

Deel 2. Bewerking in beweging

Nieuwe trends bij een flexibele produktie

J.W. van der Kamp

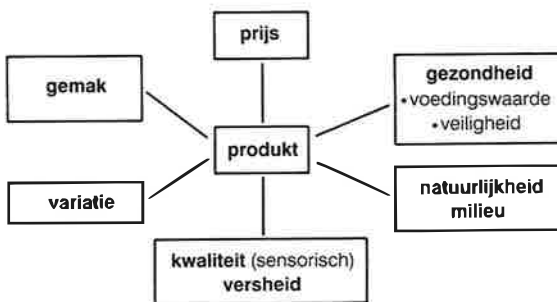
TNO-Voeding

Eén inleiding op de laatste dag van dit Symposium droeg de titel 'De wil van de consument is wet' (de bijdrage van K. Dorsman in dit boek). Omdat consumentenwensen inderdaad van steeds groter belang worden, zal ik ter inleiding van het tweede thema van het Symposium, 'Bewerking in beweging', allereerst ingaan op de technologische implicaties van de wensen van de consument. Vervolgens zal ik niet zozeer nader ingaan op de chemie en de technologie van de levensmiddelenproduktie – die aspecten komen in de volgende inleidingen aan de orde – maar op een aantal belangrijke ontwikkelingen rond de bewerking – ontwikkelingen die kunnen worden samengevat met het begrip 'integrale logistiek'.

Consumententrends en hun technologische gevolgen

De consument laat zich bij de keuze van een produkt leiden door een aantal factoren, zoals gezondheid (voedingswaarde en voedingsveiligheid), natuurlijkheid en milieuvriendelijkheid, gemak in het gebruik, variatie, kwaliteit – waarbij de versheid een belangrijk element is – en ten slotte de prijs. Recente onderzoeken laten zien dat in heel West-Europa de factor prijs van minder belang wordt voor de consument, terwijl de andere factoren in betekenis toenemen (zie figuur 1).

De consumentenwens ten aanzien van gemak ('convenience') leidt onder andere tot een toenemende hoeveelheid produkten die in de magnetron kunnen worden verhit. Hierbij worden niet alleen aan het produkt, maar ook aan de verpakking nieuwe eisen gesteld: de verpakking moet bestand zijn tegen magnetronverhitting en dient geen componenten over te dragen aan het produkt. In dit verband voeren het



Figuur 1. Factoren bij produkkeuze door de consument.

TNO-Verpakkingsinstituut en de Hoofdgroep Voeding een groot project uit voor de producenten van verpakkingsmaterialen.

De vraag naar natuurlijke en milieuvriendelijke produkten stelt weer andere eisen aan de verpakkingsmaterialen. Verder betekent deze wens een sterke impuls voor de ontwikkeling van natuurlijke ingrediënten, processen en produkten. De toepassing van de biotechnologie blijkt hier vaak goede mogelijkheden te bieden. Een gebied van onderzoek is bijvoorbeeld het zoeken van mogelijkheden om eiwitten, al dan niet na enzymatische modificatie, te benutten in plaats van synthetische emulgatoren. Een andere belangrijke trend is de toepassing van enzymen als 'processing aid'. Ten slotte geeft de vraag naar natuurlijke produkten sterke impulsen aan de opzet van systemen van integrale ketenbewaking (IKB).

Dergelijke impulsen gaan ook uit van de behoefte van de consument aan veilig voedsel, zonder contaminanten. Claims van natuurlijke en veilige produkten zijn immers pas echt hard te maken wanneer dit in de hele produktiekolom kan worden gegarandeerd met een IKB-systeem. De aanwezigheid van ongewenste micro-organismen in produkten is nog altijd het grootste voedingsveiligheidsprobleem, ook al lijkt het erop dat de consument zich meer zorgen maakt om minder belangrijke zaken zoals de aanwezigheid van hulpstoffen.

