homogeniteit van de varianties, vermits V_{max}/V_{min} (= 34,50) kleiner is dan de theoretische waarde 106,00 (voor $V = 4$ en $k = 10$ en 99 % betrouwbaarheid).

Uit de vergelijking van de gemiddelden volgt dat $q = 43,99$. Deze gevonden waarde voor q is groter dan de theoretische waarde q (= 5,70), voor $k = 10$ en $f = 36,50$ en voor 99 % betrouwbaarheid.

De test toont eveneens aan dat al de gemiddelden die meer dan 11,5 verschillen, significant verschillend zijn van elkaar (a).

 (a) De gemiddelde range $\bar{R} = \frac{\Sigma R}{k}$ $\bar{R} = \frac{157}{10} = 15,70$

Voor 10 groepen ($k = 10$) van 5 waarnemingen ($n = 5$) is $f = 36,50$ en $C_1 = 2,34$

De standaardafwijking $s = \frac{\bar{R}}{C_1} = \frac{15,70}{2,34} = 6,71$

De berekende zekerheidscoëfficiënt wordt :

$q = \frac{\bar{X}_{max} - \bar{X}_{min}}{s/\sqrt{n}} = \frac{131,20}{6,71\sqrt{5}} = 43,99$

De theoretische waarde van q (bij 99 % betrouwbaarheid en voor $k = 10$ en $f = 36,50$) = 5,70. De gevonden q (= 43,99) is groter dan de opgegeven q 0,01 (= 5,70).

De vraag kan worden gesteld hoe de bodems de een van de ander verschillen :

voor $k = 2$ en $f = 36,50$ is q 0,01 = 3,85

$W = \frac{q_{0,01} \times s}{n} = 11,5$

Al de gemiddelden die meer dan 11,5 verschillen, zijn bijgevolg ook wezenlijk verschillend van elkaar.

Dit betekent dat :

- de resultaten bekomen met de bodems 1, 2, 5, 7 en 9 niet wezenlijk verschillend zijn van elkaar,
- de resultaten bekomen met de bodems 3, 4 en 6 wezenlijk verschillend zijn van deze bekomen met de bodems 1, 2, 5, 7, 8, 9 en 10,
- de resultaten bekomen met de bodem 8 wezenlijk verschillend zijn van deze uitgevoerd op de bodems 1, 2, 5, 7 en 9,
- de resultaten bekomen met de bodem 10 wezenlijk verschillend zijn van deze bekomen met bodems 2, 5 en 9, doch niet van de bodems 1 en 7.

b. Telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 3 dagen inkubatie bij een pH-waarde zoals in de literatuur opgegeven.

De resultaten van de tellingen zijn in tabel 2 samengevat.

TABEL 2. - Resultaten van de tellingen per ml inokulum na 3 dagen inkubatie bij een pH zoals in de literatuur vermeld.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	123	119	12	45	116	52	47	102	124	60
	115	122	14	31	115	48	57	91	105	44
	132	128	18	44	112	45	46	88	106	71
	131	125	13	68	111	45	62	83	115	75
	125	109	16	45	112	52	66	96	118	58
Σ	626	603	73	233	566	242	278	460	568	308
\bar{X}	125,2	120,6	14,6	46,6	113,2	48,4	55,6	92,0	113,6	61,6
R	17	19	6	37	5	7	19	19	19	31

De test op de homogeniteit van de varianties wijst er duidelijk op dat de varianties homogeen zijn, aangezien $V_{max}/V_{min} = 37,90 < 106$ (voor $\nu = 4$ en $k = 10$ en voor 99 % betrouwbaarheid).

Daar de berekende waarde voor q ($= 32,52$) groter is dan de theoretische waarde q ($= 5,70$) voor $f = 36,50$ en $k = 10$ en voor 99 % betrouwbaarheid, bestaat een wezenlijk verschil tussen de gemiddelden. Al de gemiddelden die meer dan 13,1 verschillen, zijn wezenlijk verschillend van elkaar.

Hieruit kan worden besloten, dat de resultaten bekomen met de bodems 1, 2, 5 en 9 niet significant verschillend zijn van elkaar en dat de resultaten bekomen met de bodems 3,4, 6, 7, 8 en 10 wezenlijk verschillend zijn van deze bekomen op de bodems 1, 2,5 en 9.

c. Telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 5 dagen inkubatie bij een pH = 7.

De resultaten van de tellingen per ml inokulum zijn in tabel 3 weergegeven.

TABEL 3. Resultaten van de tellingen na 5 dagen inkubatie bij een pH = 7.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	185	180	30	80	183	74	139	177	171	189
	182	205	35	72	176	86	133	169	182	177
	195	182	37	67	186	85	127	194	194	173
	207	181	38	84	180	92	123	190	169	183
	193	182	29	76	179	95	126	182	190	180
Σ	962	930	169	379	904	432	648	912	906	902
\bar{X}	192,4	186,0	33,8	75,8	180,8	86,4	129,6	182,4	181,2	180,4
R	25	25	9	17	10	21	16	25	25	16

Aangezien $V_{max}/V_{min} = 7,51$ kleiner is dan de theoretische waarde 106,00 (voor $V = 4$ en $k = 10$ voor 99% betrouwbaarheid) zijn de varianties homogeen.

Bij de vergelijking van de gemiddelden is $q (= 44,16)$ groter dan de theoretische $q (= 5,70)$ voor $k = 10$ en $f = 36,50$ voor 99% betrouwbaarheid, zodat een wezenlijk verschil tussen de gemiddelden bestaat. Verder blijkt, dat al de gemiddelden die meer dan 13,8 verschillen, significant verschillend zijn van elkaar.

De volgende besluiten kunnen hieruit worden getrokken :

- de resultaten bekomen met de bodems 1, 2, 5, 8, 9 en 10 zijn niet wezenlijk verschillend van elkaar,
- de resultaten bekomen met de bodems 3,4, 6 en 7 zijn wezenlijk verschillend van deze op de bodems 1, 2, 5, 8, 9 en 10.

d. Telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 5 dagen inkubatie bij een pH zoals in de literatuur aangegeven.

De resultaten van de tellingen zijn in tabel 4 opgenomen.

TABEL 4 - Resultaten van de tellingen per ml inokulum na 5 dagen inkubatie bij een pH zoals in de literatuur aangegeven.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	181	164	23	80	172	113	112	131	170	190
	197	182	25	72	169	99	86	149	174	154
	177	149	23	67	191	88	93	144	197	170
	200	183	31	84	174	97	100	135	181	167
	188	169	26	76	173	120	104	143	178	186
Σ	943	845	128	379	879	517	495	702	900	867
\bar{X}	188,6	169,0	25,6	75,8	175,8	103,4	99,0	140,4	180,0	173,4
R	23	34	8	17	22	32	26	18	27	36

De test op de homogeniteit van de varianties wijst uit dat $V_{max}/V_{min} = 19,98$. Deze waarde is kleiner dan 106,00 (voor $\nu = 4$ en $k = 10$ en 99 % betrouwbaarheid). Bijgevolg zijn de varianties homogeen.

Aangezien bij het vergelijken van de gemiddelden een q-waarde van 35,33 wordt bekomen en vermits deze waarde groter is dan de theoretische q-waarde (= 5,70 voor $f = 36,50$ en $k = 10$ voor 99 % betrouwbaarheid) kan worden aangenomen, dat een wezenlijk verschil tussen de gemiddelden optreedt. Al de gemiddelden die meer dan 17,8 verschillen, zijn significant verschillend van elkaar.

Samengevat kan bijgevolg worden afgeleid dat de resultaten bekomen met de bodems 1, 5, 9 en 10 niet wezenlijk van elkaar verschillen en dat de tellingen op de bodems 2, 3, 4, 6, 7 en 8 significant verschillen van deze op de bodems 1, 5, 9 en 10.

e. Telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 6 dagen inkubatie bij pH = 7.

De tellingen geven dezelfde resultaten als na 5 dagen.

f. Telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 6 dagen inkubatie bij een pH zoals in de literatuur aangegeven.

Uit de tellingen worden dezelfde resultaten als na 5 dagen bekomen.

2.1.1.1.3. Bespreking van de resultaten.

Na 5 dagen inkubatie bij een pH = 7 blijken de tellingen op de bodems 1, 2, 5, 8, 9 en 10 wezenlijk verschillend te zijn van elkaar en bij een pH, zoals in de literatuur aangegeven, vertonen de resultaten bekomen met de bodems 1, 5, 9 en 10 eveneens geen significant verschil.

Bij het uittesten van de bodems met een pH zoals in de literatuur opgegeven staat, kan worden vastgesteld dat de resultaten bekomen met de bodems 2 en 8, die een pH = 7,4 hebben, significant verschillen van deze bekomen op de bodems 1, 5, 9 en 10, waarvan de pH tussen 6,7 en 7,1 ligt. Dit kan te wijten zijn aan de hoge waarde van de pH.

ELLIOTT (1948) stelt immers vast dat bij pH-waarden die hoger liggen dan 7 het aantal getelde aërobe bacteriën sterk afneemt. Aangezien voor bederf YAMAMOTO en SONEHARE (1953) 6,85 aangeven, terwijl FREIBER (1959), LUDORFF (1960) en WITTFOGEL (1961) 6,8 à 7,0 vooropstellen, is het dan ook aan te nemen dat de pH-waarde van het voedingsmilieu in hetzelfde gebied komt te liggen van de pH-waarden die in de vis voorkomen.

Er kan eveneens worden uitgemaakt of tussen de resultaten bekomen op de bodems 1, 2, 5, 8, 9 en 10 bij de verschillende gebruikte pH-waarden een significant verschil bestaat.

Aan de hand van tabel 5, waarin de resultaten van de tellingen zijn weergegeven, kan dit worden nagegaan.

TABEL 5 - Resultaten van de tellingen per ml inokulum van bodems 1, 2, 5, 8 en 10 na 5 dagen inkubatie bij pH-waarden tussen 6,1 en 7,1 (a).

	1(7)	2(7)	8(7)	10(7)	1(6,5)	10(6,1)	5(7)	9(7)	5(7,1)	9(7)
	185	175	177	189	181	190	183	171	172	170
	182	201	169	177	197	154	176	182	169	174
	195	177	194	173	177	170	186	194	191	197
	207	176	190	183	200	167	180	169	174	181
	193	176	182	180	188	186	179	190	173	178
Σ	962	885	912	902	943	867	904	906	879	900
\bar{X}	192,4	181	182,4	180,4	188,6	173,4	180,8	181,2	175,8	180,0
R	25	24	25	16	23	36	10	25	22	27

(a) Het getal tussen haakjes geeft de pH-waarde aan.

De test op de homogeniteit van de varianties valt positief uit, aangezien V_{max}/V_{min} (= 5,86) kleiner is dan 106,00 (voor $\sqrt{v} = 4$ en $k = 10$ en 99 % betrouwbaarheid).

Tevens bestaat geen wezenlijk verschil tussen de gemiddelden, vermits de gevonden waarde q (= 4,28) kleiner is dan 5,70 (theoretische q -waarde voor $f = 36,50$ en $k = 10$ en voor 99 % betrouwbaarheid).

2.1.1.1.4. Besluiten.

Uit de bekomen resultaten kan worden afgeleid dat :

- a) de inkubatie 5 dagen moet belopen,
- b) tussen de resultaten bekomen op de bodems 1, 2, 5, 8, 9 en 10 geen significant verschil bestaat wanneer de pH tussen 6,1 en 7,1 ligt. Dit betekent eveneens dat de optimum pH-waarde tussen 6,1 en 7,1 ligt, hetgeen de resultaten, door ELLIOTT(1948) bekomen, bevestigt,
- c) de resultaten van de tellingen op de andere bodems uitgevoerd wezenlijk verschillen van deze zes bodems, in het geval waar gelijke pH-waarden worden gebruikt, door het feit dat hun samenstelling verschillend is of dat de pH-waarden te hoog liggen in het geval waar pH-waarden uit de literatuur worden overgenomen. In dit laatste geval kan de samenstelling ook een reden tot verschil geven.

d) bodem 1 (T.G.E.A.) in deze studie voor bakteriologisch onderzoek van vis kan worden aangewend, aangezien op dit milieu het hoogst aantal bakteriënkoloniën ontwikkelen hoewel het resultaat van de tellingen op deze bodem niet significant verschilt met deze uitgevoerd op de bodems 2, 5, 8, 9 en 10. Daarenboven is deze voedingsbodem zeer gemakkelijk te bereiden, vermits dit milieu onder samengestelde vorm in de handel verkrijgbaar is.

2.1.1.2. Gebruik van zeewater.

Daar tal van onderzoekers zeewater gebruiken voor het bereiden van de voedingsmilieu's en andere daarentegen gewoon water aanwenden wordt een proef aangelegd om na te gaan of het gebruik van zeewater noodzakelijk is om het totaal aantal bacteriën in vis te bepalen.

2.1.1.2.1. Materiaal en methoden

Er wordt beroep gedaan op vier soorten kunstmatig zeewater nl. :

- Zeewater volgens de formule van DIFCO (1966)

NaCl	:	19,45 g	MgCl ₂	:	8,8 g
Na ₂ SO ₄	:	3,24 g	CaCl ₂	:	1,8 g
KCl	:	0,55 g	NaHCO ₃	:	0,16 g
H ₃ BO ₃	:	0,022 g	Na ₂ SO ₃	:	0,004 g
NaF	:	0,0024 g	NH ₄ NO ₃	:	0,0016 g
Na ₂ HSO ₄	:	0,008 g	KBr	:	0,08 g
SrCl ₂	:	0,034 g	H ₂ O	:	1.000 ml

- Zeewater volgens de formule van ZOBELL (1946)

NaCl	:	24,32 g	MgCl ₂ .6H ₂ O	:	10,99 g
Na ₂ SO ₄	:	4,06 g	CaCl ₂ .6H ₂ O	:	2,25 g
KCl	:	0,69 g	NaHCO ₃	:	0,20 g
KBr	:	0,10 g	SrCl ₂ .6H ₂ O	:	0,042 g
H ₃ BO ₃	:	0,027 g	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	:	0,005 g
NaF	:	0,003 g	NH ₄ NO ₃	:	0,002 g
FePO ₄ .4H ₂ O	:	0,001 g	H ₂ O	:	1.000 ml

- Zeewater volgens de formule van LYMAN en FLEMING (1940)

NaCl	:	23,48 g	Na ₂ SO ₄	:	3,92 g
NaHCO ₃	:	0,19 g	KCl	:	0,67 g
KBr	:	0,10 g	MgCl ₂	:	4,98 g
CaCl ₂	:	1,10 g	SrCl ₂	:	0,02 g
H ₃ BO ₃	:	0,03 g			

- Zeewatertabletten Britisch Drug House (BDH) (Persoonlijke
communicatie 1968)

NaCl	:	4,734 g	CaSO ₄	:	0,284 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	:	0,568 g	MgCl ₂ .6H ₂ O	:	0,379 g

De proeven worden aangelegd met tryptone glucose extract agar, die met gedestilleerd water en met de vier soorten artificieel zeewater wordt bereid.

De pH-waarden van de bodems, na sterilisatie bij 120°C gedurende 15 min zijn als volgt :

- T.G.E.A. met gedestilleerd water : 6,5
- T.G.E.A. met zeewater volgens DIFCO : 6,5
- T.G.E.A. met zeewater volgens ZOBELL : 6,7
- T.G.E.A. met zeewater volgens LYMAN en FLEMING : 6,7
- T.G.E.A. met zeewater volgens B.D.H. : 6,2

De werkwijze en de statistische verwerking gebeuren op indentische wijze als bij de vergelijking van de tien bodems.

2.1.1.2.2. Resultaten en berekeningen.

- a. Telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 3 dagen incubatie bij pH = 7.

Tabel 6 geeft de resultaten van die tellingen weer.

TABEL 6 - Resultaten van de tellingen per ml inokulum na 3 dagen inkubatie bij pH = 7.

	H ₂ O	Difco	ZoBell	Lyman en Fleming	BDH
	73	70	70	68	67
	81	73	74	67	65
	80	73	72	73	66
	83	68	67	75	80
	65	72	75	71	73
Σ	382	356	358	354	351
\bar{X}	76,4	71,2	71,6	70,8	70,2
R	18	5	8	7	15

De test op de homogeniteit van de varianties is positief. V_{max}/V_{min} (= 11,65) is immers kleiner dan 59,00 (theoretische waarde voor $\nu = 4$ en $k = 5$ en voor 99 % betrouwbaarheid).

De gemiddelden zijn niet wezenlijk verschillend van elkaar, aangezien de gevonden q-waarden (= 3,10) kleiner is dan 5,36 (theoretische q-waarde voor $f = 18,40$ en $k = 5$ en voor 99 % betrouwbaarheid).

b. Telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 3 dagen inkubatie bij pH-waarden die na sterilisatie worden bekomen.

In tabel 7 zijn deze resultaten samengevat.

TABEL 7 - Resultaten van de tellingen na 3 dagen inkubatie bij pH-waarden die na sterilisatie worden bekomen.

	H ₂ O	Difco	ZoBell	Lyman en Fleming	BDH
	67	71	72	68	64
	77	72	71	70	73
	66	65	66	66	78
	78	77	76	79	71
	77	70	73	68	71
Σ	365	355	358	351	357
\bar{X}	73,0	71,0	71,6	70,2	71,4
R	12	12	10	13	14

De test op de homogeniteit van de varianties wijst op een homogeniteit, vermits V_{max}/V_{min} ($= 2,67$) kleiner is dan de theoretische waarde: 59,00 (voor $\nu = 4$ en $k = 5$ en voor 99% betrouwbaarheid).

Uit de vergelijking van de gemiddelden volgt, dat $q = 1,22$. Deze gevonden waarde voor q is kleiner dan de theoretische waarde q ($= 5,36$) voor $k = 5$ en $f = 18,40$ en 99% betrouwbaarheid, waaruit volgt dat de tellingen bekomen op de bodems niet significant verschillend zijn van elkaar.

c. Telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 5 dagen inkubatie bij pH = 7.

Tabel 8 bevat de resultaten van die tellingen.

TABEL 8 - Resultaten van de tellingen per ml inoculum na 5 dagen inkubatie bij pH = 7.

	H ₂ O	Difco	ZoBell	Lyman en Fleming	BDH
	91	87	90	83	85
	103	94	84	81	84
	100	94	95	90	85
	103	82	99	92	102
	83	92	87	90	91
Σ	480	449	455	436	447
\bar{X}	96,0	89,8	91,0	87,2	89,4
R	20	12	15	11	18

De test op de homogeniteit van de varianties wijst er duidelijk op dat de varianties homogeen zijn, aangezien $V_{max}/V_{min} = 3,25 < 59,00$ (voor $\nu = 4$ en $k = 5$ en voor 99 % betrouwbaarheid).

Daar de berekende waarde voor q ($= 3,07$) kleiner is dan de theoretische waarde q ($= 5,36$) voor $f = 18,40$ en $k = 5$ en voor 99 % betrouwbaarheid, bestaat geen wezenlijk verschil tussen de resultaten van de tellingen uitgevoerd op de verschillende bodems.

d. Telling van het totaal aantal aërobe bacteriën na 5 dagen inkubatie bij pH-waarden die na sterilisatie worden bekomen.

In tabel 9 zijn de resultaten samengevat van de tellingen na 5 dagen inkubatie bij pH-waarden die na sterilisatie worden bekomen.

TABEL 9 - Resultaten van de tellingen per ml inoculum na 5 dagen inkubatie bij pH-waarden die na sterilisatie worden bekomen.

	H ₂ O	Difco	ZoBell	Lyman en Fleming	BDH
	85	87	95	85	82
	95	93	89	90	94
	83	80	84	82	96
	96	96	90	100	87
	99	84	86	88	90
Σ	458	440	444	445	449
\bar{X}	91,6	88,0	88,8	89	89,8
R	16	16	11	18	14

De test op de homogeniteit van de varianties is positief, daar V_{max}/V_{min} (= 2,87) kleiner is dan 59,00 (theoretische waarde voor $\sqrt{v} = 4$ en $k = 5$ en voor 99 % betrouwbaarheid).

Tevens zijn de gemiddelden niet significant van elkaar verschillend, aangezien de gevonden q-waarde (= 1,27) kleiner is dan 5,36 (theoretische q-waarde voor $f = 18,40$ en $k = 5$ en voor 99 % betrouwbaarheid).

2.1.1.2.3. Bespreking van de resultaten.

Uit het onderzoek blijkt dat de resultaten bekomen op deze bodems na 3 en 5 dagen inkubatie onderling niet wezenlijk verschillen, m.a.w. het gebruik van kunstmatig zeewater is niet nodig voor het bereiden van T.G.E.A. Er blijkt eveneens geen wezenlijk verschil te bestaan tussen de resultaten bekomen op de bodems die met zeewater van verschillende samenstelling zijn bereid.

2.1.1.3. Bepaling van de optimale pH.

In de literatuur worden zeer uiteenlopende pH-waarden opgegeven. COLWELL (1962) en APPLEMAN, BAIN en SHEWAN (1964) gebruiken een bodem met $pH = 6,1$. LUDORFF (1960), MATHEN, LEKSHMY, IYER en PIL-LAI (1964) en NICKERSON en GOLDBLITH (1964) geven $pH = 7$ op,

terwijl TRETSEVEN (1963) 7,1 en DYER (1947) 7,2 aanwenden. GEORGALA (1957)(1958), KISER en BECKWITH (1944) en GUNKEL, GALEN en ZOBELL (1961) stellen de pH van het voedingsmilieu voor marine bacteriën op 7,4. De hoogste waarde gebruikt SPENCER (1959) (1961a). Deze onderzoeker stelt de pH op 7,6.

Bij de proeven aangaande het testen van zeewater liggen de pH-waarden tussen 6,2 en 7,0. Wanneer de resultaten bekomen op de tien bereide bodems onderling niet wezenlijk verschillen, wijst dit er op dat het optimum tussen deze twee waarden ligt.

Tabel 10 vermeldt de resultaten van de tellingen die op de tien verschillende bodems worden uitgevoerd.

TABEL 10 - Resultaten van de tellingen per ml inokulum na 5 dagen inkubatie bij pH 6,2 tot 7,0.

	H ₂ O		Difco		ZoBell		Lyman en Fleming		BDH	
	pH=6,5	pH=7,0	pH=6,5	pH=7,0	pH=6,2	pH=7,0	pH=6,7	pH=7,0	pH=6,2	pH=7,0
	85	91	87	87	95	90	85	83	82	85
	95	103	93	94	89	84	90	81	94	84
	83	100	80	94	84	95	82	90	96	85
	96	103	96	82	90	99	100	92	87	102
	99	83	84	92	86	87	88	90	90	91
\bar{X}	458	480	440	449	444	455	445	436	449	447
R	91,6	96,0	88,0	89,8	88,8	91,0	89,0	87,2	89,8	89,4
	16	20	16	12	11	15	18	11	14	18

De test op de homogeniteit van de varianties valt positief uit, aangezien V_{max}/V_{min} (= 4,35) kleiner is dan 106,00 (voor $\nu = 4$ en $k = 5$ en 99 % betrouwbaarheid).

Bij de vergelijking van de gemiddelden is evenmin een wezenlijk verschil tussen de gemiddelden waar te nemen, daar de gevonden waarde voor q (= 3,07) kleiner is dan 5,70 (theoretische q -waarde voor $f = 36,50$ en $k = 10$ en voor 99 % betrouwbaarheid), m.a.w. de pH moet een waarde hebben tussen 6,2 en 7,0. Deze resultaten zijn in overeenkomst met de gegevens van ELLIOTT (1948).

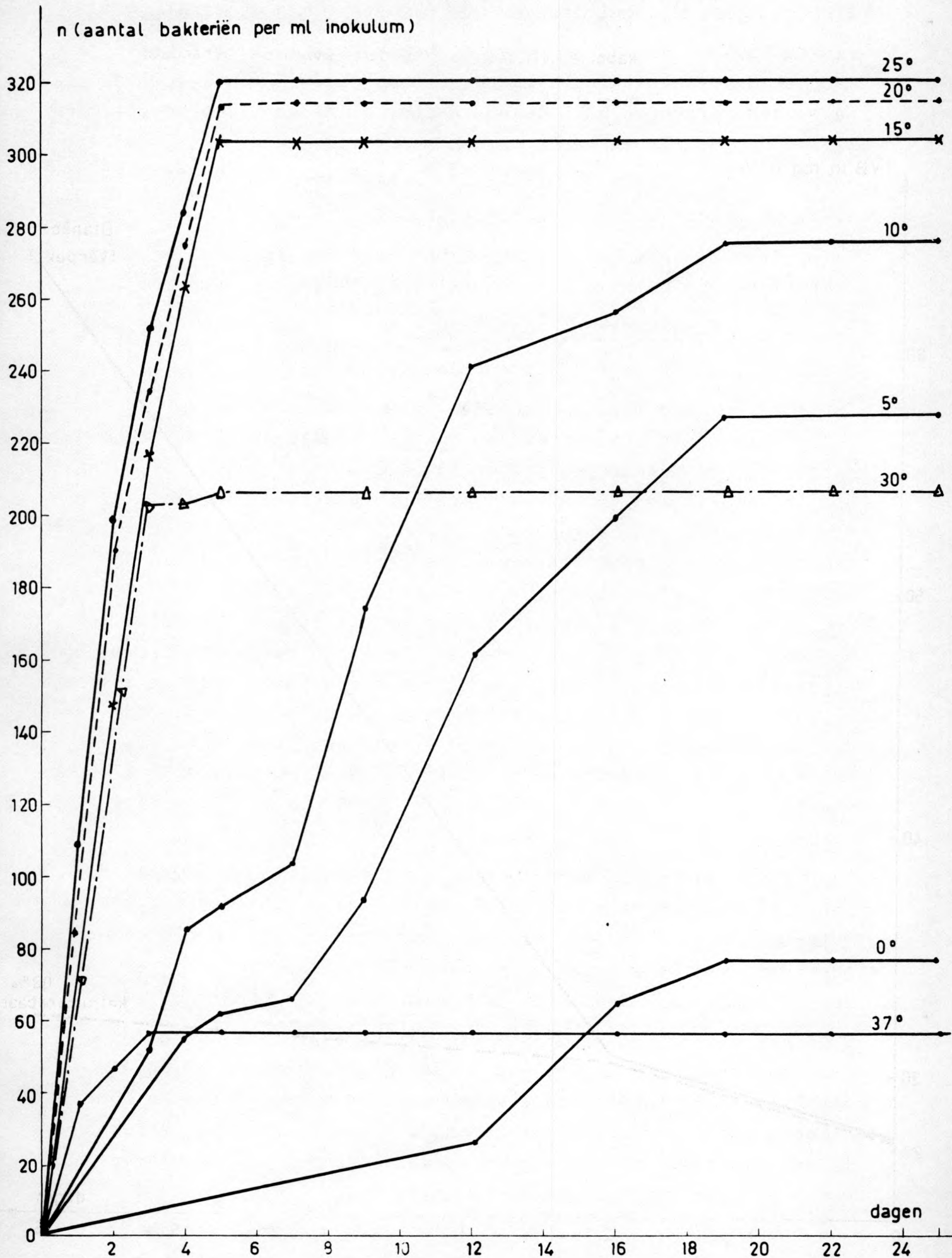
Dit heeft als voordeel dat bij gebruik van T.G.E.A., bereid met gewoon water, geen speciale pH-stelling moet geschieden, aangezien de pH na sterilisatie een waarde van 6,5 heeft.

2.1.1.4. Bepaling van de inkubatietemperatuur en -tijd.

De inkubatietemperatuur en -tijd zijn bij de verschillende onderzoekers eveneens zeer uiteenlopend. CAROLL, REESE en WARD (1968) tellen het totaal aantal aërobe bacteriën in garnaal na 2 dagen inkubatie bij 25°C. LOBBEN en LEE (1968) tellen echter na 2 dagen inkubatie bij 27° C terwijl APPLEMAN, BAIN en SHEWAN (1964) de bacteriën 3 dagen bij 37° C houden. DYER (1947) bepaalt het totaal aantal kiemen in kabeljauw na 3 dagen inkubatie bij 20° C. WATANABA (1964) stelt eveneens een inkubatietid van 3 dagen voor doch bij een temperatuur van 25°C. Deze temperatuur en tijd worden daarenboven voorgeschreven door het departement van de visserij in Canada (Standard methods of bacteriological analysis for use in fish inspection laboratories : department of fisheries of Canada 1964). HESS (1932) bepaalt de inkubatietid op 3 dagen bij een temperatuur van 35° C en LUDORFF (1960) op 3 dagen bij 30° C. Een inkubatieperiode van 4 dagen bij 24° C wordt door LUYPEN (1958) gebruikt. De meest voorkomende combinatie, nl. 20° C gedurende 5 dagen, wordt aangewend door LISTON (1956) GEORGALA (1957)(1958), SPENCER (1959)(1961a) COLWELL (1962) TRETSVEN (1963) en NICKERSON en GOLDBLITH (1964). GUNKEL, GALEN en ZOBELL (1961) voeren tellingen uit na 7 dagen inkubatie bij 18° C, terwijl PROCTOR en NICKERSON (1935) tellen na 7 dagen inkubatie bij 20° C.

Petri-platen van 9 cm diameter worden geënt met 1 ml inokulum van een bakteriënsuspensie die op dezelfde wijze wordt verkregen als in punt 2.1.1.1. De platen worden gegoten met T.G.E.A. en geïnkubeerd bij 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 en 37°C. Deze proef wordt in het vijf-dubbel uitgevoerd. De tellingen geschieden na 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 16, 19 en 25 dagen inkubatie. De resultaten zijn grafisch in figuur 1 weergegeven.

Figuur 1 - Resultaten van de temperatuurproeven



Uit de resultaten kan worden afgeleid, dat het hoogst aantal tellingen bij 20° en bij 25° C wordt bekomen. Dit gegeven komt overeen met de temperaturen aangegeven door ELLIOTT (1948). Deze maxima worden verkregen na 5 dagen inkubatie, hetgeen een bevestiging is van de resultaten van voorgaande proeven, handelend over het uittesten van bodems en het al of niet gebruiken van zeewater.

2.1.1.5. Studie van de monsterneming.

De studie van de monsterneming omvat twee aspecten, nl. de monsterneming van de huid en de monsterneming van het visvlees.

2.1.1.5.1. Monsterneming van de huid.

2.1.1.5.1.1. Metode van monsterneming.

In de literatuur worden 3 methoden voor de monsterneming van de vis-huid vermeld nl. het uitsnijden van een stukje huid, de "swab" methode en het afschrepen van de huid. GEORGALA (1957) (1958) snijdt op steriele wijze 7,5 cm² huid weg dat vervolgens in een steriele Ringeroplossing wordt geschud. LISTON (1956) en SPENCER (1961a) snijden eveneens een stukje huid met gekend oppervlak uit om het totaal aantal bacteriën per cm² te bepalen. LUDORFF (1960) gebruikt een steriel stukje filterpapier met gekend oppervlak dat op de vis wordt gelegd. Met een steriele skalpel wordt langs het papiertje gesneden om zodoende een stukje huid te bekomen met eenzelfde oppervlak als het papiertje. De huid en het papiertje worden vervolgens samen in een steriele verdunningsvloeistof geschud. COLWELL (1962) daarentegen gebruikt de "swab" methode op een oppervlakte van 10 cm², terwijl DYER (1947) het slijm van de huid afschreept.

Door TRETSEVEN (1963) wordt een vergelijkende studie gemaakt tussen drie methoden voor monsterneming van de vishuid. Uit deze resultaten kan worden afgeleid dat het uitsnijden van een bekend oppervlak van de vishuid betere resultaten geeft dan de resultaten bekomen door afschrepen van de huid en door de "swab" methode.

Voor het uitsnijden wordt met een zelfvervaardigde schabloon (raampje in aluminium met een binnenoppervlakte van 18 cm²) aseptisch een stukje huid weggenomen. Het stukje wordt in 180 ml Ringeroplossing gebracht en geschud. Hierdoor gaan de bacteriën in de oplossing over en vormen een suspensie ; van deze suspensie wordt dan een verdunningsreeks aangelegd.

2.1.1.5.1.2. Plaats van de monsterneming.

Tot nog toe wordt een belangrijk punt uit het oog verloren, nl. de plaats van de monsterneming op het vislichaam, met als doel een zo getrouw mogelijk beeld te verkrijgen van de besmettingsgraad van de vis.

De meeste onderzoekers vermelden de plaats van de monsterneming niet. COLWELL (1962) doet de monsterneming onder de eerste rugvin aan de zijlijn terwijl SPENCER (1961a) dit uitvoert boven de zijlijn vooraan de vis.

2.1.1.5.1.2.1. Vergelijking tussen de monsterneming vooraan, in het midden of achteraan de vis.

Uit een zelfde partij schol worden tien stuks willekeurig uitgekozen. Met het schabloon wordt vooraan, in het midden en achteraan de schol een stukje vishuid van 6 cm² aseptisch uitgesneden. Ieder stukje wordt in 60 ml Ringeroplossing gebracht en gedurende 30 minuten geschud. Van de bekomen suspensie wordt dan een verdunningsreeks aangelegd.

Als voedingsbodem wordt de T.G.E.A. aangewend, bereid met gewoon water en met pH = 6,5. De telling geschiedt volgens de klassieke gietplaatmethode na 5 x 24 uren inkuberen bij kamertemperatuur.

In tabel 11 worden de resultaten van de bakteriënbepalingen vooraan, in het midden of achteraan de vis weergegeven.

TABEL 11 - Resultaten van de bepalingen vooraan, in het midden of achteraan de vis (a)

Monsternummer	Vooraan	Midden	Achteraan
1	6,78	6,04	6,14
2	5,98	5,48	5,36
3	6,04	6,18	6,02
4	5,24	6,43	5,72
5	5,02	5,92	6,87
6	5,34	6,08	5,78
7	6,34	5,68	6,99
8	6,66	5,52	5,46
9	6,43	4,97	5,36
10	5,61	5,18	5,22
Σ	59,44	57,48	58,92
\bar{X}	5,94	5,75	5,89
R	1,76	1,25	1,77

(a) De waarden zijn logaritmen van het aantal bakteriëen per cm² huid.

De test op de homogeniteit van de varianties valt positief uit, daar $V_{max}/V_{min} (= 7,81) < 8,5$ (voor $\nu = 9$ en $k = 3$ en voor 99 % betrouwbaarheid).

Na vergelijking van de gemiddelde waarden van de tellingen voor- aan, in het midden en achteraan de vis kan worden besloten, dat geen significant verschil bestaat, aangezien de gevonden waarde $q (= 1,17) < 4,62$ (theoretische q -waarde voor $f = 22,60$ en $k = 3$ en voor 99 % betrouwbaarheid).

2.1.1.5.1.2.2. Bemonstering van donkere of bleke kant bij schol
onder of boven de zijlijn. --- --- --- --- ---

Een tweede aspect van de plaatsbepaling is de vraag of de monsterneming moet geschieden aan de donkere of bleke kant van de schol en onder of boven de zijlijn. Hiervoor wordt met de aluminium schabloon een strook van 18 cm^2 huid, die van de kop tot de staart loopt, verwijderd en gedurende 20 minuten in Ringeroplossing geschud.

De werkwijze is verder dezelfde als in de studie van de tellingen vooraan, in het midden en achteraan de vis. In tabel 12 zijn de resultaten samengevat van de analyses van de bemonstering van de donkere of bleke kant bij schol, onder of boven de zijlijn.

TABEL 12 - Resultaten van de bemonstering van de donkere of bleke kant bij schol, onder of boven de zijlijn (a).

Monsternummer	BD	OD	BB	OB
1	4,57	5,04	4,78	5,02
2	4,78	4,92	5,16	4,56
3	6,38	6,02	5,78	6,13
4	5,56	5,78	4,92	5,14
5	5,74	5,21	6,01	5,82
6	4,39	5,78	4,92	5,27
7	5,90	6,24	6,98	5,98
8	6,14	5,36	5,68	5,99
9	5,72	6,12	5,49	5,82
10	5,49	4,36	5,26	5,71
Σ	54,67	54,83	54,98	55,44
\bar{X}	5,47	5,48	5,50	5,54
R	1,99	1,88	2,20	1,57

BD = boven donker (boven zijlijn), OD = onder donker (onder zijlijn), OB = onder bleek (onder zijlijn), BB = boven bleek (boven zijlijn).

(a) De waarden zijn logaritmen van het aantal bacteriën per cm^2 huid.

Aangezien V_{max}/V_{min} (= 1,70) kleiner is dan 9,90 (voor $\sqrt{v} = 9$ en $k = 4$ en voor 99 % betrouwbaarheid) kan worden besloten dat de varianties homogeen zijn.

Na de gemiddelden met elkaar vergeleken te hebben, kan worden vastgesteld, dat geen wezenlijk verschil bestaat tussen de verschillende plaatsen van monsterneming. De gevonden waarde q (= 0,36) is immers kleiner dan de theoretische waarde q (= 4,80) voor $k = 4$ en $f = 30,10$ en voor 99 % betrouwbaarheid.

Aangezien geen wezenlijk verschil optreedt tussen de tellingen op de donkere of bleke kant, onder of boven de zijlijn en ook niet vooraan, in het midden of achteraan de vis mag op om het even welke plaats van de vis een monster worden genomen. Hoe groter echter het oppervlak, hoe beter de weergave is van de totale bakteriënbelasting. Daarom wordt geopteerd voor een schabloon waarmee een oppervlak over gans de lengte van de vis kan worden uitgesneden.

2.1.1.5.1.3. Invloed van de schudtijd.

Zoals wordt vermeld, wordt het uitgesneden stukje huid in een steriele Ringeroplossing geschud. Het is noodzakelijk na te gaan welke de schudtijd is om het maximum aan microben in de suspensie te krijgen. Om hier een inzicht te verkrijgen, wordt een proef aangelegd met behulp van een schudtoestel type 'Kotterman', dat 200 slagen per minuut geeft.

Er worden twee soorten vis bestudeerd, naar gelang de aard van de huid. Een eerste soort is de haring met oppervlakte schubben en een tweede soort is de schol met ingeplante schubben. Tevens wordt de invloed van Tween 80 nagegaan. Nadien wordt bepaald hoeveel bacteriën er van de huid naar de suspensie migreren.

2.1.1.5.1.3.1. Studie van de schudtijd bij de monsterneming van de vishuid bij haring. _ _ _ _ _

Van een verse haring wordt een stuk huid aseptisch weggesneden. Dit stuk huid wordt in een erlenmeyer met 200 ml steriele Ringeroplossing gebracht en geschud. Na 5, 10, 15, 20, 25 en 30 min. wordt 1 ml uit de erlenmeyer gepipeteerd, verdund en uitgeplaat op T.G.E.A. met $pH = 6,5$. Na 5 x 24 u inkubatie bij kamertemperatuur worden de kolonies geteld. De proef wordt uitgevoerd op tien verschillende haringen van een zelfde partij. De verdunningen worden in het dubbel uitgeplaat. Tabel 13 bevat de resultaten van deze schudtijdproeven bij haring.

TABEL 13 - Resultaten van de schudtijdproeven bij haring (a)

Monster- nummer	5 min.	10 min.	15 min.	20 min.	25 min.	30 min.
1	41	45	48	47	48	48
2	31	32	31	35	37	36
3	161	169	177	178	175	175
4	130	139	131	140	152	145
5	36	37	35	35	32	34
6	31	25	34	30	34	35
7	77	76	82	92	83	83
8	85	113	132	122	159	133
9	38	38	42	46	51	35
10	257	205	222	276	231	280

(a) De cijfers geven het aantal bacteriën per ml inokulum weer.
De getallen zijn de gemiddelden van twee waarnemingen.

Uit de resultaten kan worden afgeleid dat een schudtijd van 15 à 20 min. voldoende is om een maximum hoeveelheid bacteriën bij haring te tellen.

2.1.1.5.1.3.2. Studie van de schudtijd bij de monsterneming van de vishuid bij schol.

De proef wordt op identieke wijze als bij haring uitgevoerd.

In tabel 14 zijn de resultaten van deze schudtijdproeven bij schol vermeld.

TABEL 14 - Resultaten van de schudtijdproeven bij schol (a)

Monster- nummer	5 min.	10 min.	15 min.	20 min.	25 min.	30 min.
1	163	185	189	212	221	218
2	195	251	268	237	236	234
3	63	50	55	65	60	64
4	99	106	122	116	117	118
5	93	110	95	110	108	103
6	122	122	146	174	165	170
7	33	31	36	47	42	46
8	27	31	42	47	43	45
9	26	28	38	33	37	38
10	29	26	23	30	30	26

(a) De cijfers geven het aantal bacteriën per ml inokulum weer.
De getallen zijn de gemiddelden van twee waarnemingen.

Uit de resultaten blijkt eveneens, dat een schudtijd van 15 à 20 min. volstaat om het maximum aantal bacteriën in suspensie te krijgen.

2.1.1.5.1.3.3. Vergelijking tussen schudden met Ringeroplossing met 0,1 % Tween 80 en zonder Tween 80. --- -- ---

Een vergelijkende schudproef in een steriele Ringeroplossing met 0,1 % Tween 80 en in een steriele Ringeroplossing zonder Tween 80 wordt aangelegd. Tween 80 heeft de eigenschap van de oppervlakte-spanning van het water te verlagen. De bedoeling van deze vergelijkende proef is na te gaan of bij gebruik van Tween 80 na 20 minuten schudden niet meer bacteriën in suspensie zijn overgegaan dan in afwezigheid van Tween 80.

Hiervoor worden van het midden van de schol twee gelijke oppervlakten (6 cm^2) van de huid gesneden. Een stuk wordt in een erlenmeyer van 500 ml met 180 ml Ringeroplossing die 0,1 % Tween 80 bevat gebracht en het ander stuk in een erlenmeyer van 500 ml met 180 ml Ringeroplossing zonder Tween 80. Beide erlenmeyers worden gedurende 20 minuten op het "Kotterman" schudtoestel geschud. Deze proef wordt vijfmaal uitgevoerd. De resultaten van de vergelijkende proef zijn in tabel 15 samengevat.

TABEL 15 - Resultaten van de tellingen per ml suspensie (a)

Proef	0,1 % Tween 80	Zonder Tween 80
1	5,58	5,29
2	5,30	5,52
3	5,58	5,27
4	5,54	5,25
5	5,76	5,95
Σ	27,76	27,28
\bar{X}	5,55	5,45
R	0,46	0,68

(a) De resultaten zijn de logaritmische waarden van de tellingen.

Wanneer de twee gemiddelden worden vergeleken volgens de methode aangegeven door BAUER (1960) kan worden vastgesteld dat geen

wezenlijk verschil tussen de twee methoden bestaat. Immers $M (= 0,87) > 0,387$ ($M = 0,01$ met $n_1 = 5$ en $n_2 = 5$) (a).

Hieruit kan worden besloten dat het gebruik van 0,1 % Tween 80 niet meer bacteriën van de huid in de suspensie doet overgaan.

2.1.1.5.1.3.4. Bepalen van het percentage aan bacteriën dat van de huid in de suspensie overgaat.

Bij het schudden van een stukje huid van 18 cm^2 in 180 ml steriele Ringeroplossing rijst de vraag of tussen de huid en de oplossing geen evenwicht in bacteriële belasting optreedt. Zo er een evenwicht bestaat, kan worden nagegaan hoeveel bacteriën op de huid achterblijven. Dit wordt onderzocht door het stukje huid in een verse Ringeroplossing gedurende 20 minuten te schudden en telkens opnieuw in een steriele Ringeroplossing te brengen en te schudden tot praktisch al de bacteriën van de huid zijn verwijderd.

De resultaten van deze proef zijn in tabel 16 vermeld.

TABEL 16 - Resultaten van de bepaling van het percentage bacteriën dat van de huid in de suspensie overgaat (b)

Schud- perioden	Tellin- gen	%	Tellin- gen	%	Tellin- gen	%	Tellin- gen	%
1	2.300	91,35	3.200	91,58	4.600	89,42	8.000	94,30
2	120	4,76	180	5,15	290	5,64	260	3,06
3	65	2,58	75	2,14	170	3,40	140	1,65
4	30	1,19	35	1,00	80	1,56	80	0,94
5	3	0,11	4	0,13	5	0,98	4	0,05
Σ	2.518	100 %	3.494	100 %	5.145	100 %	8.484	100 %

$$(a) M = \frac{X_1 - X_2}{R_1 + R_2}$$

(b) de getallen geven het aantal bacteriën per ml suspensie weer.

De proeven wijzen uit dat na vijfmaal schudden, gedurende een periode van twintig minuten, praktisch alle bacteriën van de huid verdwenen zijn. Tevens kan worden berekend dat na éénmaal schudden gedurende 20 minuten ca 90 % van de totale belasting van de huid in de suspensie is overgegaan.

