

MINISTERIE VAN LANDBOUW  
BESTUUR VOOR LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK  
PROEFSTATION VOOR ZEEVISSERIJ

# **De Objectieve Kwaliteitsbepaling van Vis**

**I. HET BEDERF VAN DE VIS EN  
DE METHODEN OM DE VERSHEID  
TE BEPALEN**

MINISTERIE van LANDBOUW  
Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek  
PROEFSTATION voor ZEEVISSERIJ

(Directeur : P. HOVART)

=====

Nr. 5.

De Objectieve Kwaliteitsbepaling van Vis.

I. Het bederf van de vis en de methoden  
om de versheid te bepalen.

door

W. V Y N C K E

1964

## I N L E I D I N G

=====

Vanaf de vangst tot de uiteindelijke verbruiker is de vis onderworpen aan talrijke manipulaties en bewerkingen die zijn kwaliteit op gunstige of ongunstige wijze beïnvloeden. Om deze kwaliteitsinvloeden te kunnen bestuderen en tevens de technieken op punt te stellen die toelaten de vis in betere staat van versheid te behouden, zijn doeltreffende methoden voor kwaliteitsbepaling noodzakelijk.

Met het oog op zijn verdere verwerking (bv. diepvriezen, roken, fileren) en de te verwachten bewaarmogelijkheden is het anderzijds eveneens van belang te kunnen beschikken over methoden die een vlug inzicht in de kwaliteit van de vis geven en die toelaten betrouwbare kwaliteitsnormen te bepalen.

Om deze redenen werd de studie van de methoden voor objectieve kwaliteitsbepaling aangevat. In dit eerste rapport werd speciaal de aandacht besteed aan het op punt stellen en beproeven van een zestal laboratoriummethoden ; hun mogelijkheden in verband met het vaststellen van objectieve kwaliteitsnormen werden getest en hun voor- en nadelen werden in de praktijk bestudeerd. Tijdens deze eerste proefnemingen werd uitsluitend gewerkt met kabeljauw (*Gadus morhua*).

Om het verband tussen de objectieve kwaliteitsmethoden en het bederf van de vis nader toe te lichten, werden in dit rapport vooraf de veranderingen in de vis gedurende het bederf besproken.

## HOOFDSTUK I. - Veranderingen in de vis gedurende het bederf.

Onder invloed van de bacteriële, enzymatische en oxydatieve werking begint na de rigor mortis de afbraak van de bestanddelen van de vis die aan bederf onderhevig zijn : eiwitten, extraheerbare stikstofverbindingen, vetten, koolhydraten en derivaten van nucleïnezuren.

Over de stoffen die daarbij gevormd worden is nog betrekkelijk weinig gekend ; hetgeen men weet is meestal ontdekt bij het zoeken naar een goede chemische test die als maatstaf voor het visbederf zou kunnen dienen.

### (a) De eiwitten en extraheerbare stikstofverbindingen.

De eiwitten van het visweefsel bestaan vooral uit de globuline- en albumine-fracties (actomyosine, myogeen, myoalbumine en globuline X), die uitstekende bronnen zijn voor essentiële en andere aminozuren. Van de verschillende extraheerbare stikstofverbindingen zijn de voornaamste voor de beenvissen (bv. kabeljauw), creatine (400 mg %), trimethylamineoxyde (350 mg %), taurine (300 mg %) en anserine (150 mg %).

De dwarsbekken (bv. rog) hebben een hoger gehalte aan extraheerbare stikstofverbindingen (3.000 mg %) ; ongeveer 60 % van deze verbindingen bestaat uit ureum dat typisch is voor deze vissoorten (29).

De stikstofverbindingen in het visweefsel vormen een ideaal substraat voor de proteolytische bacteriën. Dit wordt nog in de hand gewerkt door het feit dat het visweefsel een bijzonder losse structuur heeft : door het klein gehalte aan bindweefsel (sarkolemma) zijn de eiwitten losser gebonden dan bij de warmbloedigen.

Dit merkt men ten ander aan het veel hoger gehalte aan extraheerbare stikstofverbindingen.

Wanneer men in de loop van het bederfproces de vorming kan aantonen van indol, skatol, histamine en tyramine, van ptomainen verwant met het muscarine, van merkaptanen en waterstofsulfide uit zwavelhoudende aminozuren, van methaan, fosfine, kooldioxyde, vluchtige zuren enz. dan is het in de eerste plaats de vorming van de vluchtige stikstofbasen (vooral ammoniak en trimethylamine) die karakteristiek zijn voor het bederf van de vis (27).

In het beginstadium van het bederf neemt de hoeveelheid aminostikstof af, terwijl de hoeveelheid ammoniak toeneemt, dit is waarschijnlijk te wijten aan de desaminatie van de aminozuren. In de verdere stadia stijgen zowel de aminostikstof als het ammoniakgehalte (34).

De ammoniak blijkt dus hoofdzakelijk afkomstig van de afbraak van aminozuren. De hierbij gevormde zuren worden verder afgebroken tot kooldioxyde en water. Bij de dwarsbekken (bv. rog) echter is er nog een belangrijker bron voor ammoniak, nl. het ureum, dat in relatief grote hoeveelheden voorkomt. Onder invloed van een bacteriële enzyme, de urease, wordt het ureum in ammoniak omgezet. De ontwikkeling kan zeer intens zijn en is gemakkelijk organoleptisch waarneembaar.

Van de extraheerbare stikstofverbindingen is het trimethylamineoxyde de belangrijkste komponent.

Uit welke stikstofverbindingen en op welke wijze het trimethylamineoxyde in het visweefsel gevormd wordt, is nog onvoldoende gekend. Men weet echter dat een enzyme, het triamineoxydase, het proces moet katalyseren.

Het trimethylamine zou ook uit andere verbindingen dan het trimethylamineoxyde kunnen ontstaan. Trouwens in zoetwater-  
vissen komt praktisch geen trimethylamineoxyde voor en toch ontstaat er bij vele soorten trimethylamine gedurende het bederfproces.

Vele onderzoekers zijn van mening dat het ook gevormd wordt uit betaine en choline door hydrolyse en oxydatie.

Het vrijkomende trimethylamine is een belangrijke komponent van de geur van bedervende vis. Dit komt door het feit (a) dat het zeer oplosbaar is in water, waardoor het zich dus in het vochtig visvlees vlug verspreidt en (b) dat het een zeer sterke geur heeft. Het menselijk reukorgaan kan er nog 0,002 mg van waarnemen (14)

(b) De vetten.

De afbraak van de vetten die in het visvlees van 0,1 tot meer dan 20 % kunnen voorkomen, afhankelijk van soort, seizoen, ouderdom, omgeving en rijpheidstadium, is nooit zo sterk als de afbraak van de andere bestanddelen. De normale vetsplijting waarbij vrije vetzuren worden gevormd onder invloed van lipasen uit het weefsel of van bacteriën geschiedt dan ook langzaam. In het bijzonder in vette vis is het optreden van oxydatieve ransheid, dat geheel los staat van de overige bederfprocessen, van grote betekenis. Doordat het hier gedeeltelijk een zuiver chemische reactie betreft, vindt deze vorm van bederf ook plaats onder omstandigheden waar de bacteriën en enzymes geheel of gedeeltelijk onwerkzaam zijn, bv. door bevroren (3).

(c) Melkzuur en andere koolhydraten.

Alhoewel melkzuur hoofdzakelijk uit glycogeen gevormd wordt, is een rechtstreeks verband tussen beide hoeveelheden niet aan te tonen, aangezien het uitgemaakt is dat melkzuur ook door degradatie van andere koolhydraten kan ontstaan.

Het melkzuur speelt een belangrijke rol bij de vorming van het trimethylamine, vermits het als waterstofdonor dienst doet bij de bacteriële reductie van trimethylamineoxyde ; hierbij wordt het tot azijnzuur en kooldioxyde geoxydeerd (38).

Behalve melkzuur kunnen echter nog verschillende andere verbindingen als waterstofdonor optreden, zoals bv. pyruvaat, glucose en d-ribose, die in zeer wisselende hoeveelheden in het visvlees kunnen aanwezig zijn (33).

Tenslotte kunnen sommige bacteriën ook kleine hoeveelheden mierenzuur, propionzuur, boterzuur, aethylalkohol en acetylmethylcarbinol voortbrengen, vooral in de verdere stadia van het bederf (17).

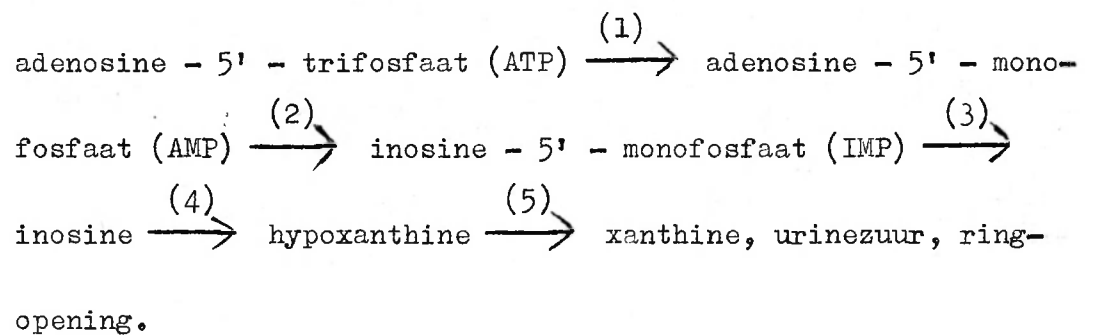
(d) Nucleïnezuren en derivaten.

De jongste jaren werden uitgebreide studies gewijd aan de nucleïnezuren, nucleotiden, nucleosiden en verwante stoffen die in kleine hoeveelheden in het visvlees voorkomen. Deze stoffen spelen niet alleen een belangrijke rol in het rigor mortis proces (⊗), maar verschillende onder hen zijn belangrijke bestand-

---

(⊗) Aan boord van fabriekschepen waar de vis korte tijd na de vangst dient verwerkt te worden vormt de rigor mortis een belangrijk technologisch probleem. Om deze reden wordt in vele landen voorrang gegeven aan de studie van de factoren die hierbij een rol spelen. De belangrijkste hieronder zijn de nucleïnezuren en derivaten.

delen van de smaak van de vis of kunnen de smaak van andere componenten wijzigen (21). Daarenboven laten zij ook toe de eerste veranderingen in de vis na de dood te volgen. Er heerst momenteel enig meningsverschil over het belang van de verschillende afzonderlijke gefosforyleerde verbindingen en afgeleiden, alsmede over de wijze waarop zij na de dood afgebroken worden. Jones (20) stelt volgend schema voor :



Volgens deze auteur zou de sleutelpositie door het IMP ingenomen worden. Reacties (1) en (2) geschieden zeer vlug, terwijl reactie (3) gewoonlijk 10 dagen en langer in beslag neemt om volledig te zijn. Deze fase van het nucleotidenmetabolisme is dan ook speciaal van belang om het bederf van de vis te volgen.



## HOOFDSTUK II. - Het bepalen van de kwaliteit van de vis (⌘).

De meest voor de hand liggende techniek om de kwaliteit of de versheid van de vis te bepalen is de organoleptische keuring. Alhoewel in verschillende landen (bv. Groot-Brittannië, Canada) een hoge graad van doeltreffendheid en nauwkeurigheid bereikt werd door gebruik te maken van een z.g. "taste panel", toch blijft deze methode subjektief ; zij is daarenboven tijdrovend en vergt een ploeg gespecialiseerde keurders.

Om deze reden werden vanaf het begin van het wetenschappelijk onderzoek over visbederf pogingen aangewend om de kwaliteit van de vis vast te stellen door middel van laboratoriumbepalingen. Men tracht aldus hetzij voor het bederf representatieve chemische verbindingen op te sporen, hetzij bepaalde fysische toestanden van de vis (bv. slapheid van het vlees) nauwkeurig vast te stellen en te volgen, hetzij nog de bacteriologische gesteldheid te bepalen.

Over het algemeen geldt de opinie dat een objectieve kwaliteitstest moet overeenkomen met de organoleptische keuring en t.o.v. deze keuring dient "geijkt" te worden. Kan dit voor de praktijk in de meeste gevallen wel aangenomen worden, toch dient hier voorbehoud gemaakt te worden. Bij de organoleptische keuring worden immers bepaalde factoren (bv. uitzicht, reuk, vastheid, enz.) beoordeeld ; het is echter noodzakelijk gebleken aan ieder van deze factoren een waardecoëfficiënt te geven : zo blijkt de geur bv. belangrijker te zijn dan de vastheid van de vis als kwaliteitsbeoordeling.

---

(⌘) Het begrip "kwaliteit" heeft een objectieve en subjektieve betekenis, doch wordt in deze studie gebruikt in de betekenis van "versheidstoestand".