De klassieke aanpak, eliminatie van micro-organismen door een forse hittebehandeling sluit echter niet aan op de vraag naar vers voedsel, evenmin als het toevoegen van conserveringsmiddelen. Daarom richt de moderne levensmiddelen-microbioloog zich niet op het doden, maar op het beperken van de groei van micro-organismen door een juiste keuze van grondstoffen, processen en opslagcondities. Trefwoorden hierbij zijn: 'predictive modelling' en snelle diagnostische tests, onderwerpen die in de bijdragen van Zwietering en Hofstra aan de orde komen, alsmede het beheersen van de temperatuur in de gehele distributieketen.

Een zeer belangrijke lange-termijntrend is de toenemende interesse van consumenten voor voeding en gezondheid. Begrippen als meervoudig onverzadigde vetzuren, cholesterol en voedingsvezel zijn al ingeburgerd, maar we staan hier nog maar aan het begin van een ontwikkeling. De industrie kan hierop inspelen door sensorisch attractieve produkten met positieve voedingsaspecten te ontwikkelen. Enkele voorbeelden zijn: halvarine, kaas waarin melkvet deels vervangen is door meervoudig onverzadigde oliën, produkten verrijkt met voedingsvezel en het toenemend gebruik van vetvervangers op eiwit- of koolhydraatbasis. Terwijl vroeger bepaalde produkteigenschappen sterk gekoppeld waren aan één vaste samenstelling, is men nu steeds beter in staat deze eigenschappen te bereiken met een brede reeks samenstellingen. Een 'missing link' voor verdere ontwikkelingen op dit terrein is een nauwe samenwerking tussen technologen en voedingskundigen. Bij het door de ministeries van Economische Zaken en Landbouw gesteunde Innovatieve Onderzoeks Programma Koolhydraten bijvoorbeeld worden (bio)technologen wel aangezet om de functionele eigenschappen van koolhydraten te bestuderen en te modificeren, maar wordt in het geheel niet gesproken over voedingskundig functionele eigenschappen. Bij andere IOP-programma's worden onder meer veranderingen van functionele eigenschappen van eiwitten bestudeerd, maar komen eveneens uitsluitend technologische eigenschappen aan de orde. Het

meenemen van voedingseigenschappen is, gelet op de interesses van de consument, van groot belang voor innovaties in de voedingsmiddelentechnologie.

In de reeks consumententrends die hier de revue passeren komen ten slotte de wensen ten aanzien van versheid, kwaliteit en variatie aan de orde. Dit zijn wensen die nu al een sterke invloed laten gelden in de voedingsmiddelentechnologie. Kernbegrippen zijn hier flexibele produktie-automatisering en intelligente procesbesturing, waarbij niet op 'primitieve' apparaatparameters wordt gestuurd, zoals roersnelheid en temperatuur in een apparaat, maar op produktparameters, zoals viscositeit en produkttemperatuur. De procestechnologie komt in de bijdragen van Verlaan en Van Leeuwen uitgebreider aan de orde.

Integrale logistiek in de voedingsmiddelenindustrie

In het tweede deel van mijn bijdrage zal ik me concentreren op de gevolgen die de wensen ten aanzien van versheid en variatie hebben voor logistiek en distributie. Ter illustratie van de sterke ontwikkeling waarin het gebied van de logistiek zich bevindt, geef ik hierbij de definitie van integrale logistiek van de Taakgroep Agrologistiek van de NRLO: 'Integrale logistiek of agrologistiek is de organisatie, planning, beheersing en besturing van de verwervings-, transport-, opslag-, verwerkings- en verpakingsactiviteiten vanaf de eerste winning van grondstoffen tot en met het leveren van de eindprodukten aan de afnemers. Ketenintegratie heeft prioriteit. De invloed van bewaar-, proces- en informatietechnologie wordt nadrukkelijk meegenomen.'

Hoewel deze definitie wel de suggestie wekt dat logistiek alles omvat – wat dat betreft doet logistiek niet onder voor andere aandachtsgebieden in opkomst – wordt goed duidelijk gemaakt dat er, om de goederenstroom naar de consument te optimaliseren, meer nodig is dan de klassieke logistiek, die zich beperkte tot transport, opslag en distributie.

Ter illustratie van de ontwikkelingen in de integrale logistiek zal ik aan de hand van voorbeelden uit de praktijk twee zaken behandelen:

- produktieplanning in de voedingsmiddelenindustrie;
- het zodanig koppelen en ontkoppelen van deelprocessen dat de consument een verser produkt krijgt.