2.1.1.5.1.4. Besluiten.

Uit de proeven kunnen volgende besluiten worden getrokken :

- Er bestaat geen verschil tussen de schudtijd voor haring en schol.
- Het gebruik van 0,1 % Tween 80 verhoogt het aantal bacteriën in de suspensie niet.
- Er gaat 90 % van bacteriën van de huid in de suspensie over na éénmaal schudden gedurende 20 minuten.
- Voor het verder onderzoek kan een schudtijd van 20 minuten in acht worden genomen, met 200 slagen per minuut op een schudtoestel type "Kotterman".

2.1.1.5.2. Monsterneming op het visvlees.

2.1.1.5.2.1. Metode van monsterneming

Met behulp van een skalpel wordt het oppervlak van de huid van het aanklevende slijm ontdaan; hierdoor wordt het grootste gedeelte van de bacteriën verwijderd. Daarna wordt de oppervlakte volledig steriel gewreven met katoenwol, doordrengd met ethanol (LOBBEN en LEE 1968). De huid wordt dan aseptisch verwijderd en van het blootgelegde vlees wordt een hoeveelheid in een vooraf getareerde steriele petri-schaal afgewogen. Vervolgens wordt met het visvlees een 10 % suspensie gemaakt door met Ringeroplossingen gedurende \pm 20 minuten steriel te homogeniseren (LUDORFF 1960).

2.1.1.5.2.2. Plaats van monsterneming.

Zoals bij de monsterneming van de vishuid werd tot op heden ook hier de plaats van monsterneming nog niet bepaald.

De plaatsbepaling wordt op schol verricht.

Onder en boven de zijlijn van de donkere en bleke kant van de schol wordt aseptisch een stuk huid van 18 cm² weggenomen en op verscheidene plaatsen van het blootgekomen vlees een monster genomen en volgens de hierboven beschreven methode gehomogeniseerd. Het aan-

leggen van de verdunningsreeks, de gebruikte bodem, de inkubatielijd en -temperatuur zijn dezelfde als bij de bepaling van het aantal bacteriën op de huid. De proef wordt uitgevoerd op vier stuks uit eenzelfde partij.

De resultaten van de bacteriologische bepalingen zijn in tabel 17 samengevat.

TABEL 17 - Resultaten van de plaatsbepaling van de monsterneming op het visvlees bij schol (a)

Monsternummer	P l a a t s			
	OD	BD	OB	BB
1	4,15	3,06	4,18	4,85
2	4,11	3,39	4,68	3,95
3	3,60	4,40	4,48	4,11
4	3,78	2,80	3,03	4,86
Σ	15,64	13,65	16,37	17,77
\bar{X}	3,91	3,41	4,09	4,44
R	0,55	1,60	1,65	0,91

OD : onder donker (onder zijlijn) OB : onder bleek (onder zijlijn)
 BD : boven donker (boven zijlijn) BB : boven bleek (boven zijlijn)

(a) De getallen zijn de logaritmen van het totaal aantal bacteriën per gram visvlees.

Aan de hand van de resultaten wordt berekend of een wezenlijk verschil bestaat tussen de vier verschillende plaatsen van monsterneming.

De test op de homogeniteit van de varianties valt positief uit, aangezien V_{max}/V_{min} (= 7,45) kleiner is dan 120,00 (voor $\nu = 3$ en $k = 4$ en 99 % betrouwbaarheid).

Tevens bestaat geen wezenlijk verschil tussen de gemiddelden, vermits de gevonden waarde q (= 3,68) kleiner is dan 5,60 (theoretische q -waarde voor $f = 11,20$ en $k = 4$ en voor 99 % betrouwbaarheid).

2.1.1.6. Bepaling van de nauwkeurigheid van de oppuntgestelde bacteriologische bepalingsmethoden. - - - - -

De nauwkeurigheid van de oppuntgestelde technieken wordt bepaald aan de hand van resultaten van een reeks dubbelproeven die over de ganse onderzoeksperiode waren gespreid. Alle resultaten van de dubbelproeven waarop ca 200 bacteriën en ca 50 bacteriën worden geteld, worden genoteerd. Op deze wijze kan de nauwkeurigheid van de methode worden berekend bij een hoog en bij een laag aantal tellingen. De nauwkeurigheid wordt nagegaan voor bepalingen op huid en in het vlees.

2.1.1.6.1. Nauwkeurigheid van de methode voor de bepaling van het aantal bacteriën op de huid. - - - - -

2.1.1.6.1.1. Nauwkeurigheid bij een hoog aantal tellingen.

Tabel 18 geeft resultaten weer van de dubbelproeven waarop ca 200 bacteriënkolonies per petri-schaal worden geteld; ook de gegevens voor het berekenen van de nauwkeurigheid zijn in de tabel opgenomen.

TABEL 18 - Nauwkeurigheid van de methode bij tellingen van ca 200 bacteriën per petri-schaal.

Monster	Dubbeltellingen		Δ	Δ^2
1	190	181	9	81
2	173	188	15	225
3	253	225	28	784
4	251	244	7	49
5	231	227	4	16
6	162	170	8	64
7	239	234	5	25
8	190	156	34	1.156
9	206	183	23	529
10	198	170	28	784
11	220	238	18	324
12	210	201	9	81
13	233	234	1	1
14	170	175	5	25
15	161	150	11	121
16	164	161	3	9
17	187	158	29	841
18	200	190	10	100
19	226	243	17	289
20	256	262	6	36
21	185	214	29	841
22	168	179	11	121
23	188	190	2	4

24	222	224	2	4
25	215	236	21	441
26	251	231	20	400
27	240	260	20	400
28	250	260	10	100
29	220	190	30	900
30	164	152	12	144
Σ	6.223	6.126		8.895
\bar{X}	207	204		

$$s = \sqrt{\frac{8.895}{60}} = \sqrt{148,25} = 12,175$$

2.1.1.6.1.2. Nauwkeurigheid bij een laag aantal tellingen.

In tabel 19 zijn de resultaten van de dubbelproeven waarop ca 50 bacteriënkolonies per petri-schaal worden geteld, alsmede de gegevens voor het berekenen van de nauwkeurigheid, vermeld.

TABEL 19 - Nauwkeurigheid van de methode bij tellingen van ca 50 bacteriën per petri-schaal.

Monster	Dubbeltellingen		Δ	Δ^2
1	38	43	5	25
2	29	29	0	0
3	64	54	10	100
4	50	45	5	25
5	33	32	1	1
6	26	32	6	36
7	32	33	1	1
8	53	56	3	9
9	54	50	4	16
10	27	26	1	1
11	63	54	9	81
12	53	43	10	100
13	67	56	11	121
14	66	61	5	25
15	86	76	10	100
16	43	46	3	9
17	35	28	7	49
18	44	52	8	64
19	45	41	4	16
20	32	35	3	9
21	51	53	2	4
22	55	49	6	36
23	40	45	5	25
24	30	25	5	25
25	61	67	6	36
26	42	45	3	9
27	42	37	5	25
28	59	63	4	16

29	65	63	2	4
30	67	70	3	9
Σ	1.452	1.409		977
\bar{X}	48	47		

$$s = \sqrt{\frac{977}{60}} = \sqrt{16,28} = 4,05$$

2.1.1.6.2. Nauwkeurigheid van de methode voor bepaling van het totaal aantal bacteriën per gram visvlees.

2.1.1.6.2.1. Nauwkeurigheid bij een hoog aantal tellingen.

Tabel 20 bevat resultaten van de dubbelproeven waarop ca 200 bacteriënkolonies per petri-schaal worden geteld, alsook de gegevens voor het berekenen van de nauwkeurigheid zijn weergegeven.

TABEL 20 - Nauwkeurigheid van de methode bij tellingen van ca 200 bacteriën per petri-schaal.

Monster	Dubbelstellingen		Δ	Δ^2
1	175	162	13	169
2	220	236	16	256
3	144	138	6	36
4	220	190	30	900
5	160	150	10	100
6	164	192	28	784
7	162	145	17	289
8	180	200	20	400
9	202	160	42	1.764
10	190	202	12	144
11	142	151	9	81
12	140	143	3	9
13	140	130	10	100
14	144	122	22	484
15	244	220	24	576
16	216	220	4	16
17	135	152	17	289
18	162	145	17	289
19	222	190	32	1.024
20	144	128	16	256
21	190	240	50	2.500
22	140	161	21	441
23	174	148	26	676
24	240	218	22	484
25	196	180	16	256
26	198	186	12	144
27	220	188	32	1.024
28	161	172	11	121
29	174	198	24	576
30	164	187	23	529
Σ	5.363	5.254		14.717
\bar{X}	179	175		

$$s = \sqrt{\frac{14.717}{60}} = \sqrt{245,28} = 15,66$$

2.1.1.6.2.2. Nauwkeurigheid bij een laag aantal tellingen.

In tabel 21 zijn de resultaten van de dubbelproeven opgenomen, waarop ca 50 bakteriënkolonies per petri-schaal worden geteld; ook de gegevens voor het berekenen van de nauwkeurigheid zijn geciteerd.

TABEL 21 - Nauwkeurigheid van de methode bij tellingen van ca 50 bakteriën per petri-schaal.

Monster	Dubbeltellingen		Δ	Δ^2
1	30	25	5	25
2	32	28	4	16
3	30	24	6	36
4	59	63	4	16
5	55	53	2	4
6	67	70	3	9
7	50	54	4	16
8	65	62	3	9
9	65	55	10	100
10	32	44	12	144
11	46	40	6	36
12	45	45	0	0
13	55	60	5	25
14	62	52	10	100
15	69	67	2	4
16	64	63	1	1
17	39	43	4	16
18	69	65	4	16
19	35	33	2	4
20	72	69	3	9
21	27	27	0	0
22	61	60	1	1
23	34	29	5	25
24	56	53	3	9
25	61	54	7	49
26	31	28	3	9
27	26	29	3	9
28	40	44	4	16
29	55	62	7	49
30	33	31	2	4
Σ	1.467	1.432		757
\bar{X}	49	48		

$$s = \sqrt{\frac{757}{60}} = \sqrt{12,62} = 3,56$$

2.1.1.6.3. Besluit.

Uit de berekening kan worden afgeleid, dat de methoden een goede nauwkeurigheid hebben zowel voor de bepaling van het totaal aantal bacteriën per cm^2 huid, als per gram visvlees en dit voor lage en hoge tellingen.

2.1.3. De bepaling van het totaal aantal trimethylamineoxydereduce- rende bacteriën of "bedervers".

Aangezien gedurende het eindstadium van het bederf hoofdzakelijk *Achromobacter* en *Pseudomonas* (WATSON 1939; CASTELL en ANDERSON 1948; LERKE et al. 1965) in de vis worden teruggevonden kan hieruit worden afgeleid dat deze soorten het visbederf veroorzaken. Een van de voornaamste bederfkomponenten is het TMA. Echter niet al deze bacteriën vormen het TMA (SOUDAN 1965; LERKE et al. 1965). Bijgevolg kan het dan ook van belang zijn bij de studie van de kwaliteit van vis een beeld te verkrijgen van het totaal aantal trimethylamineoxydereduce-
rende bacteriën of "bedervers".

2.1.3.1. Testen van voedingsbodem.

Als voedingsmilieu wordt de bodem, van WOOD en BAIRD (1943) aangewend. Deze bodem wordt vergeleken met trypton glukose extract broth die 0,5 % trimethylamineoxydehydrochloride bevat. De samenstelling van de bodems is als volgt :

1. Bodem van WOOD en BAIRD (1943) : 5 g $(\text{CH}_3)_3\text{NO.HCL}$; 2,5 g glukose; 5 g pepton; 5 g NaCl; 1 g MgSO_4 ; 1 g K_2HPO_4 ; 1000 ml H_2O en pH = 7,2.
2. Trypton glukose extract broth : 5 g $(\text{CH}_3)_3\text{NO.HCL}$; 3 g beef extract; 5 g trypton; 1 g dextrose; 1.000 ml H_2O en pH = 7,2.

Van een bakteriestam geïsoleerd uit kabeljauw die het enzyme "trimethylamineoxydease" bevat wordt een bakteriesuspensie in nutrient broth bereid en gedurende 24 u geïnkubeerd bij 22° C.

Van iedere bodem worden vervolgens 8 proefbuizen met 9 ml bodem klaar gemaakt. Iedere proefbuis wordt geënt met 1 ml van de suspensie. Na 72, 96, 120 en 144 u inkubatie bij 25° C wordt er telkens in 2 proefbuizen de hoeveelheid mg N % bepaald volgens de methode van DYER (1945) die verder wordt beschreven.

De resultaten van deze trimethylaminebepalingen staan in tabel 22 vermeld.

TABEL 22 - Resultaten van de trimethylaminebepalingen in de twee aangewende bodems (a).

T i j d	Bodem van Wood en Baird Trypton glukose extract broth			
	dubbels	gemiddelde	dubbels	gemiddelde
72 u	2,0 2,0	2,0	0,0 0,0	0,0
96 u	4,4 4,5	4,5	0,0 0,0	0,0
120 u	6,9 6,5	6,7	3,6 4,0	3,8
144 u	26,5 29,4	28,0	4,8 4,6	4,7

(a) De cijfers geven het aantal mg N %.

De resultaten tonen aan dat de bodem, door WOOD en BAIRD (1943) voorgesteld, veruit de beste resultaten geeft. Deze bodem zal dan ook worden aangewend voor de bepaling van het totaal aantal "beders" aangezien alleen de in deze bodem geënte trimethylamineoxydereducerende bacteriën TMA zullen vormen.

2.1.3.2. Werkwijze.

De bepaling van het TMA volgens WOOD en BAIRD (1943) steunt op de vluchtigheid van het TMA bij 45° C in alkalisch milieu. Volgende werkwijze wordt door deze onderzoekers aangenomen. Bij de geïnokuleerde voedingsbodem wordt 1,5 ml formaldehyde (40 %) gevoegd. Dit wordt geschud om de gevormde ammoniak te binden (BENOIT en NORRIS 1942). Na 3 minuten rusten worden 3 ml verzadigde K₂CO₃-oplossing toegevoegd om het TMA uit de oplossing te verdrijven. De proefbuis wordt onmiddellijk gesloten met een stop waardoor een glazen buisje steekt (5 mm breed en 4 cm lang) dat licht versmalt naar het einde toe en dat een stukje katoenwol, doordrenkt met bromothymolblauw-oplossing (CLARK 1928) die vooraf op pH = 4 wordt gesteld met 0,1 N H₂SO₄, bevat. Vervolgens worden de proefbuizen in een waterbad bij 45°C geïnkubeerd gedurende 30 minuten. Wanneer TMA aanwezig is in de cultuur, wordt het gekondenseerd in het katoen waardoor een verschuiving van de indikatorkleur naar het alkalisch gebied kan worden waargenomen.

Deze methode blijkt echter omslachtig en weinig nauwkeurig te zijn daar de kleuromslag soms moeilijk op te merken is.

In dit onderzoek wordt de methode van WOOD en BAIRD (1943) echter gekombineerd met een methode gesteund op de TMA-bepaling volgens DYER (1945). De methode wordt als volgt aangepast. In een maatcylinder van 50 ml wordt 1 ml voedingsbodem, die met de te onderzoeken bacteriestam is geënt, gegoten. Daarna worden \pm 5 ml formaldehyde (40 %) bijgevoegd om de ammoniak te binden. Vervolgens worden \pm 20 ml toluol toegevoegd. Hierbij worden ca 5 ml verzadigde K_2CO_3 -oplossing gegoten en de gesloten maatcylinder wordt gedurende 30 sec. krachtig geschud. Na 20 min. rusten worden 10 ml van de tolueenlaag afgepipeteerd en gedroogd op Na_2SO_4 . Van de gedroogde tolueenlaag worden ca 3 ml bij 3 ml 0,02 % pikrinezuuroplossing gevoegd. Wanneer een intens gele kleur verschijnt duidt dit op TMA-vorming.

2.1.4. Algemene besluiten nopens de bacteriologische kwaliteitsbepalingsmethoden.

Na het uittesten van de bacteriologische methoden zijn voor de bepaling van het totaal bacteriën per cm^2 huid en per gram visvlees volgende besluiten te weerhouden :

2.1.4.1. Voor de bepaling op de huid.

De monsterneming geschiedt bij middel van een aluminium schabloon, waarmede een gekende oppervlakte van de huid over gans de lengte van de vis op steriele wijze wordt weggenomen. De plaats van monsterneming mag willekeurig worden gekozen. Het stukje huid wordt gedurende 20 min. in een gekende hoeveelheid steriele Ringeroplossing geschud. Uit de bekomen suspensie wordt een verdunningsreeks aangelegd.

De telling geschiedt volgens de klassieke gietplaatmethode. Als bodem wordt T.G.E.A., dat met gewoon water is bereid, aangewend. De zuurtegraad heeft als waarde ca 6,5. De inkubatietijd is 5 x 24 u bij 20 à 25°C.

2.1.4.2. Voor de bepaling in het visvlees.

Voor de monsterneming wordt vooreerst een gedeelte van de huid met behulp van een skalpel van het aanklevend slijm ontdaan; hierdoor wordt het grootste gedeelte van de bacteriën verwijderd. Daarna

wordt het oppervlak volledig steriel gewreven met katoenwol, doordrengd met ethanol. De huid wordt dan aseptisch verwijderd en van het blootgestelde vlees wordt een hoeveelheid in een vooraf getareerde petrischaal afgewogen. Vervolgens wordt met het visvlees een 10 % suspensie gemaakt door met Ringeroplossing, gedurende + 2 minuten, steriel te homogeniseren.

De plaats van monsterneming mag geschieden aan de donkere of bleke kant onder of boven de zijlijn van de vis. Zoals bij de monsterneming ^{van} de huid is het verkieslijk dit uit te voeren over gans de lengte van de vis om de nauwkeurigheid te verhogen. Het aanleggen van de verdunningsreeks, de gebruikte bodem, de inkubatietijd en -temperatuur zijn dezelfde als bij de bepaling van het aantal bacteriën op de huid.

2.1.4.3. Voor de bepaling van het totaal aantal bedervers.

Het totaal aantal trimethylamineoxydereducerende mikro-organismen of "bedervers" zal worden bepaald met behulp van de bodem door WOOD en BAIRD (1943) voorgesteld en het gevormde TMA zal worden aangetoond met de pikraatmethode volgens DYER (1945) die tot routinemethode is omgevormd.

2.2. Chemische methoden.

In dit onderzoek wordt beroep gedaan op de bepaling van de TVB en van het TMA.

2.2.1. Bepaling van de TVB.

De bepaling van de TVB is één van de oudste methoden om het bederf van vis vast te stellen en wordt reeds in 1910 door KOENIG (1910) voorgesteld. Twee technieken kunnen worden aangewend om de TVB te bepalen, nl. de destillatie volgens LUECKE en GEIDEL (1935) en de mikrodifusie volgens CONWAY (1962). Bij de eerstgenoemde methode wordt de TVB door magnesiumoxyde vrijgesteld en overgedestilleerd in zwavelzuur en getitreerd met natriumhydroxyde. Bij de tweede methode worden bijzondere Conwayschalen gebruikt, die bestaan uit twee concentrische kuvetten. In de buitenste kuvet wordt vissap gebracht en verzadigd kaliumkarbonaat toegevoegd waardoor de TVB wordt uitgedreven. Dit wordt in de binnenste kuvet opgevangen in boorzuur en getitreerd. Door WITTFOGEL (1960) wordt een vergelijkend

onderzoek tussen de twee methoden doorgevoerd waaruit blijkt dat beide praktisch dezelfde resultaten geven. In dit onderzoek wordt dan ook uitsluitend de destillatietechniek toegepast daar deze werkwijze handiger voorkomt.

2.2.1.1. Metode.

In de methode van LUECKE en GEIDEL (1935) wordt een normale destillatie toegepast. Het is echter mogelijk een vakuüm- of stoomdestillatie door te voeren. De stoomdestillatie wordt voor deze proefnemingen echter verkozen, daar deze methode minder tijdrovend is. De TVB wordt echter in boorzuur opgevangen en rechtstreeks getitreerd met zwavelzuur zoals bij de methode van CONWAY (1962).

2.2.1.2. Reagentia.

- Magnesiumoxyde, zuiver
- Zwavelzuur, 0,1 N
- Boorzuur 3 %
- Gemengde indikator voor stikstoftitraties (Mischindikator 5, Merck).

2.2.1.3. Apparatuur (ANTONACOPOULOS 1960).

De apparatuur door ANTONACOPOULOS voorgesteld (figuur 2), wordt gebruikt. De kolven van 2 l worden elektrisch verwarmd.

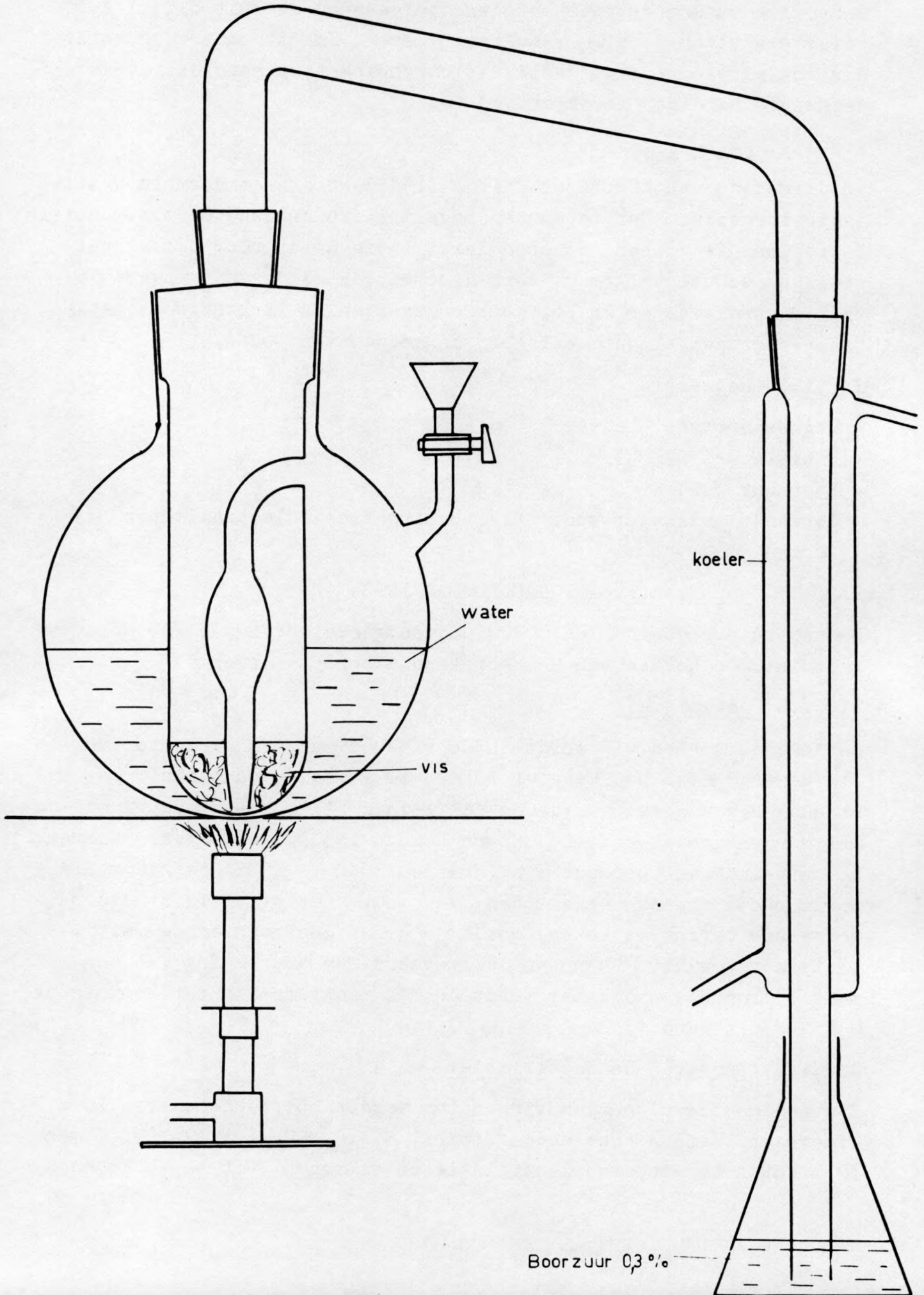
2.2.1.4. Werkwijze.

De te onderzoeken vis wordt in de vleesmolen gemalen en zorgvuldig gemengd. Van het mengsel worden 10 g in de reaktiekolf gebracht; 2 g magnesiumoxyde en een weinig silikoon-antischuimmiddel worden toegevoegd (LUECKE en GEIDEL 1935). De koeler, waarvan het uiteinde in boorzuur 3 % (KEIL en SORMOVA 1965) is gedompeld, wordt onmiddellijk aangesloten. Van zodra het water in de stoomgenerator begint te koken, wordt de kraan gesloten en de destillatie wordt exakt 17 minuten doorgevoerd. Na toevoeging van een zestal druppels indikator wordt de TVB rechtstreeks met zwavelzuur 0,1 N getitreerd.

2.2.1.5. Duur van de destillatie.

Van een homogeen gemalen vismonster worden hoeveelheden van 10 g afgewogen. Deze hoeveelheden worden, 5, 10, 12, 15, 17, 20, 25 en 30 minuten aan de stoomdestillatie onderworpen. Uit het bekomen

Figuur 2 - Apparatuur voorgesteld door Antonacopoulos



destillaat wordt de TVB bepaald. De proeven worden telkens in het dubbel uitgevoerd.

Tabel 23 vermeldt de resultaten van de bepaling van de destillatietijd voor de TVB.

TABEL 23 - Resultaten van de bepaling van de destillatietijd voor de TVB (a)

Tijd	Dubbels		Gemiddelde
5	21,0	21,0	21,00
10	23,8	23,8	23,80
12	25,9	25,9	25,90
15	27,3	28,0	27,65
17	28,3	28,0	28,00
20	28,0	28,0	28,00
25	28,4	28,4	28,40
30	28,4	29,1	28,75

(a) De cijfers geven het aantal mg N % weer.

Uit de resultaten kan worden afgeleid dat een destillatietijd van 17 minuten voldoende is voor de bepaling van de TVB.

2.2.1.6. Nauwkeurigheid van de methode.

De nauwkeurigheid van de methode kan worden getest aan de hand van een reeks dubbelproeven die over een ganse onderzoeksperiode zijn gespreid. De waarden van ca 25 mg N % worden opgetekend.

Tabel 24 geeft de resultaten van de dubbelproeven van de TVB-bepaling, alsook de gegevens voor het berekenen van de nauwkeurigheid.

TABEL 24 - Nauwkeurigheid van de TVB-bepaling (a).

Monster	Dubbels		Δ	Δ^2
1	21,7	23,1	1,4	1,96
2	22,4	24,5	2,1	4,41
3	21,0	21,7	0,7	0,49
4	24,5	23,8	0,7	0,49
5	20,3	21,7	1,4	1,96
6	28,7	29,4	0,7	0,49
7	27,3	26,6	0,7	0,49
8	25,2	25,2	0,0	0,00
9	21,7	24,5	2,8	7,84

10	23,1	21,7	1,4	1,96
11	24,5	25,9	1,4	1,96
12	28,0	29,4	1,4	1,96
13	26,6	26,6	0,0	0,00
14	23,8	24,5	0,7	0,49
15	25,9	25,9	0,0	0,00
16	25,9	27,3	1,4	1,96
17	25,9	28,0	2,1	4,41
18	22,4	20,3	2,1	4,41
19	25,2	26,6	1,4	1,96
20	25,2	25,2	0,0	0,00
21	24,5	24,5	0,0	0,00
22	24,5	25,2	0,7	0,49
23	24,5	23,8	0,7	0,49
24	21,0	21,0	0,0	0,00
25	28,0	28,7	0,7	0,49
26	29,4	28,7	0,7	0,49
27	26,6	25,9	0,7	0,49
28	28,7	29,4	0,7	0,49
29	25,2	23,8	1,4	1,96
30	21,7	23,1	1,4	1,96
Σ	743,4	756,0		44,10
\bar{X}	24,8	25,2		

(a) De cijfers geven het aantal mg N % weer.

$$s = \sqrt{\frac{44,10}{60}} = \sqrt{0,735} = 0,86$$

Rekening houdend met het feit dat de bepalingen worden uitgevoerd op biologisch materiaal waarvan de samenstelling door tal van factoren wordt beïnvloed kan aan de hand van de kleine waarde van de standaardafwijking worden besloten dat de TVB-bepaling een hoge nauwkeurigheidsgraad bezit.

2.2.2. Bepaling van het TMA.

Het TMA kan worden gedoseerd hetzij door kolorimetrie van het pikraat volgens DYER (1945), hetzij met de mikrodifusiemetode van BEATTY en GIBBONS (1937) volgens het principe van CONWAY (1962). Deze laatste methode heeft nochtans nadelen, nl. (a) het verwijderen van het vet, dat noodzakelijk is voor de luchtdichtheid, is niet altijd eenvoudig, (b) de diffusieduur is relatief lang, (c) voor de kolorimetriscie bepaling moet de absorptievloeistof kwantitatief worden overgebracht, (d) bij lage concentraties van TMA kunnen grote afwijkingen optreden, (e) volgens SPINELLI (1964) zou bij lange diffusieduur hydrolyse van trimethylamineoxyde optreden. Bij de mikrodifusietechniek moet echter een kleurstof worden gevonden die gevoelig genoeg is en niet reageert met het water dat

aanwezig is in het zwavelzuur 1 N waarin het TMA geabsorbeerd is. In de literatuur worden enkele kleurstoffen opgegeven die kunnen worden aangewend, nl. het Dragendorffreagens (BREGCFF et al. 1953), het aminozuurreagens van FOLIN (natrium naftochinon-4-sulfonaat) (1922), de chloraniltest voor aminen (SIVIDJIAN 1931), de reactie van kaliumpentacyanoferaat en Kobaltnitriet (JACOBS en HOFFMAN 1931; DYER 1945), de reactie met itaconzuuranhydride (WRONSKI 1966) en het fenolreagens van FOLIN en CIOCALTEU (1927).

Wegens de reeks nadelen van de mikrodiffusiemetode wordt in dit onderzoek beroep gedaan op de pikraatmetode volgens DYER (1945). Deze methode heeft als voordeel dat de bepaling van het TMA kan geschieden op het destillaat van de TVB-bepaling. Er is echter ook een nadeel nl. water en organische onzuiverheden (vet, detergens) storen de kleurreactie. Deze problemen zijn mits een strenge controle van glaswerk en reagentia gemakkelijk te omzeilen.

2.2.2.1. Metode.

Het principe kan als volgt worden geschetst. Het TMA, dat door extractie of destillatie uit de vis wordt geïsoleerd, wordt in een organisch solvent (bv. toluen) overgebracht. Hiervoor is het echter noodzakelijk dat het TMA, dat als zout voorkomt, in vrije base wordt omgezet. Dit geschiedt door toevoeging van kaliumcarbonaat. Ammoniak, dat eveneens aanwezig is, stoort de reactie en wordt dan ook door formaldehyde geblokkeerd. Na deze bewerking is het voldoende het toluen te drogen (het water stoort eveneens de bepaling) en het TMA als pikraat te bepalen, door het toevoegen van een pikrinezuuroplossing.

Het TMA wordt in het onderzoek bepaald op het destillaat van de TVB. Na 10 minuten immers wordt het TMA volledig overgedestilleerd.

2.2.2.2. Reagentia (DYER 1945)

- Toluen p.a., gedroogd over water vrije natriumsulfaat.
- Pikrinezuuroplossing : stockoplossing : los 2 g droog pikrinezuur, p.a. in 100 ml water vrije toluen op. Dit is de werkoplossing. Verdun 1 ml tot 100 ml met water vrij toluen.
- Kaliumcarbonaatoplossing ; los 100 g in 100 ml water op.
- Formaldehydeoplossing : verdun 10 ml kommercieel formol 40 % (geschud met magnesiumcarbonaat en gefiltreerd) tot 100 ml met water.
- Natriumsulfaat water vrij.

2.2.2.3. Apparatuur : spektrofotometer "Unicam"

2.2.2.4. Werkwijze (DYER 1945)

Uit het destillaat van de TVB-bepaling worden 2 ml gepipeteerd en in een maatglas van 50 ml, voorzien van een glazen stop gebracht. Er worden 6 ml water, 2 ml formaldehydereagens, 20 ml tolueen en 6 ml kaliumkarbonaatoplossing toegevoegd. Het maatglas wordt gesloten en goed geschud. Er wordt 10 ml van de tolueenlaag gepipeteerd in een proefbuis van 20 ml voorzien van een glazen stop en waarin 0,3 g natriumsulfaat worden gebracht. De buis wordt gesloten en zachtjes geschud, teneinde het tolueen te drogen. Van het gedroogd tolueen worden 3 ml gepipeteerd en in een droge kolorimeterbuis overgebracht. Hierbij worden 3 ml pikrinezuuroplossing gevoegd en de oplossing wordt door voorzichtig schudden gemengd. De extinktie wordt op de "Unicam" spektrofotometer bij een golflengte van 410 nm afgelezen en met de ijkcurve vergeleken.

2.2.2.5. Bepalen van de maximale golflengte en opstellen van de ijkcurve. - - - - -

2.2.2.5.1. Bepalen van maximale golflengte (λ_{max}).

De resultaten van de metingen om λ_{max} te bepalen, zijn in figuur. 3 weergegeven.

De extinktiecurve leert dat λ_{max} in het zichtbaar gebied = 410 nm en dit gegeven komt met de literatuurgegevens overeen (DYER 1950).

2.2.2.5.2. Opstellen van de ijkcurve.

Voor het opstellen van de ijkcurve wordt uitgegaan van een stockoplossing, waaruit een verdunningsreeks wordt aangelegd.

2.2.2.5.2.1. Bereiding van de stockoplossing.

Er worden 6,8214 g TMA.HCl afgewogen en in 100 ml water opgelost. Hiervan worden 5 ml genomen en tot 50 ml met water aangelengd. Deze hoeveelheid bevat bijgevolg 50 mg N.

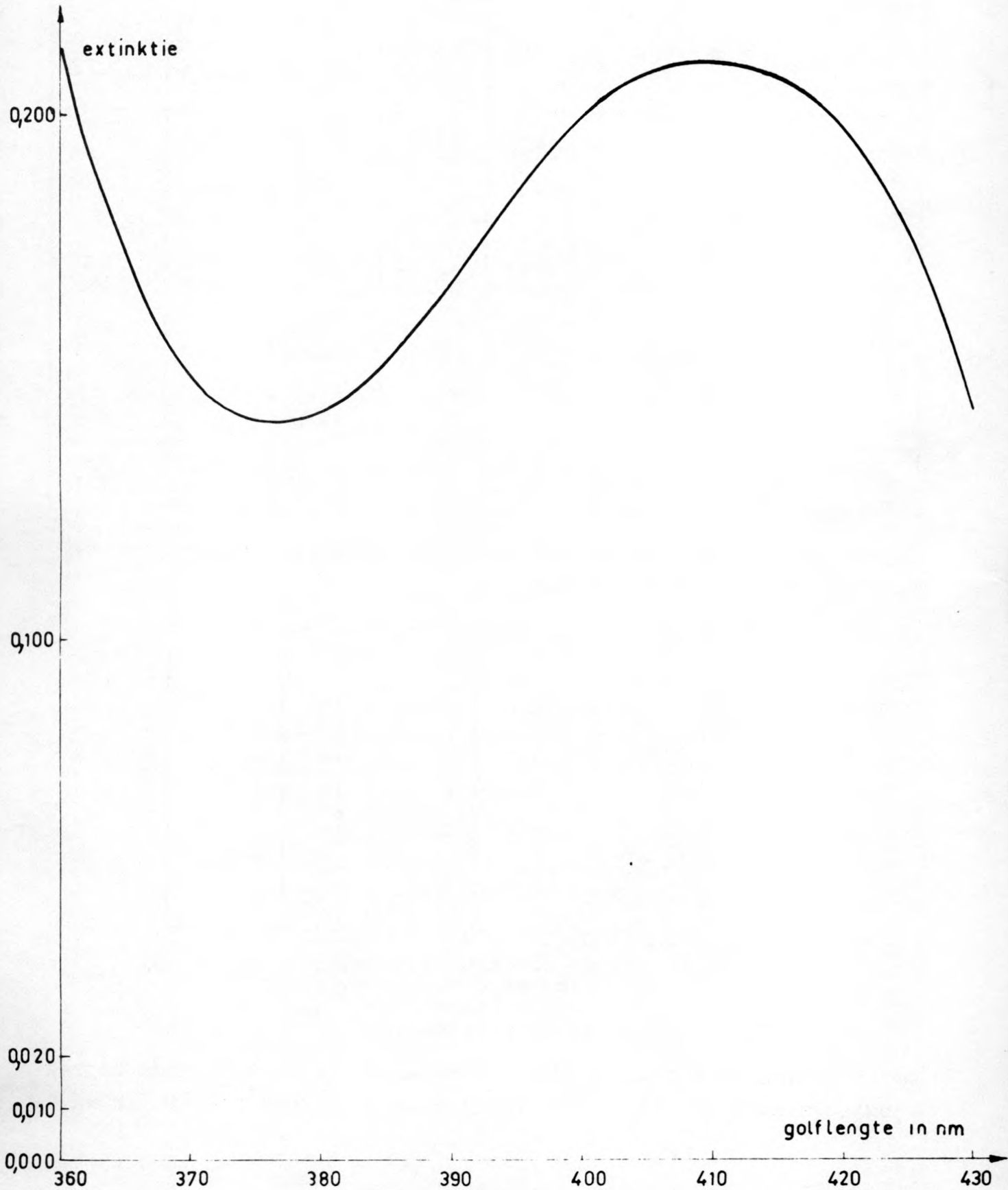
2.2.2.5.2.2. Bereiding van de verdunningsreeks.

Uit de stockoplossing worden 0,5 ml, 1,5 ml, 2,5 ml, 5 ml en 7,5 ml genomen en tot 200 ml aangelengd met water.

2.2.2.5.2.3. Uitvoering en bespreking.

Uit de vijf oplossingen van de verdunningsreeks wordt telkens 1 ml

Figuur 3 - Extinktie kurve voor TMA-bepaling



afgepipeteerd en hierop wordt een TMA-bepaling uitgevoerd. De proef wordt op vijf verschillende tijdstippen verricht en telkens in het dubbel. De resultaten zijn samengevat in tabel 25.

TABEL 25 - Extinktiewaarden voor het opstellen van de ijkcurve voor TMA-bepalingen.

P r o e f	K o n c e n t r a t i e				
	0,5 mg 200 ml	1,5 mg 200 ml	2,5 mg 200 ml	5,0 mg 200 ml	7,5 mg 200 ml
1	0,027 0,021	0,061 0,061	0,126 0,127	0,266 0,250	0,372 0,369
2	0,017 0,017	0,056 0,061	0,120 0,119	0,250 0,250	0,367 0,395
3	0,019 0,031	0,059 0,070	0,116 0,118	0,238 0,237	0,350 0,356
4	0,027 0,020	0,072 0,074	0,120 0,120	0,238 0,247	0,399 0,363
5	0,020 0,018	0,072 0,074	0,127 0,125	0,257 0,250	0,371 0,383
Σ Gemiddelde	0,217 0,022	0,660 0,066	1,218 0,122	2,483 0,248	3,725 0,373

Met de bekomen resultaten kan tabel 26 worden opgemaakt die toelaat de ijkcurve te berekenen.

TABEL 26 - Berekenen van de ijkcurve (a).

X	Y		n	\bar{y}
	hoogste	laagste		
0,5	0,0311	0,017	10	0,022
1,5	0,074	0,056	10	0,066
2,5	0,127	0,116	10	0,122
5,0	0,266	0,237	10	0,248
7,5	0,399	0,350	10	0,373

- (a) X = de concentratie aan N in mg/200 ml
 Y = bekomen extinktiewaarde
 \underline{n} = aantal waarnemingen en
 \underline{y} = gemiddelde extinktie

Op grond van de wet van LAMBERT-BEER wordt verwacht dat de betrekking tussen de onafhankelijk veranderlijk X, de concentratie en de

afhankelijk veranderlijke Y, de extinktie, wordt uitgedrukt door de vergelijking :

$$Y = bX \quad (1)$$

Daar het vrij onwaarschijnlijk is om een reeks proeven uit te voeren, waarbij de fouten elkaar precies opheffen zal bij een concentratie 0,0 normaal een Y waarde gevonden worden die niet gelijk is aan 0,0000, zodat het verband tussen de experimentele punten beter zal worden beschreven door de vergelijking :

$$Y = a + bX \quad (2)$$

Hier moet echter worden aan toegevoegd dat het intercept a aanvaardbaar moet zijn binnen de grenzen van de proeffouten. Wanneer dit niet het geval is, kan dit te wijten zijn ofwel aan de blanco die een konstante fout als gevolg kan hebben, ofwel aan het feit dat de wet van LAMBERT-BEER niet opgaat.

Aan de hand van de waarnemingen moeten de waarden van a en b worden bepaald. Dit geschiedt volgens de methode van de kleinste kwadraten (TOPPING 1960).

De formules voor het berekenen van a en b zijn als volgt :

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (3)$$

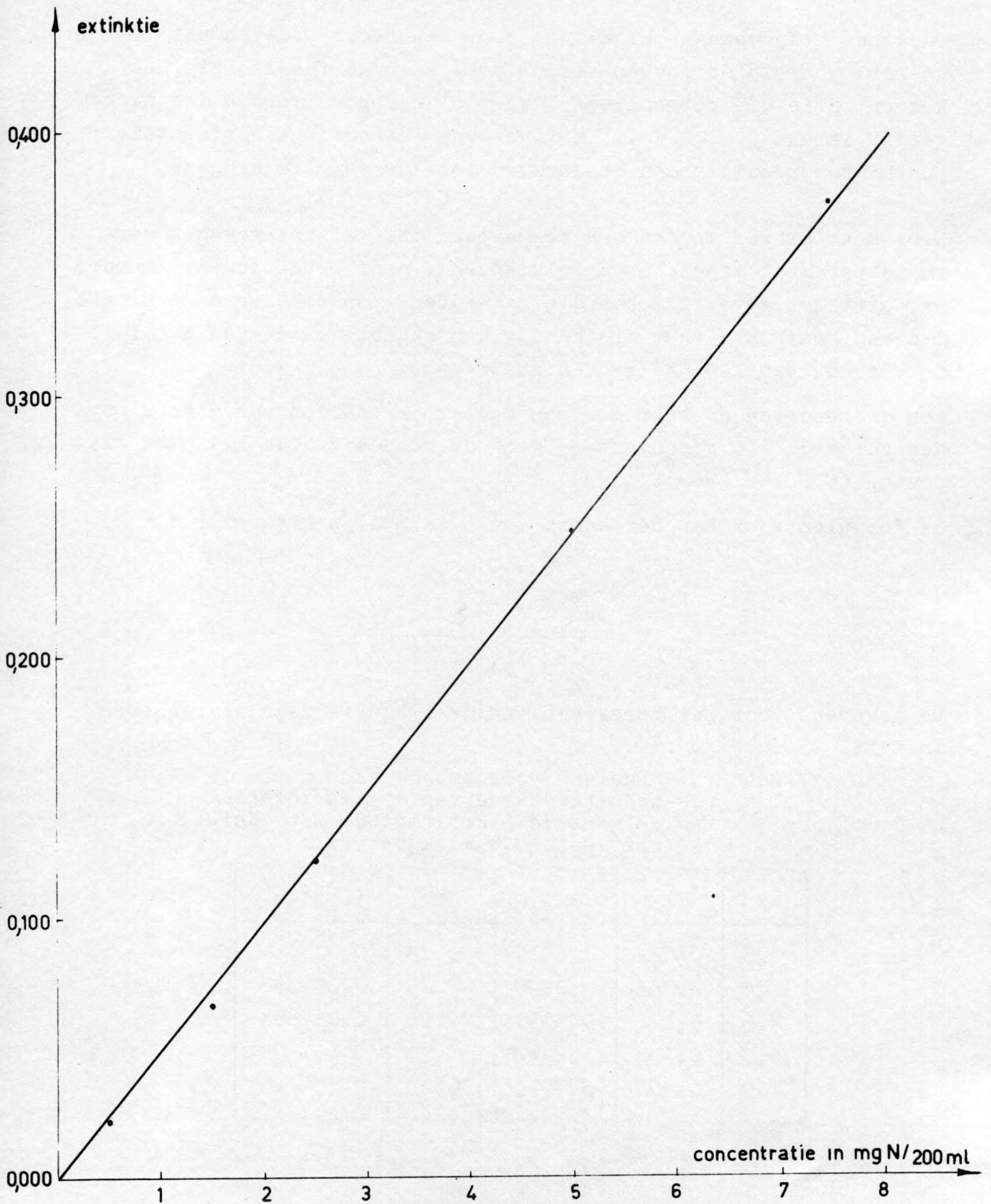
$$b = \frac{n \sum Y_i X_i - \sum Y_i \sum X_i}{n \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2} \quad (4)$$

De gegevens voor het berekenen van de ijkcurve zijn weergegeven in tabel 27 en figuur 4.