Daar de evolutie van het bederf tijdens de opslag van de vis soms sterk kan variëren (bv. door een verschil in temperatuur) en de diverse factoren die aan de organoleptische keuring onderworpen worden niet altijd op dezelfde manier beïnvloed worden, kunnen verschillende combinaties van "punten" eenzelfde resultaat geven tijdens de organoleptische keuring.

Deze keuring mag dan ook niet als een vaste referentie-standaard voor het visbederf worden aangezien en is het niet altijd noodzakelijk dat een objektieve laboratoriumtest volledig met de organoleptische keuring overeenkomt.

In dit verband dient met een ander belangrijk aspect rekening gehouden te worden nl. het doel waarvoor de vis bestemd is. Zo kan het gebeuren dat verschillen in kwaliteit die door een taste panel praktisch niet kunnen waargenomen worden, wel door een objektieve laboratoriumbepaling vastgesteld worden ; bij de verwerking (bv. het diepvriezen) van de vis kunnen deze verschillen echter duidelijk te voorschijn komen, zodat hun detectie door de objektieve kwaliteitsmethode waardevol is. Wanneer de vis daarentegen voor onmiddellijke consumptie bestemd is, dan zijn deze waargenomen verschillen in dit geval van geen belang.

Het bepalen van de "verborgen" kwaliteit van de vis, alsmede van de te verwachten bewaarmogelijkheden is een belangrijk punt in het voordeel van de objektieve methoden.

In de loop der jaren werden tientallen methoden voorgesteld. Een overzicht hiervan wordt gegeven door Treiber (35) en Wittfogel (42).

De meeste zijn echter - soms na aanvankelijke schijnbare suksessen - onbruikbaar gebleken. Men dient hierbij niet uit het oog te verliezen dat vele factoren hun invloed doen gelden. Zo kan het tijdens een proef gemakkelijk voorkomen dat de waarden voor

verschillende vissen van gelijke versheid zeer uiteenlopend zijn. Dit blijkt dan soms op een verschil in grootte, ouderdom of biologische gesteldheid van de vis te berusten. Ook kan de plaats in het vislichaam invloed hebben. Verder kan de aard van het bederf, d.w.z. bacterieel enzymatisch of oxydatief, een rol spelen. De meeste objectieve methoden echter zijn slechts in staat één of hoogstens twee van deze soorten bederf te volgen. Tijdens de opslag (bv. in diepvriesfrigo) echter kan deze aard veranderen, zodat soms een vals beeld bekomen wordt, indien hiermede geen rekening gehouden wordt.

Bij vergelijkend laboratoriumonderzoek kunnen verschillende van deze moeilijkheden uitgeschakeld worden door te werken in strict gelijke proefomstandigheden en grote zorg te besteden aan de keuze van de vissen die voor een bepaald experiment gebruikt worden. Bij vergelijkend onderzoek immers spelen de absolute waarden geen overwegende rol en is het bekomen verschil vooral van belang.

Bij "veldonderzoek" echter ontbreken gewoonlijk referentiepunten, zodat men daar wel over testen dient te beschikken waarvan de absolute waarden betrouwbaar zijn.

Ondanks al deze moeilijkheden zijn toch wel enkele bepalingen van algemeen nut gebleken en wordt momenteel in de meeste landen naar nieuwe methoden gezocht die een nauwkeurige objectieve kwaliteitsbepaling zouden kunnen geven. De onderzoekingen gaan meer speciaal in twee richtingen :

- (a) het oppuntstellen van snelle, eenvoudige methodes die rechtstreeks in het visserijbedrijf kunnen aangewend worden en een vlug inzicht in de kwaliteit van de vis kunnen geven.
- (b) het oppuntstellen van objectieve kwaliteitsmethodes die vooral de eerste veranderingen in de pas gevangen vis kunnen meten en een inzicht in de nog te verwachten bewaarmogelijkheden geeft.

De methoden voor objektieve kwaliteitsbepaling kunnen in drie categorieën ingedeeld worden, nl. bacteriologische, chemische en fysische methoden.

A. Bacteriologische methoden.

Aangezien het visbederf in hoofdzaak veroorzaakt wordt door bacteriële werking, heeft men in het begin van het onderzoek naar objektieve methoden gedacht dat de eenvoudigste en nauwkeurigste methode het bepalen van het aantal bacteriën zou zijn. Dit kan geschieden door de plaattechniek, de directe microscopische telling of nog onrechtstreeks door het bepalen van de chemische activiteit van de bacteriën (bv. met de resazurine-, methyleenblauw- of tetrazoliumtest).

Er is echter veel meningsverschil over de waarde van dergelijke bepalingen. De bacteriologie van de bedervende vis is trouwens zeer ingewikkeld : de overheersende microflora is immers niet altijd dezelfde en kan afhangen van de soort vis, zijn chemische samenstelling en biologische gesteldheid, de bewaartemperatuur enz.

Het is eveneens zeer frekwent in verschillende delen van éénzelfde vis aanzienlijke verschillen in de hoeveelheden aanwezige bacteriën vast te stellen (32).

Wittfogel (42) en Tarr (34) zijn van mening dat wanneer men de test toepast met dezelfde vismonsters, die onderzocht worden bij identische proefvoorwaarden, deze methode gewoonlijk bevredigende resultaten geeft. Volgens Castell en medewerkers (5), Dyer en medewerkers (11) en Hunter (19) zou het bepalen van het totaal aantal bacteriën weinig waarde hebben. In een recente publicatie bevestigen Baines en medewerkers (2) eveneens deze stelling. Farber (12) geeft aan dat van al de onderzochte objektieve kwaliteitsmethoden het

bepalen van het aantal bacteriën de minste resultaten gaf. Tijdens vroegere proefnemingen (36) kwam de auteur tot dezelfde conclusie.

Partmann (25) en Baines en medewerkers (2) wijzen er anderzijds op dat bij mikroskopisch onderzoek van bedorven vis onmiddellijk naast volledig aangetaste weefseldelen, praktisch ongeschonden delen voorkomen, alhoewel bij nader onderzoek deze delen een groot aantal microorganismen bevatten. Hierbij zou niet het aantal bacteriën van belang zijn, maar wel de soort en het aantal bederfveroorzakende bacteriën. Over deze laatste is echter nog betrekkelijk weinig gekend. In verband hiermede kan gewezen worden op de eventuele betekenis van de gepigmenteerde bacteriën als versheidsindikatoren. Deze bacteriën bestaan vooral uit micrococcen en flavobacter-soorten. In het beginstadium van het bederf zijn deze bacteriën in de meerderheid, maar hun aantal daalt procentgewijze met vorderend bederf ; dit is vooral te wijten aan het opkomen van meer en meer gramnegatieve pseudomonassoorten.

Volgens recente onderzoekingen van Farber en Lerke (13) zou deze bepaling wel waarde bezitten en wordt momenteel door deze onderzoekers verder onderzocht.

In verband met het bepalen van het kiemgehalte van de vis dient hier een belangrijke opmerking aan toegevoegd te worden. Wanneer deze bepaling meestal geen bevredigende resultaten als objectieve kwaliteitsmethode geeft, dan geeft zij wel een goed beeld van de hygiënische gestelheid van de inrichting waar de vis verwerkt wordt en wijzen abnormale stijgingen in kiembelasting op de een of ander bron van besmetting die zonder die controlebepalingen wellicht onopgemerkt zou voorbijgegaan zijn.

## B. Chemische methoden.

Talrijke chemische en physico-chemische methoden werden voorgesteld, o.a. de bepaling van de vrije aminozuren (waaronder vooral het tyrosine) van de ~~sulph~~hydrylgroepen, van de katalase- en fosfatase-aktiviteit, van de rH, enz. Het is echter gebleken dat deze methoden slechts een beperkte waarde bezitten.

Volgende methoden blijken meer geschikt te zijn : het bepalen van de pH, de vluchtige stikstofbasen, de vluchtige reducerende stoffen, de vluchtige zuren. In de jongste jaren werd ook meer aandacht besteed aan de afbraakprodukten van de nucleïnezuren, waarbij vooral het inosine en het hypoxanthine te vermelden zijn (20) (21).

In dit rapport wordt enkel de bepaling van de vluchtige stikstofbasen en van de pH besproken. (x)

### 1. De bepaling van de vluchtige basische stikstof.

De tijdens het bederf geproduceerde vluchtige stikstofbasen kunnen hetzij globaal, hetzij afzonderlijk bepaald worden. Als afzonderlijke componenten worden vooral de ammoniak en het trimethylamine gedoseerd, alhoewel er de jongste jaren ook meer aandacht besteed wordt aan de vluchtige basen die in geringere concentratie aanwezig zijn (methylamine, dimethylamine, purinederivaten, enz.)

---

(x) Momenteel worden echter ook experimenten ondernomen met de bepaling van de vluchtige reducerende stoffen en de vluchtige zuren.

(a) Bepaling van de totale vluchtige basische stikstof (TVB).

De bepaling van de TVB is één van de oudste methoden om het bederf van de vis vast te stellen en werd reeds in 1910 door König (22) voorgesteld. Twee technieken kunnen aangewend worden om de TVB te bepalen, nl. de destillatie volgens Lücke en Geidel (23) en de microdiffusie volgens Conway (6). Bij de eerstgenoemde methode wordt de TVB door magnesiumoxyde vrijgesteld en overgedestilleerd in getitreerd zwavelzuur. Bij de tweede methode worden bijzondere Conway-schalen gebruikt, die bestaan uit 2 concentrische cuvetten. In de buitenste cuvet wordt vissap gebracht en verzadigd kaliumcarbonaat toegevoegd waardoor de TVB uitgedreven wordt. Dit wordt in de binnenste cuvet opgevangen in boorzuur en getitreerd. Door Wittfogel (41) werd een vergelijkend onderzoek tussen de twee methoden doorgevoerd waaruit bleek, dat beide praktisch dezelfde resultaten geven. Tijdens de hier beschreven proefnemingen werd dan ook uitsluitend de destillatietechniek toegepast daar deze werkwijze handiger voorkwam.

i. Methode.

In de methode van Lücke en Geidel (23) wordt een normale destillatie toegepast. Het is echter ook mogelijk een vacuum- of stoomdestillatie door te voeren (8). De stoomdestillatie werd voor deze proefnemingen echter verkozen daar deze methode minder tijdrovend is. Hiervoor moesten echter de proefomstandigheden opnieuw vastgelegd worden.

- Reagentia

- Magnesiumoxyde, **zuiver**
- Zwavelzuur, 0,1 N
- Natriumhydroxyde, 0,1 N
- Gemengde indikator voor stikstoftitraties (Mischindikator 5, Merck).

- Apparatuur

De apparatuur door Antonacopoulos (1) voorgesteld, werd gebruikt (figuur 1). De kolven van 2 l worden elektrisch verwarmd.

- Werkwijze (⊗)

De te onderzoeken vis wordt door een vleesmolen gedraaid en zorgvuldig dooreengemengd. Een homogeen monster van 10 g wordt in de reaktiekolf gebracht ; 2 g magnesiumoxyde en een weinig silicoon-antischuimmiddel worden toegevoegd en de koeler, waarvan het uiteinde gedompeld wordt in 25 ml 0,1 N zwavelzuur, wordt onmiddellijk aangesloten. Van zodra het water in de stoomgenerator begint te koken, wordt de kraan gesloten en de destillatie juist 20 min. doorgevoerd. Na toevoeging van een achttal druppels indikator wordt het overtollig zwavelzuur teruggetitreerd met 0,1 N natriumhydroxyde.

ii. Duur van de destillatie.

Dertig proefnemingen werden uitgevoerd waarbij de TVB respectievelijk na 20,30 en 40 min bepaald werd.

Na 10 min extra-destillatie (30 min in totaal) kwam gemiddeld 24,4 % TVB bij, en na nogmaals 10 min (40 min in totaal) 20,9 %, beiden met een variatiecoëfficiënt van 6,5 %. In 20 min kwam hierbij gemiddeld 200 ml, in 30 min 331 en in 40 min 466 ml destillaat over, met telkens een variatiecoëfficiënt van 3 %.

---

(⊗) De methode werd ook beproefd op het oogvocht van de vis. Deze variante wordt op blz. 30 besproken.