Produktieplanning: planningstechnieken en organisatie

Bij TNO worden op het ogenblik de mogelijkheden onderzocht voor verbetering van de produktieplanning in de voedingsmiddelenindustrie. Dit onderzoek is gericht op vleeswaren, visprodukten, brood, biscuit en mengvoeders. Zo komt het hele scala van mogelijkheden in de voedingsmiddelensector aan bod: van dagverse tot lang houdbare produkten, van stabiele tot bederfelijke grondstoffen en van zeer korte tot langere levertijden.

In dit onderzoek wordt nagegaan of bestaande besturingstechnieken, zoals JIT ('Just In Time'), OPT ('Optimized Production Technology') en MRP-II

(‘Manufacturing Resources Planning’) kunnen worden toegepast in de voedingsmiddelenindustrie. Het is echter gebleken dat deze technieken, afkomstig uit de assemblage-industrie, geen bijdrage van betekenis kunnen leveren aan een betere planning in de voedingsmiddelenindustrie. Een belangrijk verschil tussen de assemblage-industrie en de voedingsmiddelenindustrie is dat de eerstgenoemde bedrijfstak (vrijwel) volledig op basis van orders kan produceren. Dit is mogelijk omdat de consument bereid is enige levertijd te accepteren voor zaken als auto’s, huishoudelijke apparaten en televisietoestellen.

In de voedingsmiddelenindustrie verwacht de consument een onmiddellijke beschikbaarheid van het produkt van zijn keuze. Productie op bestelling is dus in feite onmogelijk. Dit geldt in nog sterkere mate voor de agrarische productie.

Omdat de bestaande besturingstechnieken niet voldoen wordt binnen TNO nu, op basis van onderzoek in een aantal proefbedrijven, een besturingspakket specifiek voor de voedingsmiddelenindustrie ontwikkeld, COPT genaamd (‘Cost Optimal Production Planning Technique’). COPT is een optimalisatieprogramma waarin alle belangrijke keuzemogelijkheden voor de producent worden meegenomen. Het gaat hierbij om:

- *de produktiekosten per eenheid produkt*; deze hangen onder meer af van de lengte van de productie‘runs’: bij de start van de productie van een produkt op een bestaande produktielijn zijn er aanloopverliezen, daarna neemt de efficiency geleidelijk toe;
- *de omstelkosten* nodig voor het overgaan op een ander produkt op de bovengenoemde produktielijn;
- *de voorraadkosten* van grondstoffen en gereed produkt;
- *de personeelskosten*; deze zullen laag zijn wanneer de productieplanning zo is opgezet dat de behoefte aan menskracht steeds overeenkomt met de bezetting. In dit opzicht is het voorkómen van sterke fluctuaties in de behoefte aan menskracht van belang.

Het realiseren van COPT bleek wiskundig gezien bepaald geen sinecure te zijn. Het was nodig niet-lineaire optimalisatieprogramma’s te ontwerpen. Om de rekentijd binnen redelijke grenzen te houden, moesten vele wiskundige vondsten worden toegepast – vondsten die zijn gedaan door TNO’ers in nauwe samenspraak met wiskundigen van de Technische Universiteiten.

Het COPT-pakket wordt momenteel uitgetest in een proefbedrijf waar lang houdbare produkten worden gemaakt. Met COPT bleek een reductie mogelijk van het aantal productie‘runs’ waarmee in een aantal weken een breed productieprogramma wordt afgewerkt zonder dat er problemen van een te hoge of te lage voorraad ontstonden. Ook bleek een effectievere personeelsinzet mogelijk. Nog belangrijker wellicht was het dat COPT mogelijkheden biedt voor een veel beter samenspel tussen de productie- en de verkooporganisatie.