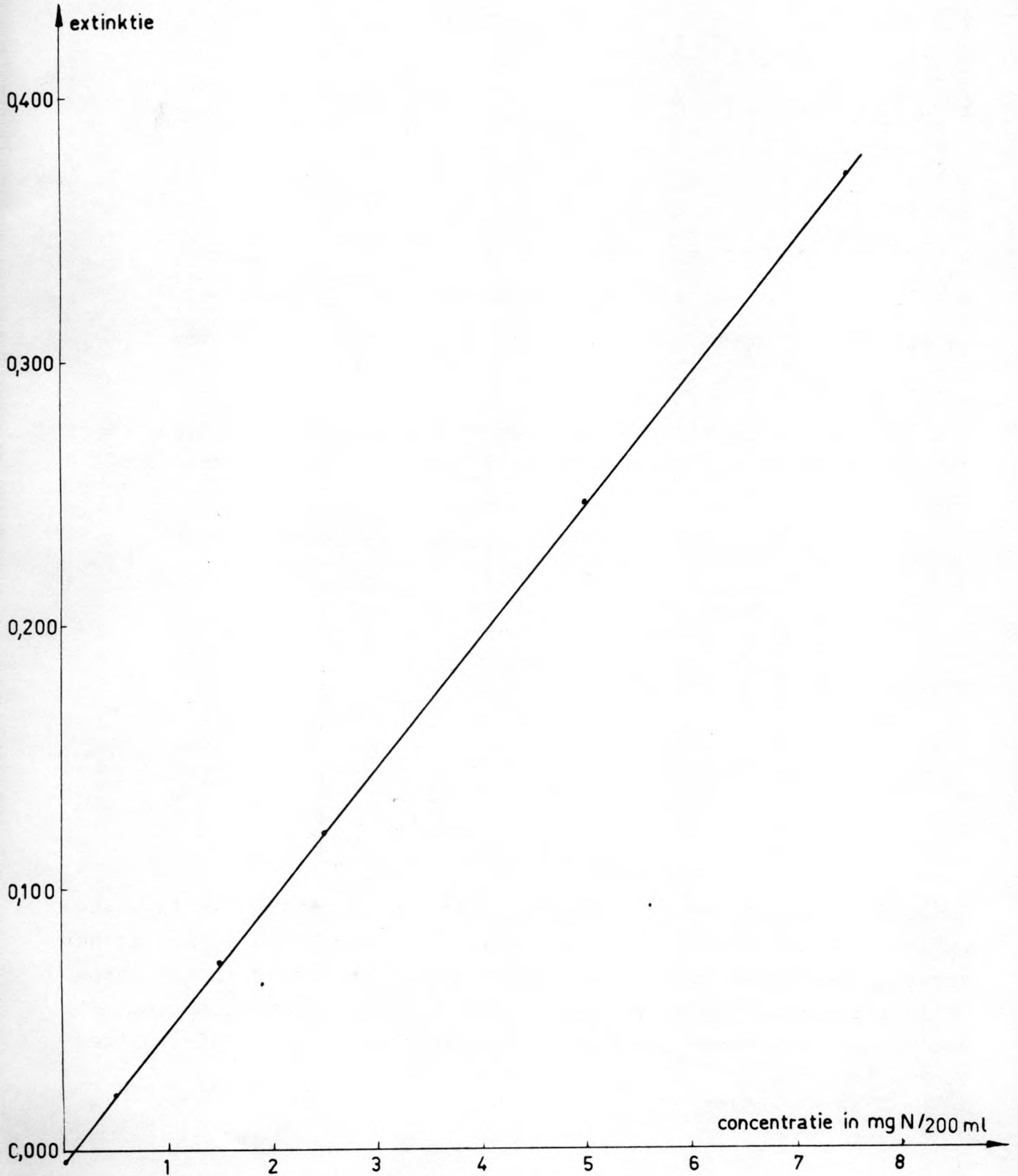
TABEL 27 - Gegevens voor het berekenen van de standaardcurve van de TMA-dosering volgens de pikraatmethode met "Unicam" met 10,0 mm kuvetten.

X	Y	XY	X ²	Y ²
0,5	0,022	0,0110	0,25	0,000484
1,5	0,066	0,0990	2,25	0,004356
2,5	0,122	0,3050	6,25	0,014884
5,0	0,248	1,2400	25,00	0,061504
7,5	0,373	2,7975	56,25	0,139129

Figuur 4 - Experimentele ijkkurve



Figuur 5 - Berekende ijkcurve voor TMA - bepaling



$$\sum X_i = 17,0$$

$$\sum X_i Y_i = 4,4525$$

$$\sum X_i^2 = 90,00$$

$$\sum Y_i = 0,831$$

$$\sum Y_i / 5 = \bar{y} = 0,1662$$

$$\sum X_i \sum Y_i = 14,127$$

$$(\sum X_i)^2 = 289,0$$

$$n = 10$$

$$b = \frac{44,525 - 14,127}{900 - 289} = 0,0498$$

$$a = 0,1662 - (0,0498 \times 3,4) = - 0,00312$$

De extinktie Y wordt bekomen met behulp van de vergelijking :

$$Y = - 0,00312 + 0,0498 X$$

Aan de hand van deze vergelijking worden enkele referentiepunten van de berekende ijkcurve in tabel 28 weergegeven; de curve wordt door figuur 5 voorgesteld.

TABEL 28 - Referentiepunten van de berekende ijkcurve.

X in mg/200 ml	Y (extinktie)
0	- 0,00312
0,5	0,02178
1,5	0,07158
2,5	0,12138
5,0	0,24588
7,5	0,37038

De gevonden waarde voor de koëfficiënt a is niet gelijk aan de theoretische waarde 0,0000. Er dient echter uitgemaakt te worden of het verschil in waarde tussen het experimentele intercept en het theoretisch intercept op grond van de proeffouten aanvaardbaar is. Dit kan worden onderzocht met behulp van een door YOUNG (1959) uitgewerkte techniek.

De waarde (S') voor de kwadraatsom van de afwijkingen tussen de experimentele punten en de rechte zonder intercept wordt weergegeven door volgende formule :

$$S' = \sum Y_i^2 - \frac{(\sum X_i Y_i)^2}{\sum X_i^2} \quad (5)$$

De waarde (S) van de kwadraatsom van de afwijking tussen de experimentele punten en de berekende rechte met een intercept a wordt weergegeven door de betrekking :

$$S = \sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n} - \frac{(\bar{x} \sum Y_i - \sum X_i Y_i)^2}{\sum X_i^2 - \bar{x} \sum X_i} \quad (6)$$

Met behulp van de gegevens uit tabel 27 en met de vergelijkingen (5) en (6) wordt het mogelijk om de beide kwadraatsommen te berekenen. Immers er wordt bekomen :

$$\sum Y_i^2 = 0,220357$$

$$\sum X_i^2 = 90,00$$

$$(\sum Y_i)^2/n = 0,069056$$

$$(\sum Y_i X_i)^2 = 19,824756$$

$$\sum X_i = 17,0$$

$$n = 10$$

$$\bar{x} = 1,70$$

$$S' = 0,220357 - \frac{19,824756}{90} = 0,000082$$

$$S = 0,220357 - 0,069056 - \frac{[(1,7 \times 0,831) - 4,4525]^2}{90 - (1,7 \times 17)} = 0,000067$$

In overeenstemming met hetgeen mag worden verwacht is $S' > S$.

Beide gegevens kunnen met behulp van de variantieanalyse worden vergeleken. Hierbij dient rekening gehouden te worden met het feit dat de n experimentele punten in de kwadraatsom S' aanleiding gegeven hebben tot $n - 1$ vrijheidsgraden, daar alleen de waarde van de koëfficiënt b aan de hand van deze gegevens is berekend. Bij de kwadraatsom S echter zijn voor de n waarnemingen slechts $n - 2$

vrijheidsgraden, daar uit de proefondervindelijk vastgestelde punten de koëfficiënten a en b zijn bepaald. De variantieanalyse is samengevat in tabel 29.

TABEL 29 - Variantieanalyse voor de kwadraatsom S' (zonder) en S (met een intercept).

Ho hypothese : experimentael intercept is niet wezenlijk verschillend van het theoretisch intercept.				
Bron variantie	Vrijheidsgraden	Kwadrat-sommen	Variantie	F (berekend)
Reduktie door intercept	1	0,000015	0,000015	1,79
Lijn met intercept	8	0,000067	0,00000837	
Lijn zonder intercept	9	0,000082		
F : theoretisch met 1 en 8 vrijheidsgraden en 5 % overschrijdingskans en 5,32 en 1 % overschrijdingskans = 11,26				

De variantieanalyse toont aan, dat het verschil tussen de experimentele waarde voor het intercept en de theoretische waarde, nul, aanvaardbaar is op grond van de proeffouten.

Daar de experimentele waarden, die bij de berekening van de betrekking zijn aangewend, afkomstig zijn van een reeks van 10 waarnemingen, is het volgens YODEN (1959) mogelijk om de overeenkomst te testen tussen de experimentele gegevens en de berekende rechte. Enerzijds is de kwadraatsom van de afwijkingen tussen de experimentele punten en de best aangepaste rechte reeds berekend. Anderzijds kan de schatting worden gemaakt van de nauwkeurigheid van de bepaling van de experimentele punten met behulp van de spreidingsbreedte binnen iedere reeks van de waarnemingen. Beide schattingen van de proeffouten kunnen onderling door middel van de variantieanalyse worden vergeleken. De schatting van de variantie op grond van de spreidingsbreedte wordt uitgevoerd met behulp van de gegevens uit tabel 30. Wanneer W de spreidingsbreedte in de extinktie voorstelt, wordt de variantie gelijk aan :

$$D = \frac{\sum W^2}{10n}$$

waarin n het aantal waarnemingsreeksen weergeeft en 10 het aantal waarnemingen per reeks.

TABEL 30 = Gegevens voor het berekenen van de variantie D , op grond van de spreidingsbreedte W .

X_i	Y_i	Y_2	w	w^2
0,5	0,031	0,017	0,014	0,000196
1,5	0,074	0,056	0,018	0,000324
2,5	0,127	0,116	0,011	0,000121
5,0	0,266	0,237	0,028	0,000841
7,5	0,399	0,350	0,049	0,002401

$$D = \frac{0,003883}{50} = 0,000078$$

De variantieanalyse is in tabel 31 vervat.

TABEL 31 = Variantieanalyse

Ho hypothese : de afwijkingen van de experimentele punten ten opzichte van de berekende rechte vallen binnen de grenzen van de proeffouten.				
Bron variantie	Vrijheidsgraden	Kwadrat-som	Variantie	F (berekend)
Lijn met intercept	8	0,000067	0,0000083	1,06
Herhalingen	10	0,000078	0,0000078	
F : theoretisch met 8 en 10 vrijheidsgraden en 5 % overschrijdingskans = 3,07 en 1 % overschrijdingskans = 5,06				

Daar de berekende F-waarde de theoretische waarde niet overtreft, wordt de hypothese dat de afwijkingen tussen de experimentele punten en de berekende rechte aanvaardbaar zijn binnen het kader van de proeffouten aangenomen.

Wanneer het TMA volgens de reeds beschreven methode wordt bepaald en de metingen bij 410 nm worden uitgevoerd, mag gebruik worden gemaakt van de experimentele of van de berekende curve. Uit deze berekende curve kan bijgevolg de faktor worden afgeleid waarmee de gevonden extinktie mag worden vermenigvuldigd om rechtstreeks de hoeveelheid in mg N % te kunnen uitdrukken.

Immers : $Y = - 0,00312 + 0,0498 X$

Voor een willekeurige waarde van Y wordt een bepaalde waarde voor X gevonden.

Bij $Y = 0,100$ wordt $X = \frac{0,100 + 0,00312}{0,0498} = 2,07$ mg N/200 ml

Een extinktie van 0,100 komt overeen met 2,07 mg N/200 ml

Een extinktie van 1 komt overeen met 20,7 mg N/200 ml

Een extinktie van E komt overeen met $E \times 20,7$

Deze 20,7 mg N/200 ml komen uit 10 g visvlees. Om de hoeveelheid uit te drukken in mg N % moet de extinktie bijgevolg met 207 worden vermenigvuldigd.

2.2.2.6. "Recovery-test" voor de bepaling van het TMA.

Het opzet van deze test is na te gaan of de ijkcurve in de praktijkomstandigheden kan worden toegepast, m.a.w. uittesten of er geen vreemde invloeden vanwege de vis zijn die gebeurlijk het doseren van het TMA kunnen storen.

Hiervoor wordt een ijkcurve opgesteld, vertrekkende van 10 gr verse kabeljauwfilets, afkomstig van een homogeen gemalen vismonster, waarbij 0,5 ml, 1,5 ml, 2,5 ml, 5 ml en 7,5 ml van een stockoplossing die 1 mg TMA-N per ml bevat wordt gevoegd. Deze stockoplossing wordt bereid door 1,3642 g TMA HCl 50 % met water tot 100 ml aan te lengen. Op deze 5 suspensies wordt het gehalte aan TMA bepaald en de kleur wordt gemeten t.o.v. de kleur gevormd door 10 g verse vis. Het is verkieselijk dat de vis vers is m.a.w. dat er nog geen TMA is gevormd. Zodoende kunnen de proeffouten zo gering mogelijk worden gehouden.

Deze proef wordt 5 maal herhaald en telkens in het dubbel. Voor iedere proef wordt een verse stockoplossing bereid. De resultaten van de kolorimetrische bepalingen zijn in tabel 32 samengevat.

TABEL 32 - Extinktiewaarden voor het opstellen van de ijkcurve van de "recovery-test" voor TMA.

0,5 mg 200 ml	1,5 mg 200 ml	2,5 mg 200 ml	5,0 mg 200 ml	7,5 mg 200 ml
0,019	0,072	0,129	0,239	0,377
0,020	0,072	0,129	0,238	0,376
0,026	0,070	0,133	0,249	0,374
0,026	0,071	0,132	0,246	0,375
0,028	0,072	0,129	0,239	0,365
0,029	0,072	0,130	0,241	0,366
0,025	0,073	0,140	0,271	0,375
0,027	0,074	0,141	0,272	0,378
0,024	0,075	0,134	0,252	0,381
0,023	0,071	0,136	0,258	0,385
Σ 0,247	0,722	1,333	2,505	3,752
\bar{X} 0,025	0,072	0,133	0,251	0,375

Met behulp van de extinktiewaarden uit tabel 25 en tabel 32 kan tabel 33 worden opgesteld.

TABEL 33 - Extinktiewaarden van de ijkcurve opgesteld met zuivere oplossingen en van de "recovery test".

X	Y	X ²	Y ²	XY
0,022	0,025	0,000484	0,000625	0,000550
0,066	0,072	0,004356	0,005184	0,004752
0,122	0,133	0,014884	0,017689	0,016226
0,248	0,251	0,061504	0,063001	0,062248
0,373	0,375	0,139129	0,140625	0,139875
0,831	0,856	0,220357	0,227124	0,223651

Deze gegevens zullen toelaten de vergelijking tussen de twee ijkcurven te bepalen. Zo er geen verschil bestaat tussen de twee ijkcurven, zal in een lineair assenstelsel een reeks punten worden bekomen die op een rechte lijn liggen wanneer de extinktiewaarden van de ene curve in de ordinaat en de extinktiewaarden van de andere in abscis worden uitgezet. De bekomen rechte wordt gekarakteriseerd door een theoretische gradiënt b, die gelijk is aan 1,000 en een theoretisch intercept a, met de waarde 0,0000.

Wanneer de extinktiefuncties van de ijkcurve, met zuivere oplossingen opgesteld, de X_i waarden worden genoemd en de extinktiefuncties van de "recovery-test" de Y_i waarden dan kan voor de overeenstemmende waarnemingen uit tabel 33 berekend worden dat :

$$\sum X_i = 0,831$$

$$\sum X_i^2 = 0,220357$$

$$\sum X_i \sum Y_i = 0,711336$$

$$\sum Y_i = 0,856$$

$$(\sum X_i)^2 = 0,690561$$

$$n = 5$$

Aan de hand van de resultaten uit tabel 33 kan nu volgens de reeds aangegeven methode van de kleinste kwadraten, de gradiënt b en het intercept a worden bepaald voor de best aangepaste rechte. Men bekomt de waarden :

$$b = 0,9895$$

$$a = 0,0068$$

De berekende rechte wordt samen met de experimentele punten voorgesteld in figuur 6.

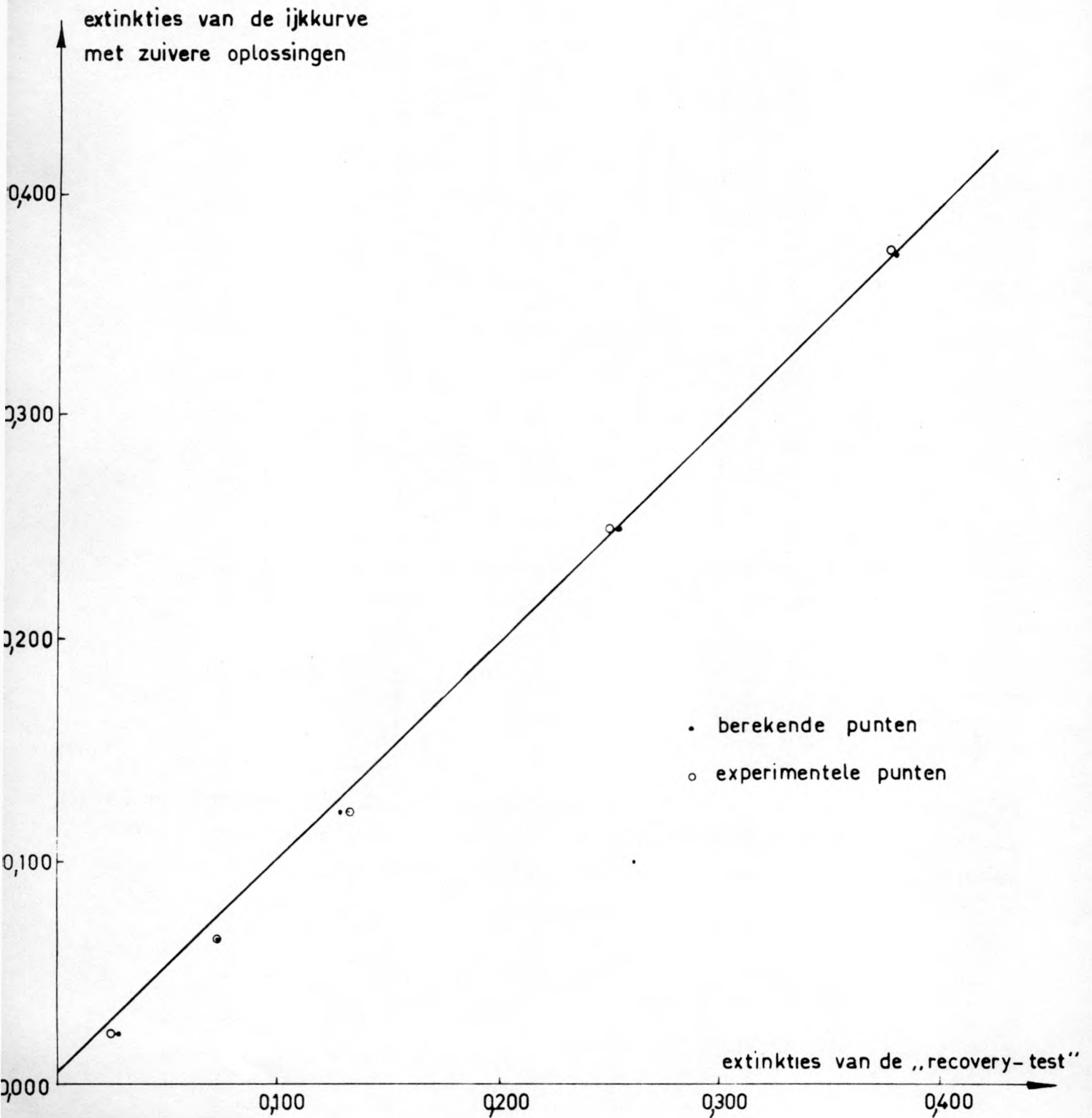
Daar de gevonden waarde b zeer dicht de waarde 1,0000 benadert en het intercept a praktisch gelijk aan 0,0000 is kan worden aangenomen dat de twee ijkcurven gelijk zijn m.a.w. bij de bepaling van het TMA in visvlees treden geen storende invloeden op.

2.2.2.7. Bepalen van de nauwkeurigheid van de methode.

De nauwkeurigheid van de methode wordt nagegaan aan de hand van een reeks dubbelproeven, die over de ganse onderzoeksperiode zijn gespreid. De waarden van ca 10 mg N % worden opgetekend.

Tabel 34 vermeldt de resultaten, alsook de gegevens voor het berekenen van de nauwkeurigheid.

Figuur 6 - Vergelijking tussen de extinktief, opgesteld met zuivere oplossingen, en de extinktief van de „recovery-test“



TABEL 34 - Nauwkeurigheid van de TMA-bepaling (a)

Monsters	Dubbels		Δ	Δ^2
1	11,7	13,3	1,6	2,56
2	8,8	8,2	0,6	0,36
3	8,7	7,5	1,2	1,44
4	8,7	7,6	1,1	1,21
5	7,6	7,1	0,5	0,25
6	9,1	7,8	1,3	1,69
7	7,1	7,5	0,4	0,16
8	8,2	8,5	0,3	0,09
9	7,5	7,6	0,1	0,01
10	7,5	8,6	1,1	1,21
11	7,6	7,1	0,5	0,25
12	8,2	7,1	1,1	1,21
13	9,4	8,2	1,2	1,44
14	7,6	7,5	0,1	0,01
15	8,9	8,3	0,6	0,36
16	7,4	7,5	0,1	0,01
17	7,6	7,7	0,1	0,01
18	7,6	8,4	0,8	0,64
19	7,4	7,4	0,0	0,00
20	10,0	8,4	1,6	2,56
21	9,0	7,5	1,5	2,25
22	7,7	8,7	1,0	1,00
23	7,8	8,0	0,2	0,04
24	7,0	7,0	0,0	0,00
25	7,5	7,1	0,4	0,16
26	9,0	9,8	0,8	0,64
27	9,9	10,4	0,5	0,25
28	8,7	8,4	0,3	0,09
29	10,0	10,9	0,9	0,81
30	9,4	9,4	0,0	0,00
Σ	252,6	248,5		20,71
\bar{x}	8,4	8,3		

(a) De cijfers geven het aantal mg N % weer.

$$s = \sqrt{\frac{20,71}{60}} = \sqrt{0,345} = 0,59$$

De lage waarde van de standaardafwijking wijst er eveneens op dat, niettegenstaande het feit dat er met biologisch materiaal wordt gewerkt, de methode om TMA te doseren nauwkeurig is.

HOOFDSTUK 3 - TECHNOLOGISCHE VERWEZENLIJKINGEN

=====

Daar in de handel verpakkingsmaterialen met verschillende gaspermeabiliteit voorkomen en gezien de grote rol die de zuurstofspanning speelt bij de ontwikkeling van de bacteriën, die grotendeels voor het bederf van de voedingswaren verantwoordelijk zijn, wordt een bederfcurve van de vis in functie van de zuurstofpermeabiliteit van de film opgesteld.

Naast de zuurstof heeft de temperatuur ook een invloed op de ontwikkeling van de mikro-organismen en daarom wordt de invloed van de bewaringstemperatuur op het verloop van de bederfcurve nagegaan.

Aangezien de bederfcurve wordt opgesteld met een reeks films van dezelfde samenstelling wordt vervolgens de toepassingsmogelijkheid van de bederfcurve uitgetest op enkele verpakkingsfolies die verschillen van deze die voor het opmaken van de curve worden aangewend.

Veel films kunnen gekrompen worden zodat de film strak en glad om de portie komt te liggen. Bijgevolg wordt de invloed van het krimpen bestudeerd. Tevens wordt de invloed van de verpakkingsfilm op de grondstof nagegaan.

Als laatste onderzoekingspunt wordt de toevoeging van enkele bewaarstoffen (citroenzuur, kaliumsorbaat) bestudeerd, met het oog op het remmen van sommige bakteriologische afbraakprocessen (reduktie van het TMAO en de desaminering).

3.1. Bederfcurve in functie van de zuurstofdoorlaatbaarheid van de films.

3.1.1. Proefomstandigheden.

3.1.1.1. Grondstof.

Filets van kabeljauw van ca 500 g per stuk worden aangekocht. De keuze van de soort is gebaseerd op de gebruikelijk commerciële praktijk.

3.1.1.2. Verpakkingsmaterialen.

Als drager wordt gebruik gemaakt van een wit gepigmenteerd schokvast polystyreen schaalpje (schokvast polystyreen bevat een bepaald

gehalte butadien wat aan het polystyreen een grotere sterkte geeft).

Polyethyleenfilms van verschillende dikte worden aangewend. Wanneer de dikte van een film toeneemt, neemt de zuurstofdoorlaatbaarheid af. Er wordt beroep gedaan op films van respectievelijk 20/ μ , 30/ μ , 40/ μ , 50/ μ en 100/ μ dik met een zuurstofdoorlaatbaarheid van respectievelijk 3600, 2100, 1800, 1500 en 500 ml zuurstof $m^2/24 \mu/1 \text{ atm}$. Deze films hebben een lage waterdampdoorlaatbaarheid en vertonen tevens geen verschillen met betrekking tot de grondstof. De karakteristieken van deze films zijn in tabel 35 samengevat.

Al de gegevens die in de tabel vermeld staan met inbegrip van de permeabiliteiten zijn statistische gegevens en dienen dus geïnterpreteerd te worden met het nodige begrip voor spreiding. In het verder verloop van de tekst worden eenvoudigheidshalve deze cijfers gebruikt.

3.1.1.3. Behandelingsprocessen.

De portie wordt in het polystyreenschaaltje gelegd. Het geheel wordt vervolgens in een polyethyleenzakje van 26 cm lang en 19 cm breed geschoven, waarna het zakje gesloten wordt door toelassen met een impuls sealapparaat (a).

Daarna wordt de vis in geëxpandeerde polystyreenbakjes van 10 kg inhoud vervoerd (ca 1 u). Op de bodem van de bakjes wordt ijs aangebracht dat met een blad polyethyleen is afgedekt; op de pakjes wordt eenzelfde blad gelegd met ijs erop.

(a) Vrijwel alle plasticfoliën kunnen autogeen worden gelast door 2 technieken.

1) Door warmte.

Hierbij perst een continu verwarmde staaf het materiaal in elkaar waardoor het versmelt.

2) Door warmte-impuls.

Hierbij wordt het materiaal ingeklemd tussen twee bekken. Een hiervan is voorzien van een geleider waarin een korte stroomstoot warmte opwekt waardoor de materialen versmelten.

TABEL 35 - Karakteristieken van de polyethyleenfilms

Karakteristieken	20 _u	30 _u	40 _u	50 _u	100 _u
Gramgewicht g/m ²	18	27,5	37	47	98
Treksterkte LR (a) kg/cm ² DR (b)	240 - 260	170 - 190	170 - 190	170 - 190	170 - 190
Verlenging LR (a) % DR (b)	150 - 200	180 - 200	180 - 220	400 - 500	500 - 700
Waterdamdoorlaatbaarheid g/m ² /24 u/bij 38° C en 90 % RV	15 - 30	15	10 - 12	6 - 12	3 - 6
Doorlaatbaarheid voor O ₂ ml/m ² /24 u/1 atm.	3.600	2.100	1.800	1.500	500
Weerstand tegen : water zuren vetten	zeer goed zeer goed goed	zeer goed zeer goed goed	zeer goed zeer goed goed	zeer goed zeer goed goed	zeer goed zeer goed goed
Invloed van licht	geen	geen	geen	geen	geen
Machinale verwerkbaarheid	goed op semi-automatisch materiaal	goed	goed	goed	goed

(a) LR : Lengterichting

(b) DR : Dwarsrichting

3.1.1.4. Laboratoriumanalysen.

Na 1, 3 en 6 dagen bewaren bij 0° C worden de filets van 10 pakjes op TVB- en TMA-gehalte ontleed. De analyses worden telkens in het dubbel uitgevoerd.

3.1.2. Resultaten.

De resultaten van de TVB- en TMA-bepalingen zijn in tabel 36 vermeld.

TABEL 36 - Resultaten van de TVB- en TMA-bepalingen van kabeljauwfilets, verpakt in polyethyleenfilms met verschillende zuurstofdoorlaatbaarheid (a).

Da- gen	3.600 ml		2.100 ml		1.800 ml		1.500 ml		500 ml	
	20/u		30/u		40/u		50/u		100/u	
	TVB	TMA	TVB	TMA	TVB	TMA	TVB	TMA	TVB	TMA
1	22,1	1,6	20,3	1,7	22,1	1,8	21,0	1,9	21,7	1,8
	19,6	1,5	21,0	1,0	20,3	1,2	22,4	0,9	20,3	0,5
	16,8	0,6	18,9	0,8	18,9	0,9	21,0	0,5	20,3	1,1
	18,9	0,6	20,3	0,9	20,3	0,7	18,2	0,8	19,6	0,8
	23,5	1,7	21,2	1,8	22,4	1,7	21,0	1,9	21,7	1,7
Σ \bar{X}	100,9	6,0	101,7	6,2	104,0	6,3	103,6	6,0	103,6	5,9
	20,2	1,2	20,3	1,2	20,8	1,3	20,7	1,2	20,7	1,2
3	22,4	2,2	23,1	2,3	22,8	2,4	23,5	2,2	23,1	2,3
	22,8	1,8	23,1	2,4	24,5	2,8	24,5	2,6	21,4	3,6
	23,1	3,6	24,5	3,0	22,4	2,9	23,1	2,7	22,8	2,7
	22,4	2,6	23,1	2,8	22,4	3,0	23,1	2,8	23,1	2,7
	28,0	3,1	25,2	3,0	31,5	6,7	26,6	3,4	29,5	4,4
Σ \bar{X}	118,7	13,5	119,0	13,5	123,6	17,8	120,8	13,7	119,9	15,7
	23,7	2,7	23,8	2,7	24,7	3,6	24,2	2,7	24,0	3,1
6	41,3	18,0	48,3	23,9	56,7	34,2	51,8	29,6	51,1	24,1
	36,8	11,8	43,4	19,4	60,2	36,4	58,8	31,0	44,8	19,7
	33,6	10,0	40,6	14,9	49,0	23,6	46,2	18,7	41,3	17,7
	37,1	16,2	43,4	21,5	50,4	28,8	46,2	23,0	44,8	20,9
	47,6	22,5	60,6	36,5	58,1	34,0	56,7	34,3	53,0	29,3
Σ \bar{X}	196,4	78,5	236,3	116,2	274,4	157,0	259,7	136,6	235,0	111,7
	39,3	15,7	47,3	23,2	54,9	31,4	51,9	27,3	47,0	22,3

Als beginkwaliteit wordt genoteerd voor TVB = 18,2 en voor TMA = 0,0

(a) De waarden voor TVB en TMA zijn in mag N % uitgedrukt.

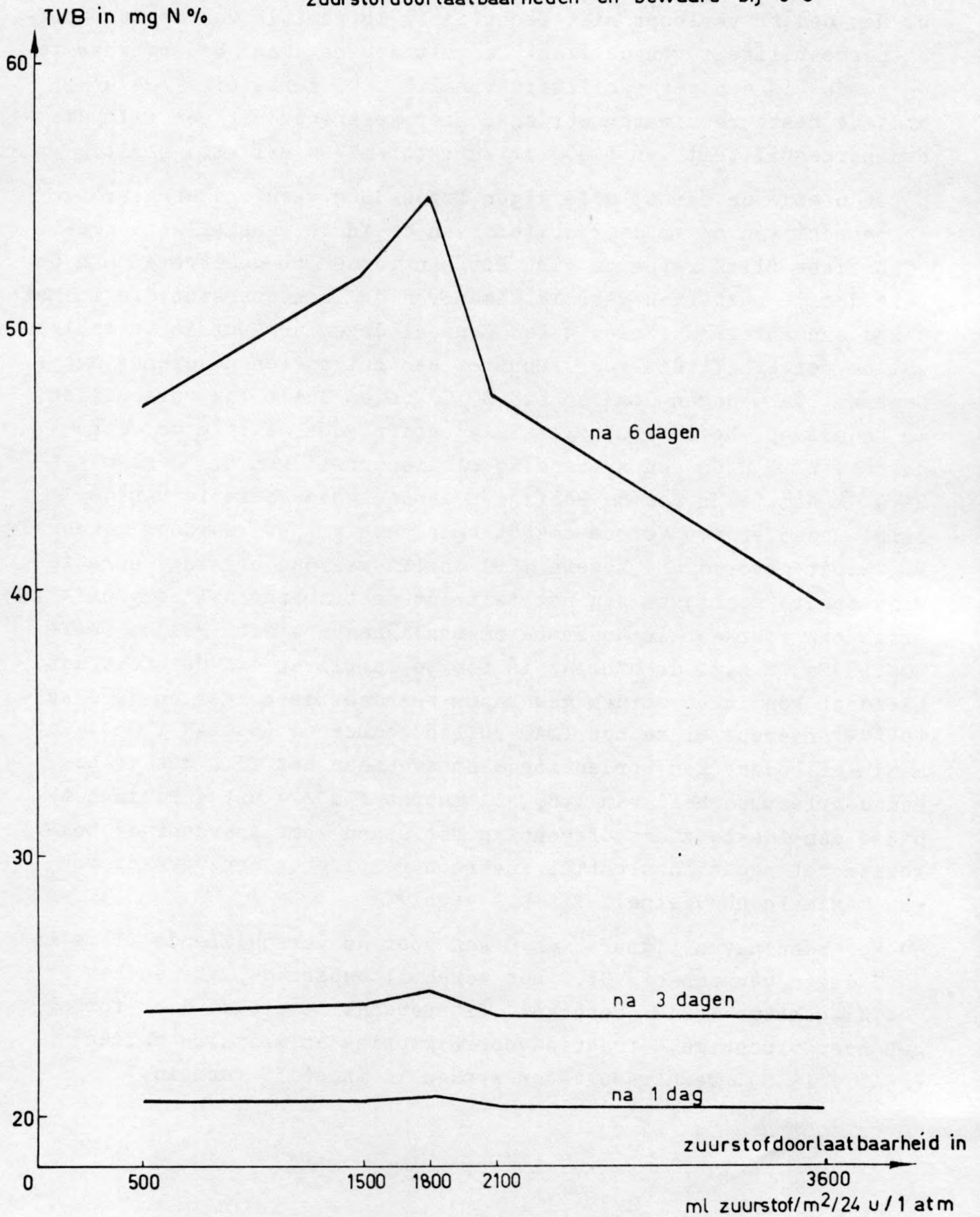
De resultaten zijn eveneens in de figuren 7 en 8 uitgezet.

3.1.3. Bespreking van de resultaten.

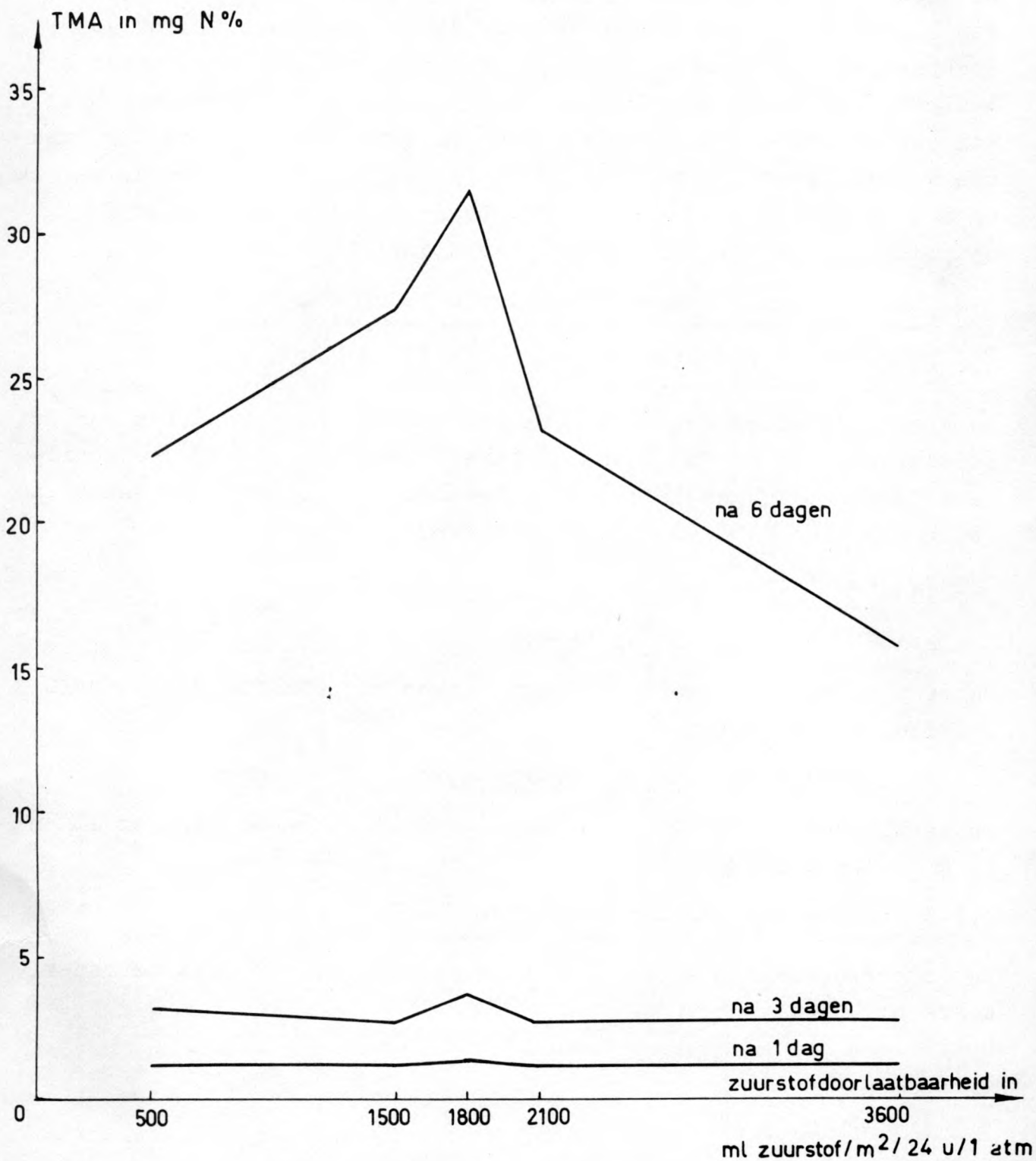
Uit de resultaten weergegeven in tabel 36 en figuren 7 en 8 kunnen volgende besluiten worden getrokken :

- a) Het bederf verloopt niet rechtlijnig in functie van de zuurstofpermeabiliteit van de film. Er valt een maximaal bederf waar te nemen bij een permeabiliteit van $1.800 \text{ ml zuurstof/m}^2/24 \text{ u/ 1 atm.}$ De beste resultaten worden echter verkregen met een film die een permeabiliteit van $3.600 \text{ ml zuurstof/m}^2/24 \text{ u/1 atm.}$ bezit.
- b) Gedurende de eerste drie dagen treden nog geen noemenswaardige verschillen op in de kwaliteit van de in de verschillende gebruikte films verpakte vis. Dit kan worden toegeschreven aan het feit dat de bacteriën gebruik maken van de luchtzuurstof die in het pakje aanvankelijk aanwezig is. Eenmaal deze zuurstof is verbruikt, zal de permeabiliteit voor zuurstof een rol spelen gedurende het bewaren. Na 6 dagen bewaren bij 0° C treden duidelijk verschillen in bederf op. De lage TVB- en TMA-waarden voor de film met een dikte van 20μ en een zuurstofdoorlaatbaarheid van $3.600 \text{ ml/m}^2/24 \text{ u/ 1 atm.}$ zijn toe te schrijven aan de goede aëratie van de film, zodat er een aërobe omzetting plaats grijpt waardoor minder TMA wordt gevormd. De hogere TVB- en TMA-waarden bij lage aëratie zijn toe te schrijven aan het feit dat de trimethylamineoxydeafbraak bij voorkeur in anaërobe omstandigheden plaats grijpt (WATSON 1939a) m.a.w. de afbraak is toe te schrijven aan het feit dat hierdoor condities worden geschapen waardoor de bacteriën op fakultatief anaërobe wijze het TMAO zullen reduceren (SOUDAN 1965). Het maximaal bederf kan worden toegeschreven aan het feit dat er bij een doorlaatbaarheid van $1.800 \text{ ml zuurstof/m}^2/24 \text{ u/1 atm.}$ in het pakje een ideale zuurstofspanning tot stand komt waardoor de bacteriën het meest fakultatief anaëroob respireren met vorming van een maximale hoeveelheid TMA als gevolg.
- c) Met behulp van figuur 7 en 8 kan voor de verschillende films na 6 dagen bewaren bij 0° C het verschil tussen de TVB- en het TMA-gehalte worden berekend. Dit verschil stelt de door formol gebonden vluchtige N-fractie voor (ammoniak en primaire aminen) (BEATTY 1938). Deze resultaten worden in tabel 37 vermeld.

Figuur 7 - Resultaten van de TVB - bepalingen van kabeljauwfilets
verpakt in polyethyleenfilms met verschillende
zuurstofdoorlaatbaarheden en bewaard bij 0°C



Figuur 8 - Resultaten van de TMA - bepalingen van kabeljauwfilets verpakt in polyethyleenfilms met verschillende zuurstofdoorlaatbaarheden en bewaard bij 0°C



TABEL 37 - Aangroei van de door formol gebonden vluchtige N-fractie.

	20/u	30/u	40/u	50/u	100/u
TVB	39,3	47,3	54,9	51,9	47,0
TMA	15,7	23,2	31,4	27,3	22,3
Vershil	23,6	24,1	23,5	24,6	24,7

De resultaten tonen aan dat gedurende een bewaarperiode van 6 dagen bij 0° C de toename van de door formol gebonden vluchtige N-fractie door de zuurstofpermeabiliteit van de film niet wordt beïnvloed, m.a.w. de verschillen in TVB-waarden zijn toe te schrijven aan de wisselende hoeveelheden TMA die worden gevormd in functie van de zuurstofpermeabiliteit. Dit wijst er eveneens duidelijk op dat de TMA-vorming sterk wordt beïnvloed door de zuurstofspanning die in het pakje wordt verwezenlijkt.

3.2. Invloed van de temperatuur op de bederfcurve.

3.2.1. Proefomstandigheden.

De proefomstandigheden zijn dezelfde als bij het opstellen van de bederfcurve bij 0° C. Alleen de bewaartemperaturen zijn verschillend (3° en 6° C) en de proef is tweemaal uitgevoerd. De ontledingen geschieden na 1 en 2 dagen bewaren.

3.2.2. Resultaten.

3.2.2.1. Resultaten van de bewaringsproef bij 3° C.

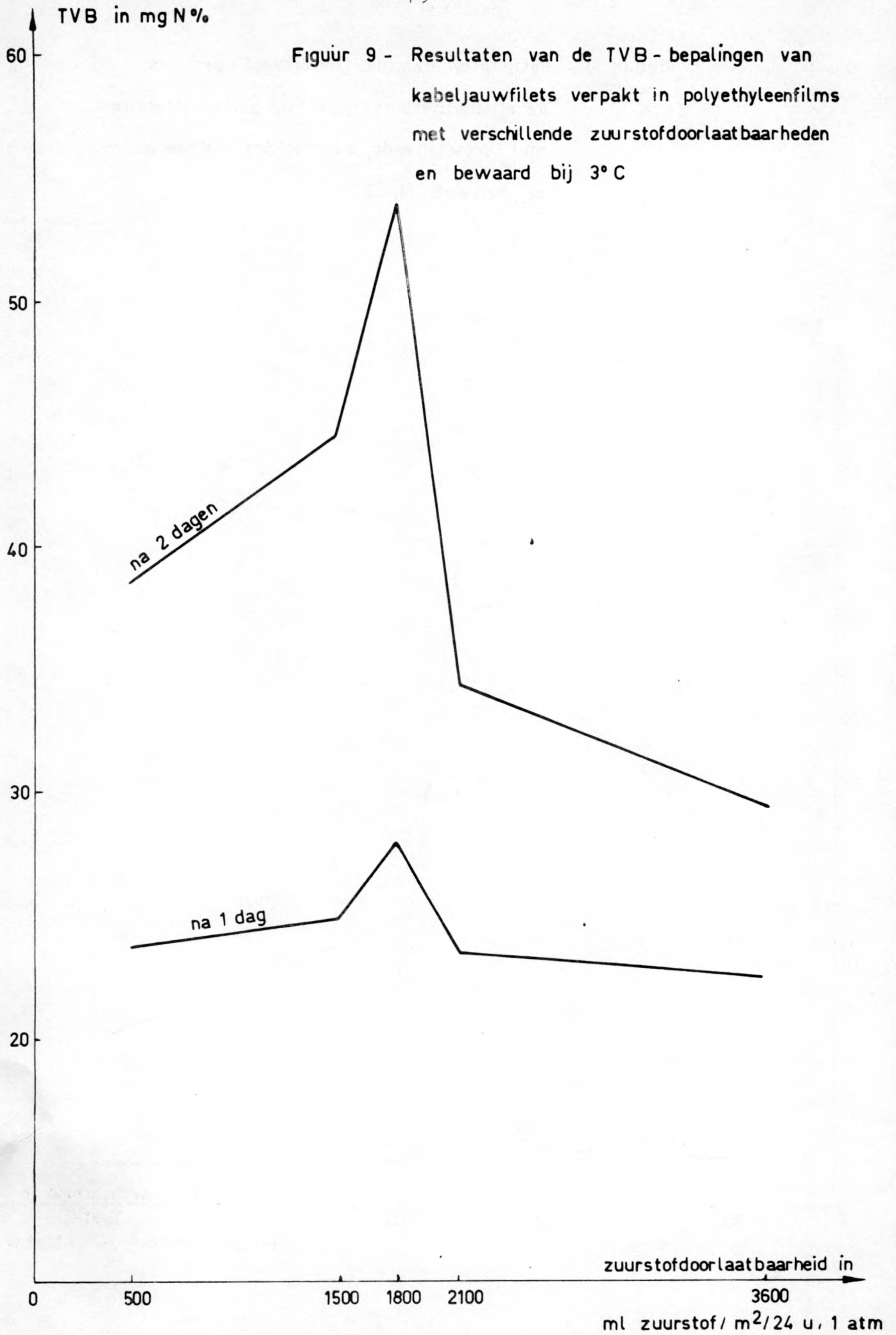
De resultaten van TVB- en TMA-bepalingen zijn in figuren 9 en 10 grafisch weergegeven.