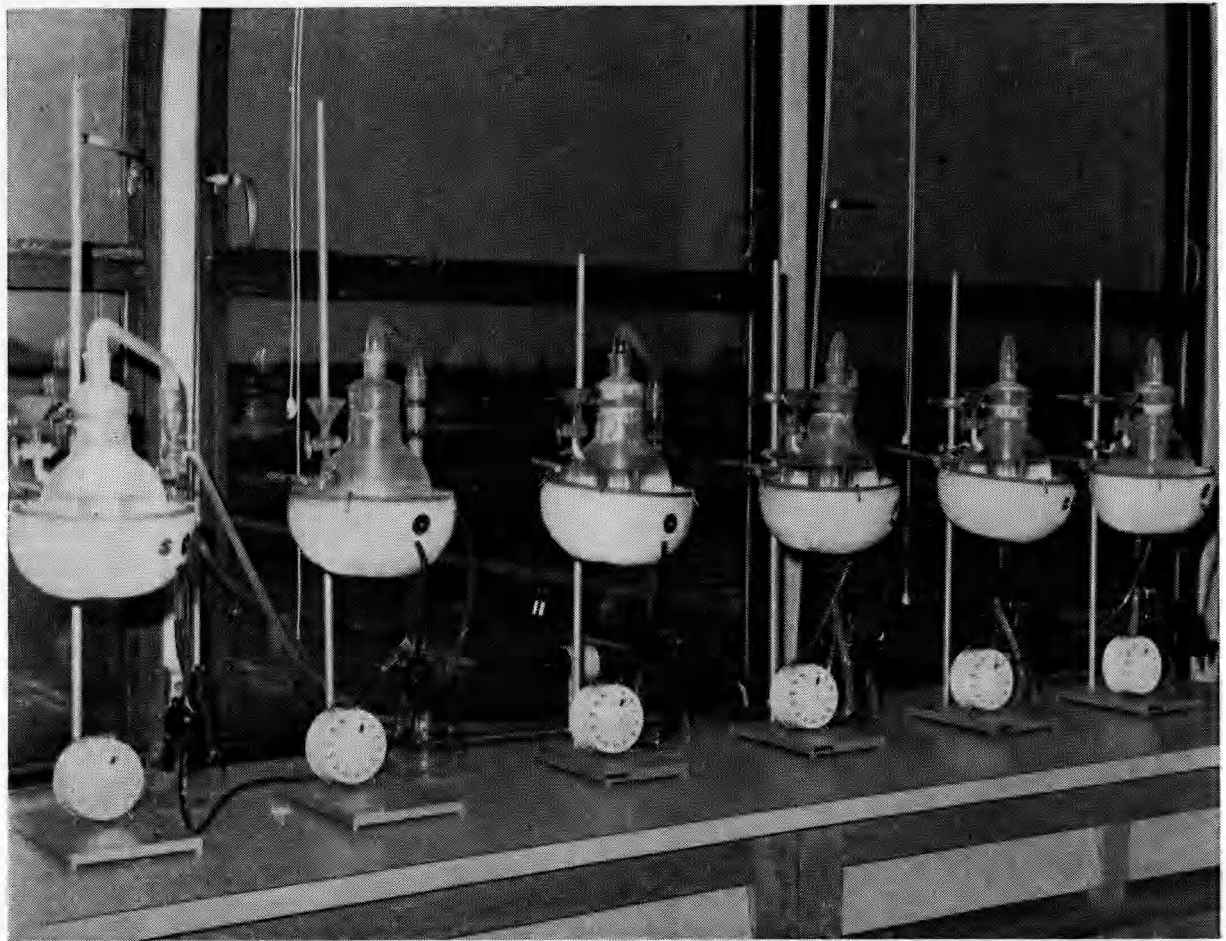


Fig. 1 — Zes destillatieapparaten voor TVB-bepaling.

Uit de proefnemingen is gebleken dat de destillatiemethode goed reproduceerbaar is en het gebruik van een energieregelaar voor de elektrische verwarmingsmantels niet vereist is. Een destillatietijd van 20 min blijkt voldoende te geven, maar dient nauwkeurig in acht genomen te worden ; per bijkomende minuut komt immers 2 à 3,5 % TVB bij.

iii. Plaats van de monstername in de vis.

Op vijf verschillende vissen werden controleproeven uitgevoerd teneinde te kunnen nagaan of de plaats van de monstername een invloed heeft. Uit de resultaten vermeld in tabel 1 blijkt, dat niettegenstaande onvermijdelijke afwijkingen, de plaats van de monstername slechts een kleine rol speelt. Ook de statistische analyse wijst hierop ; er werd namelijk geen wezenlijk verschil gevonden tussen de 6 groepen waarnemingen. De standaardafwijking bedroeg 3,8 mg voor een gemiddelde waarde van 27,4 mg TVB.

Tabel 1. - Invloed van de plaats van monstername op de TVB.

Vis Nr.	Vooraan Links	Midden Links	Achteraan Links	Vooraan Rechts	Midden Rechts	Achteraan Rechts
1	29,4	32,4	36,2	28,1	32,2	30,4
2	32,5	29,8	34,3	24,3	29,8	27,7
3	27,0	29,5	25,0	29,2	27,6	25,3
4	24,5	25,0	20,5	25,0	21,2	21,0
5	25,6	23,7	27,5	26,3	28,4	25,4
Gem.	27,8	28,0	28,7	26,5	27,8	25,9

iv. Invloed van het "spoeleffect".

Door het feit dat de vis in smeltend ijs wordt bewaard, wordt een deel van de TVB door het smeltwater meegevoerd. Dit noemt men het "spoeleffect". Anderzijds neemt het visvlees een zekere hoeveelheid water op, vooral wanneer het vel verwijderd werd. In verband met de bepaling van de TVB tijdens een bepaald experiment werd onderzocht of het beter is voor iedere analyse dezelfde vissen te nemen of telkens andere. Dit werd nagegaan op drie partijen kabeljauw van 2,5 à 3 kg met een verschillende versheidsgraad. De vissen werden gedurende 8 dagen in ijs bewaard. De TVB werd op 6 vissen bepaald bij de aanvang van de proef. Na respectievelijk vier en acht dagen werden deze vissen uit het ijs gehaald en opnieuw geanalyseerd. Hierbij werd telkens een hoeveelheid visvlees van ongeveer 50 g uit de rug van de vis gesneden. Tevens werden van iedere partij vis ~~nes~~ nog niet geanalyseerde vissen aan de TVB-bepaling onderworpen. De proef werd vijfmaal en op verschillende tijdstippen herhaald. Uit de resultaten vermeld in tabel 2 blijkt, dat de eerste vier dagen weinig verschil bestond tussen de twee werkwijzen. Na acht dagen echter waren de TVB-gehalten van de "zelfde vissen" beduidend lager (5 à 15 %) ; dit was waarschijnlijk te wijten aan een groter verlies aan TVB en aan de opname van smeltwater langs de insnijdingen tijdens de twee vorige bepalingen uitgevoerd. Hieruit kon besloten worden dat het te verkiezen is telkens andere vissen voor de TVB-bepaling te nemen.

Tabel 2. - Invloed van het spoeeffect op de TVB (in mg N %).

Partij Vis nr	Aanvangs- waarden	Na 4 d.		Na 8 d.	
		zelfde vissen	nieuwe vissen	zelfde vissen	nieuwe vissen
1	30,66	44,89	42,22	59,89	54,42
	36,00	53,77	41,23	70,48	73,14
	27,56	34,24	32,23	35,68	<b>38,17</b>
	24,54	35,93	36,47	32,62	40,27
	44,11	55,71	54,28	51,72	56,32
Gemiddeld	36,03	45,04	41,28	50,07	52,46
2	25,37	30,92	32,06	46,04	38,01
	28,65	<b>34,31</b>	34,32	40,07	51,92
	25,12	31,49	30,15	30,57	34,91
	<b>21,81</b>	<b>33,68</b>	<b>30,34</b>	35,10	35,41
	32,61	46,95	48,28	44,22	52,37
Gemiddeld	26,71	35,47	35,03	39,20	42,52
3	24,58	30,80	34,73	44,97	44,67
	29,76	32,85	32,77	32,30	33,25
	29,51	32,44	30,61	29,47	33,77
	19,47	30,48	30,46	35,51	46,54
	34,73	40,96	41,96	39,26	55,26
Gemiddeld	27,61	33,50	34,10	36,30	42,69

(b) Bepaling van de vluchtige ammoniak.

Het gehalte aan vrije ammoniak kan bepaald worden, hetzij door formoltitratie op het distillaat van de TVB, hetzij door microdiffusie volgens Conway (6).

Een nieuwe, snelle methode werd echter door Vyncke en Merlevede (37) voorgesteld. Hierbij wordt de vluchtige ammoniak afgescheiden door versnelde microdiffusie en kolorimetrisch bepaald met het Nesslerreagens.

Deze methode werd tot nog toe met succes op garnaal en andere schaaldieren toegepast en wordt momenteel op verschillende vissoorten getest (18).

(c) Bepaling van het trimethylamine (TMA).

Het TMA kan bepaald worden door distillatie volgens Budai (4), door microdiffusie volgens Conway (6) of door kolorimetrie van het picraat volgens Dyer (10). Deze laatste methode blijkt de vlugste en de handigste te zijn.

Het principe kan als volgt geschetst worden.

Het TMA, dat door extractie of distillatie uit de vis geïsoleerd werd, wordt in een organische solvent (bv. tolueen) overgebracht. Hiervoor is het echter noodzakelijk dat het TMA dat als zout voorkomt, in vrije base zou worden omgezet ; dit geschiedt door toevoeging van kaliumcarbonaat. Ammoniak, dat eveneens aanwezig is, stoort de reactie en wordt dan ook geblokkeerd door formaldehyde. Na deze bewerkingen volstaat het, het tolueen te drogen (het water stoort eveneens de bepaling) en het TMA te bepalen als picraat, door het toevoegen van een picrinezuuroplossing.

Meestal wordt de extractiemethode toegepast. Behalve deze techniek werd tijdens deze experimenten ook beproefd het TMA op het distillaat van de TVB te bepalen. Dit zou immers toelaten beide methoden te combineren.

Buiten kleine details werd voor de extractiemethode de werkwijze van Dyer ongewijzigd gevolgd.

- Reagentia

- Trichloorazijnzuuroplossing : 7,5 % in water
- Tolueen p.a., gedroogd over watervrij natriumsulfaat
- Picrinezuuroplossing : stockoplossing : los 2 g droog picrinezuur, p.a. in 100 ml watervrij tolueen op ;  
werkoplossing : verdun 1 ml tot 100 ml met watervrij tolueen.
- Kaliumcarbonaatoplossing : los 100 g in 100 ml water op.
- Formaldehydeoplossing : verdun 10 ml commercieel formol 40 % (geschud met magnesiumcarbonaat en gefiltreerd) tot 100 ml met water.
- Natriumsulfaat, korrelig, watervrij.

- Apparatuur

Coleman Junior Spectrofotometer met ronde buizen van 19 mm diameter.

- Werkwijze

Een homogeen door de vleesmolen gedraaide vismonster van 100 g wordt afgewogen en in een mixer gebracht ; 200 ml 7,5 % trichloorazijnzuuroplossing worden toegevoegd. De mixer laat men 2 min draaien.

Vervolgens wordt 1 ml van de bovenste vloeistof afgepipeteerd en in een maatglas van 50 ml, voorzien van een polyethyleenstop, gebracht. Men voegt 4 ml water bij, 1 ml formadehydereagens, 10 ml toluen en 3 ml kaliumcarbonaatoplossing. Men sluit het maatglas en schudt heftig gedurende 30 sec ; men pipeteert 5 ml van de toluenlaag in een maatglas van 10 ml voorzien van een polyethyleenstop en waarin 0,3 g korrelig natriumsulfaat gebracht werden. Men sluit de buis en schudt zachtjes enkele malen om het toluen te drogen. Het gedroogde toluen wordt in een droge colorimeterbuis gegoten, 5 ml picrinezuuroplossing worden toegevoegd en de oplossing wordt gemengd door voorzichtig schudden. Men leest de extinctie af bij een golflengte van 400  $\mu$ m en vergelijkt met de ijkcurve.

Op te merken valt dat de methode enkel bruikbaar is voor hoeveelheden TMA-stikstof begrepen tussen 0,002 en 0,035 mg.

Voor de bepaling van het TMA in het distillaat werd volgens de te verwachten concentratie 1 à 2 ml distillaat aan de proef onderworpen. Er bleek een goede correlatie te bestaan met de extractiemethode : de correlatiecoëfficiënt bedroeg + 0,95 en het verband tussen beide werd gegeven door  $E_e = 0,4 E_d - 0,002$ , waarbij  $E_e$  en  $E_d$  respectievelijk de **extincties** bekomen na extractie en destillatie voorstellen.

Voor routine-onderzoek bleek het niet noodzakelijk het volume van het distillaat juist te stellen. Zoals hoger vermeld, bleek dit volume voldoende konstant te zijn.

Alhoewel de bepaling van het TMA op het distillaat wegens de grotere verdunning minder gevoelig is, is deze methode toch zeer goed bruikbaar ; zij laat toe tijd te winnen bij vergelijkend laboratoriumonderzoek, waar verschillende methoden samen toegepast worden. Wanneer echter geen extinctie bekomen wordt (zeer verse

vis), dan verdient het aanbeveling de resultaten te controleren door de extractiemethode toe te passen.