De verkopers kunnen nu beschikken over informatie betreffende:

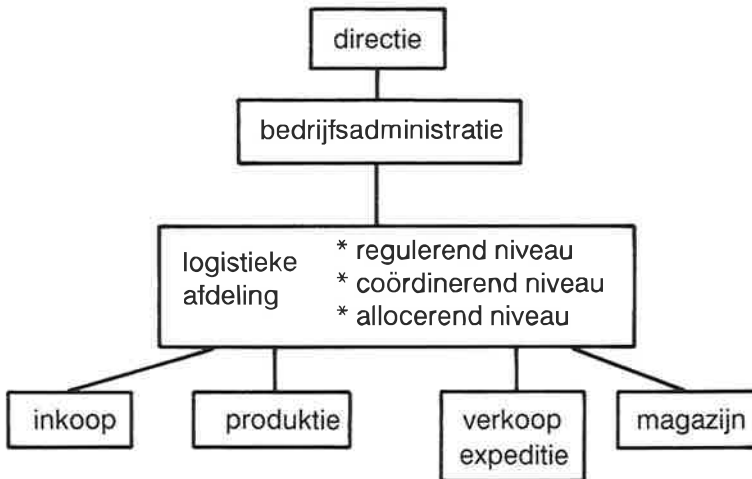
- de gewenste minimale verkoop (om veroudering van de voorraad te voorkomen);
- de maximaal te verkopen hoeveelheden zonder of na overleg met de productieafdeling;
- het spoedorderniveau dat (tegen meerkosten) kan worden geproduceerd.

Wat naar voren is gekomen bij de toepassing van COPT in de praktijk is dat het pakket niet te mooi en daardoor te duur en te klantvriendelijk moet worden gemaakt. De branchekennis binnen TNO blijkt hard nodig te zijn om pure wiskundigen tot een verstandige beperking te bewegen.

Bij het onderzoek kwam ook naar voren dat de organisatiestructuur van veel bedrijven nog niet is ingesteld op het optimaliseren van de logistiek. Veel productiebedrijven kennen een platte structuur: een directie, ondersteund door een bedrijfsadministratie en een financiële administratie en verder afdelingen voor inkoop, productie, verkoop en expeditie en een magazijn.

Wil een bedrijf logistiek gezien optimaal presteren, dan zal er een algemene logistieke afdeling moeten komen, allereerst omdat de logistiek betrekking heeft op alle bovengenoemde afdelingen, en voorts om tot een goed samenspel te komen met de afnemers, die vaak al over een logistieke afdeling beschikken. Zoals wordt aangegeven in figuur 2 zal deze logistieke afdeling dienen te opereren op een drietal niveaus:

- het regulerende niveau, vooral van belang voor de integrale logistieke keten (onder andere voor lange-termijnafspraken en voor afspraken met toeleveranciers) en het lange-termijnproductie- en investeringsplan;
- het coördinerende niveau, voor de structurering van de logistieke informatie-uitwisseling met en tussen de verschillende afdelingen;
- het allocerende niveau, voor een optimale operationele productieplanning binnen de door de bovenliggende systemen beperkte speelruimte.



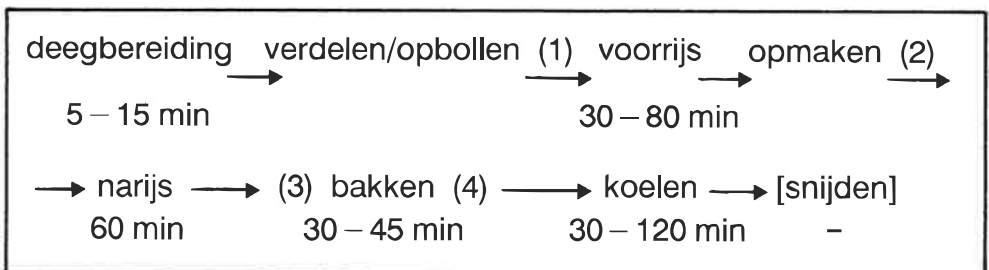
Figuur 2. Voor optimaal logistiek presteren moet een algemeen logistieke afdeling in de organisatie worden opgenomen.