3.2.2.2. Resultaten van de bewaringsproef bij 6° C.

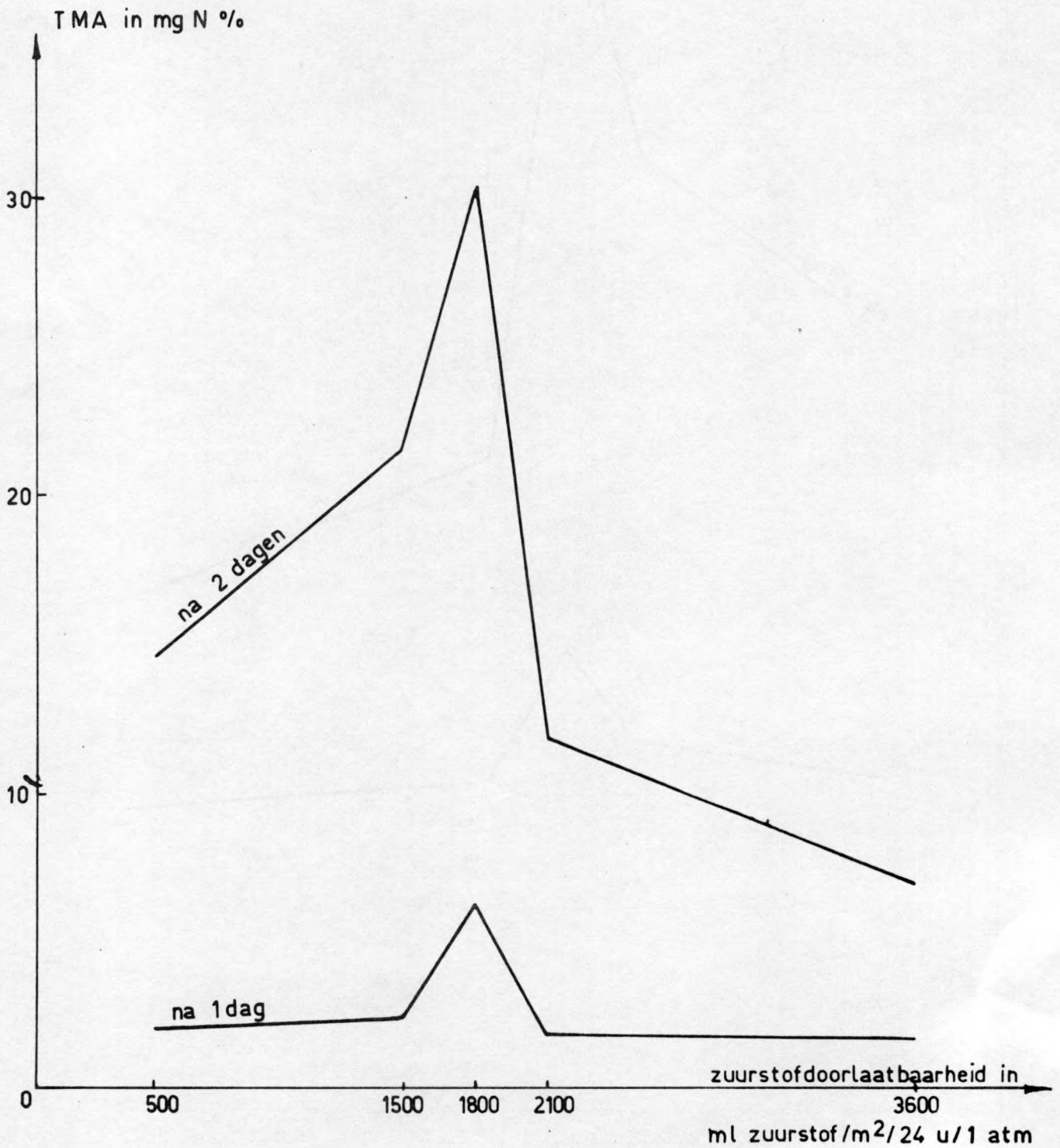
De resultaten van de TVB- en TMA-bepalingen zijn in figuren 11 en 12 grafisch uitgezet.

3.2.3. Bespreking van de resultaten.

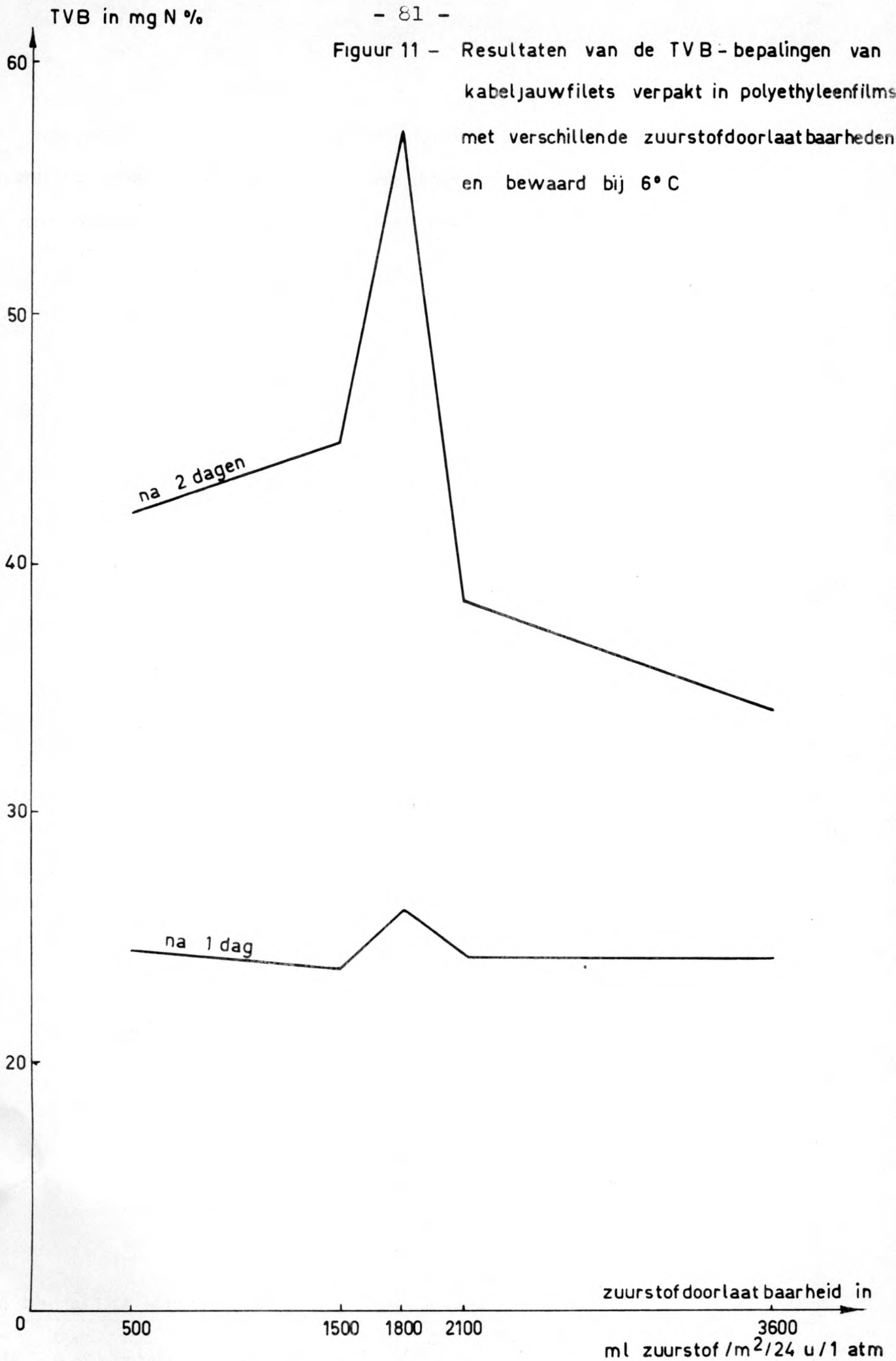
De bederfcurven bij 3° en 6° C hebben dezelfde vorm als de bederfcurve bij 0° C.



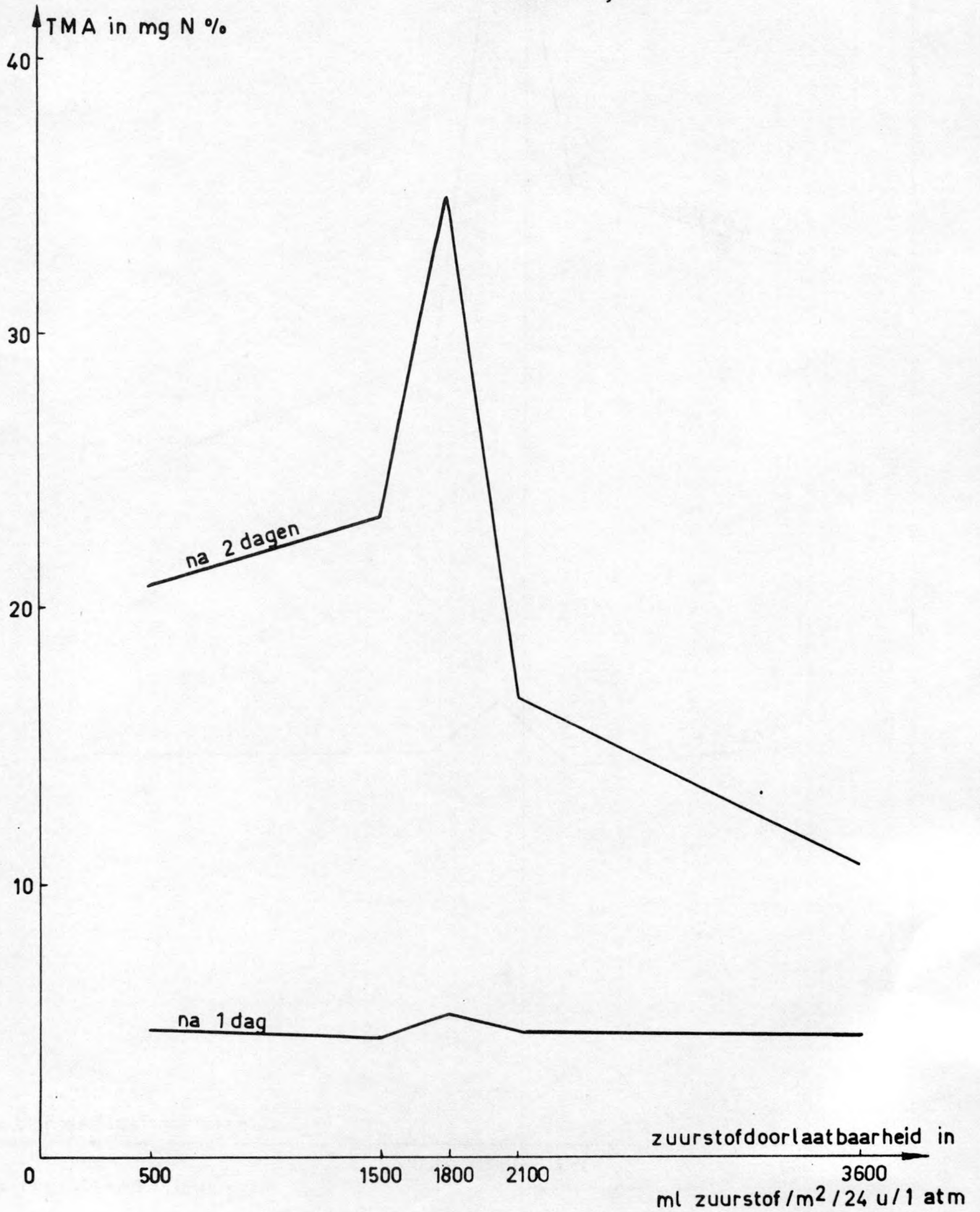
Figuur 10 - Resultaten van de TMA-bepalingen van kabeljauwfilets verpakt in polyethyleenfilms met verschillende zuurstofdoorlaatbaarheden en bewaard bij 3°C



Figuur 11 - Resultaten van de TVB-bepalingen van kabeljauwfilets verpakt in polyethyleenfilms met verschillende zuurstofdoorlaatbaarheden en bewaard bij 6° C



Figuur 12 - Resultaten van de TMA - bepalingen van kabeljauwfilets verpakt in polyethyleenfilms met verschillende zuurstofdoorlaatbaarheden en bewaard bij 6°C



Hier kan eveneens het verschil worden berekend tussen de TVB-stikstof en de TMA-stikstof m.a.w. de fraktie die door formol wordt gebonden.

De resultaten zijn weergegeven in tabellen 38 en 39.

TABEL 38 - Aangroei van de door formol gebonden vluchtige N-fraktie bij 3° C (a).

Dagen	3600 ml 20/u	2100 ml 30/u	1800 ml 40/u	1500 ml 50/u	500 ml 100/u
1	20,7	21,7	21,7	22,6	21,8
2	22,5	23,4	23,8	23,0	23,9

(a) de getallen geven het aantal mg N % aan.

TABEL 38 - Aangroei van de door formol gebonden vluchtige N-fraktie bij 6° C (a).

Dagen	3600 ml 20/u	2100 ml 30/u	1800 ml 40/u	1500 ml 50/u	500 ml 100/u
1	19,7	19,6	20,9	19,4	19,8
2	23,3	21,5	22,3	21,5	21,2

(a) de getallen geven het aantal mg N % aan.

De resultaten tonen aan, dat de vorming van de door formol gebonden N-fraktie door de zuurstofpermeabiliteit van de gebruikte films praktisch niet wordt beïnvloed met uitzondering van de film van 20/u dik, waar de hoge zuurstofpermeabiliteit reeds een nadelige invloed blijkt uit te oefenen op de vorming van door formol gebonden stikstofbestanddelen na 2 dagen bewaren bij 6° C.

Deze resultaten lopen parallel met deze gevonden bij 0° C wat tevens een bevestiging is van het hierboven vermeldde.

3.3. Toepassingsmogelijkheden van de bederfcurve.

Om de toepassingsmogelijkheden van de bederfcurve op andere verpakkingsmaterialen na te gaan wordt een vergelijkende studie uitgevoerd tussen een polyethyleenfilm, een polyvinylchloridefilm en een laminaat dat is samengesteld uit geregeneerde cellulose en polyethyleen. Dit zijn 3 films met een lage waterdampdoorlaatbaarheid doch verschillende zuurstofpermeabiliteit. De verpakkingsproeven worden uitgevoerd op kabeljauwfilets en schol.

3.3.1. Verpakkingsproeven op kabeljauwfilets.

3.3.1.1. Proefomstandigheden.

3.3.1.1.1. Grondstof.

De grondstof is van zelfde soort en gewicht als in de vorige proeven.

3.3.1.1.2. Verpakkingsmaterialen.

Als drager wordt eveneens het wit gepigmenteerd schaalpje in schokvast polystyreen gebruikt.

De eigenschappen van de films zijn in tabel 40 opgenomen.

TABEL 40 - Karakteristieken van de films die worden aangewend, om de toepassingsmogelijkheden van de bederfcurve na te gaan.

Karakteristieken	Polyethyleen	Polyvinylchloride	Laminaat
Gramgewicht g/m ²	18	23,5	83
Dikte in μ	20	18	74
Treksterkte LR(a) kg/cm ² DR(b)	240-260 120-140	700 700	3,3 2,2
Verlenging LR (a) in % DR (b)	150-200 450-500	90 80	20-25 80-90
Waterdampdoorlaat- baarheid g/m ² /24 u bij 38° C en bij 90 % RV	15-30	100	5
Zuurstofdoorlaat- baarheid ml/m ² /24 u /1 atm.	3.600	2.700	0
Weerstand tegen : water	zeer goed	zeer goed	zeer goed kant poly- ethyleen, goed kant cellofaan
zuren vetten	zeer goed goed	goed goed	idem goed
Invloed licht	geen	praktisch geen	geen

Machinale ver- werkbaarheid	goed op semi- automatisch materiaal	goed	goed
--------------------------------	---	------	------

- (a) LR : Lengterichting
- (b) DR : Dwarsrichting

3.3.1.1.3. Laboratoriumanalysen.

Na 1, 3 en 6 dagen bewaren bij 0° C worden filets van 10 pakjes op TVB- en TMA-gehalte ontleed.

De analyses worden telkens in het dubbel uitgevoerd. De proef is driemaal herhaald.

3.3.1.2. Resultaten.

De resultaten van de TVB- en TMA-bepalingen zijn in figuur 13 en 14 weergegeven.

3.3.1.3. Bespreking van de resultaten.

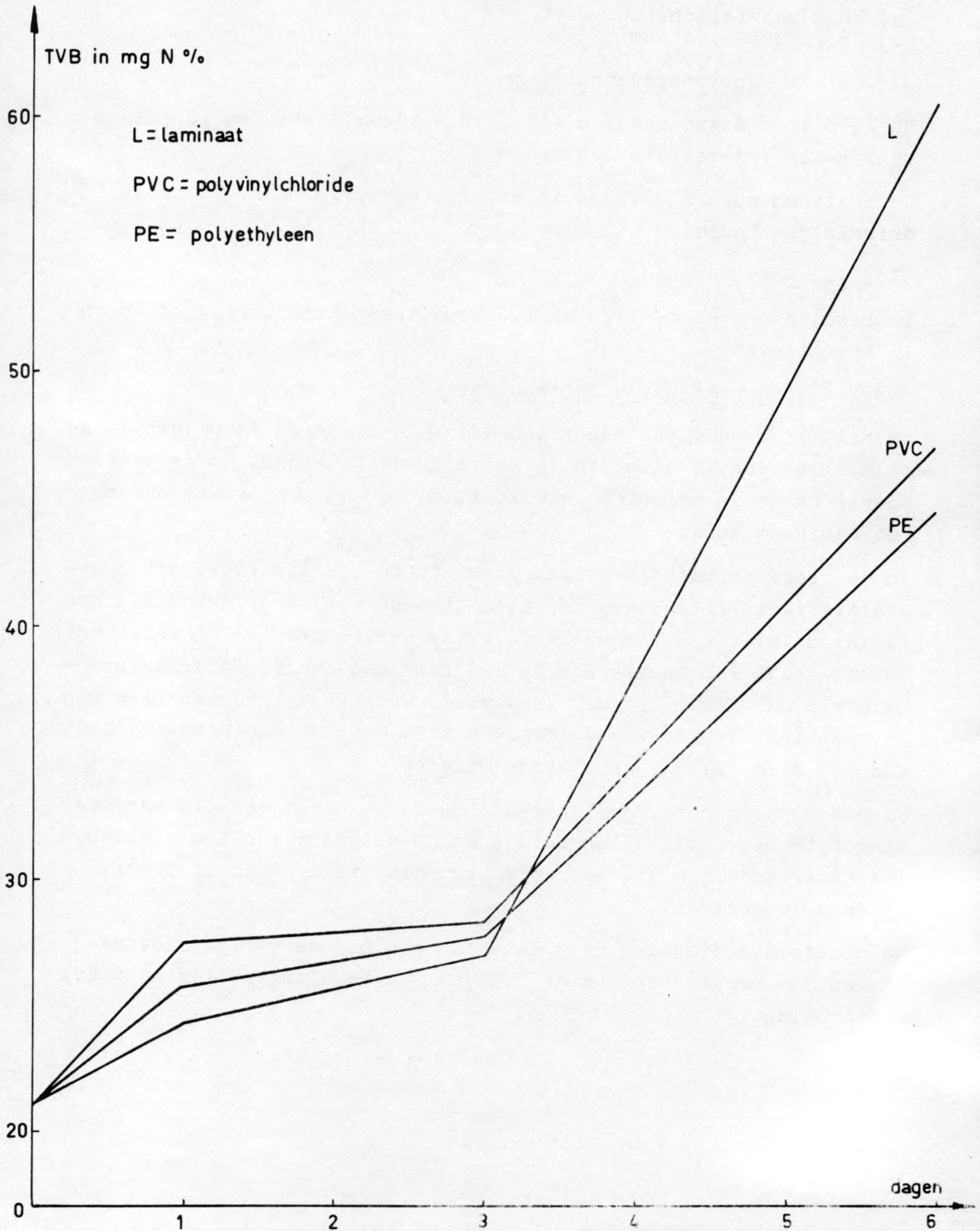
De bekomen resultaten tonen aan dat filets die in de polyethyleenfilm zijn verpakt de beste versheidsgraad behouden. Op de tweede plaats staat de polyvinylchloridefilm, terwijl op de derde rang het laminaat komt.

In de reeks polyethyleenfilms waarmede de bederfcurve wordt opgesteld is geen film opgenomen die 0 ml zuurstof doorlaat zoals het laminaat. Hier kan bijgevolg de vraag worden gesteld in welke mate de kwaliteit van de vis die in een film met zuurstofdoorlaatbaarheid van ca 0 ml/m²/24 u/1 atm. wordt verpakt zal verschillen van de kwaliteit van de vis die in een film met zuurstofpermeabiliteit van 500 ml/m²/24 u/1 atm. wordt verpakt.

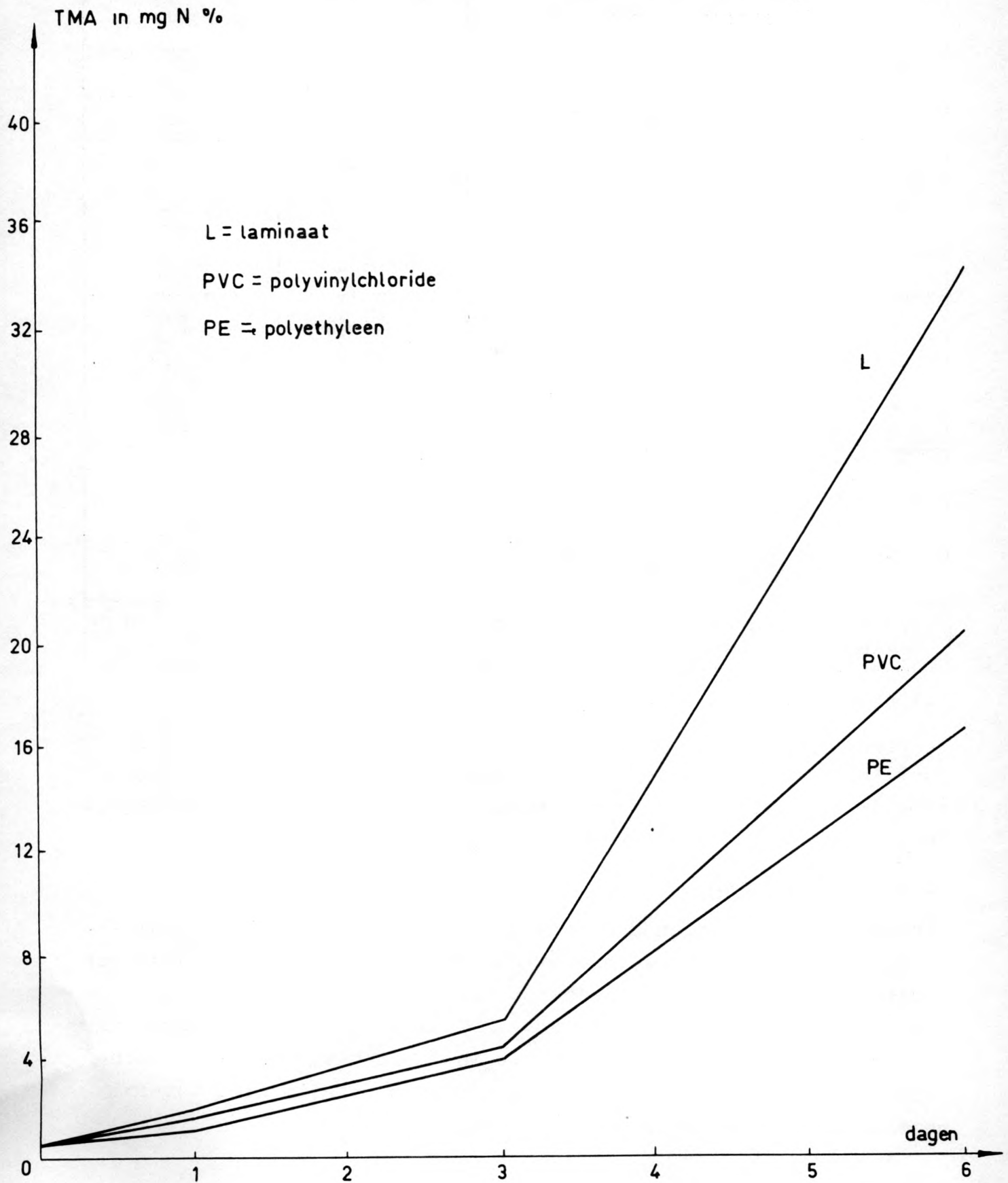
Hiervoor wordt een vergelijkende proef aangelegd met als verpakingsfilm het laminaat enerzijds en de polyethyleenfilm van 100 μ dik anderzijds. De eigenschappen van deze films zijn in tabel 35 en 40 opgegeven.

De proefomstandigheden zijn dezelfde als bij de vorige proefnemingen. De resultaten van de TVB- en TMA-bepalingen zijn in tabel 41 vermeld.

Figuur 13- Resultaten van de TVB - bepalingen op kabeljauwfilets die zijn verpakt in verschillende soorten films



Figuur 14 - Resultaten van de TMA - bepalingen op kabeljauwfilets die zijn verpakt in verschillende soorten films



TABEL 41 - Resultaten van de TVB- en TMA-bepalingen van vis verpakt in films met een zuurstofpermeabiliteit van 500 ml en 0 ml (a).

Dagen	Zuurstofpermeabiliteit = 500 ml/m ² /24 u/1 atm. (polyethyleen 100/u dik)		Zuurstofpermeabiliteit = ca 0 ml/m ² /24 u/1 atm. (laminaat)	
	TVB	TMA	TVB	TMA
1	21,0 19,6 20,3	1,6 0,7 1,2	21,7 18,9 18,9	1,3 0,8 0,9
Σ \bar{X}	60,9 20,3	3,5 1,2	59,5 19,8	3,0 1,0
3	23,1 21,0 22,8	2,4 2,2 2,3	22,4 20,3 22,4	2,7 1,4 3,9
Σ \bar{X}	66,9 22,3	6,9 2,3	65,1 21,7	8,0 2,7
6	51,8 42,4 42,0	22,8 18,4 17,3	50,4 42,0 43,4	26,8 14,2 17,9
Σ \bar{X}	136,2 45,4	58,5 19,5	135,8 45,3	58,9 19,6
Op de dag van de verpakking is de begin TVB-waarde = 22,0 en de begin TMA-waarde = 0,4.				

(a) De TVB- en TMA-waarden zijn in mg N % uitgedrukt.

De resultaten wijzen duidelijk uit, dat er geen verschil is in kwaliteit tussen de vis die wordt verpakt in een film met zuurstofpermeabiliteit van 500 ml en een film met zuurstofpermeabiliteit van ca 0 ml.

3.3.1.4. Besluiten.

Uit deze proefnemingen kan worden besloten, dat een polyethyleenfilm met zuurstofdoorlaatbaarheid van 3.600 ml/m²/24 u/1 atm. een betere kwaliteit aan de grondstof biedt dan een polyvinylchloridefilm met een permeabiliteit van 2.700 ml/m²/24 u/1 atm. Rekening houdend met de bederfcurve ligt dit in de lijn van de verwachtingen. Dit betekent eveneens dat de aard van de film niet determinerend is doch wel de zuurstofpermeabiliteit.

Tevens kan worden vastgesteld dat er tussen een film met zuurstofdoorlaatbaarheid van $500 \text{ ml/m}^2/24 \text{ u/l atm.}$ en van ca $0 \text{ ml/m}^2/24 \text{ u/l atm.}$ geen verschil optreedt, m.a.w. in beide gevallen heeft het bederf praktisch een anaëroob karakter.

3.3.2. Verpakkingsproeven op schol.

3.3.2.1. Proefomstandigheden.

3.3.2.1.1. Grondstof.

Schol van ongeveer 5 dagen oud bij het begin van de proef wordt aangewend. De keuze van de vis is gebaseerd op de gebruikelijke commerciële praktijk.

3.3.2.1.2. Verpakkingsmaterialen.

Dezelfde verpakkingsmaterialen als bij de proef op kabeljauwfilets worden gebruikt.

3.3.2.1.3. Behandelingsprocessen.

Schol van 4 stuks per kilogram wordt gekozen. Ieder pakje bevat twee stuks. De behandelingsprocessen zijn dezelfde als voor kabeljauwfilets.

3.3.2.1.4. Laboratoriumanalysen.

Na 1, 3 en 6 dagen bewaren bij 0° C worden de vissen van 10 pakjes op het TVB- en het TMA-gehalte ontleed alsmede op totaal aantal aërobe bacteriën per cm^2 huid en totaal aantal aërobe bacteriën per gram visvlees. De analyses worden telkens in het dubbel uitgevoerd.

3.3.2.2. Resultaten.

Aan de hand van de resultaten van de chemische en de bacteriologische analyses kunnen figuren 15, 16, 17 en 18 worden opgemaakt.

3.3.2.3. Besprekingen.

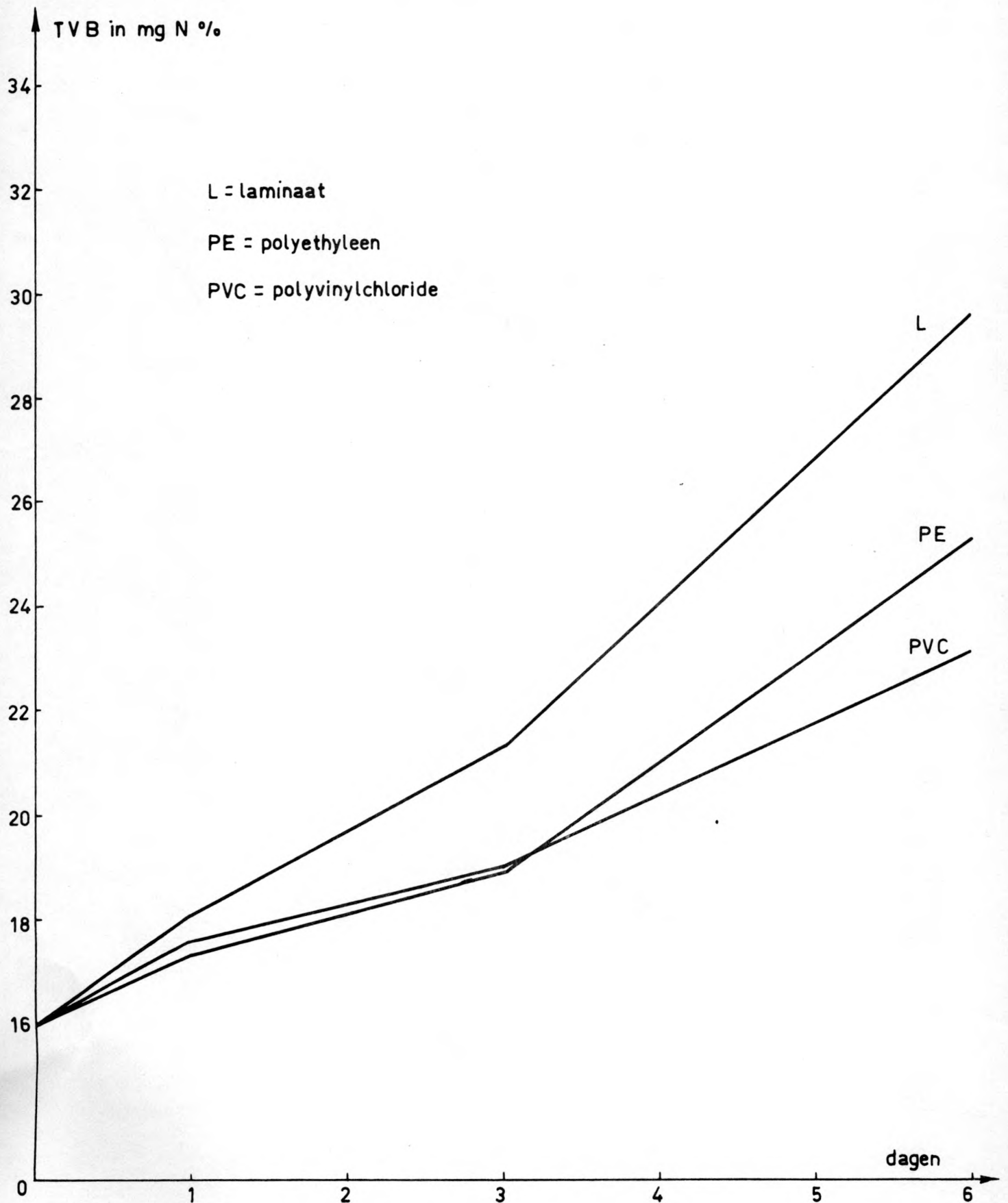
De resultaten van de TVB- en TMA-bepalingen tonen aan dat de polyvinylchloridefilm met $2,700 \text{ ml}$ zuurstofpermeabiliteit de beste resultaten geeft met daarna de polyethyleenfilm met 3.600 ml zuurstofdoorlaatbaarheid terwijl het laminaat die geen O_2 doorlaat de slechtste resultaten boekt. Dit verschijnsel is te wijten aan de besmettingsgraad van het visvlees die een zelfde beeld van bederf geeft als de chemische ontledingen. Het logaritme van het totaal aantal bacteriën per cm^2 huid integendeel geeft een gans

ander beeld dan de overige drie kwaliteitsbepalingen. Volgens deze objektieve kwaliteitsbepalingsmethode zou het laminaat de beste resultaten afwerpen en de polyethyleenfilm de slechtste, terwijl de kwaliteit van de vis die in de polyvinylchloridefilm is verpakt een waarde heeft die tussen de waarde ligt van de vis die in het laminaat en de vis die in de polyethyleenfilm wordt verpakt.

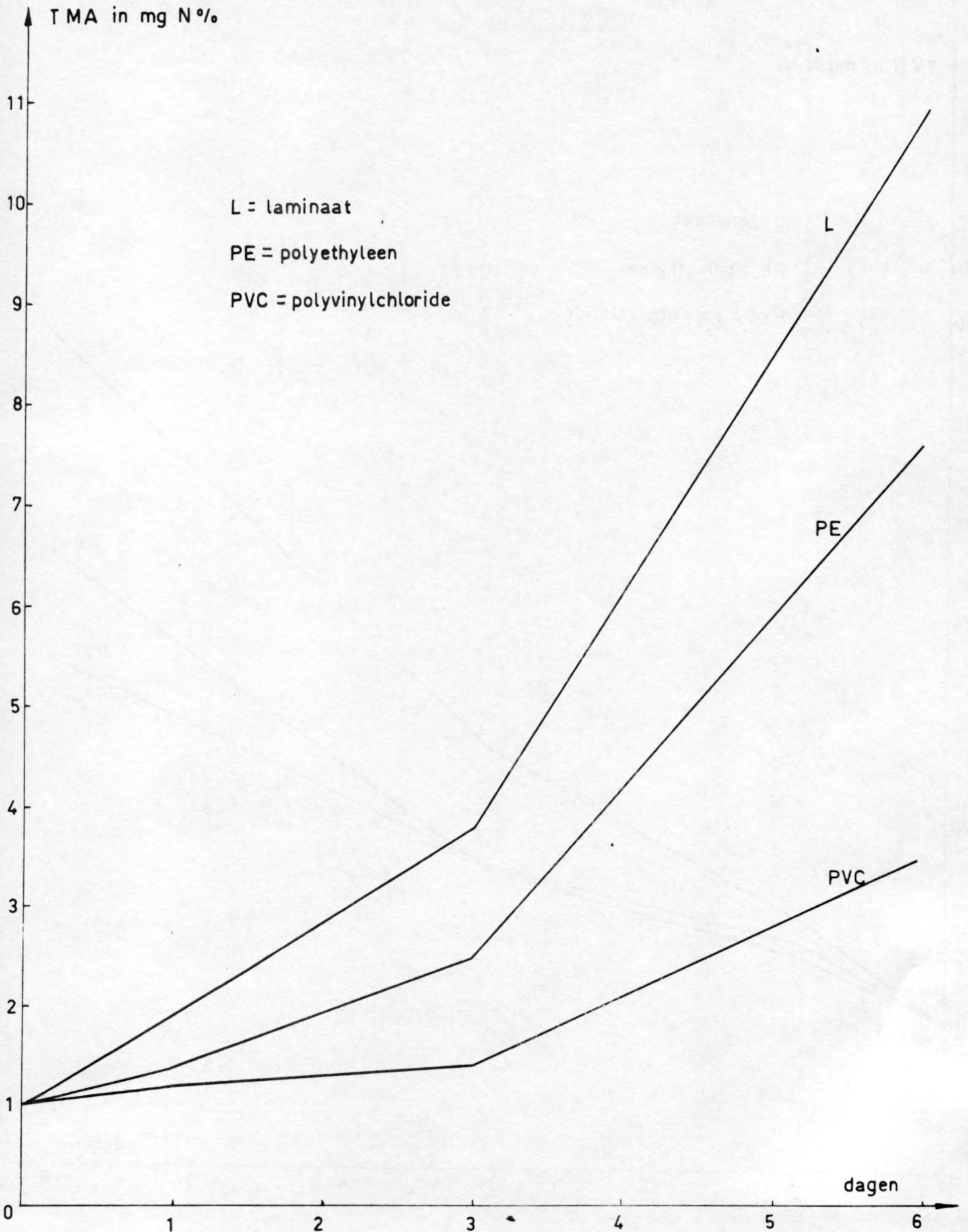
Dit verschijnsel zou kunnen verklaard worden aan de hand van de zuurstofpermeabiliteiten van de films. De polyethyleenfilm heeft immers een permeabiliteit voor zuurstof van gemiddeld $3.600 \text{ ml/m}^2/24 \text{ u/l atm.}$, terwijl de zuurstofdoorlaatbaarheid van de polyvinylchloridefilm 2.700 ml bedraagt en die van het laminaat ongeveer nul is. Dit kan voor gevolg hebben dat er op de huid van de vis bij een hoge doorlaatbaarheid, zoals dit bij polyethyleen het geval is, een sterke ontwikkeling van aërobe bacteriën plaats grijpt, zodat de bacteriën, nadat de huid volledig aangetast is, het vlees zullen binnendringen. Daartegenover zullen bij een ondoorlatende film de bacteriën, die aan de oppervlakte van de vis leven, belet worden te groeien en zullen zij naar binnen treden om de weinige zuurstof die daar nog aanwezig is op te gebruiken; tevens zal dit voor gevolg hebben dat een gedeelte van de mikro-organismen op een fakultatief anaërobe wijze zal ontwikkelen. Daar volgens WATSON (1939a) zulke mikro-organismen voornamelijk verantwoordelijk zijn voor de reductie van het TMAO in vis, zal het gehalte aan TMA sterk toenemen. Er moet aldus ergens een vergelijk worden gevonden tussen die twee doorlaatbaarheden. De polyvinylchloridefilm blijkt hier bevredigend te werken. Samengevat komt het er dan ook op aan de bakteriëngroei op de huid normaal te laten evolueren; het bederf op de huid wordt immers bij konsumptie uiteraard niet zo sterk waargenomen. Da bakteriëngroei mag evenwel niet te veel worden bevorderd, doch moet anderzijds ook niet worden tegengewerkt door het gebruik van extreem hoge of lage zuurstofdoorlaatbaarheidswaarden.