## 2. Het bepalen van de pH.

Onmiddellijk na de rigor mortis verschilt de begin pH waarde soms aanzienlijk van vis tot vis (5,6 à 6,9), aangezien de hoeveelheid uit glycogeen gevormd melkzuur afhankelijk is van de duur van de doodstrijd en talrijke andere factoren (gehalte aan nucleïnezuren, voedingstoestand enz.). Wanneer het bederf begint, zal de pH ingevolge de vorming van basen wederom stijgen, en kan de waarde volgens Wittfogel (42), Treiber (35) en Schönberg (28) een goede maatstaf zijn voor het bepalen van het bederf.

Volgens Stansby en Lemon (30) speelt de buffercapaciteit van het monster een rol. Zij stellen voor de hoeveelheid zuur, nodig om van de aanvangs-pH tot pH 6 te komen, "B-waarde" te noemen en van pH 6 tot pH 4,28 "A-waarde". **Naargelang** het bederf vordert stijgen de B-waarden en dalen de A-waarden, hetgeen op een vermindering van de buffercapaciteit wijst. Vele onderzoekers, waaronder Hacker (15) en Cutting (7) stelden hier echter aanzienlijke verschillen vast, zodat meestal de rechtstreekse pH meting verkozen wordt.

### a. Techniek.

De pH meting kan uitgevoerd worden rechtstreeks in het visvlees of op een homogene suspensie van fijngemalen vis in water, bekomen door het gebruik van een mixer. Wittfogel (43) stelt tevens voor de pH-bepaling uit te voeren met speciaal pH-indicatorpapier.



Tijdens de proefnemingen werd enkel de meting in het visvlees toegepast. Hiervoor werd een speciale gekombineerde glazen insteekelektrode met naaldvormig uiteinde gebruikt (figuur 2). In de vis werd vooraf met behulp van een lancetnaald een kleine prik gegeven, waardoor het insteken van de elektrode vergemakkelijk werd.

Tijdens de proefnemingen dient gewaakt te worden dat de glazen elektrode niet gekrast wordt, bv. door visgraten en dat zij regelmatig zorgvuldig gereinigd wordt ; er wordt immers gewerkt in een zeer eiwitrijk milieu, zodat eiwitachtige verbindingen gemakkelijk aan de glazen elektrode kunnen kleven en verkeerde resultaten geven. Op te merken valt dat naast een puntvormige elektrode, ook een elektrode met mikrobol kan gebruikt worden.

Een vergelijkend onderzoek werd doorgevoerd om na te gaan of de pH ook niet nauwkeurig kan gemeten worden op door de vleesmolen gemalen vis. Deze werkwijze zou immers toelaten de pH-meting op een vlugge manier te combineren met andere methoden waarbij gemalen vis gebruikt wordt (bv. TVB-bepaling).

Uit de proefnemingen is gebleken dat de pH-waarden in gemalen vis gemiddeld 0,12 pH-eenheden hoger lagen dan in het visvlees. De correlatie tussen beide bepalingen bleek verder niet al te goed te zijn: de correlatiecoëfficiënt bedroeg + 0,67 en de regressievergelijking  $pH_v = 0,86 pH_g + 0,84$  ( $pH_v$  en  $pH_g$  respectievelijk pH van vis en gemalen vis).

Verder bleek de fijnheidsgraad en de duur van het malen eveneens van invloed te zijn. Daar de kans op fouten bij deze methode groter uitviel, werd zij niet verder toegepast.

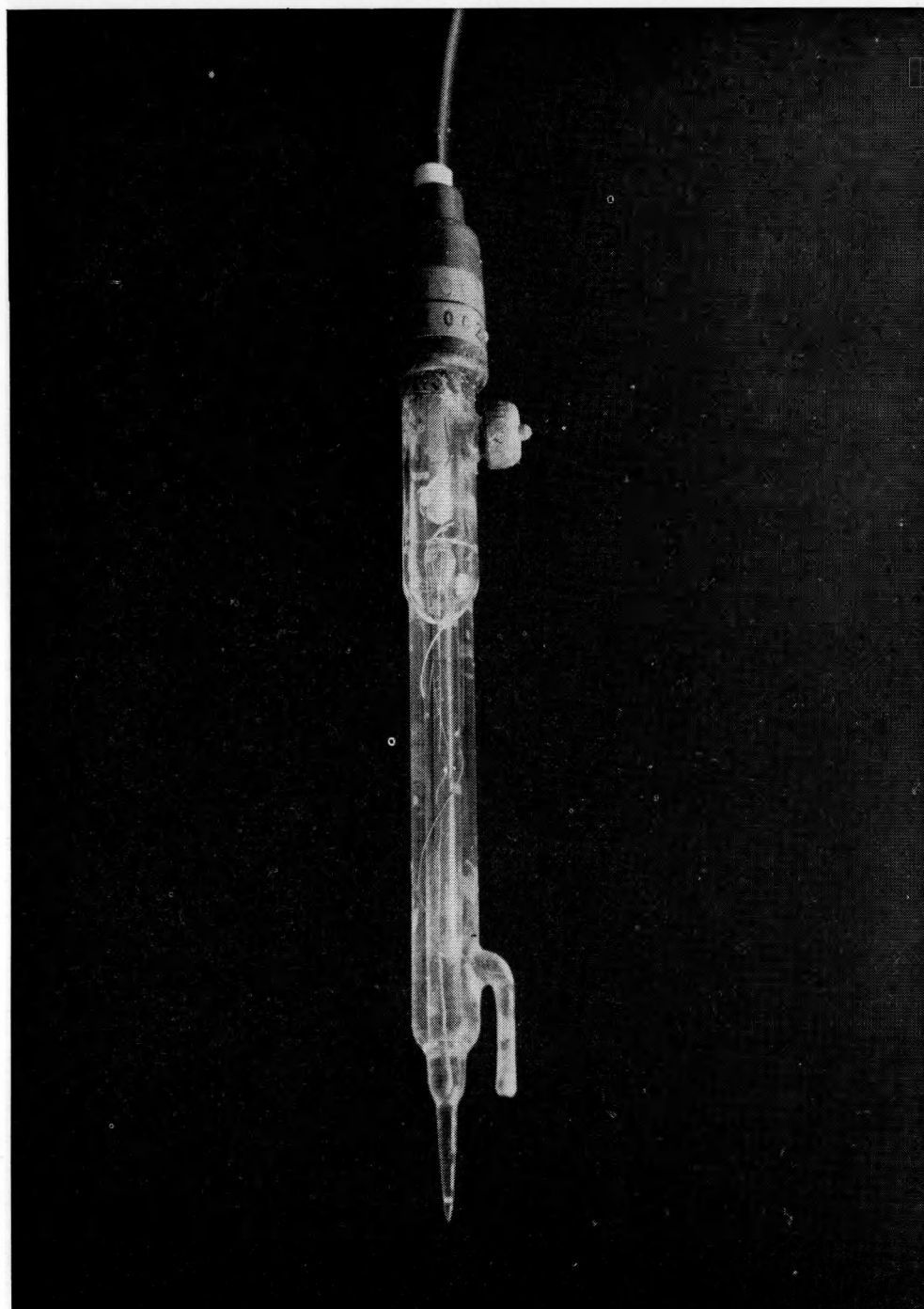


Fig. 2 — Insteekelektrode voor pH-meting.  
(links: puntvormige glaselektrode;  
rechts: referentie-elektrode).

b. Invloed van de plaats in het vislichaam.

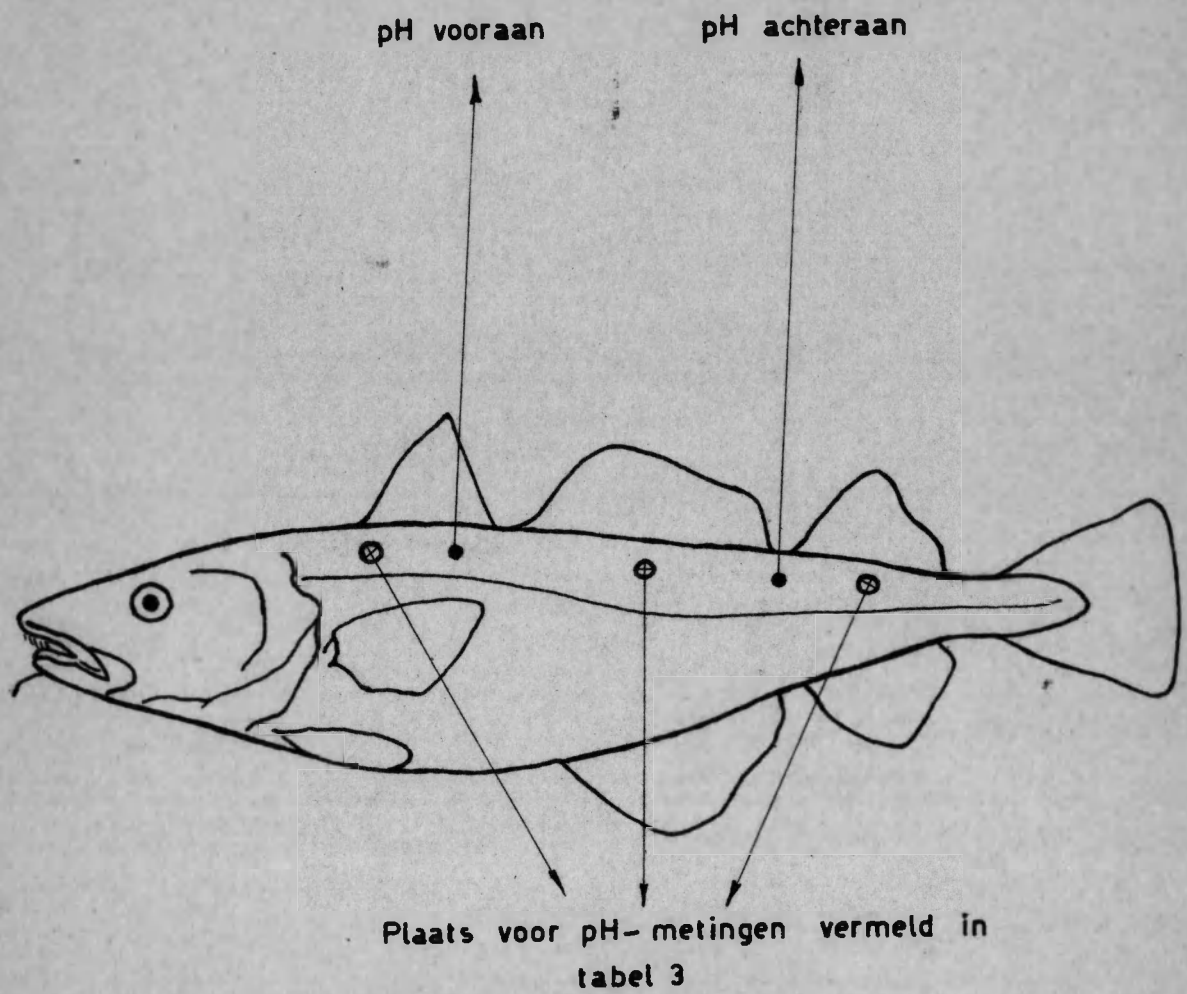
Er werd nagegaan in welke mate de pH kan variëren in eenzelfde vis. Tabel 3 geeft een beeld van de waarnemingen, die werden bekomen op verschillende plaatsen van 6 vissen (figuur 3).

Tabel 3. - pH-metingen op verschillende plaatsen van de vis.

Vis nr.	Vooraan links	Midden links	Achteraan links	Vooraan rechts	Midden rechts	Achteraan rechts
1	6,86	6,56	6,28	6,69	6,50	6,44
2	6,40	6,54	6,70	6,80	6,66	6,61
3	7,05	6,74	6,79	6,95	6,85	6,83
4	6,85	6,65	6,70	6,75	6,69	6,70
5	7,04	6,87	6,91	7,09	6,93	6,79
6	7,04	6,21	7,05	7,02	6,76	7,01
Gemid.	6,87	6,71	6,73	6,88	6,73	6,73

Uit deze resultaten blijkt dat de pH-waarden nogal uiteenlopend waren en dat voor het bepalen van de versheidstoestand in ieder geval meerdere metingen per vis dienen uitgevoerd te worden. Ook komt duidelijk tot uiting dat de waarnemingen die vooraan zeer dicht bij de kop uitgevoerd werden, hoger lagen dan de overige. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het feit dat de kop een grote bron van infectie is, zodat de dichtbij gelegen delen van de vis sneller bederven. Tussen de linker en rechter-zijde bleek anderzijds gemiddeld weinig verschil op te treden, alhoewel de individuele waarden ook uiteenlopend waren.