Optimalisatie van de integrale logistiek in de bakkerijsector

Bij lang houdbare producten is het van belang een optimum te vinden tussen de lengte van de produktieruns en de voorraad van de diverse eindprodukten. Speciaal als het gaat om gecompliceerde productieprocessen met een lange aanloopperiode voordat een lijn optimaal draait, ligt een nationale of internationale taakverdeling voor de hand. In de biscuitsector komt het al voor dat de gehele productie van een produkt voor Europa wordt gemaakt op één of twee produktielijnen.

Bij kort houdbare producten, zoals brood, ligt dit niet voor de hand. Bij de broodbereiding duurt het produktieproces ongeveer vier uur (zie figuur 2), en wanneer een groot assortiment aan een supermarkt moet worden geleverd, wordt de 'lead time' (de tijd tussen bestellen en afleveren) al gauw acht uur. Niet zozeer de optimalisatie van transport en distributie als wel de proces- en bewaarstechnologie kunnen een bijdrage leveren aan het verkorten van de 'lead time'. Dit kan gebeuren door de rustpunten, de ontkoppelpunten in het bereidingsproces, niet te leggen vóór de deegbereiding, maar tussen de verschillende fasen van het bereidingsproces. In de loop der tijd zijn de volgende mogelijkheden ontwikkeld (zie ook figuur 2).

1. De rijsonderbreking, die vooral door bakkers zelf wordt toegepast om een stuk arbeid en behandeling te verplaatsen van de nacht of vroege ochtend naar de dag ervoor.
2. Het al bijna klassieke 'bake-off', hier 'bake-off-1' genoemd. In steeds meer supermarkten en andere verkooppunten worden 'bake-off'-bakkerijen neergezet. Deze vragen een kleine ruimte en lage investeringen en geven een verkorting van de 'lead time' en ter plekke gebakken vers brood. Een probleem is vaak dat de kwaliteit van dit brood minder is dan die van brood bereid op de klassieke manier.
3. De derde ontwikkeling – 'bake-off-2' – is zeer nieuw. In principe is het zeer aantrekkelijk om volledig gerezen brood in te vriezen, daarna te vervoeren naar de supermarkt en daar af te bakken. Tot voor kort was echter de kwaliteit



Figuur 3. Broodbereiding: 'unit operations' en mogelijke koppelingen.

- (1) rijsonderbreking 0°C gekoeld deeg
- (2) 'bake-off-1' -20°C diepvriesdeeg
- (3) 'bake-off-2' -20°C volgerezen diepvriesdeeg
- (4) 'brown and serve' 20°C voorgebakken brood

van het brood onacceptabel. In opdracht van en in samenwerking met Albert Heijn is TNO-Voeding erin geslaagd na invriezen van gerezen deeg toch een goed brood te krijgen. Sinds een jaar produceert Albro, de bakkerij van Albert Heijn, volgerezen diepvriesdegen voor de AH-supermarkten. Dit geeft een sterke verkorting van de 'lead time'.

4. De vierde mogelijke ont koppeling is het heel licht voorbakken van brood om het later, thuis of in de winkel, af te bakken.

Uit het hierboven gegeven voorbeeld blijkt dat logistiek in combinatie met proces- en bewaar technologie voor nieuwe oplossingen kan zorgen.

Gevolgen van integrale logistiek voor de voedingsmiddelenindustrie

Met de integrale benadering van de logistiek is hier en daar al een begin gemaakt. In de nabije toekomst zal integraal logistiek denken nog veel grotere consequenties hebben voor de voedingsmiddelenindustrie. Hierbij is een optimale afstemming tussen producenten en afnemers op strategisch en operationeel niveau van groot belang. Het gaat hierbij om het verbeteren en versnellen van de informatiestromen en het afstemmen van investeringen. Bij het verkorten van bestelprocedures en levertijden moet de afnemer ervan op aan kunnen dat de gevraagde kwaliteit wordt geleverd, terwijl de leverancier mag verwachten dat de afnemer het geleverde produkt onder de voorgeschreven condities transporteert en bewaart. Dit houdt in dat goede en goed op elkaar afgestemde systemen van kwaliteitsborging een noodzaak worden voor de voedingsmiddelenindustrie. De noodzaak van kwaliteitsborging wordt nog dringender als gevolg van de verdere integratie in Europa.