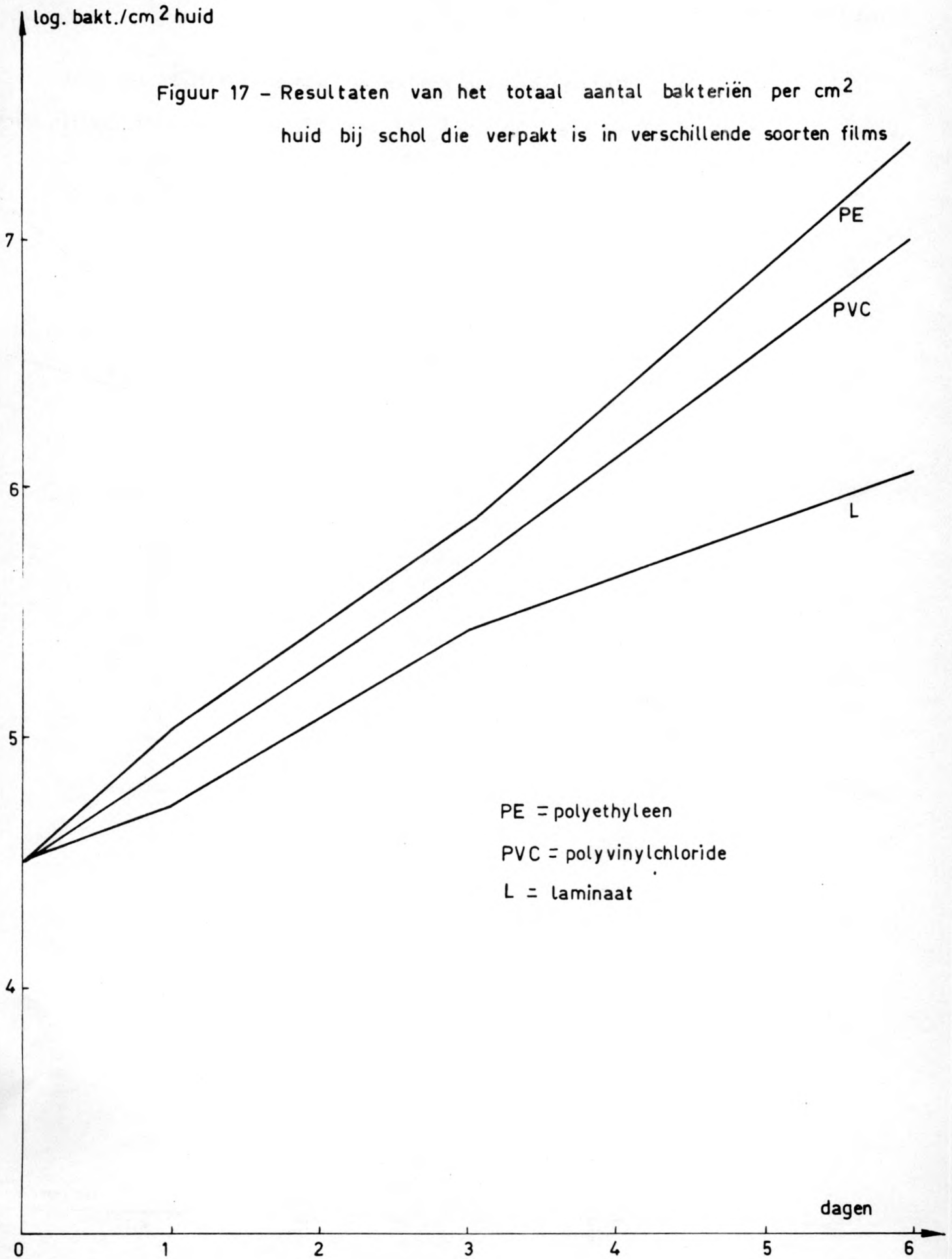
Deze hypothese wordt door de bekomen resultaten bevestigd. Het hoog aantal bacteriën per cm^2 huid van vis die in polyethyleen wordt voorverpakt, korrespondeert met een hoge waarde aan bacteriën per cm^2 huid van de vis die in het laminaat wordt voorverpakt, hetgeen eveneens overeenkomt met een hoge waarde aan bacteriën in het visvlees. Het aantal bacteriën ligt hier echt nog
hoger dan

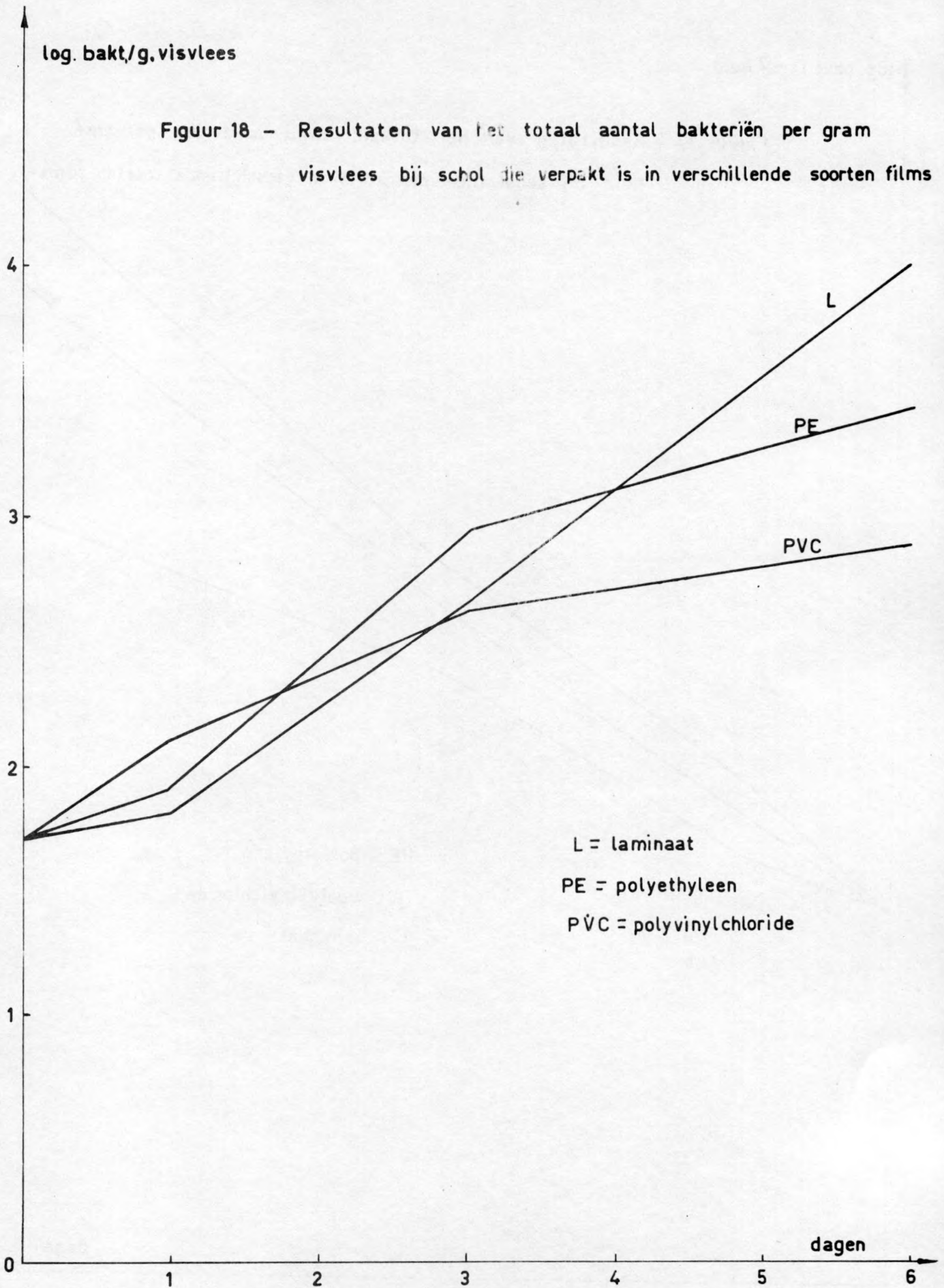
Figuur 15- Resultaten van de TVB-bepalingen op schol die verpakt is in verschillende soorten films



Figuur 16 - Resultaten van de TMA - bepalingen op schot die verpakt is in verschillende soorten films







bij vis die in de polyethyleenfilm wordt verpakt en dit zou kunnen te wijten zijn aan de groei van de fakultatief anaëroben en eventueel anaëroben. De middelmatige hoeveelheid bacteriën op de huid van de in polyvinylchloride verpakte vis geeft het laagste aantal bacteriën in het visvlees.

De bekomen resultaten wijzen er nogmaals op dat het bederf door lagere zuurstofspanningen in de hand wordt gewerkt.

3.3.3. Besluit.

In tegenstelling met de resultaten van de proeven op filets zal er bij het voorverpakken van gehele vis moeten worden gestreefd naar het gebruik van een film die een zuurstofdoorlaatbaarheid bezit die niet te hoog en ook niet te laag is. Bijgevolg kan er hier worden geopteerd voor een film met een zuurstofdoorlaatbaarheid van ca 2.700 ml/m²/24 u/1 atm.

3.4. Invloed van het krimpen.

In de moderne verpakkingsmethoden wordt nu veel beroep gedaan op de krimpstechniek. Hiervoor zijn speciale materialen nodig die derwijze gefabriceerd zijn dat ze onder invloed van warmte gaan krimpen.

Het verloop van de verpakking is als volgt :

- 1) het voorwerp wordt in het zakje geplaatst
- 2) het zakje wordt gesloten
- 3) het geheel gaat door een tunnel met regelbare temperatuurinstelling. Hierdoor krimpt de film en komt strak en glad om de portie te liggen.

Tot hiertoe zijn de films niet gekrompen geweest omdat volgens de wet van Fick (a) (DUBOIS 1968) de zuurstofpermeabiliteit afneemt met toenemende dikte en bijgevolg de doorlaatbaarheid telkens opnieuw zou moeten worden gemeten.

(a) Wet van Fick : $Q = - D \frac{dc}{dx}$ waarin Q de hoeveelheid gas die diffundeert, c de concentratie, x de dikte en D de diffusiecoëfficiënt voorstellen.

Om de invloed van het krimpen na te gaan worden vergelijkende proeven aangelegd met schol die wordt verpakt in een polyethyleenfilm met een zuurstofpermeabiliteit van 3.600 ml waarvan een gedeelte van de pakjes wordt gekrompen en in de polyvinylchloridefilm met een zuurstofdoorlaatbaarheid van 2.700 ml waarvan eveneens een gedeelte van de pakjes wordt gekrompen.

3.4.1. Proefomstandigheden.

3.4.1.1. Grondstof.

Schol van ongeveer 5 dagen oud bij het begin van de proef. De keuze van de soort is gebaseerd op de gebruikelijke commerciële praktijk.

3.4.1.2. Verpakkingsmaterialen.

Het wit gepigmenteerd schokvast schaaltje uit polystyreen wordt gebruikt.

De verpakking geschiedt met de polyethyleenfilm van 20/ μ dik en de polyvinylchloridefilm van 18/ μ dik. De eigenschappen van deze films zijn in tabel 40 samengevat.

3.4.1.3. Behandelingsprocessen.

Het verpakken gebeurt op indentieke wijze als in de vorige proeven, doch na het verpakken wordt bij een gedeelte van de pakjes de film gekrompen. Het krimpen van een polyethyleenfilm gebeurt bij 160° C luchttemperatuur in een tunnel die 2 m lang is en waarin het pakje gedurende 10 seconden verblijft. Het krimpen van de polyvinylchloridefilm geschiedt bij 105° C luchttemperatuur gedurende 3 seconden en de tunnel is hier slechts een halve meter lang. Bij het krimpen ondergaat de vis geen opwarming aanzien al de warmte omgezet wordt in energie die nodig is om de film te krimpen (DELEST 1969). Temperatuurmetingen met sondethermometers tonen ~~aan~~ de temperatuur in de vis konstant blijft.

3.4.1.4. Laboratoriumanalysen.

Na 1, 3 en 6 dagen bewaren bij 0° C worden 10 pakjes ontleed in duplo naar het totaal aantal bacteriën per cm² huid en per gram visvlees alsook op TVB- en TMA-gehalte.

De proeven worden driemaal uitgevoerd.

3.4.2. Resultaten.

De resultaten van de proefnemingen zijn grafisch weergegeven in figuren 19, 20, 21 en 22.

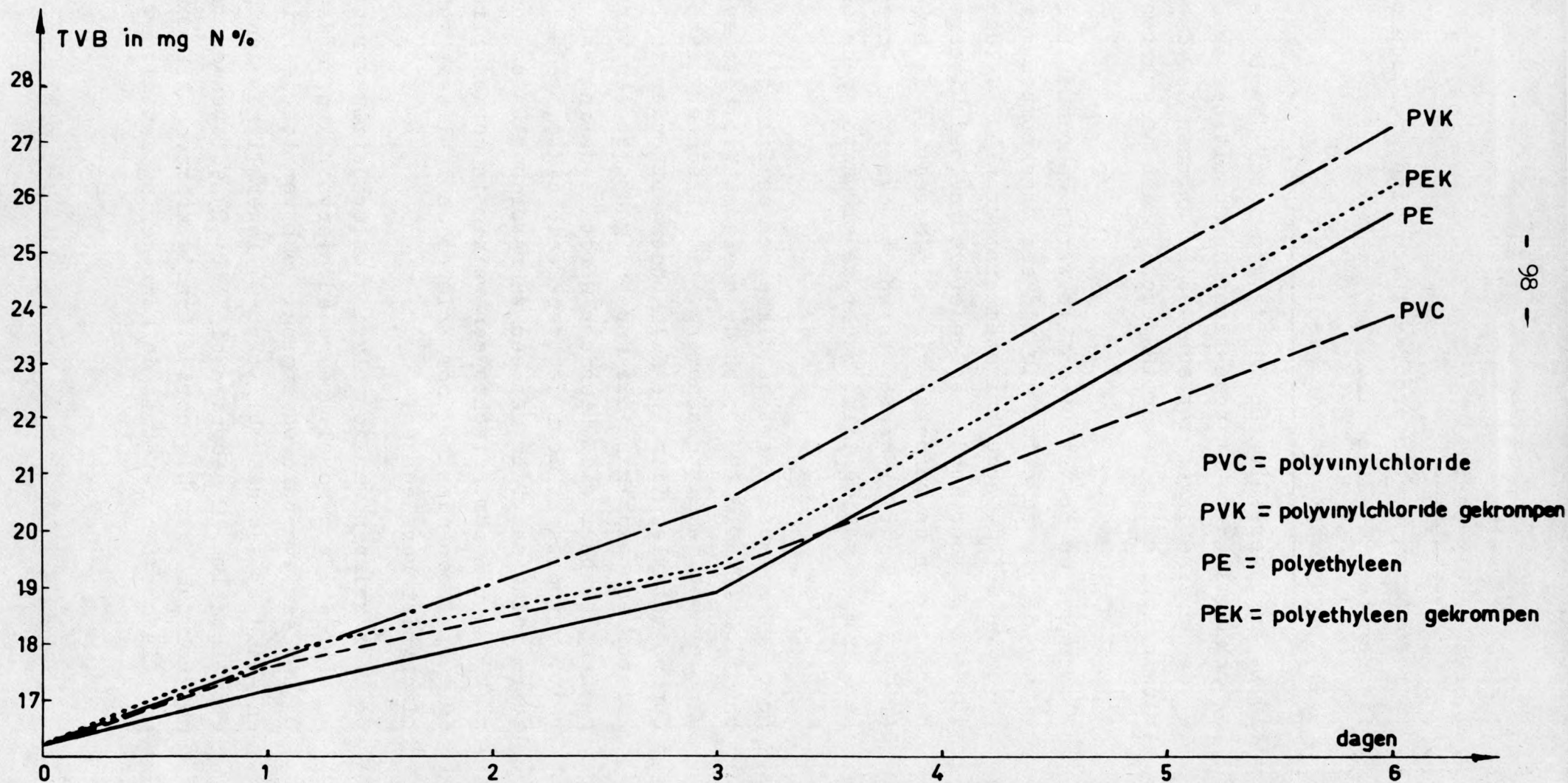
3.4.3. Bespreking van de resultaten.

- 1) De analyseresultaten van de grondstof die in de ongekrompen pakjes is verpakt bevestigen de resultaten bekomen gedurende de proefnemingen met schol die aantonen dat de gebruikte polyvinylchloridefilm beter is geschikt dan de gekozen polyethyleenfilm.
- 2) Wanneer de polyethyleenfilm wordt gekrompen blijft de kwaliteit van de vis dezelfde als bij een ongekrompen verpakking. Dit wijst er op dat de hoge krimptemperatuur (160° C luchttemperatuur gedurende 10 seconden) geen nadelige invloed uitoefent op de bewaarbaarheid van de verpakte vis. Dit bevestigt de bewering van DELEST (1969), nl. dat al de warmte wordt omgezet in energie nodig voor het krimpen van de film, zodat de grondstof geen opwarming ondergaat.

Door het krimpen neemt de dikte van de film toe. Volgens de wet van FICK (DUBOIS 1968) zou de gaspermeabiliteit evenredig moeten afnemen met de diktetoeëneming. Dit is echter niet het geval met een polyethyleenfilm. De film ondergaat onder invloed van het krimpen een wijziging die gepaard gaat met een verhoging van de gasdoorlaatbaarheid. Hierdoor wordt de daling aan gaspermeabiliteit, veroorzaakt door de toenemende dikte, gedeeltelijk gecompenseerd zodat een film met een zuurstofdoorlaatbaarheid van 3.600 ml/m²/24 u/1 atm. slechts een weinig in permeabiliteitswaarde zal afnemen. Zodoende zal door krimpen de kwaliteit van de vis praktisch niet verslechteren.

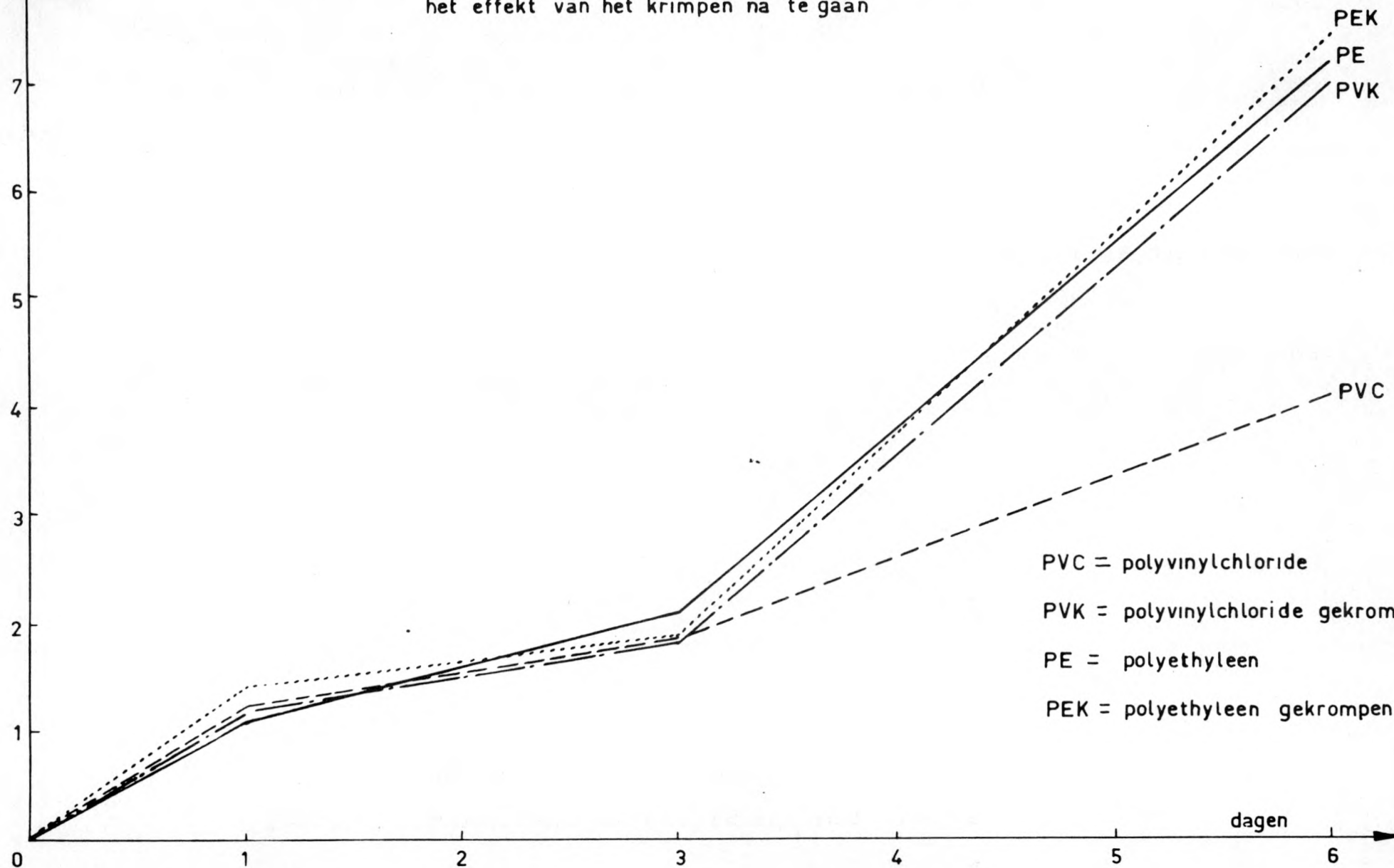
- 3) Door krimpen van de polyvinylchloridefilm verandert de bewaarbaarheid van schol. De reden hiervoor kan worden toegeschreven aan een eventuele opwarming. Doch vermits de krimptemperatuur en -tijd (3 seconden bij 105° C) lager liggen dan bij de polyethyleenfilm (10 seconden bij 160° C) en eveneens rekening houdend met het feit dat bij oordeelkundig krimpen alle warmte in krimpenergie wordt omgezet is de kans gering dat dit de oorzaak is.

Figuur 19 - TVB-bepalingen op de vis die is aangewend om het effect van het krimpen na te gaan



TMA in mg N %

Figuur 20 - TMA-bepalingen op de vis die is aangewend om
het effect van het krimpen na te gaan



PVC = polyvinylchloride

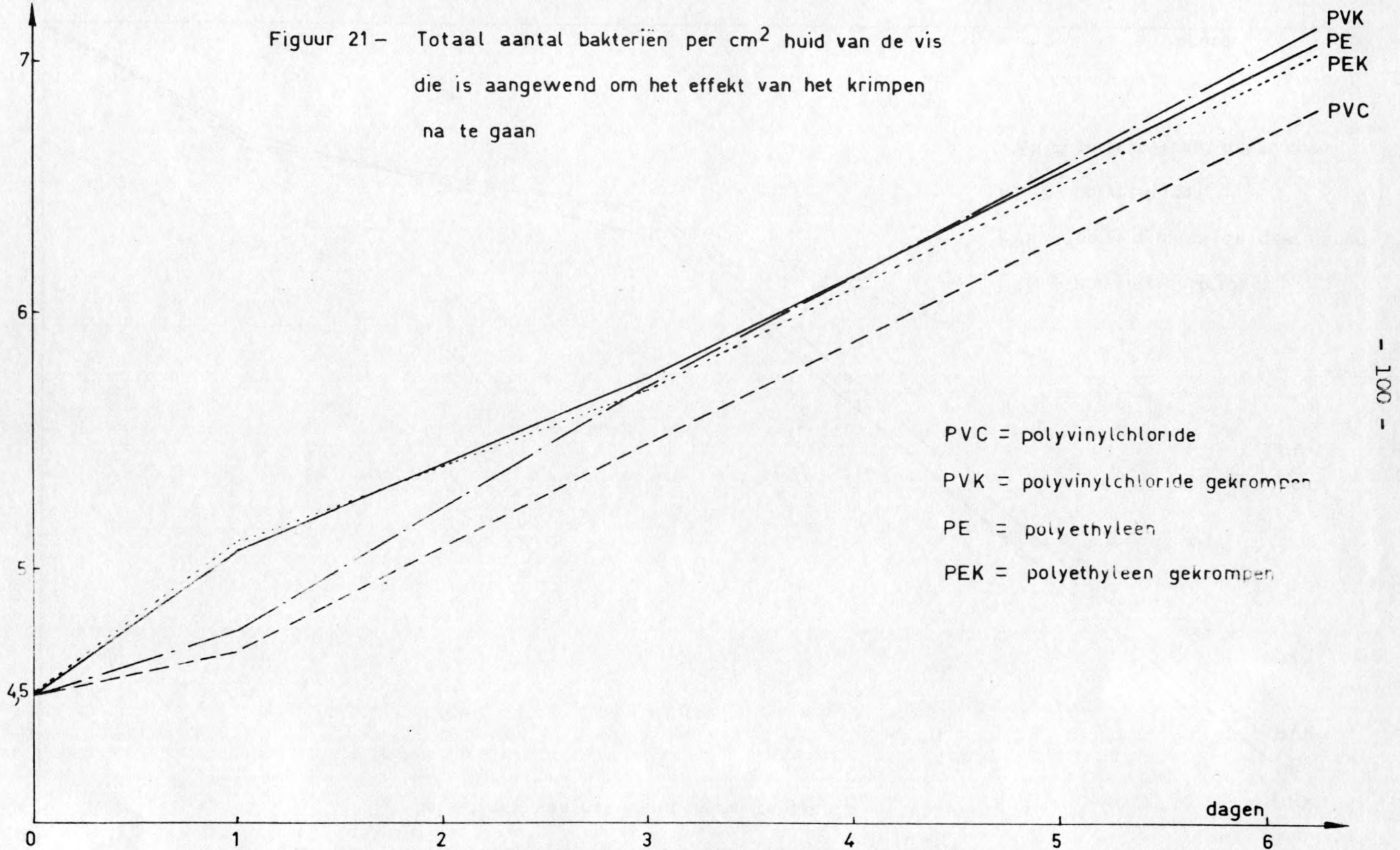
PVK = polyvinylchloride gekrompen

PE = polyethyleen

PEK = polyethyleen gekrompen

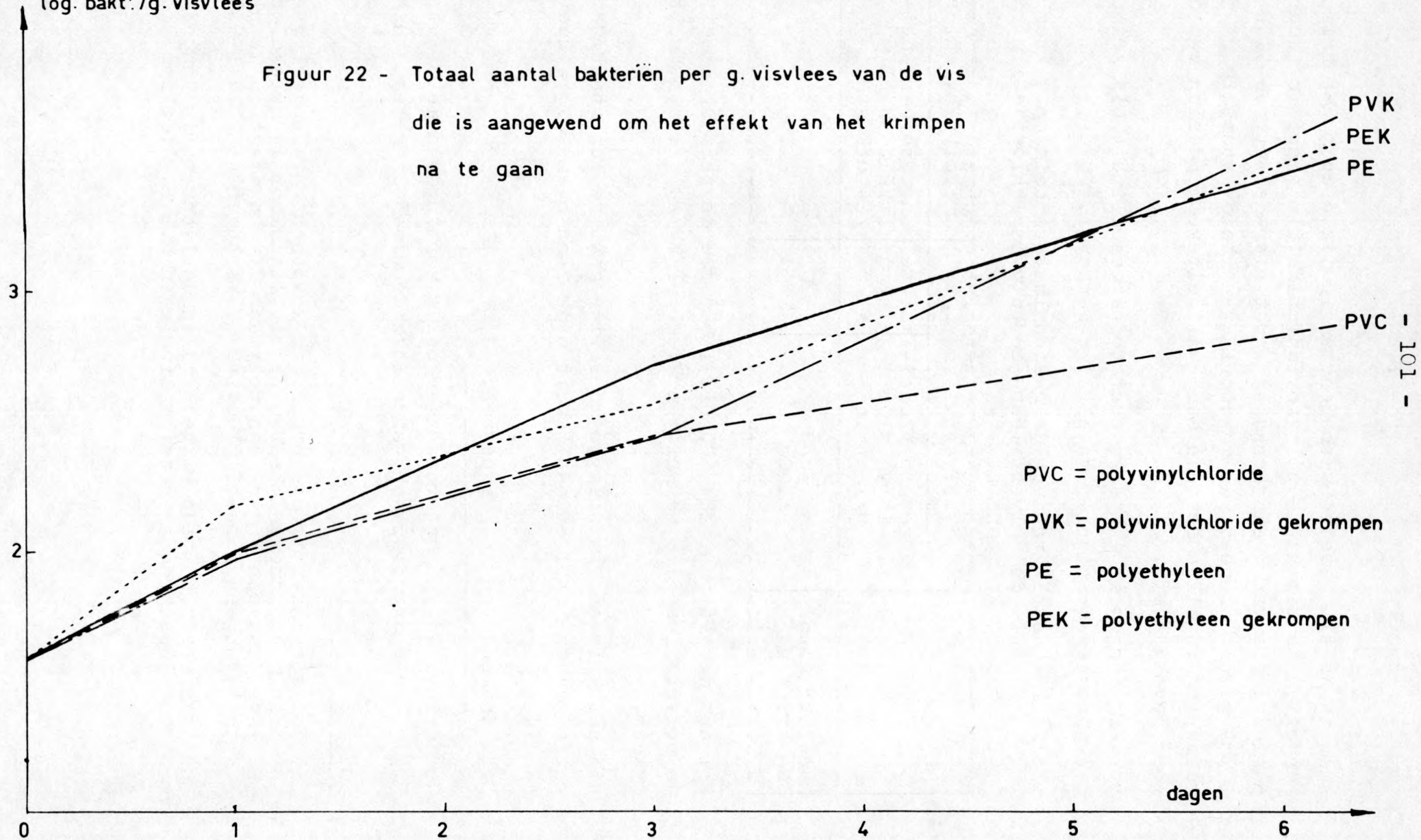
log. bakt./cm² huid

Figuur 21 - Totaal aantal bacteriën per cm² huid van de vis die is aangewend om het effect van het krimpen na te gaan



log. bakt./g. visvlees

Figuur 22 - Totaal aantal bacteriën per g. visvlees van de vis die is aangewend om het effect van het krimpen na te gaan



PVC = polyvinylchloride

PVK = polyvinylchloride gekrompen

PE = polyethyleen

PEK = polyethyleen gekrompen

101

Hier is de film eveneens toegenomen in dikte door het krimpen. Aangezien de gebruikte polyvinylchloridefilm amorf is (door de aanwezigheid van weekmakers)(a) wordt hier de wet van FICK (DUBOIS 1968) gevolgd en neemt de gasdoorlaatbaarheid evenredig af met de toeneming in dikte hetgeen een kwaliteitsvermindering van de vis voor gevolg heeft.

De verandering in dikte en zuurstofpermeabiliteit bij krimpen worden nagezien en zijn in tabel 41 samengevat.

TABEL 41 - Resultaten van de gasdoorlaatbaarheid en diktemetingen bij de polyethyleen- en polyvinylchloridefilm vóór en na krimpen (b).

	Polyethyleen		Polyvinylchloride	
	Zuurstofpermeabiliteit in ml/m ² /24 u/1 atm.	dikte in /u	Zuurstofpermeabiliteit in ml/m ² /24 u/1 atm.	dikte in /u
Vóór krimpen	3.500	20	2.325	18
Na krimpen	3.000	25	1.095	37

Volgens de wet van FICK (DUBOIS 1968) zou de permeabiliteit van de polyethyleenfilm na krimpen 2.800 ml/m²/24 u/1 atm. moeten bedragen.

Bij het krimpen van polyvinylchloride gaat de wet van FICK op aangezien de zuurstofpermeabiliteit praktisch evenredig afneemt met de diktetoeneming.

3.5. Invloed van het verpakken.

Om de invloed van het verpakken op de vorming van de TVB en het TMA na te gaan wordt een vergelijkende proef aangelegd tussen

-
- (a) Een weekmaker is een organisch component of mengsel van organische componenten bestaande uit middelmatige molekulen met lage dampspanning of een polymeer die in staat is de plasticiteit van een hars of plastic te verhogen (DUBOIS 1968).
 - (b) Deze metingen zijn uitgevoerd in de laboratoria van het departement "Research en ontwikkeling" van U.C.B. afdeling Sidac.

kabeljauwfilets die worden verpakt in polyethyleen van 20/ μ dik en onverpakte kabeljauwfilets.

3.5.1. Proefomstandigheden.

3.5.1.1. Grondstof.

De grondstof is dezelfde als in vorige proeven.

3.5.1.2. De verpakkingsmaterialen.

De drager is een schokvast polystyreenschaaltje.

De film is een polyethyleenfilm die bij het opstellen van de bederfcurve in functie van de zuurstofdoorlaatbaarheid de beste resultaten geeft, nl. de film van 20/ μ dik met een zuurstofdoorlaatbaarheid van 3.600 ml/m²/24 u/1 atm.

3.5.1.3. Behandelingsprocessen.

De behandelingsprocessen voor de verpakte vis zijn dezelfde als in de vorige proefnemingen.

De niet verpakte vis wordt in een polystyreenkistje bewaard bij 0° C (zonder ijs).

3.5.1.4. Laboratoriumanalysen.

Er worden na de 1e, 3e en 6e dag 10 pakjes ontleed op TVB- en TMA-gehalte. De proeven worden 3 maal herhaald. Tevens wordt het verschil tussen de 2 frakties uitgerekend om de door formol gebonden vluchtige N-fractie te bepalen. De analyses worden telkens in het dubbel uitgevoerd.

3.5.2. Resultaten.

De resultaten van de TVB- en TMA- en de door formol gebonden N-fractie-bepalingen zijn grafisch voorgesteld in figuren 23, 24 en 25.

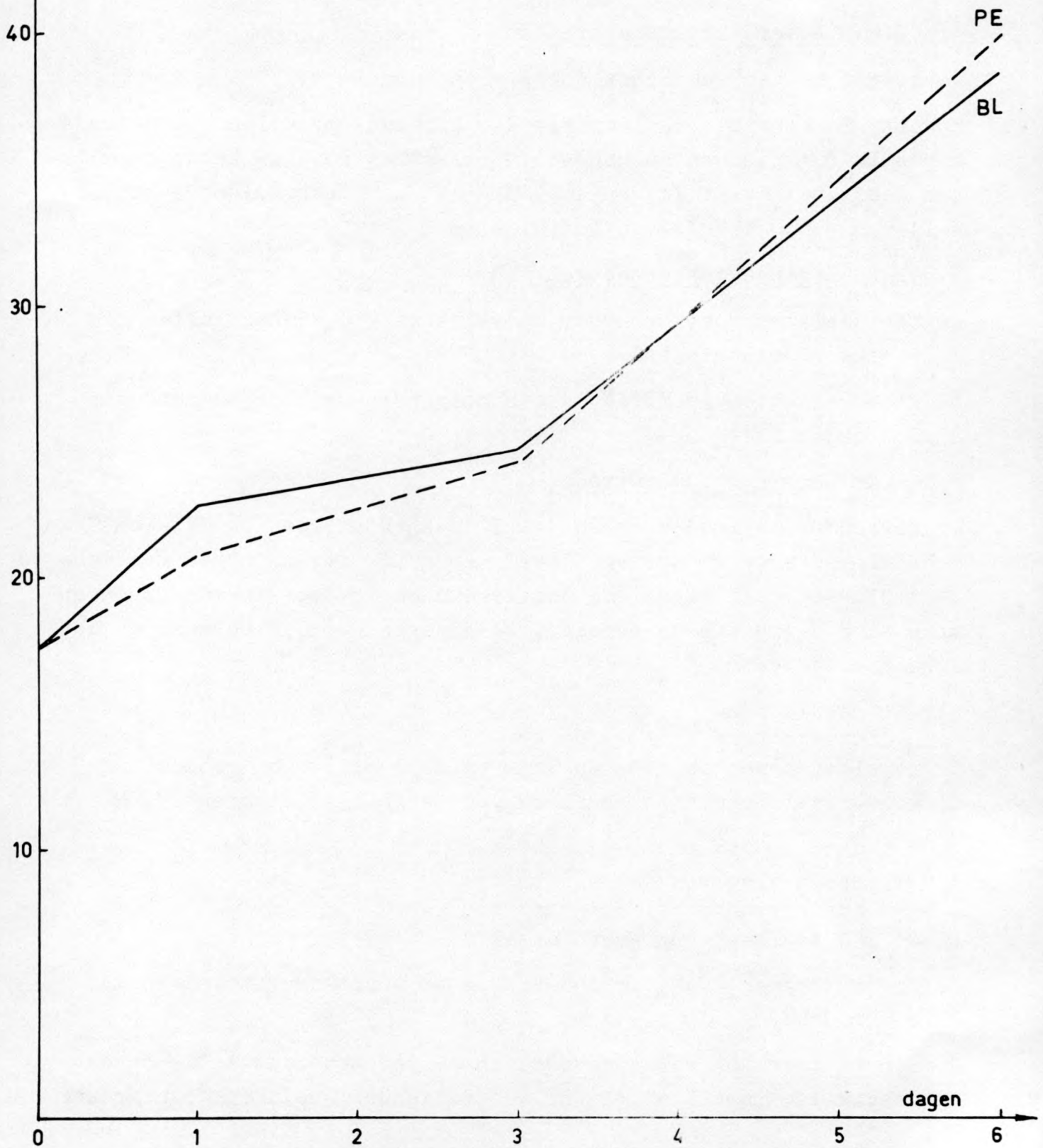
3.5.3. Bespreking van de resultaten.

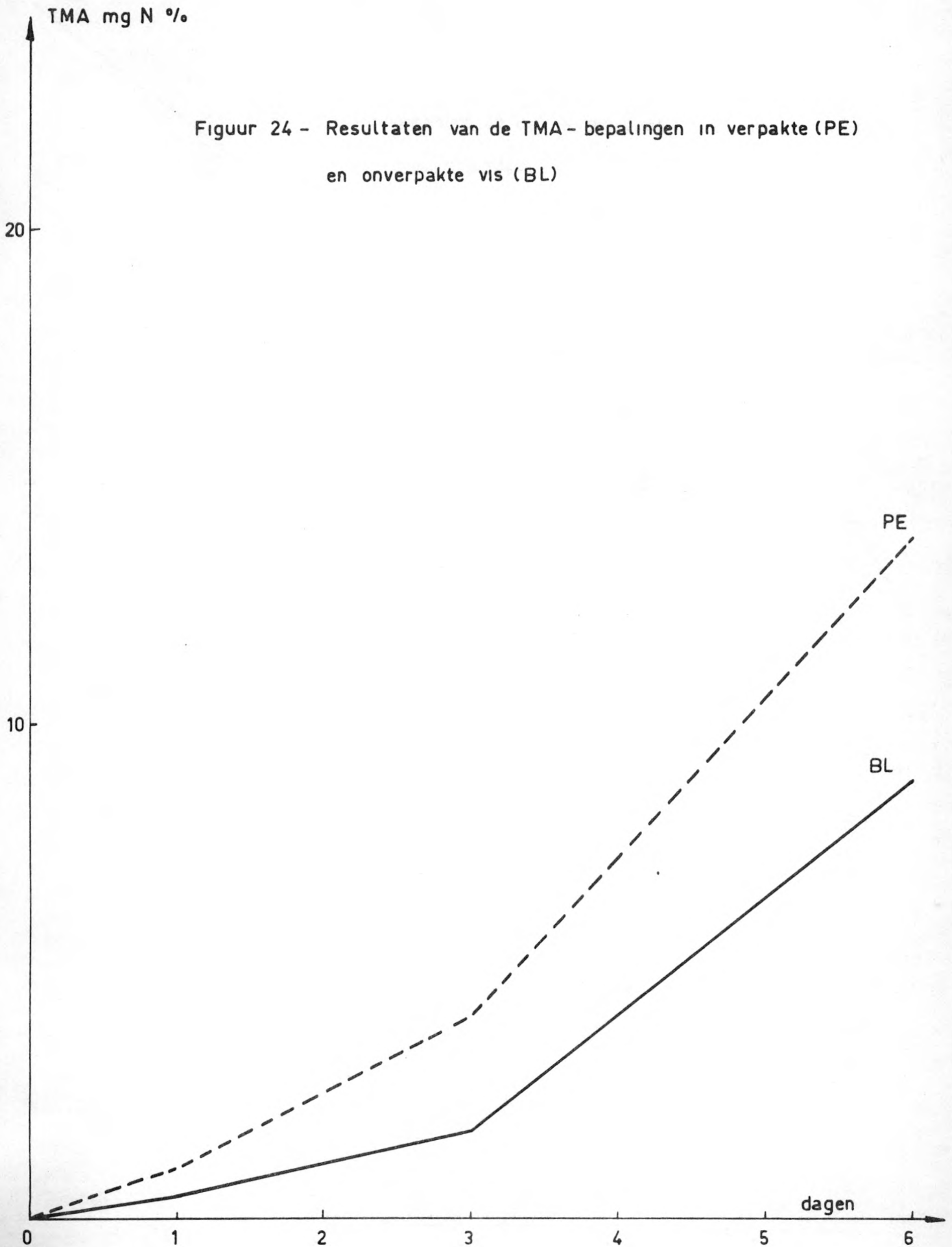
- 1) De TVB bedraagt ongeveer dezelfde waarde.
- 2) Er wordt meer TMA geproduceerd in de verpakte vis dan in de onverpakte.

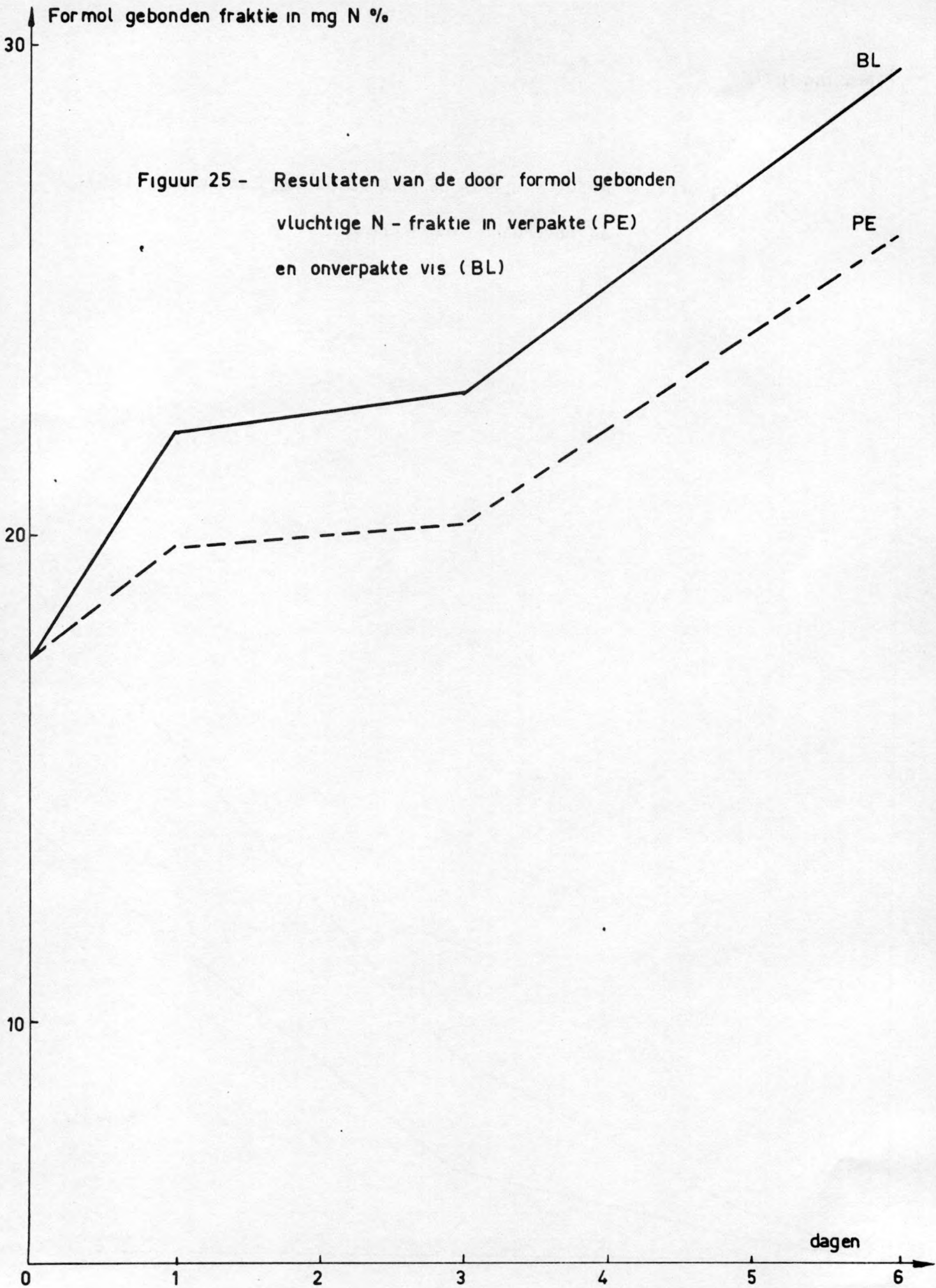
Indien er meer TMA wordt gevormd in de verpakte dan in de onverpakte vis dan is dit te wijten aan de aanwezigheid van een groter

TVB mg N%

Figuur 23 - Resultaten van de TVB -- bepalingen in verpakte (PE) en onverpakte vis (BL)







aantal bedervers in de verpakte dan in de onverpakte vis. Immers, gedurende het bewaren vermindert de zuurstofspanning in het pakje en hierdoor worden min of meer mikro-aërobe omstandigheden gekreëerd. Aangezien volgens WATSON (1939a) het TMA het sterkst wordt gevormd in anaërobe omstandigheden kan er worden verwacht dat bij voorverpakte vis een groter aantal TMA-vormers aanwezig is dan bij onverpakte vis.

De door formol gebonden N-fractie ligt hoger bij de blanco dan bij de verpakte vis. Analoge resultaten zijn door INGRAM (1962) reeds vastgesteld bij het verpakken van kippen. Deze onderzoeker konstateerde immers bij het verpakken van kippen dat bij gebruik van een film met lage zuurstofpermeabiliteit de produktie van slechte geuren, karakteristiek voor bederf, langer uitblijft dan bij verpakking in een film met hoge zuurstofdoorlaatbaarheid. CARLIN, HOLL en WALKER (1957) stellen gelijkaardige verschijnselen vast bij kippen die verpakt zijn in een zuurstofdoorlaatbare celluloseacetaatfilm. Het bederf van de in deze film verpakte kippen verloopt vlugger dan wanneer een ondoorlaatbare "Saran" film wordt aangewend. WELLS, SPENCER en STADELMAN (1958) beweren dat bij kippen verpakt in een luchtdichte polyvinylchlorideverpakking die vakuüm wordt gemaakt, het bederf later optreedt dan bij kippen die in dezelfde verpakking zitten doch waar het zakje niet luchtledig wordt getrokken.

3.5.4. Telling van het totaal aantal aërobe bacteriën en het totaal aantal "bedervers".

Dit wordt nagegaan aan de hand van een vergelijkende proef tussen verpakte en onverpakte filets van kabeljauw die bij 0° C worden gestockeerd en ontleed na 0,3 en 7 dagen op totaal aantal bacteriën en op totaal aantal "bedervers". De behandelingsprocessen zijn dezelfde als in de vorige proefnemingen doch de verpakking geschiedt alleen met de polyethyleenfilm van 20_u dik.

Om het totaal aantal "bedervers" te bepalen worden van de petriplaten, waarop de telling van het totaal aantal bacteriën is uitgevoerd, willekeurig 50 kolonies afgepikt en na zuiveren geënt in de bodem van WOOD en BAIRD (1943). Na 3 dagen inkubatie wordt er tot bepaling van het totaal aantal "bedervers" overgegaan volgens hoger beschreven methoden. Er worden telkens 6 pakjes ontleed.

De resultaten van de tellingen staan vermeld in tabel 42.

TABEL 42 - Resultaten van de tellingen van het totaal aantal bacteriën en het totaal aantal "bedervers" bij verpakte en onverpakte vis (a)

Dagen	onverpakt		verpakt	
	Totaal	Bedervers	Totaal	Bedervers
0	5,92	5,31 (38 %)	5,92	5,51 (38 %)
3	6,54	6,20 (46 %)	6,92	6,70 (60 %)
7	7,70	7,30 (40 %)	7,78	7,50 (52 %)

(a) De cijfers zijn de gemiddelden van twee waarnemingen en zijn de logarische waarden van de tellingen. Het getal tussen haakjes geeft het procent "bedervers" weer van het totaal aantal bacteriën.

De resultaten tonen aan dat procentsgewijze het totaal aantal "bedervers" bij verpakte vis hoger ligt dan bij onverpakte vis. Het procent "bedervers" dat bij de onverpakte vis wordt teruggevonden komt overeen met de gegevens van SHEWAN (SOUDAN 1965). Absoluut gezien liggen de waarden van het totaal aantal bacteriën en het totaal aantal "bedervers", hoger bij verpakte dan bij onverpakte vis.