Om het systematisch verschil achteraan - vooraan nader te bepalen werd een volgende proef met 50 vissen met een verschillende versheidsgraad uitgevoerd. De pH-meting werd verricht



**Fig 3**      **Plaats voor de pH-metingen**

vooraan en achteraan, maar telkens een drietal cm meer naar het midden (zie figuur 3). De resultaten waren de volgende : in 88 % van de gevallen lagen de waarnemingen achteraan lager, en hiervan bleek 28 % tussen 0,10 en 0,25 pH eenheden, 30 % tussen 0,05 en 0,10 en 30 % tussen 0,10 en 0,25 pH-eenheden lager te liggen. Gemiddeld bedroeg dit 0,10 pH-eenheden. De statistische analyse wees uit dat het verschil met een risico van 0,01 wezenlijk was.

In alle verdere bepalingen werd dan ook per vis het gemiddelde van de vier opgegeven metingen genomen. In de praktijk bleek dit een goede maatstaf te zijn voor het bederf.

### C. Fysische methoden.

Als fysische methoden voor kwaliteitsbepaling werden vooral voorgesteld : de bepaling van de elasticiteit van het visvlees, van de brekingsindex van het oogvocht en van de elektrische weerstand van het visweefsel. De laatste twee methoden werden tijdens deze proeven getest.

#### 1. Brekingsindex van het oogvocht (BI).

Het oogvocht van de vissen bestaat overwegend uit eiwitten en water. Visuele observatie toont aan dat het vocht gedurende de eerste dagen na de vangst kristalhelder is en gedurende de verdere opslag een gele kleur verkrijgt, waarvan de intensiteit sterker en sterker wordt. Na een zekere tijd komt bloed vrij, zodat het vocht rood wordt. Tenslotte wordt de kleur door het oplossen van de "nethuid" bruinzwart tot zwart. Op zicht echter is het zeer moeilijk de verschillende veranderingen nauwkeurig vast te stellen. In het laboratorium echter is het mogelijk ofwel de optische dichtheid (colorimetrie), ofwel de brekingsindex (refractometrie) te bepalen. De eerstgenoemde methode blijkt echter niet zo geschikt te

Tabel 4. - Invloed van het staalnemen op de brekingsindex van het oogvocht

Hoeveelheid oogvocht achtereenvolgens uitgetrokken	Vis nr. 1		Vis nr. 2	
	Linkeroog	Rechteroog	Linkeroog	Rechteroog
0,2 ml	1,3398 (zeer klaar)	1,3355 (zeer klaar)	1,3382 (zeer bruin)	1,3386 (bruin)
0,2 ml	1,3354 (zeer klaar)	1,3355 (zeer klaar)	1,3379 (bruin)	1,3359 (licht bruin)
0,5 ml	1,3384 (bruin)	1,3370 (bruin)	1,3380 (bruin)	1,3376 (bruin)
2 ml	1,3381 (bruin)	1,3379 (bruin)	1,3385 (bruin)	1,3380 (bruin)
2 ml gecentrifugeerd	1,3375	1,3377	1,3383	1,3383

zijn (26) en de aandacht werd dan ook tijdens deze proefnemingen meer speciaal gevestigd op de refractometrie, die een eenvoudige en zeer snelle methode is.

### Methode

De beproefde methode steunt hoofdzakelijk op deze door Proctor en medewerkers (26) en Wegner (39) voorgesteld.

Met behulp van een injectiespuit van 2 ml wordt het oogvocht uit het oog van de vis getrokken en gedurende 5 min gecentrifugeerd ; twee druppels worden op het prisma van een Abbé-refractometer gebracht en de brekingsindex wordt afgelezen. De temperatuur wordt hierbij op 20° C gehouden (figuur 4).

Tijdens het oppuntstellen van de methode werden verschillende factoren getest.

#### a. Invloed van het staalnemen, van het centrifugeren en het filtreren.

Er werd vooreerst nagegaan of de hoeveelheid vocht uit het oog getrokken een invloed heeft op de BI. Dit werd op verschillende vissen getest. Als representatief voorbeeld worden de waarnemingen van twee vissen afkomstig van twee verschillende vangsten gegeven ; uit de ogen werden achtereenvolgens variërende hoeveelheden vocht getrokken waarvan de BI onmiddellijk bepaald werd. De resultaten zijn vermeld in tabel 4.

Uit deze resultaten blijkt dat zich een duidelijke variatie voordeed tussen de verschillende frakties. Daar dit vooral voor de eerste kleine frakties (0,2 ml) het geval was, is het noodzakelijk voor het onderzoek steeds zoveel mogelijk de ganse hoeveelheid oogvocht uit het oog op te zuigen.

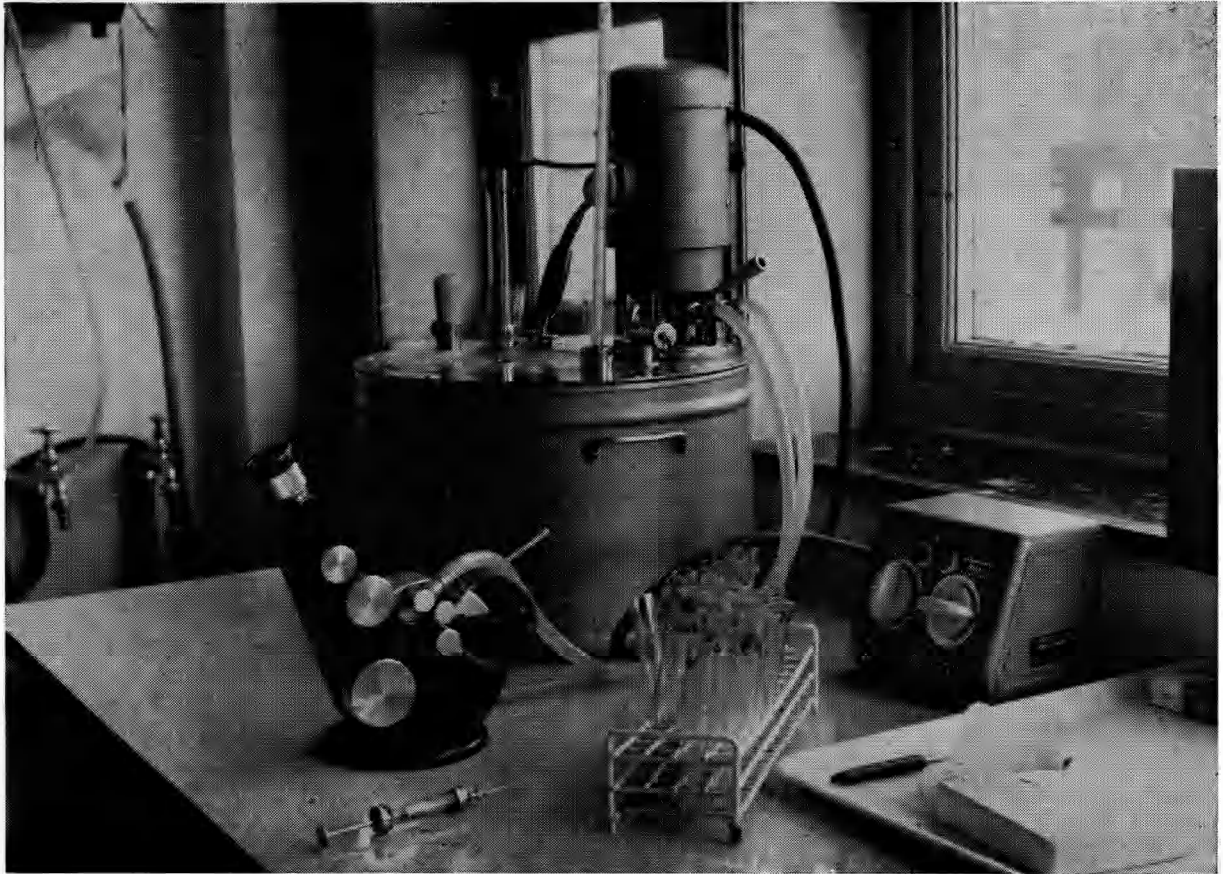


Fig. 4 — Apparaat voor refraktometrie.



Op te merken valt dat voor vissen met kleine ogen (bv. kleine gullen) het oogvocht best dient samengegoten te worden. Ook voor grote vissen kan dit gebeuren : de proefnemingen wezen uit dat de afgelezen waarde goed overeenkomt met het gemiddelde berekend uit de BI van de afzonderlijke vissen. Het is echter aan te bevelen zoveel mogelijk de individuele waarden te bepalen, daar hierdoor een beter inzicht in de homogeniteit van een monster vis bekomen wordt.

In verband met het staalnemen rijst ook de vraag of het noodzakelijk is de BI van het linker- en rechteroog te controleren en deze vissen te verwerpen waarvan het verschil tussen beide ogen te groot is. Wegner (40) wijst er op dat verschillen kunnen optreden door het indringen van smeltwater en dat vissen waarvan de afwijking tussen beide ogen groter is dan 0,010 eenheden dienen verworpen te worden voor de kwaliteitsbeoordeling.

Anderzijds is het ook van belang de invloed van het centrifugeren in het oogvocht te bepalen. Beide factoren werden samen op 30 vissen getest. De waarnemingen zijn vermeld in tabel 5.

Tabel 5. - Invloed van linker- en rechteroog en van het centrifugeren van het oogvocht.

Linkeroog		Rechteroog	
Zonder centri- fugeren	Na centri- fugeren	Zonder centri- fugeren	Na centri- fugeren
1,3385	1,3380	1,3372	1,3367
1,3380	1,3382	1,3390	1,3400
1,3376	1,3383	1,3391	1,3384
1,3366	1,3382	1,3381	1,3374
1,3368	1,3369	1,3408	1,3373
1,3412	1,3387	1,3382	1,3382
1,3384	1,3387	-	1,3392
1,3409	1,3392	1,3388	1,3387
1,3368	1,3367	1,3372	1,3375
1,3369	1,3368	-	1,3368
-	1,3370	1,3375	1,3373
1,3359	1,3357	1,3372	1,3371
1,3365	1,3365	1,3367	1,3367
-	1,3375	1,3374	1,3378
1,3374	1,3375	1,3375	1,3376
1,3365	1,3365	1,3360	1,3361
1,3364	1,3364	1,3368	1,3372
1,3362	1,3362	1,3365	1,3364
1,3380	1,3378	1,3369	1,3365
1,3366	1,3364	1,3355	1,3354
1,3365	1,3362	1,3368	1,3364
1,3367	1,3363	1,3369	1,3364
1,3365	1,3360	1,3372	1,3368
1,3367	1,3367	1,3390	1,3396
1,3371	1,3371	1,3368	1,3369
1,3359	1,3362	-	1,3382
1,3354	1,3356	1,3362	1,3358
1,3363	1,3361	1,3365	1,3368
Gemiddeld 1,3372	1,3371	1,3374	1,3373
Standaard- afwijking 0,00137	0,00098	0,00117	0,00110

Er kan eerst en vooral opgemerkt worden dat de gemiddelde waarden weinig verschilden, alhoewel soms uitgesproken variaties voorkwamen tussen de individuele waarnemingen. Ook de standaardafwijkingen verschilden weinig.

Uit deze proeven kon besloten worden dat het niet volstrekt nodig is het oogvocht te centrifugeren. Het vergemakkelijkt echter de bepaling en daarenboven komt het regelmatig voor (zie tabel 5) dat bij niet gecentrifugeerd oogvocht de bepaling wegens te grote troebelheid niet uit te voeren is.

De belangrijkste conclusie is echter dat het niet noodzakelijk is telkens de BI van het linker- en rechteroog te controleren, dit op voorwaarde dat een voldoende aantal vissen genomen wordt. Dit is belangrijk aangezien dit het werk zeer vergemakkelijkt en snellere bepalingen toelaat.

Door Proctor en medewerkers (26) wordt aangeraden het oogvocht te filtreren over glaswol, waardoor een gelatineuze "sluier" verwijderd wordt. Uit de proefnemingen bleek dat de BI van gefiltreerd oogvocht gemiddeld 0,0001 à 0,0003 eenheden hoger lag. Er kon echter besloten worden dat het filtreren geen praktisch voordeel oplevert. Daar het tamelijk veel tijd vergt kan het best achterwege gelaten worden.

b. Invloed van de bewaarduur van het oogvocht.

In de praktijk kan het gebeuren dat een zekere tijd verloopt tussen het staalnemen en de eigenlijke bepaling. De invloed hiervan werd getest door het oogvocht gedurende 24 uur te bewaren respektievelijk bij 1° C en 20° C.