De informatietechnologie zal bij dit alles een grote rol spelen. De voedingsmiddelenindustrie zal hierbij vaak, maar niet altijd, profijt kunnen hebben van ontwikkelingen in andere sectoren. Ook de ontwikkelingen in de proces- en bewaar technologie kunnen een bijdrage leveren aan de optimalisering van de goederenstroom. Deze ontwikkelingen zijn echter veel meer bedrijfstakgebonden dan die van de informatietechnologie.

De logistiek, begonnen op het terrein van transport en distributie, laat zijn invloed steeds sterker gelden in de produktie en zelfs in onderzoek en ontwikkeling (R & D). Voor de voedingsmiddelenindustrie betekent dit alles dat logistiek denken integraal deel moet gaan uitmaken van het denken en doen van de organisatie. Gezien de wegvallende grenzen in Europa hoort bij deze denkwijze ook bezinning op de positie in Europa en op de mogelijkheden van samenwerking, taakverdeling en specialisatie.

De visverwerkingsketen van de jaren negentig

P.M. van Leeuwen

TNO-Voeding

Inleiding

De weg die loopt van de vangst van een vis tot de consumptie van het visserijprodukt, de visverwerkingsketen, is een lange en zeker niet geplaveide weg. Het begint al met het jachtkarakter van de verwerving, die ook nog eens op flinke afstand moet worden bedreven. Aangezien het niet de moeite loont met de eerste vangst direct huiswaarts te keren, is men met het vol krijgen van het schip enige dagen in de weer (en wind!). Daarbij moet de heenreis en de terugreis worden opgeteld.

Voor schepen met zeer grote opslagcapaciteit is het al gauw niet meer mogelijk de vangst vers aan te voeren. Daarom wordt meestal uitgeweken naar diepgevroren opslag. De meeste trawlers met een opslagcapaciteit van 1000 ton zijn al gauw drie weken onderweg. Kotters met een opslagcapaciteit van 100 ton zijn er wél op ingericht de vangst vers aan te voeren. De daarvoor benodigde tijd is ongeveer 5 dagen. Zowel bij kotters als trawlers kan dit traject aardig uitlopen als de vangsten tegenvallen of als er grote afstanden moeten worden afgelegd.

De schepen die verse vis aanvoeren (kotters) zien zich genoodzaakt een compromis te sluiten tussen kwaliteit en kwantiteit, hetgeen vaak ten gunste van de kwantiteit wordt beslecht. Ook bij de schepen die diepgevroren produkt aanvoeren speelt de keuze tussen kwaliteit en kwantiteit een rol (met hetzelfde resultaat), zij het dat hier niet zozeer de tijd die op zee wordt doorgebracht een rol speelt als wel de tijd die nodig is om de soms enorme vangsten (tot 400 ton) binnen redelijke tijd te verwerken.

Nadat de vis is aangeland vindt voor een groot deel verwerking in de industrie plaats of wordt direct geëxporteerd. Die industrie ziet zich voor zijn verse vis genoodzaakt voor de hele week in te kopen. Dit komt doordat de vissersschepen de verse vis vrijwel uitsluitend op vrijdag aanlanden. Aangezien er geen systemen zijn om de eerst gevangen vis ook het eerst te verwerken kan het voorkomen dat vis uiteindelijk zo'n tien dagen oud is als hij (vers) door de industrie wordt verwerkt.

De vis die in diepvries wordt aangevoerd kent vergelijkbare problemen. Er is ook hier geen inzicht in het verwerkingstijdstip van de vis na de vangst. Het kan zijn dat de aangekochte partij bestaat uit vis die enkele uren na de vangst is verwerkt, maar ook dat de vis enkele dagen aan dek heeft gelegen dan wel dat men een mengsel ontvangt dat varieert in versheid.

Omdat bepaalde soorten vis (bijvoorbeeld maatjesharing) niet het hele jaar door kunnen worden gevangen, is de industrie voor dit diepvriesprodukt afhankelijk van opgeslagen voorraden. Uitdroging en oxydatie kunnen de kwaliteit aanmerkelijk verminderen tijdens een maandenlange opslag.