Aangezien het TMA het meest in omstandigheden wordt gevormd waarbij een fakultatief anaërobe respiratie plaats heeft, zouden alle bacteriën die trimethylamine produceren in anaërobe omstandigheden groeien. Om de groei in anaërobe omstandigheden na te gaan wordt er geënt op de bodem die door WATSON (1939a) wordt voorgesteld. Deze bodem heeft de volgende samenstelling : beef extract 3 g; pepton 5 g; NaCl 5 g; KH_2PO_4 6,8 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 18 g; Agar 15 g; TMA oxyde 15g; pH : 6,9.

Bij deze proefnemingen wordt een willekeurige reeks "bedervers" geënt op "slants" die gegoten worden met de bodem van WATSON (1939a). De proefbuizen worden in anaërobe kamers geïnkubeerd bij 22° C. Na 3 dagen vertonen al de geënte bodems bakteriëngroei. Deze proefnemingen tonen bijgevolg aan dat al de trimethylaminevormende

mikro-organismen uit vis de grootste activiteit vertonen in omstandigheden waarbij TMAO voor een fakultatief anaërobe respiratie wordt omgezet.

3.6. Invloed van enkele bewaarstoffen op de kwaliteit van voorverpakte vis.

De TVB-fractie van voorverpakte vis is hoofdzakelijk samengesteld uit ammoniak en trimethylamine. Aangezien de proeven uitwijzen dat enerzijds de ammoniakvorming bij voorverpakte vis geringer is dan bij onverpakte, doch anderzijds de trimethylaminevorming aanzienlijker wordt onder invloed van de verpakking zou een remming van de TMA-vorming m.a.w. een inhibitie van de trimethylamineoxyderende bacteriën, de kwaliteit van de vis aanzienlijk verbeteren.

Tal van bewaarstoffen die het bakteriëel bederf tegenhouden zijn reeds bestudeerd geweest. Volgens TARR en SUNDERLAND (1940) verhoogt chloroform (0,7 %) de houdbaarheid van bewerkte vis, terwijl waterstofperoxyde (0,1 %) weinig effect heeft. Zwaveldioxyde (0,1 %) daartegenover vertraagt merkkelijk de bakteriëngroei doch produceert een onaangename geur. Tevens merken deze onderzoekers op dat HCL (0,1 %) het bederf gedeeltelijk remt doch de vis krijgt een onaantrekkelijk uitzicht. Volgens hen zijn benzoënzuur (0,1%) en natriumbenzoaat (0,1 %) zeer effectief, zelfs meer dan boorzuur (0,1%) of het ethylester van parahydroxybenzoënzuur (0,09 %). De beste resultaten worden volgens TARR en SUNDERLAND (1940) echter bekomen met Na- en K-nitriet (0,1 %). Later vindt TARR (1945) dat hydroxylamine (0,001 tot 0,024 %) een blijvende of voorbijgaande inhibitie van visbedervende en andere bacteriën veroorzaakt.

De meeste van deze bewaarstoffen zijn volgens de Belgische wetgeving (Belgisch Staatsblad 1968) niet toegelaten. Enkele mogen worden aangewend (zwaveldioxyde en nitrieten) in sommige voedingswaren, doch niet in vis. Benzoënzuur en zijn natrium-, kalium- en calciumzouten (maximaal gehalte uitgedrukt in benzoënzuur) zijn voor 0,15 % toegelaten in half-konserven van vis.

Het gebruik van benzoënzuur en natriumbenzoaat wordt door STEWART en CASTELL (1960) bestudeerd. De resultaten van hun proefnemingen tonen aan dat een inhibitie van het trimethylamineoxydereductiesysteem slechts bij sommige bacteriën wordt bekomen.

In de lijst van de toegelaten bewaarstoffen komt citroenzuur voor alsook sorbinezuur en zijn natrium, kalium- en calciumzouten (maximaal gehalte uitgedrukt in sorbinezuur) (Belgisch Staatsblad 1968). Citroenzuur wordt toegelaten in voedingswaren en -stoffen bij de bereiding waarvan ingrediënten worden gebruikt waarin citroenzuur is toegelaten, en tot een gehalte evenredig, aan de van deze ingrediënten gebruikte hoeveelheid. Aangezien vis in vele gevallen met citroen wordt bereid, wordt een bewaarproef met citroenzuur aangelegd. Tevens wordt de werking van het citroenzuur vergeleken met deze van kaliumsorbataat die maximaal voor 0,3 % (uitgedrukt in de overeenkomstige hoeveelheid sorbinezuur) in half-konserven mag worden aangewend.

3.6.1. Invloed van citroenzuur.

3.6.1.1. Proefomstandigheden.

3.6.1.1.1. Grondstof.

Als grondstof worden kabeljauwfilets van 500 g gebruikt.

3.6.1.1.2. De verpakkingsmaterialen.

Het wit gepigmenteerd schokvast polystyreenschaaltje wordt gebruikt.

De filets worden verpakt in de polyethyleenfilm van 20 μ dik met een zuurstofdoorlaatbaarheid van 3.600 ml/m²/24 u/1 atm.

3.6.1.1.3. De behandelingsprocessen.

Alvorens te worden verpakt wordt iedere filet afzonderlijk besprenkeld met 5 ml opgeloste bewaarstof (2,5 ml op elke kant). De concentraties zijn zodanig gekozen dat de filets na besproeien respektievelijk 0,1 %, 0,5 % en 1 % citroenzuur bevatten. Naast de besproeide filets worden verpakte en onverpakte blanko's bewaard. Het stockeren geschiedt bij 0° C.

3.6.1.1.4. Laboratoriumanalysen.

Na 0,3 en 7 dagen worden telkens 10 pakjes van iedere behandeling ontleed op totaal aantal bacteriën, totaal aantal "bedervers", op TVB- en op TMA-gehalte. De analyses worden telkens in het dubbel uitgevoerd.

3.6.1.2. Resultaten van de proefnemingen.

3.6.1.2.1. Resultaten van de bacteriologische analyses.

De resultaten van de bacteriologische analyses staan vermeld in tabel 43.

TABEL 43 - Resultaten van de bacteriologische tellingen op voorverpakte filets die met citroenzuur zijn behandeld (a).

Dagen	0 % HCl		0,1 % HCl		0,5 % HCl		1,0 % HCl		Blanco onverpakt	
	totaal	beder- vers	totaal	beder- vers	totaal	beder- vers	totaal	beder- vers	totaal	beder- vers
3	6,88	6,64 (58 %)	-	-	-	-	4,51	3,76 (18 %)	6,51	6,08 (38 %)
7	7,78	7,56 (62 %)	-	-	-	-	5,20	4,51 (20 %)	7,60	7,20 (40 %)

(a) De cijfers zijn de logaritmische waarden van de tellingen. Het getal tussen de haakjes geeft het procent "bedervers" weer.

3.6.1.2.2. Resultaten van de chemische analyses.

De resultaten van de chemische analyses zijn grafisch samengevat in figuren 26, 27 en 28.

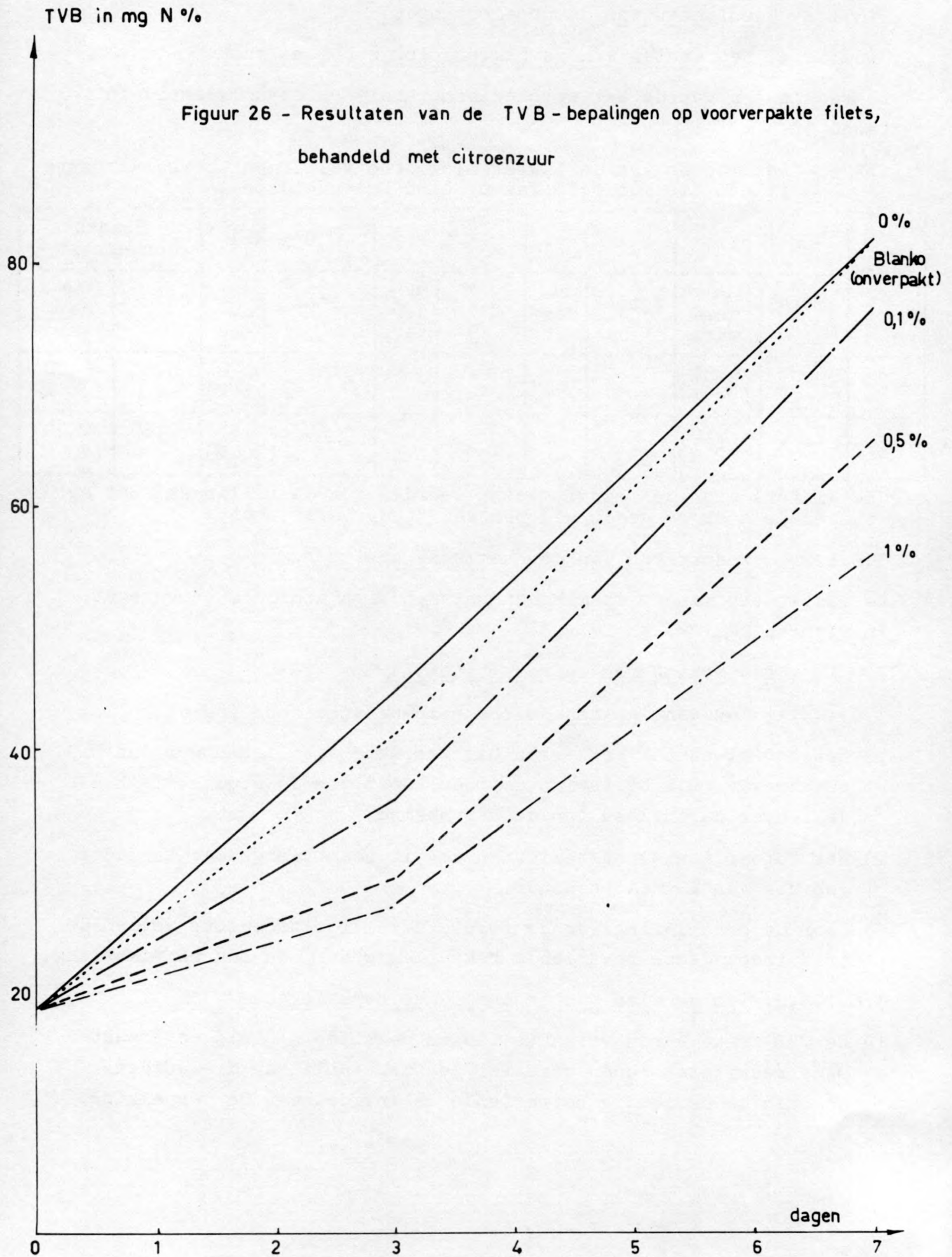
3.6.1.3. Bespreking van de resultaten.

3.6.1.3.1. Ten aanzien van de bacteriologische bepalingen.

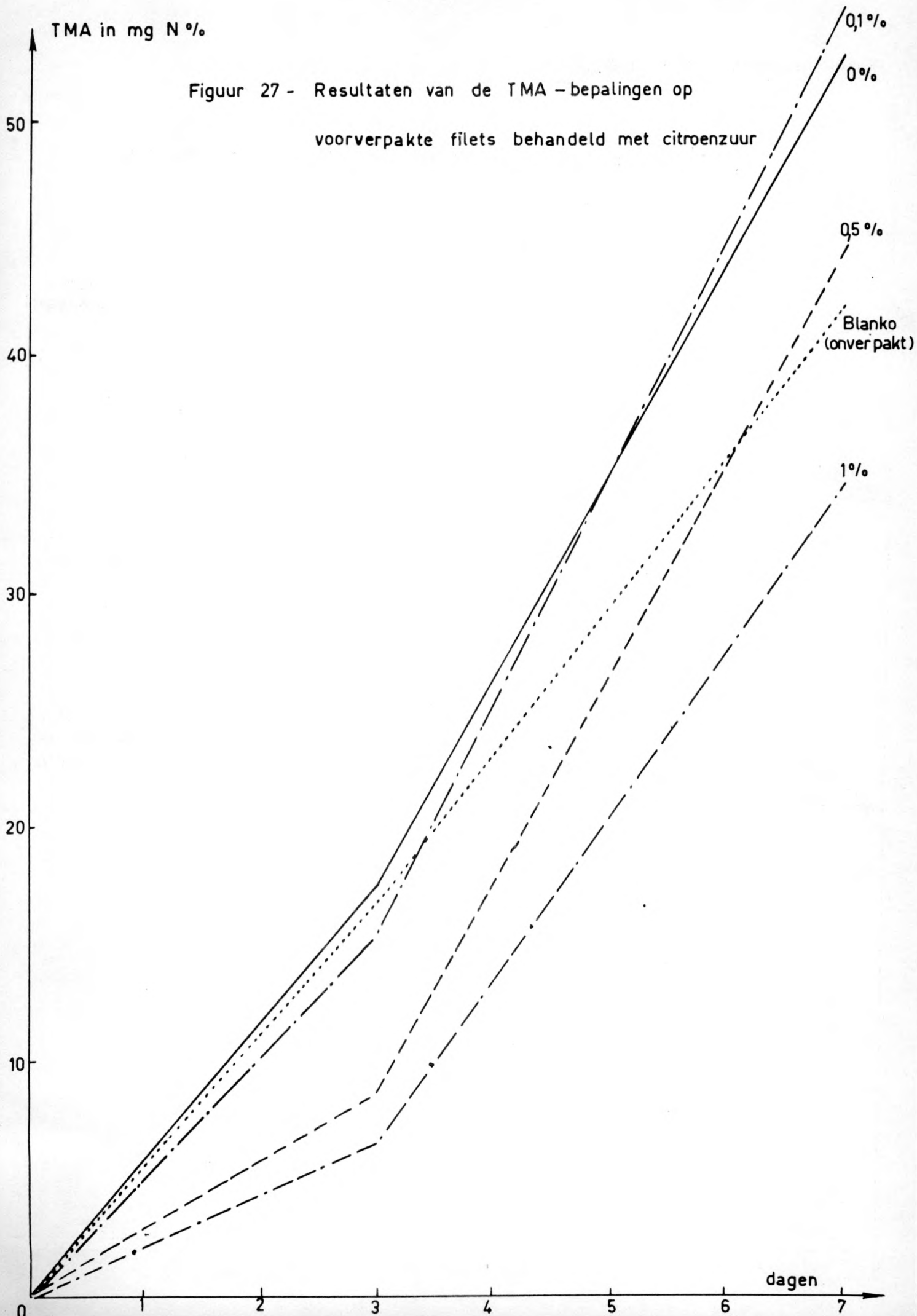
- 1) Het totaal aantal bacteriën bij verpakte vis ligt hoger dan bij onverpakte. Dit bevestigt de resultaten van de studie die handelt over de invloed van de verpakking.
- 2) Het totaal aantal bacteriën in de vis neemt langzamer toe door gebruik van 1 % citroenzuur.
- 3) Door de behandeling van de filets met 1 % citroenzuur worden de triamineoxydease bevattende bacteriën geremd in hun ontwikkeling.

3.6.1.3.2. Ten aanzien van de chemische bepalingen.

- 1) De TVB-fractie bij verpakte vis is dezelfde als bij onverpakte. Deze resultaten lopen parallel met de resultaten die worden bekomen in de studie betreffende de invloed van de verpakking.

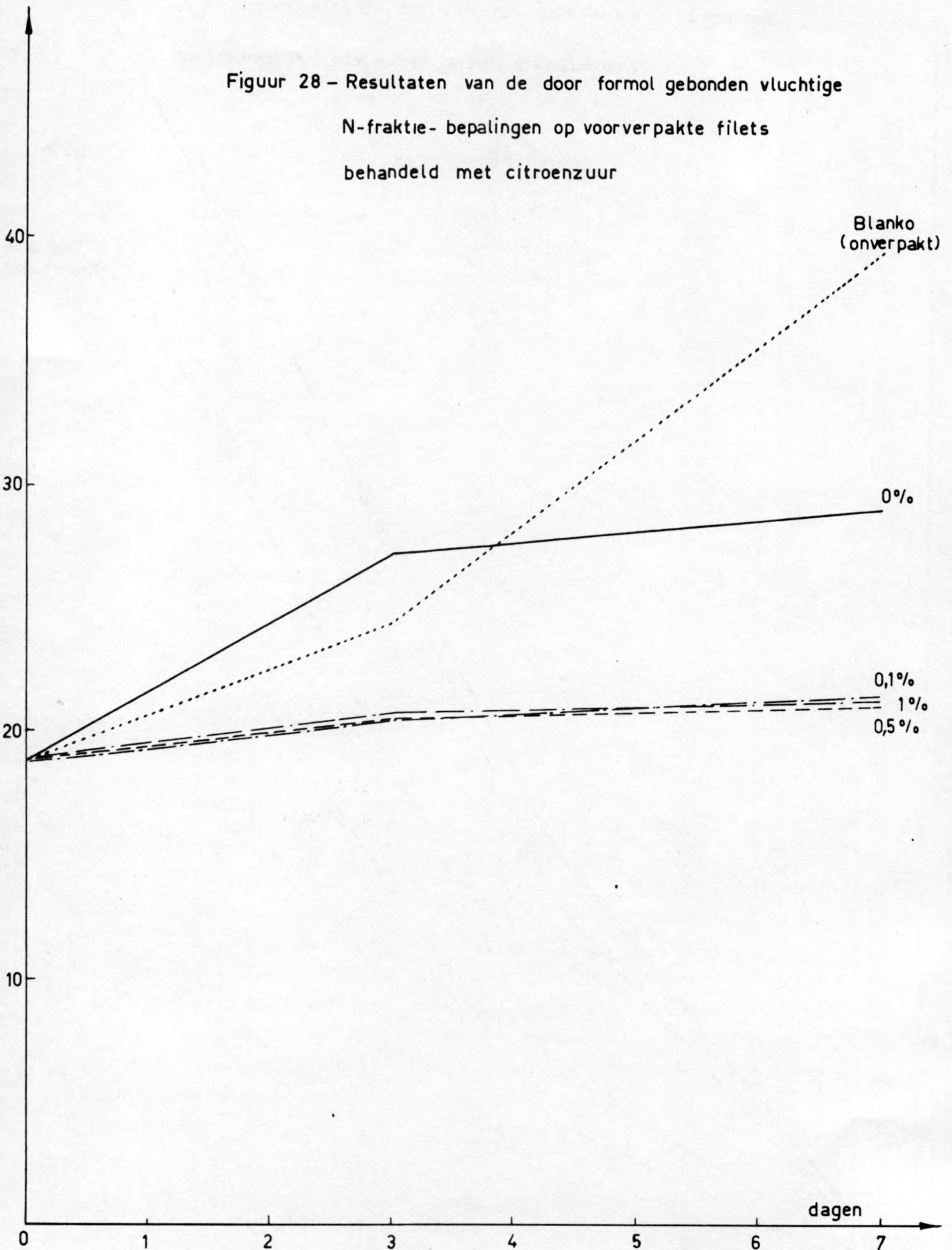


Figuur 27 - Resultaten van de TMA -bepalingen op
voorverpakte filets behandeld met citroenzuur



Formol gebonden fraktie in mg N%

Figuur 28 - Resultaten van de door formol gebonden vluchtige N-fraktie- bepalingen op voorverpakte filets behandeld met citroenzuur



- 2) De TMA-fraktie is kleiner bij de onverpakte dan bij de verpakte vis. Dit is eveneens in overeenstemming met eerder gevonden resultaten.
- 3) De door formol gebonden vluchtige N-fraktie is kleiner bij verpakte dan bij onverpakte vis. Ook deze resultaten zijn in de voorgaande proefnemingen bekomen. De aangroei van de door formol gebonden vluchtige N-fraktie wordt eveneens geremd door citroenzuur. De gebruikte concentraties blijken geen verschillen te geven. Aangezien de vorming van deze fraktie hoofdzakelijk geschiedt onder invloed van de desaminase, (DYER en MOUNSEY 1945; HUGHES 1958; SOUDAN 1965), kan worden besloten dat citroenzuur deze enzymensystemen of de mikro-organismen die deze enzymen bevatten inhibeert.
- 4) Door de behandeling met citroenzuur wordt gedurende 7 dagen bewaren bij 0° C de vorming van het TMA tegengewerkt. Dit is in de eerste plaats te wijten aan een remming van de groei van het totaal aantal bacteriën, veroorzaakt door een verlaagde pH en in de tweede plaats aan een vermindering van het percent totaal aantal "bedervers" bij gebruik van 1 % citroenzuur. Deze remming wordt bepaald door de concentratie aan citroenzuur.

3.6.1.3.3. Ten aanzien van de presentatie van het produkt.

Het gebruik van citroenzuur heeft tot gevolg dat door de verlaging van de pH een denaturatie van de visproteïnen optreedt. Dit gaat gepaard met een volledig wit worden van het visvlees en een overvloedige vochtuittrekking. Deze verschijnselen bieden een uiterst onaantrekkelijk beeld aan het voorverpakte produkt.

3.6.2. Vergelijkende proef tussen kaliumsorbaat en citroenzuur.

In 1945 is kaliumsorbaat voor het eerst voorgesteld als schimmelwerend middel (WRIGHT 1961). Later stellen BECKER en ROEDER (1957) bij margarine vast dat sorbinezuur een sterkere bakteriostatische werking bezet dan benzoëzuur. FERGUSON en POWRIE (1957) beweren dat de ontwikkeling van Acetobacter in appelsap door het gebruik van sorbinezuur wordt geïnhibeerd, terwijl SALUNKHE (1957) vaststelt dat appelcider die kaliumsorbaat bevat langer bewaard blijft. Tevens bemerkt deze onderzoeker dat bij hoge bewaartemperaturen de groei van gisten en schimmels wordt tegengewerkt terwijl de bakte-

riostatistische werking echter sterk afneemt. Dit is te wijten aan een sterke vermenigvuldiging van de bacteriën, waardoor het kaliumsorbaat wordt geassimileerd en zodoende de concentratie aan kaliumsorbaat afneemt. In een onderzoek op varkensworst, behandeld met 0,1 % sorbinezuur, konstateert STARR (1955) dat naast een vermindering in oxydatie en ranzigheid het totaal aantal bacteriën sterk is gedaald. Hij vestigt er evenwel de aandacht op dat een gehalte van 0,1 % sorbinezuur niet schadelijk is, terwijl wettelijk 0,3 % sorbinezuur en zijn Na-, K- en Ca-zouten (uitgedrukt in hoeveelheid sorbinezuur) toelaatbaar zijn (MELNICK et al. 1956) (BELGISCH STAATSBLAD 1968).

Kaliumsorbaat wordt reeds bij vele voedingswaren gevoegd, waaronder gerookte en gemarineerde vis (half-konserven). Het hoofddoel hiervan is de oxydatie en de ranzigheid tegen te werken. Dit onderzoek echter heeft als doel na te gaan of visbederf wordt geremd door kaliumsorbaat en aan welke verschijnselen deze remming te wijten is. Tevens wordt het gebruik van kaliumsorbaat vergeleken met dit van citroenzuur.

De voornaamste eigenschappen van kaliumsorbaat kunnen als volgt worden geresumeerd :

- a) kaliumsorbaat is een breed-spektrum inhibitor voor gisten, schimmels en inhibeert sommige bacteriën,
- b) deze bewaarstof is zeer goed oplosbaar in water; oplossingen van 50 % zijn zeer gemakkelijk te bereiden en bezitten een lange bewaarduur. Deze hoge concentraties zijn noodzakelijk voor verscheidene toepassingen in de voedingsindustrie zoals het onderdompelen en het besproeien van bederfbare voedingswaren,
- c) een van de bijzonderste eigenschappen is de optimale werking in een pH-gebied tussen 5 en 7 (WRIGHT 1961). In dit gebied vallen de pH-waarden van tal van voedingswaren die dienen te worden bewaard. Daar de zuurtegraad van vis tussen 6 à 7 ligt kan een gebeurlijke aktiviteit van kaliumsorbaat dan ook als optimaal worden beschouwd.

3.6.2.1. Proefomstandigheden.

Filets van kabeljauw die in polyethyleen van 20 μ dik met 3.600 ml zuurstofpermeabiliteit worden verpakt en waaraan respektievelijk kaliumsorbaat (0,1 % en 0,3 %) en citroenzuur (0,1 % en 0,3 %)

is toegevoegd, worden aan een bewaarproef bij 0° C onderworpen. Na 2 en 6 dagen worden telkens 8 pakjes ontleed op TVB, TMA en totaal aantal bacteriën. Tevens wordt na 6 dagen het totaal "bedervers" geteld. De ontledingen worden in het dubbel uitgevoerd.

3.6.2.2. Resultaten.

De resultaten van de chemische ontledingen zijn in figuren 29, 30 en 31 weergegeven.

De resultaten van de tellingen van het totaal aantal aëroben en van het totaal aantal "bedervers" na 6 dagen bewaren bij 0° C zijn in tabel 44 samengevat.

TABEL 44 - Resultaten van de tellingen van het totaal aantal bacteriën en van het aantal "bedervers" na 6 dagen bewaren bij 0° C (a).

	Totaal aantal	Aantal bedervers
Blanko	$100 \cdot 10^5$	$44 \cdot 10^5$ (44 %)
0,1 % citroenzuur	$70 \cdot 10^4$	$308 \cdot 10^3$ (44 %)
0,3 % citroenzuur	$60 \cdot 10^4$	$288 \cdot 10^3$ (48 %)
0,1 % kaliumsorbaat	$90 \cdot 10^4$	$18 \cdot 10^4$ (20 %)
0,3 % kaliumsorbaat	$70 \cdot 10^4$	$56 \cdot 10^3$ (8 %)

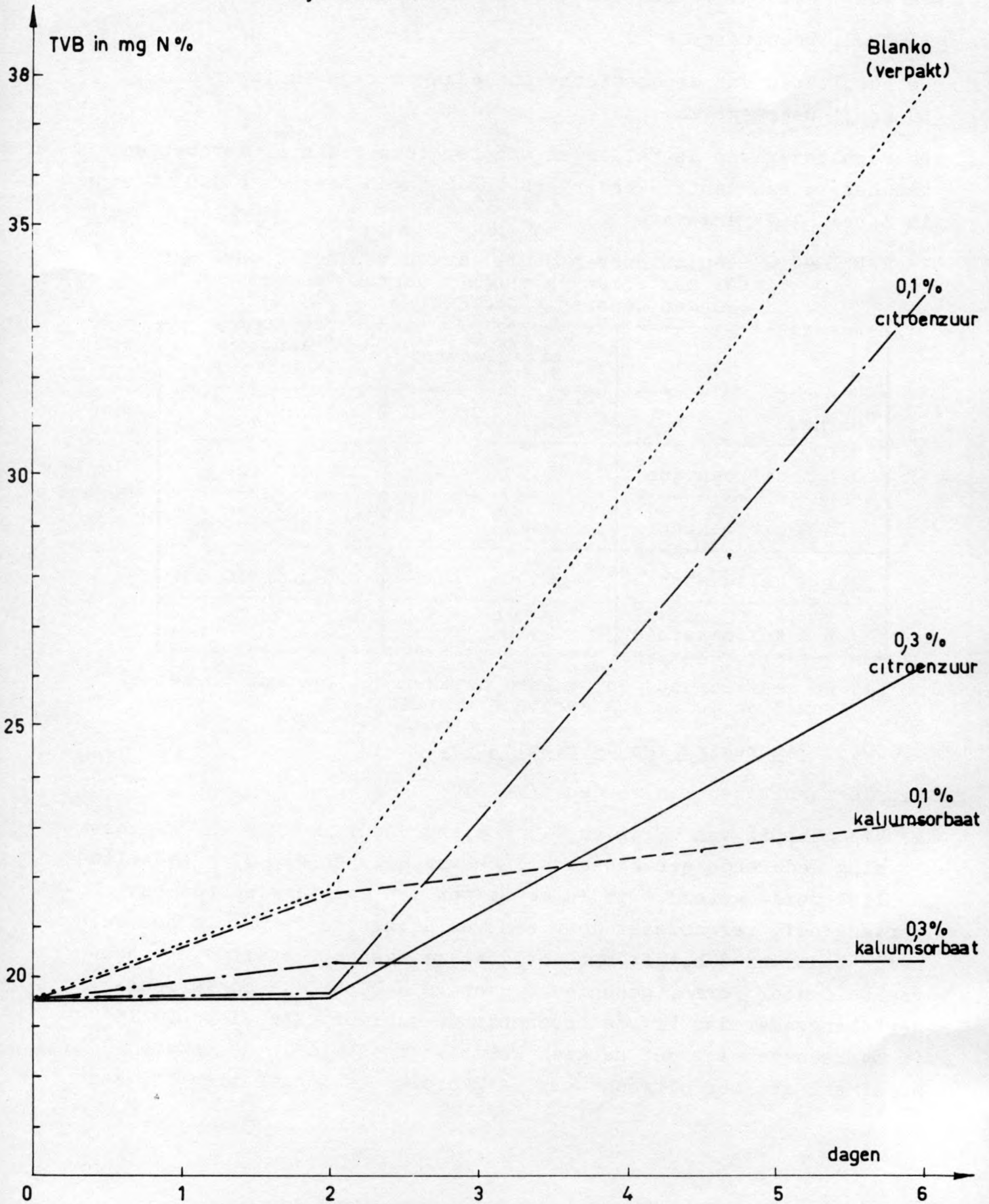
(a) De getallen tussen haakjes drukken het procent "bedervers" op de totale aërobe flora uit.

3.6.2.3. Bespreking van de resultaten.

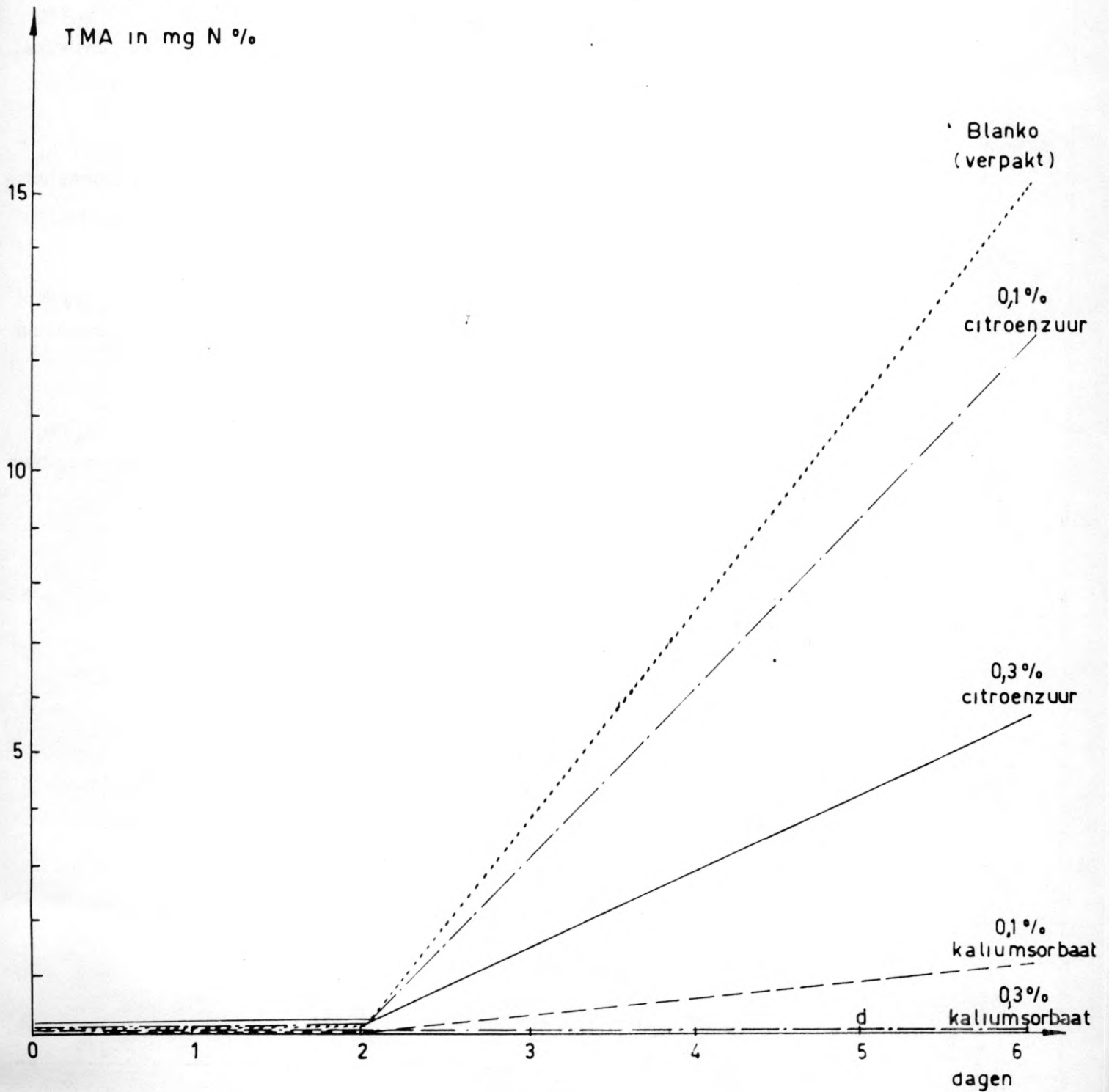
Uit de resultaten kan worden afgeleid dat :

a) bij gebruik van 0,1 % en 0,3 % citroenzuur de TVB- en TMA-vorming gedurende een bewaarperiode van 6 dagen bij 0° c gedeeltelijk wordt geremd. Dit is te wijten aan een verminderde bacteriëngroei, veroorzaakt door een verlaging van de pH. De hoeveelheid "bedervers" blijft procentsgewijze evenwel dezelfde. De hoeveelheid door formol gebonden vluchtige N-bestanddelen vermeerderd langzamer dan bij de onbehandelde voorverpakte vis. Dit is in overeenstemming met hetgeen wordt vastgesteld in de eerste proefnemingen met citroenzuur. De gebruikte concentraties blijken

Figuur 29 - Resultaten van de TVB-bepalingen op voorverpakte kabeljauwfilets die met citroenzuur en kaliumsorbaat zijn behandeld

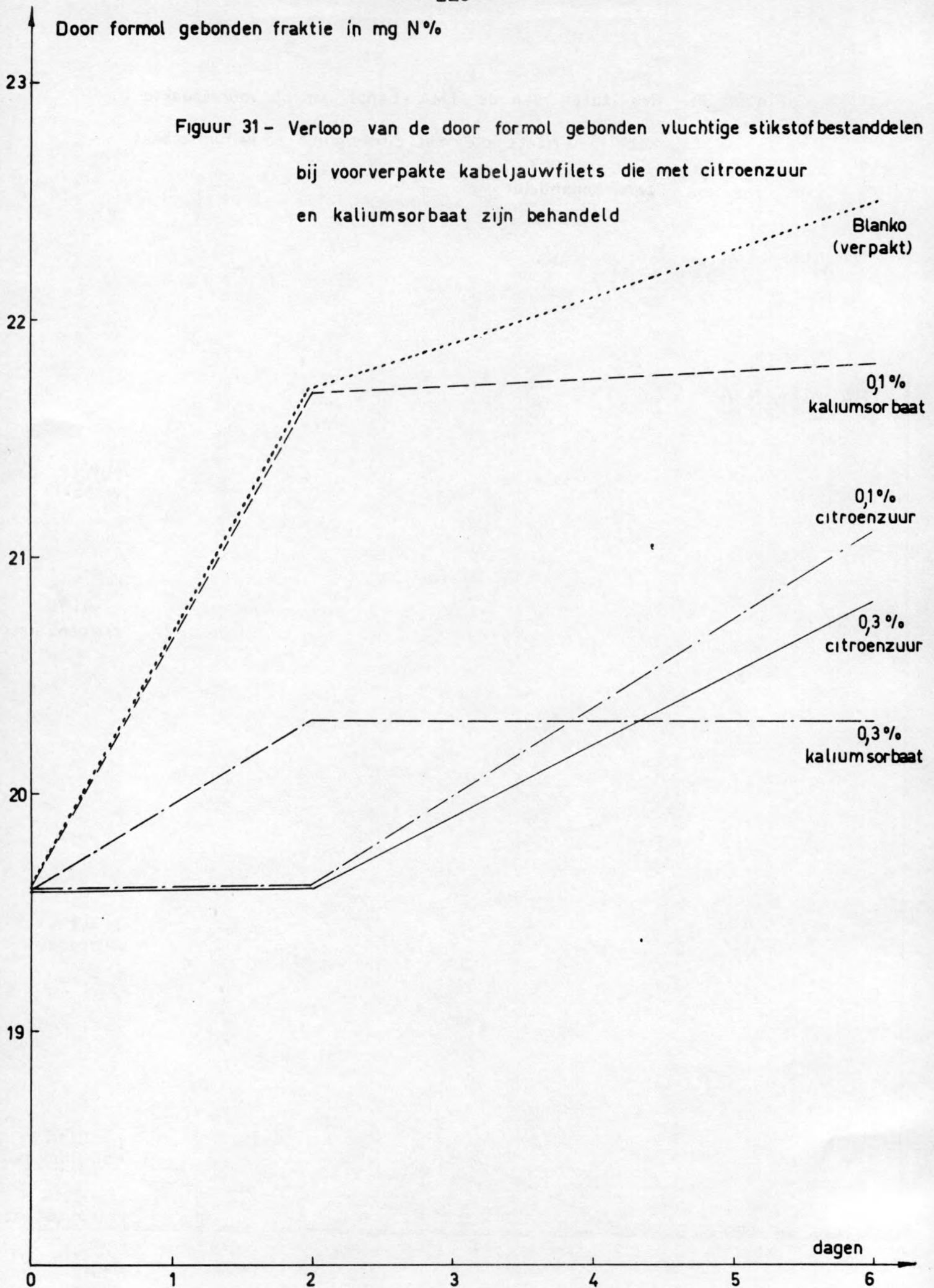


Figuur 30 - Resultaten van de TMA - bepalingen op voorverpakte kabeljauwfilets die met citroenzuur en kaliumsorbaat zijn behandeld



Door formol gebonden fraktie in mg N%

Figuur 31 - Verloop van de door formol gebonden vluchtige stikstofbestanddelen bij voorverpakte kabeljauwfilets die met citroenzuur en kaliumsorbaat zijn behandeld



evenmin verschil te geven. Hier dient echter opnieuw opgemerkt dat bij gebruik van 0,3 % citroenzuur de viseiwitten degenereren met als gevolg een overtollige sapuittreding.

b) bij gebruik van 0,1 % en 0,3 % kaliumsorbaat de TVB- en TMA-vorming praktisch volledig wordt stilgelegd. Dit moet worden toegeschreven aan de sterke remming van de groei der triamineoxydase-bevattende bacteriën. Het gebruik van 0,3 % kaliumsorbaat blijkt betere resultaten af te werpen dan 0,1 % kaliumsorbaat aangezien de TMA vorming volledig wordt stilgelegd. De aangroei van de hoeveelheid door formol gebonden N-fractie verloopt langzamer dan bij onbehandelde vis. De concentratie blijkt hier echter een rol te spelen.

3.6.3. Invloed van de beginkwaliteit van de vis op het gebruik van 0,3 % kaliumsorbaat.

De vorige proefneming wijst uit dat bij zeer verse vis met een TMA-gehalte van praktisch 0 mg N % de vorming van TMA wordt belet door toevoegen van 0,3 % kaliumsorbaat. Meteen rijst de vraag of bij vis met een bepaalde begin TMA-gehalte m.a.w. vis die niet van eerste kwaliteit is, het gehalte aan TMA konstant blijft door toevoegen van 0,3 % kaliumsorbaat.

3.6.3.1. Proefomstandigheden.

Filets van kabeljauw van mindere kwaliteit worden verpakt in een polyethyleenfilm van 20 μ dik met 3.600 ml zuurstofpermeabiliteit na 0,3 % kaliumsorbaat te hebben toegediend. De proef wordt in het dubbel uitgevoerd. Na 2 en 6 dagen bewaren bij 0° worden telkens 8 pakjes ontleed op TVB- en TMA-gehalte. De analyses worden in het dubbel uitgevoerd.

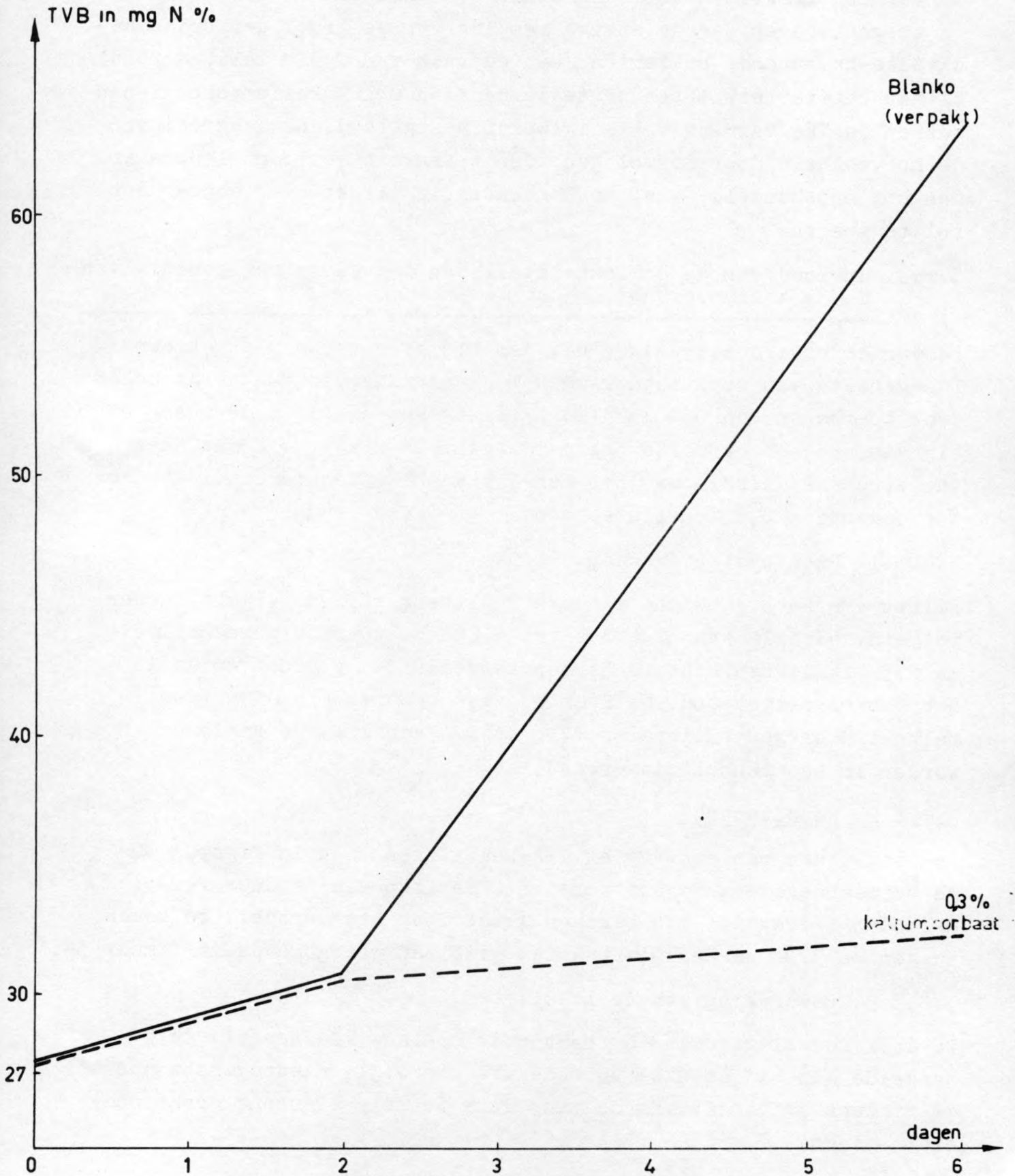
3.6.3.2. Resultaten.

De resultaten van de TVB- en TMA-bepalingen zijn in figuren 32 en 33 weergegeven. Tevens wordt het verloop van de door formol gebonden N-fractie, die bekomen wordt door het verschil te maken tussen de TVB- en de TMA-fractie, grafisch weergegeven in figuur 34.