Uit de resultaten bleek dat het verblijf in frigo ( $1^{\circ}$  C) gedurende 24 u weinig invloed heeft : enkel een zeer lichte stijging (0,0001 à 0,0002) werd vastgesteld en dit voor vissen van uiteenlopend versheid. Dit is gunstig : de tijdens de nacht na het lossen genomen stalen kunnen gemakkelijk overdag bepaald worden. Bij  $20^{\circ}$  C echter treedt het bederf van het zeer eiwitrijke oogvocht vlug in : de BI steeg van 0,0008 tot 0,0013 eenheden. De stalen dienen dan ook koel bewaard te worden.

c. Invloed van de temperatuur van de refractometer.

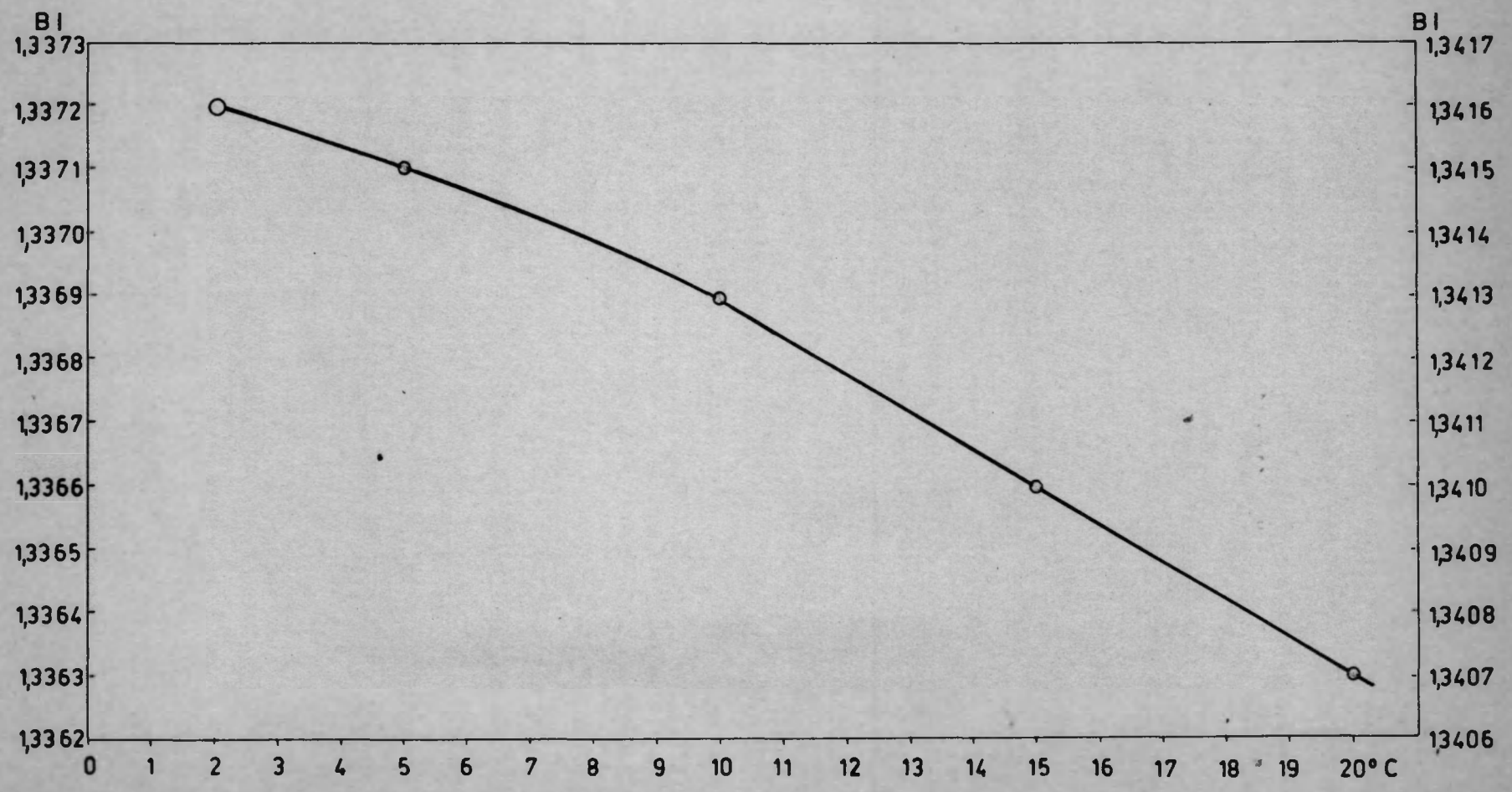
Daar de brekingsindex beïnvloed wordt door de temperatuur werd nagegaan in hoeverre dit het geval was voor het oogvocht van vis. De proef werd uitgevoerd op 5 verse vissen en 5 vissen die als bedorven konden worden aangezien. De waarnemingen werden verricht bij  $2^{\circ}$ ,  $5^{\circ}$ ,  $10^{\circ}$ ,  $15^{\circ}$  en  $20^{\circ}$  C. De resultaten zijn weergegeven in figuur 5.

Zowel voor verse, als voor bedorven vis bleek de BI van het oogvocht bijna lineair te verlopen tussen  $5^{\circ}$  en  $20^{\circ}$ . Per  $^{\circ}$  C werd een daling van gemiddeld 0,00006 eenheden bekomen. Hieruit kan besloten worden dat de meting bij  $20^{\circ} \pm 1,5^{\circ}$  C dient te geschieden. Een grove thermostaat is dus voldoende ; bij tamelijk konstante kamertemperatuur kan deze zelfs achterwege gelaten worden. Voor bedrijfslaboratoria kan dit van betekenis zijn.

d. Gebruik van een handrefractometer.

Om ook in de vismijn rechtstreeks de BI op een vlugge manier te bepalen, wordt door Wegner (40) voorgesteld een handrefractometer te gebruiken. Het oogvocht wordt hier eveneens met een injectiespuit uitgetrokken, twee druppels op het prisma

Fig 5 Verband tussen de brekingsindex van het oogvocht en de temperatuur



van een handsuikerrefractometer gebracht en de brekingsindex onmiddellijk afgelezen.

De proefnemingen uitgevoerd met een Zeiss handrefractometer O/30 wezen echter uit dat deze techniek moeilijk bruikbaar is : de variatie is zeer groot en de correlatie met de Abbé-refractometerbepalingen praktisch onbestaande. Een verklaring hiervoor is wellicht te zoeken in de soms grote verschillen in temperatuur tussen de vissen in de vismijn, het niet centrifugeren van het oogvocht en de kleinere gevoeligheid van de handrefractometer (praktisch alle waarnemingen liggen tussen 2 en 6 suikergraden overeenkomend met een BI respectievelijk van 1,3360 en 1,3420).

e) Bepaling van de TVB van het oogvocht.

Als aanvulling van de refractometrie werd ook nagegaan of de TVB van het oogvocht geen goede indicatie van de versheidstoestand van de vis zou kunnen vormen. Een bijkomend voordeel zou zijn dat voor controle-onderzoek geen enkele vis zou dienen geschonden te worden, zoals dit het geval is voor de bepaling van de TVB van het visvlees.

De bepalingen werden op 5 à 10 ml samengegoten oogvocht volgens de hoger beschreven techniek uitgevoerd en de resultaten uitgedrukt in mg N per 100 ml oogvocht. Controleproeven wezen uit dat dezelfde proefomstandigheden als voor de gewone TVB-bepalingen konden genomen worden.

2. De elektrische weerstand van het visvlees.

In 1963 heeft Hennings (16) een apparaat, "vistester" (Intelection Fischtester V, Dethloff-Electronic, Hamburg, Duitsland) genaamd, op punt gesteld dat steunt op volgend principe.

De wanden van de cellen van het visvlees gedragen zich als condensatoren, waarvan de capaciteit hoog is wanneer de vis zeer vers is. Naarmate het bederf vordert, verhoogt echter de permeabiliteit van de wanden door de enzymatische en bacteriële afbraak van de eiwitten en vermindert de capaciteit. Een relatief hoogfrequentie stroom ondervindt weinig of geen invloed van de capaciteit van de celwanden, echter wel een relatief laagfrequentie stroom.

De verschillen in wisselstroomweerstand (impedantie) gemeten bij twee frequenties worden aldus kleiner en kleiner om tenslotte bij bedorven vis nul te benaderen. Zij laten aldus toe het bederf van de vis te volgen. Als meest geschikte frequenties werden 1 en 16 kHz gekozen.

Om beide wisselstroomweerstand (impedanties) te vergelijken, wordt de schakeling van het apparaat zo verwezenlijkt dat een waarde  $Q$  bekomen wordt, die aangeeft met hoeveel procent de bij de frequentie van 1 kHz gemeten weerstand  $R_L$  groter is dan bij de frequentie van 16 kHz gemeten weerstand  $R_H$  :

$$Q = \frac{(R_L - R_H) \cdot 100}{R_H} = \left[ \frac{R_L}{R_H} - 1 \right] \cdot 100$$

Bij pas gevangen vis benadert  $Q$  dus 100 en bij bedorven vis 0. De waarde  $Q$  wordt conventioneel uitgedrukt in "versheidsgraden" en heeft het voordeel onafhankelijk te zijn van de temperatuur, de dikte van de vis en andere factoren, daar beide weerstanden  $R_L$  en  $R_H$  op dezelfde manier beïnvloed worden.

Praktisch gezien wordt  $Q$  gemeten door twee grafiotelektroden in contact te brengen met de vis (figuur 6). De waarde kan onmiddellijk afgelezen worden.



Fig. 6 — Meting van de vistester.

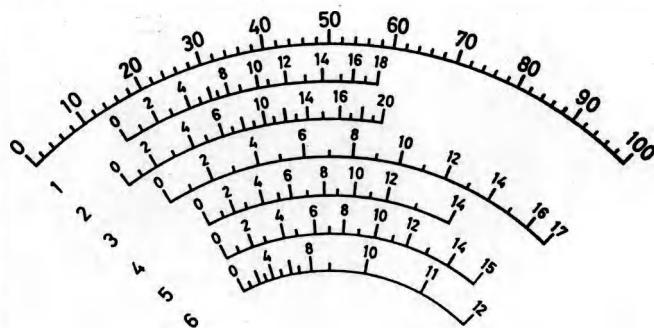


Fig. 7 — Versheidsschaal van de vistester.

1. Rode poon
2. Koolvis
3. Tong
4. Schelvis
5. Kabeljauw
6. Haring



Hennings heeft voor een zestal belangrijke vissoorten het verband versheidsgraden - organoleptische keuring bepaald en dit uitgedrukt in z.g. "ijsdagen", t.t.z. het aantal dagen dat de vis nog goed in ijs kan bewaard worden. Figuur 7 geeft een beeld van de versheidsschaal van de vistester.

Het is echter gebleken dat de structuur van het visweefsel volgens de plaats in de vis verschilt en dus de meting beïnvloedt ; zo zijn de metingen bv. dicht bij de kop boven de buikholte **iets** lager. Om vergelijkbare resultaten te bekomen dient de bepaling steeds op dezelfde plaats uitgevoerd te worden, bij voorkeur op het einde van de buikholte. Voor de Gadiden (bv. kabeljauw) ligt dit onder de tweede rugvin op de zijlijn.

De methode blijkt verder door volgende factoren beïnvloed te worden :

- (a) de huid van de vis : metingen zonder huid (bv. filets) zijn met het huidig apparaat moeilijk uit te voeren ; ook op ontschubde vis kan de bepaling niet verricht worden.
- (b) de aanwezigheid van elektrolyten : metingen op gezouten vis bv. zijn onmogelijk.
- (c) beschadiging van de cellen door kneuzingen, bevriezing, uitdroging, enz. ; de methode is aldus bv. niet geschikt voor diepvriesvis.

Tijdens de proeven werd verder de opgegeven gebruiksaanwijzing zonder wijzigingen gevolgd.

### HOOFDSTUK III. - Het bepalen van objectieve kwaliteitsnormen.

Behalve hun gebruik in het vergelijkend laboratoriumonderzoek voor de studie van de factoren die de kwaliteit van de vis beïnvloeden, beogen de objectieve methoden het bepalen van voor de praktijk geldende objectieve kwaliteitsnormen (⊗). Deze kunnen twee aspecten omvatten : (a) het bepalen van de grens van het bederf, d.w.z. vaststellen of de vis nog geschikt is voor menselijke consumptie of niet en (b) het indelen van de vis in kwaliteitscategoriën.

Er dient dadelijk gewezen te worden op het feit dat geen enkele van de beschreven methoden in staat is hiervoor welbepaalde grenzen op te geven en dit wegens de hogervermelde variaties van de vis die te wijten zijn aan ouderdom, seizoen, visgrond enz.

#### A. Voorgestelde normen.

Mits het nodig voorbehoud kunnen voor de verschillende geteste methoden, met uitzondering van de pH, wel gemiddelde grenzen opgegeven worden. Deze werden bepaald voor kabeljauw na proefnemingen die 18 maanden duurden en waarbij 2.500 vissen onderzocht werden.