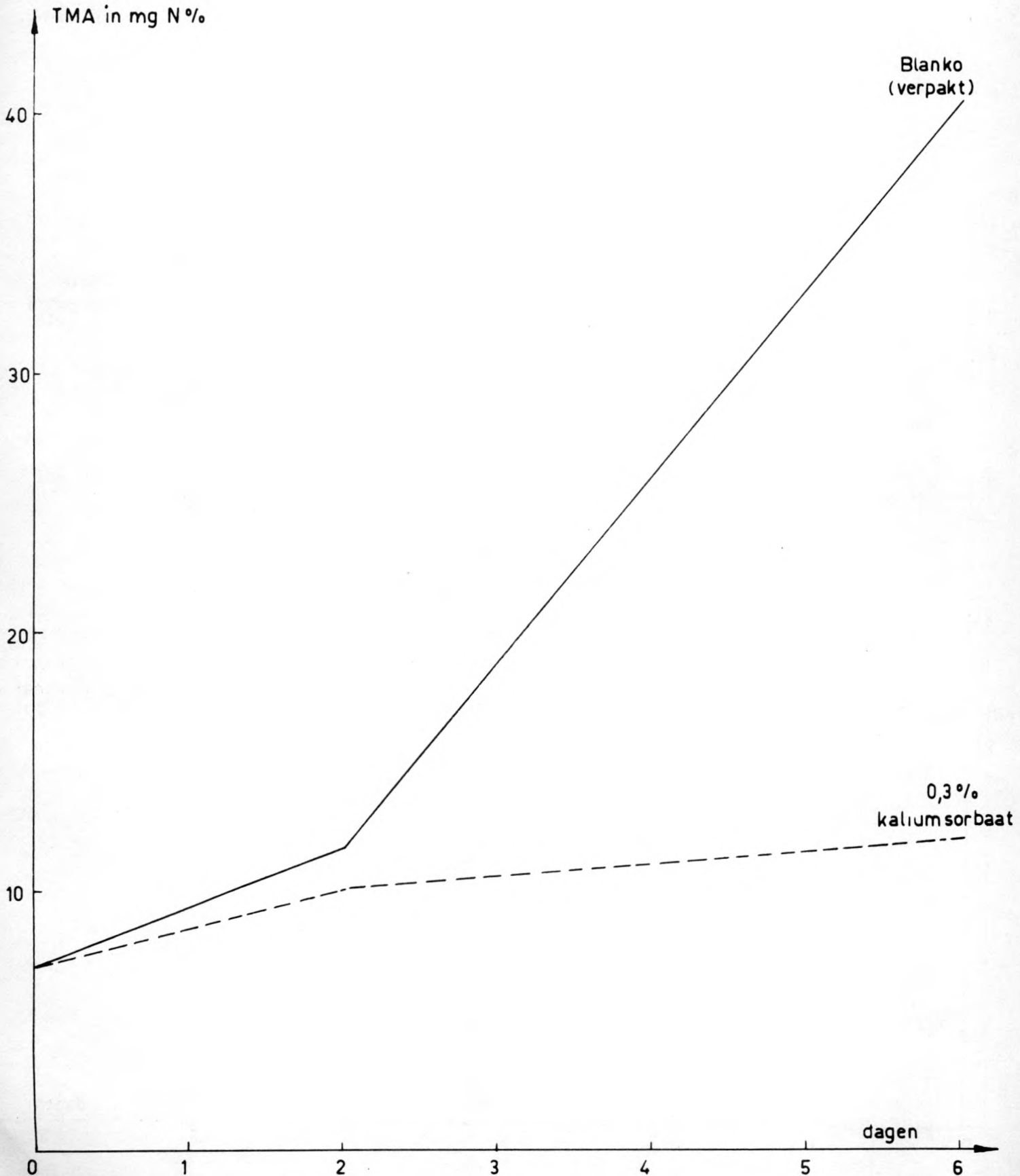
3.6.3.3. Bespreking van de resultaten.

De door formol gevonden N-fractie is opnieuw kleiner bij de behandelde dan bij de onbehandelde vis, terwijl, niettegenstaande de mindere kwaliteit van de vis, deze fractie eveneens praktisch niet stijgt.

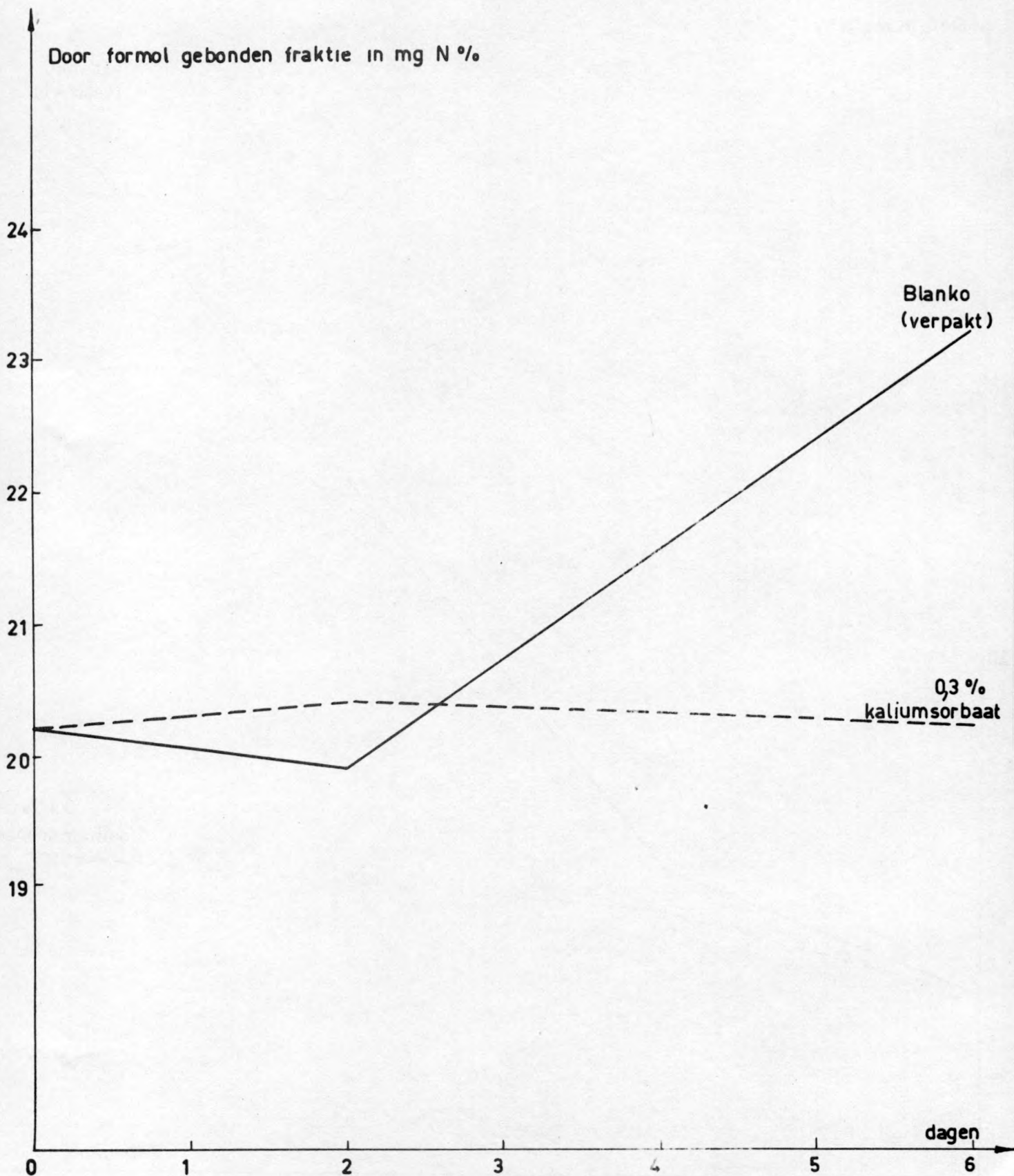
Figuur 32 - Resultaten van de TVB - bepalingen op verpakte kabeljauwfilets van mindere kwaliteit, behandeld met 0,3% kaliumsorbaat



Figuur 33 - Resultaten van de TMA -bepalingen op verpakte kabeljauwfilets van mindere kwaliteit, behandeld met 0,3% kaliumsorbaat



Figuur 34 - Resultaten van de bepalingen van de door formol gebonden N-fractie in kabeljauwfillets van mindere kwaliteit, behandeld met 0,3% kaliumsorbaat



De resultaten tonen duidelijk aan dat de TVB- en de TMA-aangroei opmerkelijk langzamer verloopt bij filets die met 0,3 % kalium-sorbaat zijn behandeld; doch de vorming is niet volledig geremd. Dit kan ofwel worden toegeschreven aan het feit dat de besmetting reeds te diep in het visvlees is binnengedrongen en het kalium-sorbaat als het ware de plaats van besmetting te laat bereikt, ofwel aan een tekort aan kaliumsorbaat. Een te langzame diffusie van kaliumsorbaat en een tekort aan sorbaat kunnen alleen worden ondervangen door een hoger gehalte aan kaliumsorbaat aan de vis toe te voegen. Aangezien volgens de Belgische wetgeving (Belgisch Staatsblad 1968) de toelaatbare hoeveelheid kaliumsorbaat, uitgedrukt in de korresponderende hoeveelheid sorbinezuur, niet meer dan 0,3 % mag bedragen, zijn verdere proefnemingen uit praktisch oogpunt niet meer uitgevoerd.

3.6.4. Invloed van de zuurstofpermeabiliteit van de verpakkingsfilm op de kwaliteit van de met kaliumsorbaat behandelde kabeljauwfilets.

Aangezien door gebruik van 0,3 % kaliumsorbaat bij verse vis die in de polyethyleenfilm van 20 μ dik met 3.600 ml zuurstofpermeabiliteit is verpakt de TVB- en TMA-vorming volledig wordt stilgelegd gedurende een bewaarperiode van 6 dagen bij 0°C, stelt zich de vraag of de permeabiliteit voor zuurstof evenzeer determinerend zal zijn voor het kwaliteitsbehoud als bij voorverpakte vis die geen bewaarstof bevat. Om dit probleem te bestuderen wordt een gelijkaardige proef aangelegd als bij het opstellen van de bederfcurve in functie van de zuurstofpermeabiliteit.

3.6.4.1. Proefomstandigheden.

Filets van kabeljauw die 0,3 % kaliumsorbaat bevatten worden verpakt in een reeks polyethyleenfilms met verschillende zuurstofdoorlaatbaarheden nl. 3.600 ml, 2.100 ml, 1.800 ml en 1.500 ml zuurstof/m²/24 u/1 atm. Na 2,6 en 12 dagen bewaren bij 0° C worden telkens 8 pakjes ontleed op TVB- en TMA-gehalte. De analyses worden telkens in het dubbel uitgevoerd.

3.6.4.2. Resultaten.

In tabel 45 staan de resultaten van de TVB- en TMA-bepalingen, uitgevoerd op met kaliumsorbaat behandelde vis, samengevat.

TABEL 45 - Analyseresultaten van de TVB- en TMA-bepalingen op met sorbaat behandelde kabeljauwfilets die in films met verschillende zuurstofpermeabiliteit zijn verpakt (a)

Zuurstofpermeabiliteit ml/m ² /24 u/1 atm.	3.600ml(20 _μ)			2.100ml(30 _μ)			1.800ml(40 _μ)			1.500ml(50 _μ)		
Dagen bij 0° C	TVB	TMA	Δ	TVB	TMA	Δ	TVB	TMA	Δ	TVB	TMA	Δ
0	21,0	0,0	21,0	21,0	0,0	21,0	21,0	0,0	21,0	21,0	0,0	21,0
2	21,0	0,0	21,0	21,0	0,0	21,0	21,7	0,0	21,7	21,0	0,0	21,0
6	21,0	0,0	21,0	21,7	0,0	21,7	21,7	0,0	21,7	21,0	0,0	21,0
12	28,7	0,0	28,7	26,6	0,0	26,6	25,1	0,0	25,2	23,8	0,0	23,8

(a) De analyseresultaten voor TVB en TMA zijn weergegeven in mg N %. Het verschil tussen TVB en TMA is de door formol gebonden fraktie. Het getal tussen de haakjes geeft de dikte van de film weer.

3.6.4.3. Besprekingen van de resultaten.

De resultaten zijn een bevestiging van de efficiënte werking van het kaliumsorbaat. Gedurende de eerste 6 dagen is geen stijging van de TVB waar te nemen. Dit komt doordat geen TMA en geen door formol gebonden stikstofbestanddelen worden gevormd. Tussen de 6e en 12e dag is echter een stijging waar te nemen in TVB alhoewel er nog altijd geen TMA is gevormd. De stijging wordt echter veroorzaakt door vorming van door formol gebonden stikstofbestanddelen. Dit kan op de eerste plaats worden toegeschreven aan het feit dat op dit tijdstip het inhiberend effect van 0,3% kaliumsorbaat op de bacteriën die verantwoordelijk zijn voor de vorming van ammoniak en primaire aminen verdwijnt en op de tweede plaats aan het begin van de proteolyse die gepaard gaat met vorming van aminozuren die tot ammoniak en primaire aminen kunnen worden omgezet. Het blijkt dat de proteolyse zich in een latere fase van het visbederf voordoet (BEATTY en COLLINS 1939).

Daarenboven is een stijging in TVB-aangroei waar te nemen naarmate de zuurstofpermeabiliteit van de verpakkingsfilm toeneemt. Dit kan worden verklaard doordat de desaminering van de aminozuren, waardoor ammoniak en primaire aminen ontstaan, een oxydatief proces is. Bijgevolg is het aan te nemen dat in een verpakking die minder doorlaatbaar is geringere hoeveelheden ammoniak en primaire aminen zullen worden gevormd. Deze resultaten zijn in overeenstemming met hetgeen bij het verpakken van vlees wordt vastgesteld (INGRAM 1962; CARLIN et al. 1957; WELLS et al. 1958).

3.6.5. Algemene besluiten van de proeven met bewaarstoffen.

Aan de hand van de resultaten van de proeven met bewaarstoffen kunnen volgende besluiten worden getrokken.

1. Citroenzuur in hoge concentraties in kabeljauwfilets toegevoegd, remt de TMA-vorming doch het kan niet worden aangewend aangezien de viseiwitten degenereren met een sapuittreding als gevolg.
2. Het gebruik van 0,3 % kaliumsorbaat remt de TMA-vorming volledig wanneer de beginwaarde voor TMA = 0, m.a.w. bij filets van eerste kwaliteit. Bij gebruik van kaliumsorbaat moeten de kabeljauwfilets in een film met lage zuurstofpermeabiliteit worden verpakt. Dit is in tegenstelling met het verpakken van kabeljauwfilets die geen kaliumsorbaat bevatten waar films met hoge luchtpermeabiliteiten noodzakelijk zijn.

3. Bij het verpakken van onbehandelde kabeljauwfilets in een polyethyleenfilm van 20μ dik met een zuurstofdoorlaatbaarheid van $3.600 \text{ ml/m}^2/24 \text{ u/1 atm.}$ wordt een TVB-waarde van ca 24 mg N % bekomen na 3 dagen bewaren bij 0°C (tabel 36). Deze zelfde waarde wordt bij de met 0,3 % kaliumsorbaat behandelde filets, verpakt in een polyethyleenfilm van 50μ dik en met een zuurstofdoorlaatbaarheid van $1.500 \text{ ml/m}^2/24 \text{ u/1 atm.}$ bekomen na 12 dagen bewaren bij 0°C (tabel 45) m.a.w. de houdbaarheidsperiode is viermaal groter.

SAMENVATTING EN BESLUITEN

=====

De studie van de voorverpakking van vis is uitgevoerd met behulp van een reeks bacteriologische, chemische en technologische verwezenlijkingen waarbij normen voor de zuurstofpermeabiliteit van de film zijn vastgelegd. Tevens zijn deze objektieve kwaliteitsbepalingsmethoden uitzonderlijk nuttig gebleken voor de studie van de invloed van sommige behandelingsprocessen en bewaringskondities.

Bij de studie van de objektieve bacteriologische kwaliteitsbepalingsmethoden is gebleken dat de meeste onderzoekers methoden aanwenden die op beperkt onderzoek zijn gesteund, m.a.w. de factoren die determinerend zijn voor de bacteriologische bepalingen (bodem, zuurtegraad, inkubatietemperatuur en -tijd en monsterneming) zijn onvoldoende uitgetest en aangepast aan de bacteriologische onderzoekingsproblemen van vis. De proefnemingen wijzen uit dat voor de bepaling van het totaal aantal bacteriën per cm^2 huid de monsterneming geschiedt bij middel van een aluminium schabloon, waarmee 18 cm^2 van de huid over gans de lengte van de vis op steriele wijze wordt weggenomen. De plaats van monsterneming mag willekeurig worden gekozen. Het stukje huid wordt gedurende 20 min. in 180 ml steriele Ringeroplossing geschud. Uit de bekomen suspensie wordt een verdunningsreeks aangelegd.

Voor de bepaling van het totaal aantal bacteriën per gram visvlees wordt vooreerst een gedeelte van de huid met behulp van een skalpel van het aanklevend slijm ontdaan. Hierdoor wordt het grootste gedeelte van de bacteriën verwijderd. Daarna wordt het oppervlak volledig steriel gewreven met katoenwol, doordrengd met ethanol. De huid wordt dan aseptisch verwijderd en van het blootgelegde vlees wordt een hoeveelheid in een vooraf getareerde petrischaal afgewogen. Vervolgens wordt met het visvlees een 10 % suspensie gemaakt door met Ringeroplossing, gedurende ± 2 minuten, steriel te homogeniseren.

De plaats van monsterneming mag geschieden aan de donkere of bleke kant onder of boven de zijlijn van de vis. Zoals bij de monsterneming van de huid is het verkieslijk dit uit te voeren over gans de lengte van de vis om de nauwkeurigheid te verhogen.

De telling geschiedt volgens de klassieke gietplaatmethode. Als bodem wordt T.G.E.A., met gewoon water bereid, aangewend. De zuurtegraad heeft als waarde ca 6,5. De inkubatietijd is 5 x 24u bij 20 à 25° C.

Het totaal aantal 'bedervers' wordt bepaald door een combinatie van de methode van WOOD en BAIRD (1943) en de pikraatmethode van DYER (1945).

De bepaling van de totale hoeveelheid vluchtige basische stikstof en van het trimethylamine blijken uiterst betrouwbare kwaliteitstesten te zijn. Alhoewel deze beide methoden door tal van onderzoekers reeds met succes worden toegepast bij de studie van verse vis zijn ze nogmaals uitgetest op hun toepassingmogelijkheid voor de studie van voorverpakte vis. Bij het opstellen van de ijkcurve voor de TMA-bepaling blijkt dat het intercept niet wezenlijk verschillend is van nul m.a.w. het intercept is aanvaardbaar binnen het kader van de proeffouten. De afwijkingen van de experimentele punten ten opzichte van de berekende rechte vallen eveneens binnen de grenzen van de proeffouten. Bijgevolge mag bij de TMA-bepaling beroep worden gedaan op de berekende of op de experimentele ijkcurve. Tevens wordt met behulp van een 'recovery test' aangetoond dat in de verpakte vis geen storende invloeden bij de TMA-bepaling voorkomen.

De bederfcurve in functie van de zuurstofpermeabiliteit toont duidelijk aan dat het bederf bij 0°C niet rechtlijnig in functie van de zuurstofpermeabiliteit van de film verloopt. Er is een maximaal bederf waar te nemen, bij een zuurstofpermeabiliteit van 1.800 ml/m²/24 u/1 atm. Deze hoge graad van bederf kan worden toegeschreven aan het feit dat er bij een doorlaatbaarheid van 1.800 ml zuurstof in het pakje een ideale zuurstofspanning tot stand komt die toelaat dat een fakultatief anaërobe respiratie plaats heeft waardoor een maximale hoeveelheid TMA wordt gevormd. Het verloop van de bederfcurve bij hogere bewaartemperaturen (3° en 6°C) is van dezelfde aard als deze van de bederfcurven bij 0°C. Met behulp van de curve kan daarenboven worden afgeleid dat een film met 3.600 ml zuurstofdoorlaatbaarheid de beste resultaten geeft voor het voorverpakken van kabeljauwfilets.

Verpakkingsproeven van kabeljauwfilets verpakt in andere films leveren dezelfde resultaten op als kan worden verwacht aan de hand van de bederfcurve opgesteld met polyethyleenfilms. Voor ongefileerde verse vis echter, waar het visvlees praktisch niet of minder besmet is dan filets zal een film met een zuurstofpermeabiliteit van $2.700 \text{ ml/m}^2/24 \text{ u/l atm.}$ betere resultaten afwerpen. Het komt er bijgevolg op aan bij het verpakken van filets zo weinig mogelijk anaërobe condities te scheppen teneinde de TMA-vorming te beletten, terwijl bij gehele vis het er op aan komt de bakteriëngroei op de huid normaal te laten evolueren; het bederf op de huid wordt immers bij **konsumptie** uiteraard niet zo sterk waargenomen. De bakteriëngroei op de huid mag evenwel niet te veel worden bevorderd, doch moet anderzijds ook niet worden tegengewerkt door het gebruik van extreme hoge of lage zuurstofdoorlaatbaarheidswaarden.

Aangezien door krimpen van een amorfe film de zuurstofpermeabiliteit afneemt is het noodzakelijk bij gebruik van dergelijke krimpfilm de dikte te kennen na krimpen en hiermede rekening te houden bij de aankoop van een verpakkingsfilm die aan strenge normen van permeabiliteit moet voldoen. Bij een kristallijne krimpfilm echter wordt de gasdoorlaatbaarheid niet zo zeer gewijzigd onder invloed van het krimpen.

Door het gebruik van een verpakkingsfilm wordt de vorming van de door formol gebonden vluchtige stikstofbestanddelen (ammoniak en primaire aminen) geremd. Dit is te wijten aan het feit dat de desaminering van de aminozuren, die een oxydatief proces is, langzamer verloopt aangezien de vis grotendeels door de film wordt beschermd tegen het contact met de luchtzuurstof. Het TMA-gehalte integendeel stijgt veel sneller in de verpakte dan in de onverpakte vis. Dit wordt toegeschreven aan de aanwezigheid van trimethylamineoxydereducerende bacteriën die TMAO afbreken voor een facultatief anaërobe respiratie.

De vorming van TMA wordt geremd door toevoegen van citroenzuur of kaliumsorbaat aan de vis. Citroenzuur vertraagt de vorming van het TMA en van de door formol gebonden stikstofbestanddelen. Dit is te wijten aan een remming van de groei van de bacteriën, veroorzaakt door een verlaagde pH. Hier dient echter opgemerkt dat bij gebruik van 0,1 % en 0,3 % citroenzuur het procent "bedervers" ge-

lijk blijft terwijl bij gebruik van 1 % citroenzuur het procent "bedervers" daalt.

Toch kan citroenzuur niet worden aangewend aangezien door verlaging van de pH een denaturatie van de viseiwitten optreedt. Dit gaat gepaard met een volledig wit worden van het visvlees en een overvloedige vochtuittrekking. Deze verschijnselen bieden een uiterst onaantrekkelijk beeld aan het voorverpakte produkt.

Bij gebruik van 0,1 % en 0,3 % kaliumsorbaat wordt het bederf praktisch volledig stilgelegd. Dit is voornamelijk toe te schrijven aan een inhibitie van de trimethylamineoxydereducerende bacteriën. De concentratie aan sorbaat speelt een rol aangezien 0,3 % betere resultaten blijkt af te werpen dan 0,1 %. Daarenboven verloopt de aangroei van de door formol gebonden N-fractie langzamer dan bij vis die niet met kaliumsorbaat is behandeld. De concentratie aan sorbaat speelt hier echter een kleine rol.

Wanneer de vis niet meer van eerste kwaliteit is m.a.w. wanneer reeds TMA aanwezig is verloopt de vorming van TMA en de door formol gebonden stikstofbestanddelen opmerkelijk langzamer door gebruik van 0,3 % kaliumsorbaat; doch de vorming van TMA is niet volledig geremd zoals dit bij verse vis het geval is.

De zuurstofpermeabiliteit van de pefilm is eveneens determinerend bij de verpakking van met 0,3 % kaliumsorbaat behandelde vis. Doch een gans andere bederfcurve wordt verkregen. De film met de laagste permeabiliteit werpt de beste resultaten af aangezien het bederf gedurende de eerste 12 dagen uitsluitend wordt veroorzaakt door de aangroei van de door formol gebonden vluchtige stikstofbestanddelen. De vorming van deze fractie geschiedt vlugger naargelang meer zuurstof aanwezig is vermits de desaminering van de aminozuren die door proteolyse zijn gevormd, een oxydatieve reactie is.

Samengevat kan er bij de voorverpakking van kabeljauwfilets worden geadviseerd voor een film met een zuurstofpermeabiliteit van $3.600 \text{ ml/m}^2/24 \text{ u/1 atm.}$, wanneer geen bewaarstoffen zijn toegevoegd. Voor schol is een film met 2.700 ml het best geschikt doch praktisch gezien kan ook de film met 3.600 ml doorlaatbaarheid worden aangewend gezien gedurende het bewaren geringe verschillen

in kwaliteit van de vis worden bekomen. Wanneer echter kaliumsorbitaat bij de vis wordt gevoegd moet worden gestreefd naar een film met lage zuurstofpermeabiliteit. De film met een doorlaatbaarheid van $1.500 \text{ ml/m}^2/24 \text{ u/1 atm.}$ blijkt zeer goede resultaten af te werpen aangezien slechts na 12 dagen bewaren bij 0°C een TVB-waarde (24 mg N %) wordt bekomen die bij onbehandelde vis, verpakt in de film met 3.600 ml doorlaatbaarheid reeds na 3 dagen wordt bereikt.

LITERATUUR

=====

- ADAMS, R., FARBER, L., en LERKE, P. (1964) : Appl. Microbiol., 12, 277.
- ANDERSON, A. (1907) : 26th Ann. Rept. Fishery Bd. (Scotland) Part III. Scientific Investigns, 13.
- ANTONACOPOULOS, N. (1960) : Z. Lebensmittel-Unters. u. Forsch., 113, 113.
- APPLEMAN, M., BAIN, N., en SHEWAN, J. (1964) : J. appl. Bact., 27, 69.
- ASSCHEHOUG, V., en VESTERHUS, R. (1943) : Zentr. Bakteriöl. Parasitenk. Akt. II., 106, 5.
- BALDWIN, E. (1960) : Dynamic Aspects of Biochemistry, 3e Uitg., University Press, Cambridge en Comp. Biochem. Physiol., 1, 24.
- BAUER, E. (1960) : A Statistical Manual for Chemists, Academic Press, New York.
- B.D.H. (1968). Persoonlijk kommunikatie.
- BEATTY, S., en GIBBONS, N. (1937) : J. Biol. Bd. Can., 3, 77.
- BEATTY, S. (1938) : J. Fish. Res. Bd. Can., 4, 63.
- BEATTY, S. (1939) : J. Fish. Res. Bd. Can., 4, 229.
- BEATTY, S., en COLLINS, V. (1939) : J. Fish. Res. Bd. Can., 4, 412.
- BEATTY, S., en COLLINS, V. (1940, a) : J. Fish. Res. Bd. Can., 4, 412.
- BEATTY, S., en COLLINS, V. (1940, b) ; J. Fish. Res. Bd. Can., 5, 32.
- BECKER, E., en ROEDER, I. (1957) : Fette, Seifen, Anstrichmittel, 59, 321.
- BEDFORD, R. (1933) : Contrib. Can. Biol. and Fisheries, N.S., 7, 433.
- BELGISCH STAATSBLED (1968) ; 138, 1929.
- BENOIT, G., en NORRIS, E. (1942) : Ind. Eng. Chem., 14, 823.
- BENOIT, G., en NORRIS, E. (1945) : J. Biol. Chem., 158, 439.
- BILINSKI, E. (1962) : J. Fish. Res. Bd. Can., 19, 505.
- BILINSKI, E. (1964) : J. Fish. Res. Bd. Can., 21, 765.
- BREGOFF, A., ROBERTS, E., en DELWICHE, C. (1953) : J. Biol. Chem., 205, 565.
- BUTTIAUX, R. (1962) : in : Fish as Food, vol. II. Uitg. G. Borgström, Academic Press, New York and London.
- CARLIN, A., HOLL, B., en WALKER, H. (1957) : Food Tech., Champaign, 11, 573.
- CARLUCCI, A., en PRAMER, D. (1959) : Appl. Microbiol., 7, 388.
- CARROL, B., REESE, G., en WARD, B. (1968) : in : Microbiological study of iced shrimp : excerpts from the 1965 Iced-Shrimp Symposium. United States department of the interior, Fish and

Wildlife Service, Bureau of Commercial Fisheries, circular 284.

- CASTELL, C., en ANDERSON, G. (1948) : J. Fish. Res. Bd. Can., 7, 370.
- CASTELL, C., ANDERSON, G., en PIVNICK, H. (1948) : J. Fish. Res. Bd. Can., 7, 378.
- CLARK, W. (1928) : in : The determination of hydrogenions. Williams and Wilkins co. Baltimore, Md.
- COLLINS, V. (1941) : J. Fish. Res. Bd. Can., 5, 197.
- COLWELL, R., en LISTON, J. (1960) : Appl. Microbiol., 8, 104.
- COLWELL, R., (1962) : J. appl. Bact., 25, 147.
- CONWAY, E. (1962) : in : Microdiffusion Analysis and Volumetric Error. Crosby Lockwood & Son Ltd., London.
- COYNE, F. (1932) : J. Soc. Chem. Ind., 52, 119T-121T.
- COYNE, F. (1933) : J. Soc. Chem. Ind., 52, 19T-24T.
- DA COSTA, A., TOMIYAMA, T., en STERN, J. (1960) : in : Chilling of Fish - Staatsdrukkerij - en uitgeversbedrijf, Den Haag.
- DEBEVERE, J. (1967) : Rijksstation voor Zeevisserij, Oostende, werkgroep "Voorverpakking Vis" (I.W.O.N.L.), publikatie nr. 1.
- DELEST, P. (1969) : Agefi Emballage, april 69, p. 18.
- Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures (1953) : Difco Laboratories. Detroit 1, Michigan.
- Difco supplementary literature (1966) : Difco Laboratories, Detroit 1, Michigan, U.S.A.
- DUBOIS, P. (1968) ; in : Plastiques modernes. Masson et Cie éditeurs, Paris.
- DYER, W., SIGURDSSON, G., en WOOD, A. (1944) : Food Res., 9, 138.
- DYER, W. (1945) : J. Fish. Res. Bd. Can., 6, 351.
- DYER, W., en MOUNSEY, Y. (1945) : J. Fish. Res. Bd. Can., 6, 359.
- DYER, W., DYER, F., en SNOW, M. (1946) : J. Fish. Res. Bd. Can., 6, 403.
- DYER, F., en WOOD, A. (1947) : J. Fish. Res. Bd. Can., 7, 17.
- DYER, F. (1947) : J. Fish. Res. Bd. Can., 7, 128.
- DYER, W. (1950) : J. Fish. Res. Bd. Can., 7, 576.
- DYER, W. (1952) : J. Fish. Res. Bd. Can., 8, 314.
- ELLIOTT, R. (1948) : Commercial Fisheries Review, 10, 11.
- FERGUSON, W., en POWRIE, W. (1957) : Appl. Microbiol., 5, 41.
- FOLIN, O. (1922) : J. Biol. Chem., 51, 377.
- FOLIN, O., en CIOCALTEU, V. (1927) : J. Biol. Chem., 73, 627.
- GEORGALA, D. (1957) : J. appl. Bact., 20, 23.
- GEORGALA, D. (1958) : Gen. Microbiol., 18, 84.

- GRIFFIN, P. (1953) : Trans. Am. Fisheries Soc., 83, 241.
- GULASEKHARAM, J., VELOUDAPILLAI, T., en NILES, G. (1956) : J. Hyg., 54, 581.
- GUNKEL, W., GALEN, E., en ZOBELL, C. (1961) : Helgoländer Wissensch. Meeresunter., 8, 85.
- HARTLEY, H. (1950) : Biometrika, 37, 308.
- HASHIMOTO, Y., en OKAICHI, T. (1958) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 24, 640.
- HERBERT, R., en HAIGHT, R. (1967) : J. appl. Bact., 30, 224.
- HESS, E. (1932) : Contrib. Can. Biol. and Fisheries, 7, 149.
- HESS, E. (1934a) : Contrib. Can. Biol. and Fisheries, 8, 461.
- HESS, E. (1934b) : Contrib. Can. Biol. and Fisheries, 8, 491.
- HESS, E. (1950) : Food Technol., 4, 477.
- HODGKISS, W., en JONES, N. (1955) : Biochem. J., 61, IV.
- HUGHES, R. (1958) : Nature, 181, 1281.
- INGRAM, M. (1962) : J. appl. Bact., 25, 259.
- JACOBS, H., en HOFFMAN, W. (1931) : J. Biol. chem., 93, 685.
- JONES, N. (1962) : in : Recent Advances in Food Science Vol. 1, Uitg. G. Hawthorn en J. Muil Leitch, Butterworths, London.
- KAWABATE, T. (1953) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 19, 505.
- KEIL, B., en SORMOVA, Z. (1965) : in : Laboratoriumstechnik für Biochemiker. Akademische Verlagsgesellschaft. Geest & Portig K.G., Leipzig.
- KISER, J., en BECKWITH, T. (1944) : Food Res., 9, 250.
- KISER, J. (1944) : Food Res., 9, 257.
- KOENIG, J. (1910) : in : Untersuchung von Nahrungs-, Genussmitteln und Gebrauchsgegenständen. J. Springer, Leipzig.
- KREBBS, H. (1937) ; Biochem. J., 31, 2095.
- LEIFSON, E. (1963) : J. Bacteriol., 85, 1183.
- LERKE, P., ADAMS, R., en FARBER, L. (1963) : Appl. Microbiol., 11, 458.
- LERKE, P., ADAMS, R., en FARBER, L. (1965) ; Appl. Microbiol., 13, 625.
- LERKE, P., FARBER, L., en ADAMS, R. (1967) : Appl. Microbiol., 15, 770.
- LEWIS, J., en CORPE, W. (1964) : Appl. Microbiol., 12, 13.
- LISTON, J., (1956) : J. Gen. Microbiol., 15, 305.
- LISTON, J. (1957) : J. Gen. Microbiol., 16, 205.
- LISTON, J. (1965) : in : The Technology of Fish Utilization. Uitg. R. Kreuzer (F.A.O. Rome), Fishing News (Books), London.
- LOBBEN, J., en LEE, J. (1968) : Appl. Microbiol., 16, 1320.
- LUECKE, F., en GEIDEL, W. (1935) : Z. Lebensmittel - Unters. u. Forsch., 70, 411.

- LUECKE, F., en FRERCKS, E. (1940) : Vorratspflege u. Lebensmittel-
forsch., 3, 130.
- LUDORFF, W. (1960) : in : Fische und Fisch-Erzeugnisse. Berlin,
Verlag A. Hayn's, Erben.
- LYMAN, J., en FLEMING, R. (1940) : J. Marine Research, 3, 134.
- LUYPEN, A. (1958) : J. Sci. Food Agric., 9, 410.
- MACLEOD, R., ONOFREY, E., en NORRIS, M. (1954) : J. Bacteriol.,
68, 680.
- MALTSCHESKY, N., en PARTMANN, W. (1950) ; Arch. f. Microbiol.,
16, 252.
- MASUROVSKY, E. (1963) : Appl. Microbiol., 11, 229.
- MATHEW, C., LEKSHMY, A., KRISHNA IYER, H., en PILLAI, V. (1964) :
Fish. Technol., 1, 1.
- MELNICK, D., VAHLTEICH, en HACKETT, A. (1956) : Food Res., 21, 145.
- NEILANDS, J. (1945) : J. Fish. Res. Bd. Can., 6, 368.
- NEWTON, D. (1924) : Contributions to Canadian Biology, 1, 377.
- NICKERSON, J., GOLDBLITH, S., en PROCTOR, B. (1950) : Food Tech-
nol., 4, 84.
- NICKERSON, J., en GOLDBLITH, S. (1964) : J. Milk and Food Tech-
nol., 27, 7.
- NORRIS, E., en BENOIT, G. (1945) : J. Biol. Chem., 158, 433.
- OCKAICHI, T., MANABE, M., en HASHIMOTO, Y (1959) : Bull. Japp. Soc.
Scient. Fish., 25, 136.
- OPPENHEIMER, C. (1952) : J. Bacteriol., 64, 783.
- PARTMANN, W. (1966) : Z. Lebensmitt.-Untersuch., 129 , 205.
- PFISTER, R., en BURKHOLDER, P. (1965) : J. Bacteriol., 90, 863.
- PROCTOR, B., en NICKERSON, J. (1935) : J. Bacteriol., 30, 377.
- PROCTOR, B., NICKERSON, J., en GOLDBLITH, S. (1950) : Refrig. Eng.,
59, 375.
- REAY, G. (1935) : J. Soc. Chem. Ind., 54, 145.
- REAY, G., en SHEWAN, J. (1949) : Advances in Food Research, 3, 343.
- REED, G., en SPENCE, C; (1929) : Contrib. Can. Biol. and Fisheries,
4, 259.
- RONALD, O., en JAKOBSEN, F. (1947) : J. Soc. Chem. Ind., 66, 160.
- RUCKER, R., EARP, B., en ORDAL, E. (1953) : Trans. Am. Fisheries
Soc., 83, 297.
- SALUNKHE, D. (1957) : Food Technol., 11, 667.
- SCHOLES, R., SHEWAN, J. (1964) : Adv. Mar. Biol., 2, 133.
- SCHOOP, G. (1936) : Deut. tierarztl. Wochschr., 44, 370.
- SHAW, B., en SHEWAN, J. (1968) : J. appl. Bact., 31, 89.
- SHEWAN, J. (1938) : J. Bacteriol., 35, 397.
- SHEWAN, J. (1949) : J. Roy. Sanit. Inst., 59, 394.

- SHEWAN, J., en JONES, N. (1957) : J. Sci. Food Agric., 8, 491.
- SHEWAN, J., (1961) : in : Fish as Food, Vol. I, Uitg. G. Borgstrøm, Academic Press, New York and London.
- SHEWAN, J., (1962a) : in : Fish as Food, Vol. II, Uitg. G. Borgstrøm, Academic Press, New York and London.
- SHEWAN, J., (1962b) ; in : Recent Advances in food Sciences, Vol. I, Uitg. J. Hawthorn en J. Muil Leitch, Butterworths, London.
- SIGURDSSON, G. (1947) : Analytic. Chem., 19, 892.
- SIMIDU, W., en OISI, K. (1951) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 16, 547.
- SIMIDU, W., en OISI, K. (1951a) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 16, 423.
- SIMIDU, W., en OISI, K. (1951b) ; Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 17, 38.
- SIVADJIAN, J. (1931) : J. Pharm. Chem., 13, 528.
- SOUDAN, F. (1965) : in : La conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques, J.B. Baillièrre et fils, Paris.
- SPENCER, R. (1959) : J. appl. Bact., 22, 73.
- SPENCER, R. (1961a) : J. appl. Bact., 24, 4.
- SPENCER, R. (1961b) ; J. appl. Bact., 24, 110.
- SPINELLI, J. (1964) ; Fish. Ind. Res., 2, 17.
- Standard methods of bacteriological analysis for use in fish inspection laboratories : department of Fisheries of Canada (1964) in : The Technology of Fish Utilization, Uitg. R. Kreuzer (F.A.O. Rome), Fishing News (Books) London.
- STARR, L. (1955) : M.S. Thesis, M.I.T. Dept. of Food Technol.
- STEWART, M. (1932) : J. Marine Biol. Assoc. United Kingdon, 18, 35.
- STEWART, J., en CASTELL, C. (1960) ; J. Fish. Res. Bd. Can., 17, 595.
- SUWA, A. (1909) : Pflüger's Arch. Ges. Physiol., 128, 421 en 129, 231.
- TARR, H., en SUNDERLAND, P. (1940) : J. Fish. Res. Bd. Can., 5, 148.
- TARR, H. (1940) : J. Fish. Res. Bd. Can., 5, 187.
- TARR, H. (1941) : J. Fish. Res. Bd. Can., 5, 211.
- TARR, H. (1945) : J. Fish. Res. Bd. Can., 6, 349.
- TARR, H. (1954) : Bacteriol. Rev., 18, 1.
- TAKADA, K. en NISHIMOTO, J. (1958) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 24, 636.
- THJØTTA, T., en SØMME, O. (1938) : Acta Pathol. Microbiol. Scand., Suppl. No. 37, 514.
- TOMLINSON, N., en MAC LEOD, R. (1957) : Can. J. Microbiol., 3, 627.
- TOPPING, J. (1960) : in : Errors of Observation and their Treatment, Chapman & Hall, Ltd., London.
- TREIBER, H. (1959) : Dtsch. Lebensmittel. Rdsch., 6, 146.
- TRETSVEN, W. (1963) : J. Milk and Food Technol., 26, 302.

- WANG, J., en TARR, D. (1955) : J. Am. Chem. Soc., 77, 6205.
- WATANABE, K. (1964) ; in : The Technology of Fish Utilization. Uitg. R. Kreuzer (F.A.O. Rome), Fishing News (Books), London.
- WATSON, D. (1939a) : J. Fish. Res. Bd. Can., 4, 252.
- WATSON, D. (1939b) : J. Fish. Res. Bd. Can., 4, 267.
- WELLS, F., SPENCER, J., en STADELMAN, W. (1958) : Food Tech. Champaign, 12, 425.
- WITTFOGEL, H. (1960) : Arch. Lebensmittelhyg., 4, 84.
- WITTFOGEL, H. (1961) : in : Sanitary Regulations for Fish and Fish products. O.E.C.D., Parijs.
- WOOD, A., SIGURDSSON, G., en DYER, W. (1942) : J. Fish. Res. Bd. Can., 6, 53.
- WOOD, A., en BAIRD, E. (1943) : J. Fish. Res. Bd. Can., 6, 194.
- WRIGHT, H. (1961) : Food Trade Review, 31, 43.
- WRONSKI, M. (1966) : Chemia analit., 11, 799. (Anal. Abstr. 14, 6895, 1967).
- YAMAMOTO, M., en SONEHARA, M. (1953) : Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 19, 761.
- YOU DEN, W. (1959) : in : Statistical Methods for Chemists, John Willy & Sons, Inc., N.Y.
- ZOBELL, C. (1934) : Quart. Rev. Biol., 9, 460.
- ZOBELL, C. (1941) : J. Marine Research, 4, 42.
- ZOBELL, C. (1946) : in : Marine Microbiology, Chronica Botanica co., Waltham, Massachusetts.

SUMMARY

=====

In the distribution and processing sector of fish and fishery products the packing and presentation of the products as yet, still present particular difficulties, especially as the buying habits and the demands of the customer continually change; the consumer insists upon better quality and presentation as well as upon an ample assortment and he looks out for quick purchasing possibilities preferably of "dressed" products.

One thing and another is cause and effect of the creation of "self-service" shops and of the sale of pre-packed products. For a diversity of foodstuffs there a fairly complete pre-packing system already exists. Fresh fish and fishery products however remain somewhat behind on this evolution, although in many countries also in Belgium - more and more efforts are being made in order to introduce the pre-packing of these products.

The pre-packing of fish however evokes a number of problems due to the diversity of the packing material, the variety of the raw material and the sensitiveness to the storage conditions. These three factors evidently exert an interaction upon each other, whereby the knowledge of the interaction between the packing material and the raw material in relation to the storage is of crucial importance.

An extensive market study has shown that for the pre-packing of foodstuffs many films are used. The most current packing films for fish are the cellophane and the polyvinylchloride (PVC) films. The PVC is used both as a shrink film and as a stretch film. All these films possess a low water vapour permeability, which due to the high moisture content of fish will not play an important part during the spoilage of the fish. The oxygen permeability however differs widely and constitutes at the same time a predominating factor during the shelf-life of pre-packed fish.

The aim of this study therefore is to elaborate the deterioration curve of the fish in relation to the oxygen permeability of the films and in relation to the storage temperature. The applicability of the deterioration curve is subsequently tested upon some packing films which differ from those which are used to draw up the deterioration curve.

The film which is found as being "the most ideal" film is further used in the research to study the influence of shrinking process, the influence of the packing material and the addition of some preservatives.

The whole research is carried out in view of compiling standards to which a film must conform in order to be proposed as "the most ideal" film for the pre-packing of fresh fish. These data are useful for the elaboration of an optimum packing pattern as well as for the development of an optimum quality pattern of the raw material.

In order to judge the quality of the pre-packed fish objective quality determination methods must be called upon. During this study three bacteriological and two chemical methods were applied. As chemical analysis methods the determination of the total quantity of volatile basic nitrogen (TVN) and the determination of the trimethylamine content (TMA) were used. These chemical determinations are frequently employed in research concerning the quality of fish and fishery products. These methods are nevertheless once again tested on their applicability to the study of the pre-packing of fish.

The bacteriological activity has a special significance during the spoilage of fish and many research-workers are of the opinion that an accurate knowledge of the bacteria and their activity in the fish flesh can serve as a good quality index.

As regards the bacteriological methods little or no uniformity seems to exist between the different research-workers concerning the culture medium, the pH, the incubation temperature and the incubation time, the technique and the place of sampling. Some research-workers use methods based on limited research. Others use methods applied to the microbiological research of milk, meat or water. In consequence it is of the utmost importance to perfect the bacteriological determination methods. In this thesis the determinations of the total number of bacteria per cm^2 of skin, of the total number of bacteria per gramme fish flesh and of the total number of trimethylamineoxide reducing bacteria are perfected and applied to the study of the pre-packing of fish.