Tijdens deze proefnemingen was het niet mogelijk een gedetailleerde organoleptische keuring (bv. met puntenschema en taste panel) uit te voeren. Niettemin werd de vis in drie categorieën ingedeeld : (1) zeer goed, (2) goed tot middelmatig goed en (3) op de grens van het bederf of bedorven.

---

(⊗) Het testen van de beschreven methoden met het oog op hun gebruik voor vergelijkend laboratoriumonderzoek maakt het voorwerp uit van een afzonderlijke reeks proefnemingen.

Tabel 6 geeft de normen aan die als basis kunnen genomen worden.

Tabel 6.- Voorgestelde objectieve kwaliteitsnormen voor kabeljauw.

Kwaliteit	TVB	TVB oogvocht	TMA	pH	BI	Vistester C-waarden
Zeer goed	< 20 mg N %	< 15 mg N %	0 - 3 mg N %	} < 6,9	< 1,3370	> 50
Goed tot middelmatig goed	20 - 45 mg N %	15 - 40 mg N %	3 - 10 mg N %		1,3370 - 1,3400	50-15
Op de grens van het bederf of bedorven	> 45 mg N %	> 40 mg N	> 10 mg N %	> 6,9	> 1,3400	< 15

Deze normen gelden enkel voor kabeljauw wanneer de opgegeven methoden nauwkeurig gevolgd worden en op voorwaarde dat minstens 10 vissen voor de bepaling genomen worden.

In de praktijk werden gunstige resultaten bereikt door volgende werkwijze te volgen : naast de organoleptische keuring wordt de vis aan minstens vier objectieve kwaliteitsmethoden onderworpen. Indien de resultaten van drie van deze vier methoden overeenstemmen, wordt de globale beoordeling aanvaard, zoniet wordt de laagste kwotering genomen.

In grote lijnen stemmen de bekomen normen voor kabeljauw overeen met degene die door andere onderzoekers werden opgesteld. Er moet hierbij echter gewezen worden op het feit dat de gegevens enkel rechtstreeks vergelijkbaar zijn als strikt dezelfde methoden toegepast worden, hetgeen meestal niet het geval is.

Voor de TVB van het visvlees gewen Lücke en Geidel (23) als grens voor het bederf 45 mg, Treiber (35) 35 mg,

Stansby (31) 25 mg en Wittfogel (42) 30 mg. Voor de TMA geeft de Canadese gezondheidsinspectie 6 mg N % aan (9). Voor de pH geven Yamamoto en Sonohare (44) 6,85, Wittfogel (42) en Ludorff (24) en Treiber (35) 6,8 à 7,0.

Voor de brekingsindex van het oogvocht stellen Proctor en medewerkers (26) en Wegner (39) een meer volledige classificatie voor ; tabel 7 geeft hiervan een overzicht. De resultaten van het eigen onderzoek werden duidelijkheidshalve eveneens opgenomen.

Tabel 7.- Vergelijking van voorgestelde normen voor de B.I.

Kwaliteit	Proctor en medewerkers	Wegner	Eigen onderzoek
zeer goed	1,3347 - 1,3366	1,3340 - 1,3360	minder dan 1,3370
goed	1,3367 - 1,3380	1,3361 - 1,3385	} 1,3370 - 1,3400
middelmatig	1,3381 - 1,3393	1,3386 - 1,3399	
slecht	1,3394 en meer	1,3400 en meer	1,3401 en meer

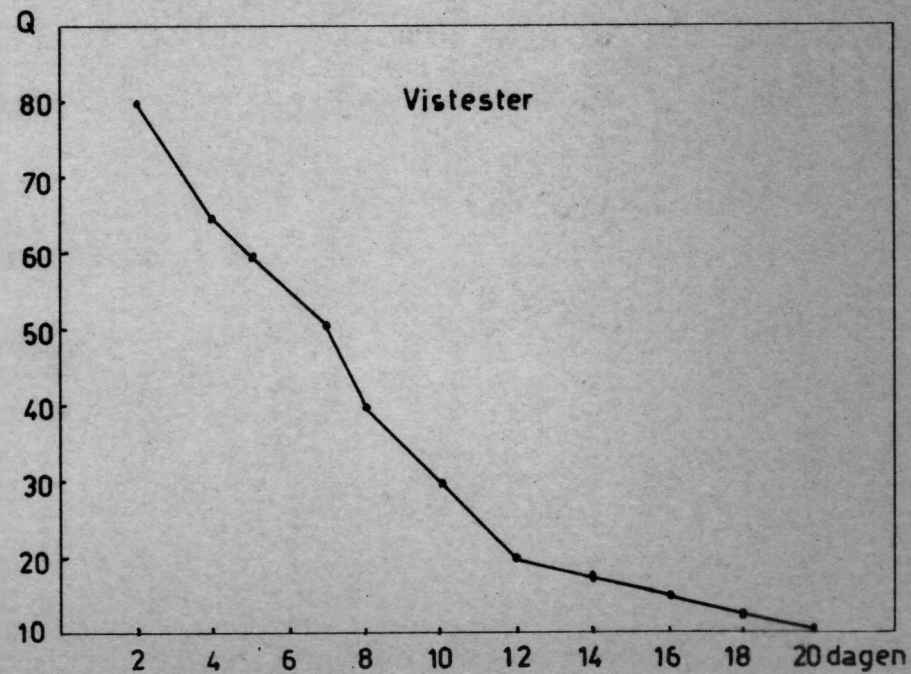
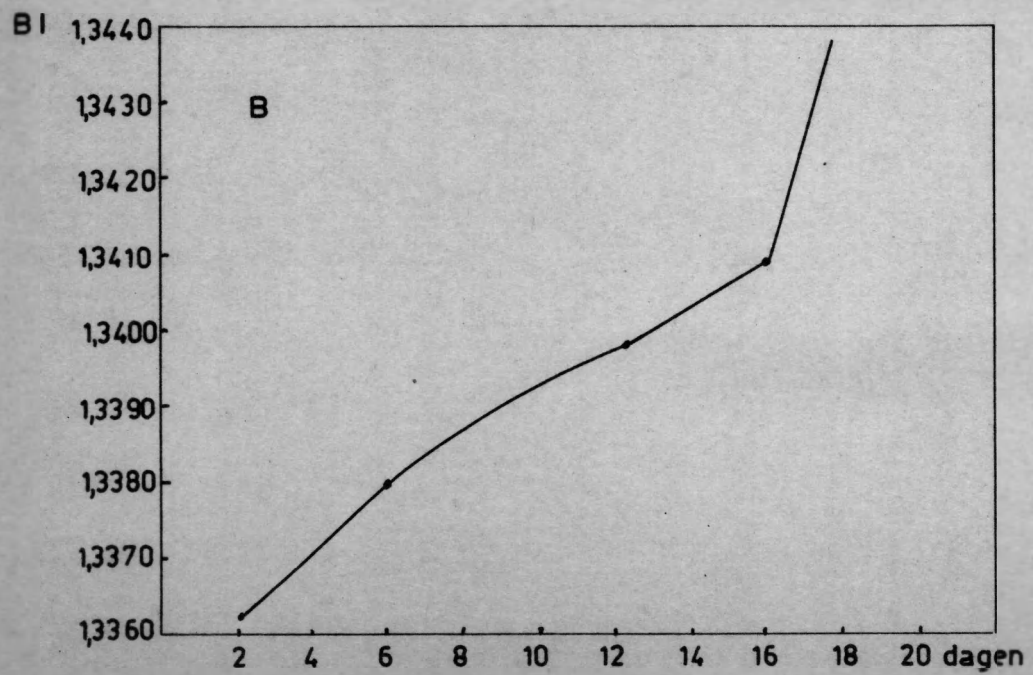
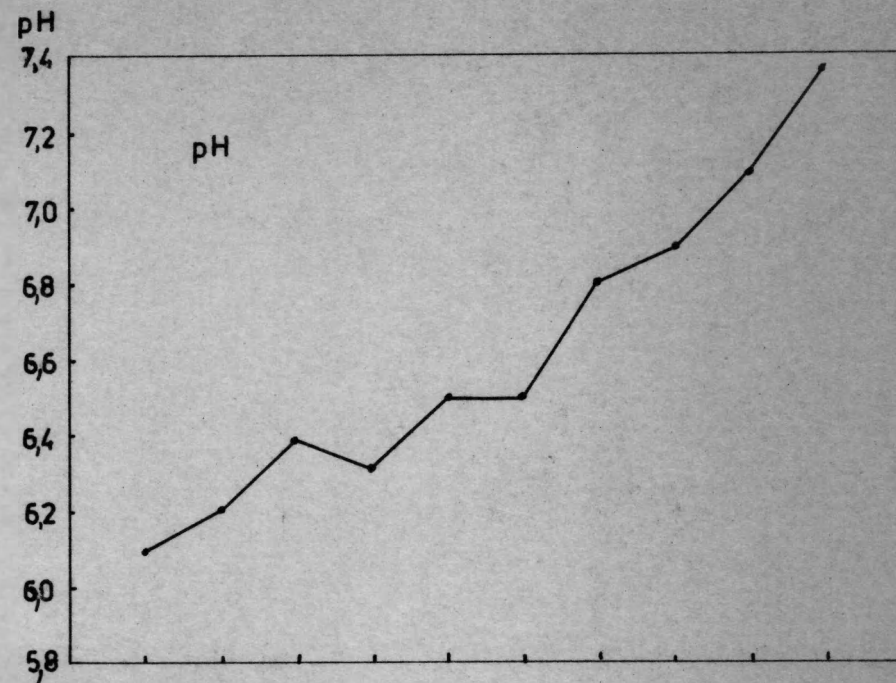
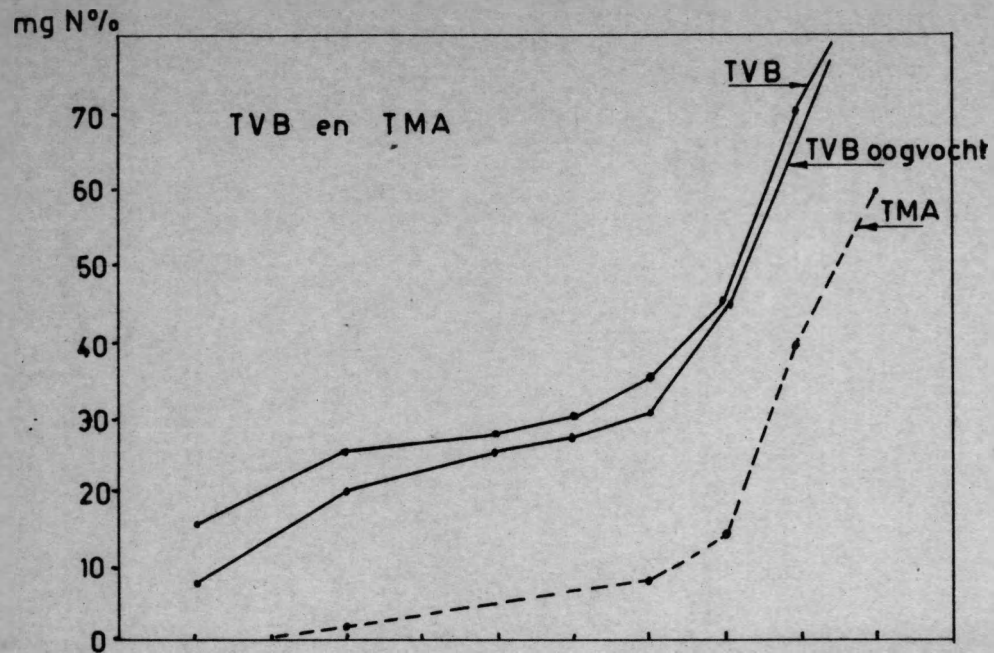
Voor de elektrische weerstand geeft Hennings (16) een grenswaarde van  $Q = 20$  op.

#### B. Bewaarcapaciteit.

Een ander aspect van de objectieve kwaliteitsbeoordeling is het aangeven van de bewaarcapaciteit van de vis. Zoals hoger werd vermeld, is dit voor de praktijk van groot belang en worden intensieve studies gewijd aan het oppuntstellen van methoden die in zekere zin het toekomstig bederf van de vis kunnen voorspellen.

Voor de tijdens deze proefnemingen geteste methoden werd dit eveneens nagegaan. In figuur 8 worden de gemiddelde bederf-

Fig 8 Gemiddelde bederfcuurven



curven weergegeven die met deze methoden werden bekomen. Deze curven zijn gemiddelden van een twintigtal proefnemingen.

Hieruit blijkt dat voor de TVB en de TMA een zeker "palier" voorkomt en dat de gemiddelde bederfcurve slechts in de nabijheid van de grens van bederf stijl gaat oplopen. Het is dan ook maar vanaf deze relatief hoge waarden dat een inzicht in de te verwachten bewaarcapaciteit bekomen wordt. Op dit ogenblik is deze echter zeer laag geworden.

In verband met de bepaling van de TVB van het oogvocht kan bemerkt worden dat de gemiddelde bederfcurve een weinig lager ligt dan deze van de gewone TVB, maar praktisch hetzelfde verloop kent. De variaties tussen de individuele waarden waren evenwel groter dan bij de gewone TVB-bepaling. Er dienen dus meer vissen genomen te worden. Het verdient aanbeveling de bepaling van de TVB van het oogvocht enkel uit te voeren wanneer de gewone TVB-bepaling moeilijk toe te passen is of wanneer een aanvullende kwaliteitsbepaling gewenst is.

De waarden voor de pH beneden 6,8 zijn onderhevig aan grote variaties, zodat deze test evenmin een goede indicator van de bewaarcapaciteit blijkt te zijn.

Voor de BI en de elektrische weerstand (vistester) wordt echter een ander beeld bekomen. De bederfcurven verlopen stijler en er komt geen palier voor, zodat dus ook voor verse vis een beter inzicht in de te verwachten bewaarmogelijkheden bekomen wordt. Daar de individuele afwijkingen soms groot zijn dient echter het gemiddelde van een tamelijk groot aantal vissen van een bepaalde partij genomen te worden : minstens 10 en liefst nog rond de 30 indien mogelijk.

### C. Voor- en nadelen van de beschreven methoden.

Naast hun mogelijkheden op het gebied van de objectieve kwaliteitsbepaling, zijn de voor- en nadelen verbonden aan de methoden zelf eveneens van belang.

#### 1. De totale vluchtige basische stikstof.

Het grote voordeel van deze methode is dat weinig apparatuur en produkten vereist zijn : de kleinste bedrijfs-laboratoria kunnen er zonder grote kosten mee uitgerust worden. De bepaling is verder zeer eenvoudig en verloopt, wanneer de stoomdestillatie gebruikt wordt, tamelijk snel. Verder kunnen naast verse vis ook verwerkte vis (gerookte vis, gezouten vis, conserven, enz.) geanalyseerd worden. Het is echter geen veldtechniek en vereist daarenboven een tamelijk grote hoeveelheid niet meer te recupereren vis.

#### 2. Het trimethylaminegehalte.

De TMA-dosering is een vlugge methode, maar vergt meer bewerkingen en meer vakkennis van de ~~anal~~yst. Daarenboven is een colorimeter noodzakelijk, hetgeen de kostprijs van de methode aanzienlijk opdrijft. In verband met de techniek zelf kan dezelfde opmerking als voor de TVB-bepaling gemaakt worden.

#### 3. De pH-bepaling.

Het voordeel van de pH-bepaling is wel dat het een vlugge methode is, die weinig apparaturen vergt en in vele ge-

vallen een goed inzicht in de kwaliteit van de vis kan geven. Behalve het nadeel van de soms onbetrouwbare lage waarden, dient ook de relatieve broosheid en de beperkte levensduur van de gekombineerde insteekelektrode vermeld te worden. Voor serieonderzoek valt de methode dan ook duur uit. Wellicht kan het gebruik van metalen pH-elektroden of van speciale pH-indicatorpapier hierin verbetering brengen.

De pH-meting blijkt vooral nut te hebben als aanvullende snelle methode in geval van twijfel, zoals bv. bij expertise van vis. Tenslotte gaat **bij** deze methode geen enkele vis verloren.

#### 4. De brekingsindex van het oogvocht.

De BI kan zeer vlug bepaald worden en vereist een minimum aan materiaal. Ook door minder ervaren personeel kan de methode gemakkelijk uitgevoerd worden. Verder wordt geen enkele vis geschonden. Voor bedrijflaboratoria valt de refractometer echter nogal duur uit. Het nadeel is verder dat geen bepalingen op ontkopte of verwerkte vis kunnen uitgevoerd worden. Ook vissen met zeer kleine ogen zijn moeilijk te onderzoeken.

#### 5. De elektrische weerstand van het visvlees.

Dit is tot nog toe de enige echte veldtechniek die in het visserijbedrijf kan worden toegepast. De methode laat toe op zeer vlugge wijze een inzicht in de kwaliteit van een bepaalde partij vis te hebben. De bediening van de **vistester** is zeer eenvoudig en vereist geen gespecialiseerd personeel. Zoals hoger aangegeven, zijn de nadelen van deze methode echter talrijk ; hierbij is vooral te vermelden : de onmogelijkheid ontvelde, gefileerde, diepbevroren, gezouten, gedroogde vis, enz. te keuren. Daarbij valt het apparaat zeer duur uit.



## S A M E N V A T T I N G    e n    B E S L U I T E N

=====

Zes methoden voor objectieve kwaliteitsbepaling werden op kabeljauw (*Gadus morhua*) getest, nl. de bepaling van de totale vluchtige basische stikstof van het visvlees en van het oogvocht, van het trimethylamine, van de pH, van de brekingsindex van het oogvocht en van de elektrische weerstand van het visvlees.

Voor deze methoden werden de proefomstandigheden bestudeerd en de beste toe te passen werkwijzen bepaald.

Aan de hand van talrijke waarnemingen konden kwaliteitsnormen worden voorgesteld en konden tevens de voor- en nadelen van de verschillende technieken in de praktijk worden nagegaan.

Uit het onderzoek is gebleken dat de beschreven methoden voor objectieve kwaliteitsbepaling in de meeste gevallen een nuttige aanvulling van de organoleptische bepaling kunnen zijn. Hiervoor is het echter noodzakelijk steeds te werken met een voldoende aantal vissen en in ieder geval meer dan één objectieve methode toe te passen.

LITERATUUR

- (1) ANTONACOPOULOS, N. - Verbesserte Apparatur zur quantitativen Destillation wasserdampfvlüchtiger Stoffe - Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 113 (2), 113, 1960.
- (2) BAINES, C., JONES, N. en SHEWAN, J. - Technological problems of measuring degree of freshness of wet fish and problems of quality control requiring more knowledge from fundamental research - FAO Symposium on the Significance of Fundamental Research in the Utilization of Fish, Husum, nr. WP/IV/1, 1964.
- (3) BANKS, A. - The storage of fish with special reference to the onset of rancidity - Journal of the Society of Chemical Industries, 57, 124, 1938.
- (4) BUDAI, K. - Zeitschrift für Physiologische Chemie, 86, 107, 1913.
- (5) CASTELL, C., ANDERSON, G., en PIVNICK, H. - Relation of bacterial count to quality of cod fillet - Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 7, 378, 1948.
- (6) CONWAY, E. - Microdiffusion Analysis and Volumetric Error - Crosby Lockwood & Son Ltd., London, 1962.
- (7) CUTTING, G. - Report of the Food Investigation Board, Blz. 78, 1937.
- (8) DA COSTA, A., TOMIYAMA, T. en STERN, J. - The applicability of the vacuum distillation technique for the determination of volatile acids and volatile bases in fish flesh, - in : Chilling of Fish - Staatsdrukkerij- en Uitgeversbedrijf, Den Haag, blz. 244, 1960.
- (9) Documentation sur la définition et le contrôle de la qualité du poisson aux Etats-Unis d'Amérique et au Canada, OECE, Paris, EPA/AG(60) 19, blz. 73, 1960.
- (10) DYER, W. - Report on Trimethylamine in fish - Journal of the A.O.A.C., 42 (2), 292, 1959.
- (11) DYER, W., DYER, F. en SNOW, J. - Spoilage of iced eviscerated cod - Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 4, 327, 1939.
- (12) FARBER, L. - Food Technology, 6, (8), 316, 1952.
- (13) FARBER, L. en LERKE, P. - Studies on the evaluation of freshness and on the estimation of the storage life of raw fishery products - Food Technology, 15, 191, 1961.
- (14) GUGGENHEIM, M. - Les amines biologiques - J. Baillièrre, Parijs, 1920.
- (15) HACKER, R. - Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, 90, 361, 1950.

- (16) HENNINGS, C. - Ein neues elektronisches Schnellverfahren zur Ermittlung der Frische von Seefischen - Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 119 (6), 461, 1963.
- (17) HILLIG, F., PATTERSON, W. en MACLEAN, M. - Individual Volatile acids as indices of decomposition in tuna - Journal of the A.O.A.C., 33, 834, 1950.
- (18) HOVART, P. en VYNCKE, W. - Handling and Processing Norway Lobsters - Fishing News International, 2, 117, 1964 en 3, 221, 1964.
- (19) HUNTER, A. - Bacterial decomposition of salmon - Journal of Bacteriology, 5, 353, 1920.
- (20) JONES, N. - Hypoxanthine and other purine-containing fractions in fish muscle as indices of freshness - FAO Symposium on the Significance of Fundamental Research in the Utilization of Fish, Husum, nr. WP/IV/4, 1964.
- (21) JONES, N. en MURRAY, J. - Rapid measures of nucleotide dephosphorylation in iced fish muscle. Their value as indices of freshness and of inosine 5' - monophosphate concentration - Journal of the Science of Food and Agriculture, 15, 684, 1964.
- (22) KONIG, J. - Untersuchung von Nahrungs-, Genussmitteln und Gebrauchsgegenständen - J. Springer, Leipzig, 1910.
- (23) LÜCKE, F., en GEIDEL, W. - Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung, 70, 441, 1935.
- (24) LUDORFF, W. - Fische und Fisch-Erzeugnisse - Berlijn, Verlag A. Hayn's Erben, blz. 147, 1960.
- (25) PARTMANN, W. - Zur Frage der Bestimmung des Frischezustandes von Fischen - Zeitschrift für Lebensmittel - Untersuchung und -Forschung, 93, 341, 1951.
- (26) PROCTOR, B., NICERSON, J., FAZZINA, T., RONSIVALLI, L., SMITH, R., en STERN, J. - Rapid determination of the quality of whole eviscerated haddock - Food Technology, 13 (4), 224, 1959.
- (27) PRUDHOMME, M. - Inspection sanitaire des poissons, mollusques et crustacés comestibles - Vigot Frères, Parijs, blz. 175, 1957.
- (28) SCHOENBERG, F. - Archiv für Lebensmittel-Hygiene, 7, 166, 1961.
- (29) SHEWAN, J. en JONES, N. - Chemical changes occurring in cod muscle during chill storage and their possible use as objective indices of quality - Journal of the Science of Food and Agriculture, 8, 492, 1957.
- (30) STANSBY, S., en LEMON, J. - Ind. Eng. Chem. An. ed., 5, 208, 1933.
- (31) STANSBY, M. - Industrial Fishery Technology - Reinhold Publishing Corporation, New York, blz. 369, 1963.

- (32) TARR, H. en BAILEY, B. - Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 4, 327, 1939.
- (33) TARR, H. - Ribose and the Maillard reaction in fish muscle - Nature, 171, 344, 1953.
- (34) TARR, H. - Microbiological deterioration of fish post mortem, its detection and control - Bacteriological Reviews, 18, 1, 1954.
- (35) TREIBER, H. - Die Bestimmung des Frischegrades (Qualität) von frischem Seefisch und dessen filet - Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 6, 146, 1959.
- (36) VYNCKE, W. - De invloed van antibiotica op het bederf van de vis - Rijkslandbouwhogeschool, Gent, blz. 11, 1958.
- (37) VYNCKE, W. en MERLEVEDE, E. - Spoilage of fish and crustaceans ; Rapid determination of volatile ammonia by accelerated microdiffusion - Archives Belges de Médecine Sociale, Hygiène, Médecine du Travail et Médecine Légale, 3, 147, 1963.
- (38) WAKSMAN, S. - Mycologia, 39, 565, 1947.
- (39) WEGNER, H. - Refraktometrische Messungen der Augenflüssigkeit zur Frischebeurteilung von Seefischen - Archiv für Lebensmittelhygiene, 4, 83, 1960.
- (40) WEGNER, H. - Weitere Untersuchungen über die Brauchbarkeit der Refraktometrie bei der Frischebeurteilung von Seefischen - Archiv für Lebensmittelhygiene, 4, 90, 1962.
- (41) WITTFOGEL, H. - Ueber den Wert der Conway'schen Mikrodiffusions-Technik zur Bestimmung flüchtiger Basen als Fischfrischetest - Archiv für Lebensmittelhygiene, 4, 84, 1960.
- (42) WITTFOGEL, H. - Uniform methods of inspection and analysis of fish and fish products in international trade and uniformity of terminology - in : Sanitary Regulations for Fish and Fish products - OECD, Parijs, blz. 152, 1961.
- (43) WITTFOGEL, H. - Difficulties in controlling quality of iced frozen fish - FAO Symposium on the Significance of Fundamental Research in the Utilization of Fish, Husum, nr. TN/II/2, 1964.
- (44) YAMAMOTO, M. en SONEHARA, M. - Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 19, 761, 1953.