1. EXPERIMENTAL.

=====

1.1. The bacteriological methods.

As bacteriological methods the determinations of the total number of aerobic bacteria per cm² of skin and per gramme fish flesh are applied as well as the count of the total number of trimethylamineoxide reducing bacteria or "spoilors".

1.1.1. Determination of the total number of aerobic bacteria per cm² of skin and per gramme fish flesh.

Diverse culture media are used for the bacteriological determinations. The choice of the medium however is based upon limited research or on media employed for the microbiological study of other foodstuffs such as milk or meat. Different values for pH and temperature are also taken into account whereas there is also no uniform incubation time. Concerning the necessity to use sea-water in the preparation of the medium doubts also arise. Furthermore no references are to be found in the literature as regards a justified place for sampling.

Therefore a study is first of all carried out comprising the following elements : the selection of the most appropriate culture medium, the use of sea-water in the preparation of the medium, the determination of the optimum pH, the determination of the incubation temperature and the incubation time as well as the justified sampling technique. Based upon these elements analyses were carried out and the results were checked on their accuracy.

1.1.1.1. Comparison between ten culture media.

During this study ten media were compared; these culture media are the most frequently cited in the literature.

The cultures have the following composition :

- Medium 1 : Tryptone glucose extract agar (T.G.E.A.) (Difco Manual 1953)

Beef extract 3 g : tryptone 5 g; dextrose 1 g; agar 15 g; water 1,000 ml; pH 6.5.

This medium is mentioned in the standard method for the bacteriological examination of fish in Canada (Standard methods of

bacteriological analysis for use in fish inspection laboratories : department of fisheries of Canada, 1964). LERKE, ADAMS and FARBER (1963) use T.G.E.A. in the study of the bacteriological spoilage in cod fillets whereas CAROLL, REESE and WARD (1968) apply the same method for the determination of the total number of bacteria in shrimps.

- Medium 2 : Bacto marine agar (B.M.A.) (ZOBELL 1941; Difco supplementary literature 1966)

Peptone	: 5.0 g	Yeast extract	: 1.0 g
Agar	: 15.0 g	Iron citrate	: 0.1 g
NaCl	: 19.45 g	MgCl ₂	: 8.8 g
Na ₂ SO ₄	: 3.24 g	CaCl ₂	: 1.8 g
KCl	: 0.55 g	NaHCO ₃	: 0.16 g
H ₃ BO ₃	: 0.022 g	Na ₂ SiO ₃	: 0.004 g
NaF	: 0.0024 g	NH ₄ NO ₃	: 0.0016 g
Na ₂ HPO ₄	: 0.008 g	KBr	: 0.08 g
SrCl ₂	: 0.034 g	Water	: 1,000 ml
pH	: 7.4		

- Medium 3 : (SPENCER 1961a)

Beef extract Lab Lemco 10 g; peptone 10 g; agar 15 g; water 250 ml; sea-water 750 ml; pH 7.6.

- Medium 4 : (COLWELL 1962)

Nutrient broth 8 g; yeast extract 5 g; agar 15 g; sea-water 1,000 ml; pH 6.1.

- Medium 5 : (TRETSEVEN 1963)

Beef extract 3 g; peptone 5 g; agar 15 g; NaCl 15 g; water 1,000 ml; pH 7.1.

- Medium 6 : (GEORGALA 1957; GEORGALA 1958)

Lab Lemco 5 g; peptone 10 g; agar 15 g; sea-water 1,000 ml; pH 7.4.

- Medium 7 : (DYER 1947)

Peptone 2 g; beef extract 2 g; yeast extract 2 g; glucose 1 g; NaCl 5 g; K₂HPO₄ 1 g; agar 15 g; water 1,000 ml; pH 7.2.

- Medium 8 : (GUNKEL et al. 1961)

Casein hydrolysate 5 g; K₂HPO₄ 0.05 g; FePO₄ 0.01 g; agar 15 g; water 250 ml; sea-water 750 ml; pH 7.4.

- Medium 9 : (ELLIOTT 1948)

Beef extract 3 g; peptone 5 g; agar 15 g; sea-water 1,000 ml; pH 7.0.

- Medium 10 : (APPLEMAN et al. 1964)

Beef extract Lab Lemco 10 g; peptone 10 g; NaCl 5 g; agar 15 g; water 1,000 ml; pH 6.1.

In most cases natural filtered sea-water is used after storing in darkness. This storage is aimed at the breaking down of the organic components in order to obtain an identical composition of the sea-water of different origins and also to neutralize its bacteriostatic properties.

Some authors even make use of artificial sea-water to prepare bacteriological culture media for marine bacteria. According to MacLEOD, ONOFREY and NORRIS (1954) artificial sea-water may be used instead of natural sea-water.

Artificial sea-water was therefore also used during this study.

This artificial sea-water was composed according to the formula proposed by Difco in the compound marine agar medium (B.M.A.) (ZOBELL 1941; Difco supplementary literature 1966).

A first series of experiments in fivefold is built up with the ten mentioned cultures; an identical degree of acidity, viz. pH = 7.0 is established. A second series of experiments was also carried out in fivefold with the same series of cultures but with a degree of acidity as mentioned in the literature. When the pH is not stated in the literature, the pH obtained after sterilization is measured. The cell suspension is obtained through shaking a piece of skin of 18 cm² in a flask of 500 ml with 180 ml sterile Ringer solution for 30 minutes. The sample of skin is cut out by means of an aluminium plate of known dimensions and by a sterile scalpel. The bacterial count is made according to the classical petri disc method. The incubation temperature stands at 22° C and the counts are made after 3, 5 and 6 days.

1.1.1.2. Use of sea-water.

As some research-workers use sea-water in the preparation of the culture media whilst others on the contrary use distilled water, an experiment is carried out to determine whether the use of sea-water is essential to check the total number of bacteria in fish.

Four types of artificial sea-water were employed, viz. :

- Sea-water according to the formula of Difco (1966)

NaCl	: 19.45 g	MgCl ₂	: 8.8 g
Na ₂ SO ₄	: 3.24 g	CaCl ₂	: 1.8 g
KCl	: 0.55 g	NaHCO ₃	: 0.16 g
H ₃ BO ₃	: 0.022 g	Na ₂ SO ₃	: 0.004 g
NaF	: 0.0024 g	NH ₄ NO ₃	: 0.0016 g
Na ₂ HSO ₄	: 0.008 g	KBr	: 0.08 g
SrCl	: 0.034 g	H ₂ O	: 1,000 ml

- Sea-water according to the formula of ZOBELL (1946)

NaCl	: 24.32 g	MgCl ₂ .6H ₂ O	: 10.99 g
Na ₂ SO ₄	: 4.06 g	CaCl ₂ .6H ₂ O	: 2.25 g
KCl	: 0.69 g	NaHCO ₃	: 0.20 g
KBr	: 0.10 g	SrCl ₂ . 6H ₂ O	: 0.042 g
H ₃ BO ₃	: 0.027 g	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	: 0.005 g
NaF	: 0.003 g	NH ₄ NO ₃	: 0.002 g
FePO ₄ .4H ₂ O	: 0.001 g	H ₂ O	: 1,000 ml

- Sea-water according to the formula of LYMAN and FLEMING (1940)

NaCl	: 23.48 g	Na ₂ SO ₄	: 3.92 g
NaHCO ₃	: 0.19 g	KCl	: 0.67 g
KBr	: 0.10 g	MgCl ₂	: 4.98 g
CaCl ₂	: 1.10 g	SrCl ₂	: 0.02 g
H ₃ BO ₃	: 0.03 g		

- Sea-water tablets British Drug House (BDH) (Personal communication 1968)

NaCl 4.734 g ; CaSO₄ 0.234 g : MgSO₄.7H₂O 0.568 g;
MgCl₂.6H₂O 0.379 g

1.1.1.3. Determination of the optimum pH.

Rather divergent pH values (from 6.1 tot 7.6) are mentioned in the literature.

During the experiments concerning the testing of sea-water the pH values vary between 6.2 and 7.1. If the results obtained from the ten prepared cultures do not differ significantly among themselves, this means that the optimum pH value lies between the two values.

1.1.1.4. Determination of the incubation temperature and incubation time. -----

Petri discs of 9 cm in diameter are inoculated with 1 ml cell suspension. T.G.E.A. is poured upon the discs and these are incubated at 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 37°C. This experiment is repeated five times. The bacterial counts are made after 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12, 16, 19 and 25 days incubation.

1.1.1.5. Study of the sampling methods.

The study of the sampling method comprises two aspects, viz. the sampling of the skin and the sampling of the fish flesh.

For both techniques the method and place of the sampling are examined.

As regards the sampling of the skin, the influence of the shaking time and of the use of 0.1 % Tween 80 are determined.

1.1.1.6. Conclusions.

1.1.1.6.1. As regards the determination on the skin.

The sampling is carried out by means of an aluminium plate allowing the aseptic removal of a known surface of skin over the whole length of the fish. The place of sampling may be chosen arbitrarily. The piece of skin is shaken for 20 minutes in a known quantity of sterile Ringer solution. From the suspension obtained a dilution series is built up.

The bacterial counts are made according to the classical petri disc method. As culture medium T.G.E.A., prepared with distilled water is used. The acidity equals about 6.5. The incubation time is five days at 20 to 25°C.

1.1.1.6.2. As regards the determination in the fish flesh.

Before sampling the adherent slime is first of all removed from part of the skin by means of a scalpel; in this manner most of the bacteria are taken away. The surface is next completely rubbed sterile with cotton-wool impregnated with ethanol. The skin is then aseptically removed and of the fish flesh thus exposed a quantity is weighed in a preweighed sterile petri disc. Thereupon a 10 % suspension is prepared with the fish flesh by homogenizing with a sterile Ringer solution for about 2 minutes.

The sampling may be carried out on the dark as on the pale side, above or underneath the lateral line of the fish. As for the sampling of the skin it is recommended to take the sample over the whole length of the fish so as to promote the accuracy. The dilution series, the culture medium, the incubation time and incubation temperature are identical as for the determination of the number of bacteria on the skin.

1.1.2. The determination of the total number of trimethylamineoxide reducing bacteria or "spoilors".

1.1.2.1. Tests on the culture media.

The culture medium as proposed by WOOD and BAIRD (1943) is used. This medium is compared with tryptone glucose extract broth containing 0.5 % trimethylamineoxide hydrochloride. The composition of the culture media is as follows :

1. Medium of WOOD and BAIRD (1943) : 5 g $(\text{CH}_3)_3\text{NO}\cdot\text{HCl}$, 2.5 g glucose, 5 g peptone, 5 g NaCl, 1 g MgSO_4 , 1 g K_2HPO_4 , 1,000 ml H_2O and pH = 7.2.
2. Tryptone glucose extract broth : 5 g $(\text{CH}_3)_3\text{NO}\cdot\text{HCl}$, 3 g beef extract, 5 g tryptone, 1 g dextrose, 1,000 ml H_2O and pH = 7.2.

From the bacteria isolated from cod fillets containing the "trimineoxydease" enzyme, a cell suspension is prepared in nutrient broth and incubated during 24 hours at 22° C.

From each medium 8 test are subsequently prepared with 9 ml of the culture. Each tube is inoculated with 1 ml of cell suspension. After 72, 96, 120 and 144 hours, the quantity of mg N % in two test tubes is each time determined according to the method of DYER(1945).

The results show that the medium as proposed by WOOD and BAIRD (1943) gives by far the best results. This medium will thus be used for the determination of the total number of "spoilors" as only the trimethylamineoxide reducing bacteria inoculated in this culture will form TMA.

1.1.2.2. Experimental

The determination of TMA according to WOOD and BAIRD (1943) depends on the ready volatility of TMA at 45°C in alkaline medium. The following procedure was instituted. To an inoculated culture medium 1.5 ml formaldehyde (40 %) is added. This is shaken to bind any ammonia that may be present (BENOIT and NORRIS 1942). Let stand 3 minutes and add 3 ml of saturated K_2CO_3 solution to distill the TMA from the solution. The tube is immediately closed with a one hole rubber stopper which has been fitted with a short glass tube (5 mm wide and 4 cm long), slightly constricted at the lower end and containing a small piece of absorbent cotton which has been impregnated with bromthymol blue (CLARK 1928) adjusted to pH 4.0 with 0.1 N sulphuric acid. The tubes are then incubated in a water-bath at 45° C for 30 minutes. If TMA is present in the culture it distills from the broth and condenses in the cotton causing a shift of the indicator colour to the alkaline side.

This method seems to be rather cumbrous and not very accurate as the change of colour is sometimes observed with difficulty.

This study combines the method of WOOD and BAIRD (1943) with the method based upon the TMA determination according to DYER (1945) The method is adapted as follows. One ml of culture medium inoculated with the bacteria to be examined is poured into a 50 ml measuring cylinder. Next + 5 ml formaldehyde (40 %) is added to bind the ammonia. Further + 20 ml of toluol is added. To this about 5 ml of saturated K_2CO_3 solution is poured and the closed measuring cylinder is vigorously shaken for 30 seconds. Twenty minutes later 10 ml of toluene layer is pipetted off and dried with Na_2SO_4 . About 3 ml dried toluene is added to 3 ml 0.02 picric acid solution. If an intense yellow colour appears this indicates formation of TMA.

1.2. Chemical methods.

During this research-work the determination of the total quantity of volatile basic nitrogen (TVN) and the determination of the trimethylamine content (TMA) are applied.

1.2.1. Determination of TVN.

The determination of TVN is carried out according to the method

of LUECKE and GEIDEL (1935). This method is based upon a normal distillation. Nevertheless it is possible to carry through a vacuum or steam distillation. The steam distillation was preferred for these experiments as this method is less time-consuming. The TVN is captured in boric acid and directly titrated with sulphuric acid as in the CONWAY method (1962).

1.2.2. Determination of TMA.

This research calls upon the picrate method according to DYER (1945). This method has the advantage that the determination of TMA can be carried out on the distillate obtained from the determination of TVN. As a disadvantage however can be mentioned that water and organic impurities (fat, detergents) interfere with the colour reaction. These problems are easily dealt with provided that a strict control is kept on glass and reagents.

1.2.2.1. Determination of the maximum wavelength.

The extinction curve demonstrates the the λ max in the visible light equals 410 nm.

1.2.2.2. Elaboration of the standard curve.

The calculated curve shows an intercept. The analysis of variance proves that the difference between the experimental value for the intercept and the theoretical value zero, due to errors inherent to the experiment, is acceptable.

At the same time it appears that the variance of the experimental points in respect of the calculated curve falls within the limits of the experimental errors. This means that when TMA is determined according to the method of DYER (1945) and when the measurements are carried out by 410 nm, both the experimental and the calculated curves may be used.

1.2.3. "Recovery-test" for the determination of TMA.

The aim of this test is to examine if the standard curve can be applied under practical conditions, in other words to test if no influence due to the fish eventually interfere with the dosage of TMA.

To this end a standard curve is drawn up starting from 10 grammes of fresh fish, taken from a homogeneous ground fish sample

to which 0.5 ml, 1.5 ml, 2.5 ml, 5 ml and 7.5 ml of a stock solution containing 1 mg of TMA-N per ml is added. This stock solution is prepared by diluting 1.3642 g TMA HCl 50 % with water to 100 ml. The TMA content is determined on the 5 suspensions and the colour is measured against the colour formed by 10 grammes of fresh fish. Preferably the fish should be really of prime quality so that no TMA has as yet been formed. The experimental errors can thus be kept as small as possible.

No difference is observed between the results of the recovery-test and those of the standard curve built up with pure solutions since in a rectangular coordinate system in which the extinctions of the one curve are plotted on the ordinate and the extinction values of the other curve on the abscissa a straight line is obtained with an intercept practically equalling zero and a b-value approximating very closely the value of 1.000.

2. TECHNOLOGICAL EXPERIMENTS.

=====

The technological experiments comprise the elaboration of a deterioration curve of the fish in relation to the oxygen permeability of the film. At the same time the influence of the conservation temperature on the deterioration curve is checked. The applicability of the deterioration curve is subsequently tested on some packing films which differ from those used for the elaboration of the curve. Once the "ideal" film is found the influence of shrinking as well as the influence of the packing film on the raw material are checked. As last item in the research, the addition of some preservatives (citric acid, potassium sorbate) is studied.

2.1. Deterioration curve in relation to the oxygen permeability of the films.

2.1.1. Experimental.

2.1.1.1. Raw material.

Cod fillets of about 500 g apiece are bought. The choice of the species is based upon the usual commercial practice.

2.1.1.2. Packing material.

As carrier a white pigmented shock-resistant polystyrene tray is used (shock-resistant polystyrene contains a specified amount of butadiene giving greater strength to the polystyrene).

The research involves polyethylene films with different thicknesses. When the thickness of a film increases, the oxygen permeability decreases. Films of respectively 20 μ , 30 μ , 40 μ , 50 μ and 100 μ are used with oxygen permeabilities of respectively 3,600, 2,100, 1,800, 1,500 and 500 ml oxygen $m^2/24 h/1 atm$. These films possess a low water permeability and present at the same time no differences as regards the raw material.

2.1.1.3. Procedure.

The portion is put in the polystyrene tray. Fish and tray are then packed in a polyethylene bag (26 cm long and 18 cm wide) whereupon the bag is closed by sealing with an impuls sealing apparatus.

The fish is then transported (about 1 hour) in expanded polystyrene boxes (10 kg content). Ice is spread out on the bottom of the boxes and covered with a polyethylene sheet; a similar sheet covered with ice is laid on top of the fish packets.

2.1.1.4. Laboratory analyses.

After a conservation period of 1, 3 and 6 days at 0° C the fillets of 10 packets are checked on their TVN and TMA contents. The analyses are always carried out in duplo.

2.1.2. Discussion.

On the basis of the results obtained, the following conclusions may be drawn :

- a) the spoilage does not proceed rectilinearly in relation to the oxygen permeability of the film. A maximum spoilage is observed at a permeability of 1,800 ml oxygen $m^2/24 h/1 atm$. The best results however are obtained with a permeability of 3,600 ml oxygen $m^2/24 h/1 atm$.
- b) during the first three days no appreciable changes occur in the quality of the fish packed in the different films. This may be ascribed to the fact that the bacteria utilize the oxygen of the air initially present in the packet. Once this oxygen is consumed, the oxygen permeability will play a role during the conservation. After 6 days conservation at 0° C distinct differences appear in the spoilage. The low TVN and TMA values for the film with a thickness of 20 μ and an oxygen permeability of 3,600 ml

oxygen $\text{m}^2/24 \text{ h}/1 \text{ atm.}$ are due to the excellent aeration of the film so that an aerobic conversion takes place forming less TMA. The higher TVN and TMA values at a lower aeration are to be ascribed to the fact that the break-down of the trimethylamineoxide preferably proceeds under anaerobic conditions (WATSON 1939a), in other words the break-down is attributed to the fact that conditions are thus created causing the bacteria to reduce the TMAO in a facultative aerobic manner (SOUDAN 1965). The maximum spoilage may be due to the fact that with a permeability of 1,800 $\text{ml oxygen m}^2/24 \text{ h}/1 \text{ atm.}$ an ideal oxygen tension is effected in the packet permitting the development of a facultative anaerobic respiration causing a maximum quantity of TMA to be formed.

c) the difference between the TVN and the TMA contents can be calculated for the different films after a conservation period of 6 days at 0° C. This difference represents the formalin bound N-fraction (ammonia and primary amines) (BEATTY 1938a).

The results prove that during a conservation period of 6 days at 0° C the increase of the formalin bound N-fraction is not influenced by the oxygen permeability of the film, in other words, the differences in the TVN values are to be attributed to the varying quantities of TMA formed in relation to the oxygen permeability. This means that the TMA formation is to a large extent influenced by the oxygen tension created in the packet.

2.2. Influence of the temperature on the deterioration curve.

2.2.1. Experimental.

The experimental conditions are identical as for the elaboration of the deterioration curve at 0° C. Only the conservation temperatures differ (3° and 6° C) and the experiment is carried out twice. The analyses take place after 1 and 2 days conservation.

2.2.2. Discussion.

The deterioration curves at 3° and 6° C progress in the same manner as the deterioration curve at 0° C.

The difference between the TVN nitrogen can likewise be calculated, viz. the formalin bound N-fraction can be determined.

The results prove that the formation of the formalin bound N-fraction is practically not influenced by the oxygen permeability of the film with the exception of the film of 20 μ , whose higher oxygen permeability already seems to exert a harmful effect on the formation of the formalin bound nitrogen compounds after 2 days conservation at 6° C.

These results run parallel to those obtained at 0° C and confirm at the same time what was previously mentioned.

2.3. The applicability of the deterioration curve.

To determine the applicability of the deterioration curve on other packing material a comparative study is carried out between a polyethylene film, a polyvinylchloride film and a laminate composed of regenerated cellulose and polyethylene. These three films possess a low water vapour permeability but different oxygen permeabilities. Cod fillets and plaice are used for the packing experiments.

2.3.1. Experimental.

The experimental conditions are identical as for the elaboration of the deterioration curve.

2.3.2. Discussion.

From the experiments on cod fillets can be concluded that the polyethylene film with oxygen permeability of 3,600 ml/m²/24 h/1 atm. confers a better quality to the raw material than the polyvinylchloride film of 2,700 ml/m²/24 h/1 atm. oxygen permeability.

Bearing the deterioration curve in mind this comes up to the expectations.

The results of the TVN and TMA determinations demonstrate that the polyvinylchloride film with 2,700 ml oxygen permeability gives the best results followed by the polyethylene film with 3,600 ml oxygen permeability, whereas the laminate being impermeable to oxygen books the worst results. This phenomenon is due to the degree of contamination of the fish flesh reproducing an identical contamination progression as the chemical analyses. The logarithm of the total number of bacteria per cm² of skin presents on the contrary a totally other image than the three remaining quality

determinations. According to these objective quality determinations the laminate would yield the best results and the polyethylene film the worst, whereas the quality of the fish packed in the polyvinylchloride film would be situated somewhere between that of the fish packed in the laminate and the fish packed in the polyethylene film.

This phenomenon could perhaps be explained by the oxygen permeabilities of the films. The polyethylene film has however on average an oxygen permeability of $3,600 \text{ ml/m}^2/24 \text{ h/1 atm.}$, whereas the oxygen permeability of the polyvinylchloride film amounts to $2,700 \text{ ml}$ and the permeability of the laminate is about zero. In consequence a strong bacterial growth takes place on the skin of the fish with a film of higher permeability as is the case for polyethylene so much so that the bacteria after having attacked the skin completely, will penetrate into the flesh. On the other hand, with an impermeable film the bacteria living on the surface of the fish will be prevented from proliferating and shall penetrate into the fish flesh to consume the little oxygen that may still be present; simultaneously this will result in some bacteria developing themselves in a facultative anaërobic manner. As according to WATSON (1939) these micro-organisms are in essence responsible for the reduction of the TMAO in fish, the TMA content shall increase sharply. Somewhere a comparison must be found between these two permeabilities. Polyvinylchloride seems in this case to work satisfactorily. To recapitulate a normal evolution of the bacterial growth is needed; the spoilage on the skin however is not very clearly perceived during consumption. The bacterial growth must nevertheless not be stimulated too much, but must on the other hand also not be obstructed by the use of extreme high or low permeabilities.

The results obtained confirm this hypothesis. The higher number of bacteria per cm^2 of skin of the fish pre-packed in the polyethylene film corresponds with the higher number of bacteria in the fish flesh whereas the lower value of the total number of bacteria per cm^2 of skin of fish pre-packed in the laminate likewise corresponds with the higher number of bacteria in the fish flesh. The number of bacteria in this case however lies still higher than with fish packed in the polyethylene film. The moderate quantity

of bacteria on the skin of fish packed in polyvinylchloride film gives the lowest number of bacteria in the fish flesh.

The results prove once again that the break-down is facilitated by lower oxygen tensions.

2.4. Influence of the skrinking process.

In the modern packing methods use is now often made of the shrink technique. This technique needs special materials which are manufactured in such a way that they shrink under the influence of heat.

The packing proceeds as follows :

- 1) the object is put into the bag
- 2) the bag is closed
- 3) the whole packet passes through a tunnel with a thermostatic temperature installation. The film shrinks and envelops the portion tightly and smoothly.

Up to now the films were not shrunk because according to Fick's law (DUBOIS 1968) the oxygen permeability decreases with increasing thickness and therefore the permeability would have to be measured each time.

With a view to determining the influence of the shrinking process a series of comparative experiments is carried out with plaice packed in a polyethylene film with an oxygen permeability of 3,600 ml (some of the packets are shrunk) and in a polyvinylchloride film with an oxygen permeability of 2,700 ml (some of the packets are also shrunk).

2.4.1. Experimental.

2.4.1.1. Raw material.

The plaice is about 5 days old at the start of the experiment. The choice of species is based upon the usual commercial practice.

2.4.1.2. Packing material.

The white pigmented shock-resistant tray in polystyrene is used as well as the polyethylene film of 20 μ and the polyvinylchloride film of 18 μ .

2.4.1.3. Procedure.

The packing is carried out in an identical manner as in the pre-

vious experiments, but after packing part of the packets are shrunk. Polyethylene film shrinks at an air temperature of 160°C in a tunnel (2 m long) where the packet remains for 10 seconds. Polyvinylchloride film shrinks at an air temperature of 105° C during 3 seconds, the tunnel only having half a metre's length. During the shrinking process the fish does not take up any heat as all the heat is converted into energy needed to shrink the film (DELEST 1969). Temperature measurements made with probe thermometers demonstrate that the temperature in the fish remains constant.

2.4.1.4. Laboratory analyses.

After a conservation period of 1, 3 and 6 days at 0° C ten packets are checked in duplo on their total number of bacteria per cm² of skin and per gramme fish flesh as well as on their TVN and TMA contents. The experiments are repeated three times.

2.4.2. Discussion.

- a) the results of the analyses of the raw material packed in unshrunk packets confirm the results obtained during the experiments on plaice; these demonstrate that the polyvinylchloride film is more appropriate than the polyethylene film chosen.
- b) when polyethylene film is shrunk the quality of the fish remains identical as with the unshrunk packing. This proves that the higher shrink temperature (160° C air temperature during 10 seconds) does not exert a harmful influence on the keeping quality of the pre-packed fish. This confirms DELEST's assertion (1969), viz. that all the heat is converted into energy needed to shrink the film, so much so that the raw material is not heated up. During shrinking the film increases its thickness. According to the law of Fick (DUBOIS 1968) the gas permeability should decrease proportionally to the increase in thickness. This however is not so for crystalline polyethylene film. The crystalline structure of such a film which is determinant for the permeability sustains under the influence of shrinking a modification involving an increase of the gas permeability. In consequence the decrease in the gas permeability, caused by the increasing thickness, is partly compensated so that a film with an oxygen permeability of 3,600 ml/m²/24 h/1 atm. will only loose little of its permeability value. The shrinking process will thus practically not cause any spoilage of the fish.

c) the shrinking process of polyvinylchloride film modifies the keeping quality of plaice. This may possibly be attributed to a heating up. Since however the shrink temperature and shrink time (3 seconds at 105° C) lie lower than for polyethylene film (10 seconds at 160° C) and also taking into account that when the shrinking process is carried out judiciously all heat is converted into shrink energy the chances are rather small that this could be the cause. The film has indeed also increased its thickness during the shrinking process. As the polyvinylchloride film is amorphous (owing to the presence of softeners) the law of Fick (DUBOIS 1968) is complied with and the gas permeability decreases proportionally to the increase in thickness resulting into a declining quality of the fish.

2.5. Influence of packing.

With the view to examine the influence of the packing on the TVN and TMA formation a comparative study is carried out between cod fillets packed in polyethylene film of 20 μ and unpacked cod fillets.

2.5.1. Experimental.

The experimental conditions are the same as in the experiments for the elaboration of the deterioration curve.

2.5.2. Discussion.

- a) the TVN has about the same value.
- b) more TMA is produced in the packed fish than in the unpacked fish.

If more TMA is being formed in the packed than in the unpacked fish this is due to the presence of a larger number of "spoilors" in the packed than in the unpacked fish. Indeed during the conservation the oxygen tension decreases in the packet and to a certain extent micro aerobic conditions are thus created. As according to WATSON (1939a) TMA is mostly formed under anaerobic conditions it may be expected that in pre-packed fish a larger number of TMA formers is present than in unpacked fish.

- c) the formalin bound N-fraction is higher in the blanco than in the packed fish.

Analogous results are already ascertained by INGRAM (1962) during the packing of chickens. This research-worker noted during the packing of poultry meat that with a film of lower oxygen permeability the production of bad odours characteristic for spoilage holds off longer than when the packing is carried out with a film of a higher oxygen permeability. Similarly, CARLIN, HALL and WALKER (1957) observed identical phenomena with chickens packed in oxygen permeable cellulose acetate film. The spoilage of the chickens packed in this film proceeds faster than with an impermeable "Saran" film. WELLS, SPENCER and STADELMAN (1958) contend that with chickens vacuum-packed in impermeable PVC film the spoilage appears later than with chickens not vacuum-packed in the same film.

2.5.3. Counts of the total number of bacteria and of the total number of "spoilors".

This is checked during a comparative experiment between packed and unpacked cod fillets stored at 0° C and analysed after 0, 3 and 7 days on the total number of bacteria and on the total number of "spoilors". The procedure is the same as in the previous experiments but only the polyethylene film of 20 μ is used as packing material.

The results prove that proportionally the total number of "spoilors" with packed fish lies higher than with unpacked fish. The percentage of "spoilors" observed in unpacked fish corresponds to the results obtained by SHEWAN (SOUDAN 1965). Positively the values of the total number of bacteria and of the total number of "spoilors" are higher with packed than with unpacked fish.

Since most of the TMA is formed under conditions causing a facultative anaerobic respiration to take place, all bacteria producing trimethylamine under anaerobic conditions should proliferate. In order to examine the growth under anaerobic conditions the culture medium as proposed by WATSON (1939a) is inoculated. This medium has the following composition : beef extract 3 g; peptone 5 g; NaCl 5 g; KH_2PO_4 6.8 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 18 g, agar 15 g, TMA oxide 15 g; pH 6.9.

During these experiments an arbitrary series of "spoilors" is inoculated on "slants" on which the culture medium of WATSON (1939a)

is poured. The test tubes are incubated in anaerobic jars at a temperature of 22° C. Bacterial growth appeared after 3 days in all inoculated media. These experiments demonstrate that all trimethylamine producing micro-organisms in fish display the greatest activity under conditions where TMAO is converted by a facultative anaerobic respiration.

2.6. Influence of some preservatives on the quality of pre-packed fish.

The TVN fraction of pre-packed fish is mainly composed of ammonia and trimethylamine. Since the experiments prove that on the one hand the ammonia formation in pre-packed fish is smaller than in unpacked fish, but that on the other hand the trimethylamine formation increases considerably under the influence of the packing the inhibition of the trimethylamineoxide reducing bacteria (i.e. the TMA formation) would enhance the quality of the fish to a large degree.

In the list of preservatives allowed citric acid is mentioned as well as sorbic acid and its sodium, potassium and calcium salts (maximum content expressed in sorbic acid) (Belgian Official Gazette 1968). The addition of citric acid is allowed in foodstuffs and in other nutritious substances in whose preparation ingredients are used in which citric acid is allowed and this up to a content proportional to the quantity of these ingredients used. As fish is often prepared with lemon a conservation experiment with citric acid is carried out. Concurrently the effect of citric acid is compared with the effect of potassium sorbate of which a maximum of 0.3 % (expressed in the corresponding quantity of sorbic acid) may be used in semi-preserves.

2.6.1. Influence of citric acid.

2.6.1.1. Experimental.

The raw material and the packing material are identical to those used in the previous experiments. Polyethylene film of 20 μ is used. Preparatory to being packed each fillet is sprinkled separately with 5 ml of dissolved preservative (2.5 ml on each side). The concentrations are chosen in such a way that the fillets after sprinkling contain respectively 1 %, 0.5 % and 0.1 % citric acid. In ad-

dition to the sprinkled fillets packed and unpacked blanco's are also included in the experiment. The storage temperature is adjusted to 0° C.

After 0, 3 and 7 days ten packets of each treatment are analysed on the total number of bacteria, on the total number of "spoilors", on TVN and TMA content. The analyses are carried out in duplo.

2.6.1.2. Discussion.

2.6.1.2.1. As regards the bacteriological determinations.

- a) the total number of bacteria in the fish increases at a slower rate when 1 % citric acid is used.
- b) the treatment of the fillets with 1 % citric acid inhibits the triamineoxidase containing bacteria in their development.

2.6.1.2.2. As regards the chemical determinations.

- a) the TVN fraction in packed fish is the same as in unpacked fish. The results run parallel to the results obtained during the study concerning the influence of the packing material.
- b) the TMA fraction is smaller for unpacked than for packed fish. This is likewise in accordance with earlier results.
- c) the formalin bound volatile N-fraction is smaller for packed than for unpacked fish. These results are also observed during previous experiments. The increase of the formalin bound volatile N-fraction is also inhibited by citric acid. The concentrations used do not seem to present any differences. Since the formation of this fraction takes mainly place under the influence of deaminase the conclusion may be drawn that citric acid inhibits these enzyme systems or the micro-organisms containing these enzymes.
- d) the treatment with citric acid inhibits the TMA formation during 7 days at 0° C. This is in the first place due to the inhibition of the growth of the total number of bacteria caused by a reduced pH and secondly to a decrease in the percentage of the total number of "spoilors" caused by the use of 1 % citric acid. This inhibition is determined by the citric acid concentration strength.

2.6.1.2.3. As regards the aspect of the product .

Due to reduction in the pH caused by the use of citric acid a denaturation of the fish proteins sets in.

2.6.2. Comparative experiment between potassium sorbate and citric acid.

Potassium sorbate is already added to many foodstuffs including smoked and marinated fish (semi-preserves). The main aim is to counter oxidation and rancidity. This research however is aimed at examining if fish spoilage is inhibited by potassium sorbate and to which phenomena this inhibition is due.

Simultaneously the addition of potassium sorbate is compared with the addition of citric acid.

The principal properties of potassium sorbate can be summed up as follows.

- 1) potassium sorbate is a broad spectrum inhibitor for yeasts, moulds and inhibits some bacteria.
- 2) this preservative is very soluble in water; 50 % solutions are very easy to prepare and can be stored for a long time. These high concentrations are necessary for the different applications in the food manufacturing industry such as the immersion and the spraying of perishable foodstuffs.
- 3) one of the most particular properties is its optimum efficacy in pH-range between 5 and 7 (WRIGHT 1961). The pH values of many foodstuffs to be preserved fall within this range. As the degree of acidity of fish lies between 6 and 7 a possible effect of potassium sorbate can therefore be considered as very favourable.

2.6.2.1. Experimental.

The experimental conditions are the same as for the experiments with citric acid; however potassium sorbate (0.1 % and 0.3 %) and citric acid (0.1 % and 0.3 %) are respectively added to the fish.

2.6.2.2. Discussion.

The following conclusions may be drawn from the results :

- a) the addition of 0.1 % and 0.3 % citric acid inhibits partially the TVN and TMA formation during a conservation period of 6 days at 0° C. This is due to a decrease in the bacterial growth caused by a reduction of the pH. The number of "spoilors" remains however proportionally the same. The quantity of formalin bound volatile N-compounds increases at a slower rate than in untreated

pre-packed fish. This is in accordance with the results obtained during the experiments with citric acid. The concentrations used also do not seem to present any differences. The remark however ought to be made that when 0.3 % citric acid is added the fish proteins degenerate causing an abundant exudation.

b) the addition of 0.1 % potassium sorbate practically completely inhibits the TVN and TMA formation. This may be ascribed to the strong inhibition of the growth of the triamineoxidase containing bacteria. The addition of 0.3 % potassium sorbate seems to give better results than the addition of 0.1 % potassium sorbate since the TMA formation is completely stopped. The increase of the quantity of the formalin bound N-fraction proceeds at a slower rate than in untreated fish. The concentration seems to be of little importance.

2.6.3. Influence of the initial quality of the fish on the efficacy of 0.3 % potassium sorbate.

The previous experiment proves that with very fresh fish containing 0 mg N % of TMA the formation of TMA is prevented when 0.3 % potassium sorbate is added. The question immediately arises if with fish with a certain initial TMA content, in other words fish which is no longer of prime quality, the TMA content remains constant when 0.3 % potassium sorbate is added.

2.6.3.1. Experimental.

Cod fillets of inferior quality to which 0.3 % potassium sorbate is added are packed in a polyethylene film of 20 μ with an oxygen permeability of 3,600 ml. The experiment is carried out twice. After 2 and 6 days conservation at 0° C 8 packets are analysed on their TVN and TMA content. The analyses are always carried out in duplo.

2.6.3.2. Discussion.

The formalin bound N-fraction is once again smaller for the treated than for the untreated fish, whereas notwithstanding the inferior quality of the fish, this fraction also practically does not increase.

The results also prove clearly that the increase of TVN and TMA formation remarkably proceeds at a slower rate for fillets treated with 0.3 % potassium sorbate; however the formation is not completely inhibited. This can either be ascribed to the fact that the

contamination has already penetrated too deeply into the fish flesh and that the potassium sorbate as it were reaches the centre of infection too late or to a shortage of potassium sorbate. A too slow diffusion of potassium sorbate or too little of it can only be obviated by adding a higher content of potassium sorbate to the fish. Since according to the Belgian Legislation (Belgian Official Gazette 1968) the quantity of potassium sorbate authorized, expressed in the corresponding quantity of sorbic acid, may not exceed 0.3 % further experiments are not carried out.

2.6.4. Influence of the oxygen permeability of the packing film on the quality of cod fillets treated with potassium sorbate.

Since the addition of 0.3 % potassium sorbate to fresh fish packed in the polyethylene film of 20 μ with an oxygen permeability of 3,600 ml completely inhibits the TVN and TMA formation during a period of 6 days at 0° C, the question arises if the oxygen permeability will be as determinant for the keeping quality as is the case for untreated pre-packed fish. To study this problem a similar experiment as for the elaboration of the deterioration curve in relation to the permeability is carried out.

2.6.4.1. Experimental.

Cod fillets treated with 0.3 % potassium sorbate are packed in a series of polyethylene films with different oxygen permeabilities, viz. 3,600 ml, 1,800 ml and 1,500 ml oxygen $m^2/24 h/1 atm$. After 2, 6 and 12 days conservation at 0° C, 8 packets are analysed on their TVN and TMA content. The analyses are always carried out in duplo.

2.6.4.2. Discussion.

The results confirm the efficacy of potassium sorbate. During the first 6 days no increase in TVN is observed. This is so because no TMA and no formalin bound nitrogen compounds are being produced. Between the sixth and the twelfth day however an increase in TVN is perceived although no TMA has as yet been formed. The increase is caused by the production of formalin bound nitrogen compounds. This may in the first place be attributed to the fact that at that moment the inhibiting effect of 0.3 % potassium sorbate on the bacteria responsible for the production of ammonia and primary amines

disappears and secondly to the start of the proteolysis coupled to the formation of amino acids which are converted into ammonia and primary amines. It seems that proteolysis occurs in a later phase of the fish spoilage (BEATTY and COLLINS 1939).

An increase of TVN is moreover observed as the oxygen permeability of the packing film increases. This may be explained because the deamination of the amino acids causing ammonia and primary amines to develop is an oxidative process. In consequence it may be assumed that in a less permeable packing smaller quantities of ammonia and primary amines will be produced. These results concur to those observed in the packing of meat (INGRAM 1962; CARLIN et al. 1957; WELLS et al. 1958).

2.6.5. General conclusions on the experiments with preservatives.

Based upon the results of the experiments with preservatives the following conclusions may be drawn :

- a) high concentrations of citric acid added to cod fillets inhibit the TMA formation yet it cannot be used since the fish proteins degenerate causing exudation.
- b) the addition of 0.3 % potassium sorbate inhibits the TMA formation completely when the initial value of TMA equals zero, in other words when the cod fillets are of prime quality. If potassium sorbate is added the cod fillets must be packed in a film with a lower oxygen permeability. This contrasts with the packing of cod fillets without potassium sorbate and where films with higher oxygen permeabilities are essential.
- c) untreated cod fillets packed in the polyethylene film of 20 μ with an oxygen permeability of 3,600 ml/m²/24 h/1 atm. yield a TVN value of about 24 mg N % after 3 days conservation at 0° C. The same value is obtained with fillets treated with 0.3 % potassium sorbate packed in the polyethylene film of 50 μ with an oxygen permeability of 1,500 ml/m²/24 h/1 atm. after 12 days at 0° C, in other words the shelf-life is normally longer.

3. SUMMARY AND CONCLUSIONS.

=====

The study of the pre-packing of fish is carried out by means of a series of bacteriological, chemical and technological experiments

during which standards for the oxygen permeabilities of the films are established. At the same time the objective quality determination methods have been found to be extremely useful in the research concerning the influence of some experimental procedures and keeping conditions.

The deterioration curve in relation to the oxygen permeability demonstrates clearly that the spoilage at 0° C does not proceed rectilinearly in relation to the oxygen permeability of the film. A maximum spoilage is observed with an oxygen permeability of 1,800 ml/m²/24 h/1 atm. The progression of the deterioration curve at higher conservation temperatures (3° and 6° C) is of the same form as that of the deterioration curve at 0° C. From the curve can moreover be deduced that a film with 3,600 ml oxygen permeability gives the best results in the pre-packing of cod fillets.

Packing experiments with cod fillets packed in other films yield the same results as can be expected from the deterioration curve built up with polyethylene films. A film with an oxygen permeability of 2,700 ml/m²/24 h/1 atm. will yield better results for unfilleted fresh fish where the fish flesh is practically not or to a lesser degree contaminated than for fillets. In consequence it is required that during the packing of fillets as few anaerobic conditions as possible are created in order to prevent TMA formation, whereas for the whole fish it is essential to permit a normal development of the bacterial growth on the skin.

Since shrinking an amorphous film causes a decrease of its oxygen permeability it is necessary when such a shrink film is used to be acquainted with its thickness after shrinking and to take this into account when purchasing a packing film which must conform to severe standards of permeability. The gas permeability of a crystalline shrink film however is not to a very large extent modified under the influence of the shrinking process.

The use of a packing film inhibits the formation of the formalin bound volatile nitrogen compounds (ammonia and primary amines). This is due to the fact that the deamination of the amino acids which is an oxidative process proceeds at a slower rate since the film protects the fish to a high degree from contact with air oxygen. The TMA content on the contrary increases faster in the

packed than in the unpacked fish. This may be attributed to the presence of triamineoxidase containing bacteria which reduce TMAO by facultative anaerobic respiration.

The TMA formation is inhibited by the addition of citric acid or potassium sorbate to the fish. Citric acid delays the TMA formation as well as the formation of the formalin bound nitrogen compounds. The inhibition of the bacterial proliferation is due to a reduced pH. It must be remarked that when 0.1 % and 0.3 % citric acid is added the percentage of "spoilors" remains constant, whereas with a concentration of 1 % citric acid the percentage of "spoilors" declines.

Yet citric acid cannot be used since owing to a reduction in the pH a denaturation of the fish proteins appears. This corresponds to a whitening of the fish flesh and to an abundant exudation. These phenomena present an extremely unattractive aspect to the pre-packed product.

The addition of 0.1 % and 0.3 % potassium sorbate practically completely inhibits the spoilage. This is in essence due to the inhibition of the trimethylamineoxide reducing bacteria. The concentration of the sorbate plays a part since 0.3 % seems to give better results than 0.1 %. The increase of the formalin bound N-fraction moreover proceeds at a slower rate than with fish which was not treated with potassium sorbate. The sorbate concentration is in this case not determinant.

If the fish is no longer of prime quality, in other words if TMA is already present, the further TMA formation and the formation of the formalin bound nitrogen compounds proceed remarkably at a slower pace if 0.3 % potassium sorbate is added; the TMA formation however is not completely inhibited as in fresh fish.

The oxygen permeability of the film is also determinant in the packing of fish treated with 0.3 % potassium sorbate. An entirely different deterioration curve is obtained. The film with the lowest permeability yields the best results since the spoilage during the first 12 days is exclusively caused by the increase of the formalin bound volatile nitrogen compounds. The formation of this fraction proceeds faster and this in proportion to the oxygen present in the packet since the deamination of the amino acids produced by proteolysis is an oxidative reaction.

Summing up a film with an oxygen permeability of 3,600 ml/m²/24 h /1 atm. may be chosen for the pre-packing of cod fillets when no preservative is added. A film with 2,700 ml is most appropriate for plaice; practically a film with 3,600 ml permeability may also be used considering that during the conservation only slight differences are observed in the quality of the fish. If potassium sorbate however is added to the fish a film with a lower oxygen permeability must be aimed at. The film with a permeability of 1,500 ml oxygen m²/24 h/1 atm. seems to yield very good results inasmuch as that after 12 days storage at 0° C a TVN value of only 24 mg N % is obtained, whereas this value is already reached after 3 days with untreated fish packed in a film with 3,600 ml oxygen permeability.

---ooOoo---