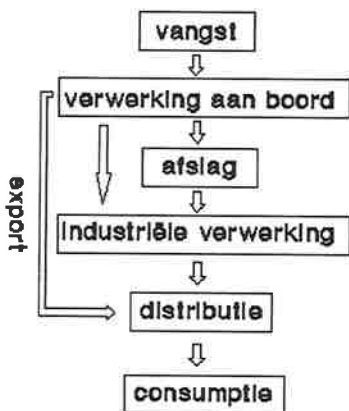
Naast bovengenoemde 'hobbels' in de visverwerkingsketen speelt ook nog de grote gevoeligheid voor bederf een rol. Ten eerste is vis rijk aan stikstof en zwavel, waardoor bederf al snel gepaard gaat met de vorming van onaangename aromastoffen. Ten tweede is de Nederlandse vloot is aangewezen op de vangst van vis uit koud water (4 – 18 °C), waardoor de van nature aanwezige microflora psychrofiel van karakter is en dus aangepast aan lage opslag- en verwerkingstemperaturen.

De automatiseringsgraad is laag, waardoor de toegevoegde waarde in de visverwerkende industrie één van de laagste is in de Nederlandse (voedingsmiddelen)industrie. Er wordt veel gewerkt met prestatieloon en het werk is zwaar en geestdodend, waardoor het moeilijk is voldoende geschikte arbeidskrachten te verwerven.

Om toch concurrerend te kunnen werken besteedde de garnalenverwerkende industrie het pellen uit aan particulieren. Door de overheid is daar per 1 juli 1990 een einde aan gemaakt. Hierdoor is de ontwikkeling van pelmachines in een stroomversnelling geraakt. Veel garnalen worden nu echter in het buitenland gepeld, buiten de controle van de overheid.

Als gevolg van de quoteringsmaatregelen (verscherping van de controle op naleving is zeer actueel!) is de vraag naar vis groter dan het aanbod. De aanvoerders en de overheid zijn hierop nog niet ingespeeld, zodat aan het eind van het jaar de aanvoer stagneert en de industrie niet meer kan produceren.

Een ander groot probleem, waarmee met name kottereigenaren worden geconfronteerd, is de gebrekkige selectiviteit van de vangstmethoden. Dit houdt in dat zij in hun vangst een mengeling van vissoorten aantreffen. Wanneer nu hun



Figuur 1. De visverwerkingsketen.

quotum voor tong of kabeljauw vol is, zijn zij genoodzaakt dit (dure) produkt overboord te zetten. Hiertegen zijn begrijpelijkerwijs economische bezwaren, ook omdat het nog maar de vraag is of de overboord gezette vis deze behandeling overleeft.

Teneinde de hierboven genoemde 'hobbels' in de jaren negentig te kunnen vereffenen is veel inspanning en vooral samenwerking nodig. Overheid, aanvoerders, verwerkers en handel zullen in een goede onderlinge verstandhouding de problemen moeten onderkennen en oplossingen moeten realiseren. Hieraan kan het IVP, de in deze problematiek gespecialiseerde afdeling van TNO-Voeding in IJmuiden, in belangrijke mate bijdragen.

De verwerkingsketen (figuur 1)

De schepen

Kotters

Aantal: ca. 700

Lengte: tot ca. 40 meter

Vermogen: tot ca. 1500 kW

Aanvoer: verse vis

Reisduur: ca. 5 dagen.

De aangevoerde vis bestaat voornamelijk uit platvis (schol, tong, schar, griet, bot, enz.). Als bijvangst wordt voornamelijk kabeljauw aangevoerd. De grootte van de vangst varieert sterk, maar ligt gemiddeld rond de 250 kg per trek.

De verse vis wordt op soort gescheiden, gestript en gewassen en van ijs voorzien, waarna ze in viskisten van 60 liter wordt opgeslagen in het koelruim. Op de veiling wordt de vis (schol en tong) per soort op lengte gesorteerd en in viskisten in porties van 40 kg afgewogen. De hele vangst wordt per afslag verkocht.

Sommige kotters vissen op haring en horsmakreel. Hierop kan wel selectief worden gevestigd, en de vangstgrootten liggen tientallen malen hoger dan bij de platvisvangst. De vis wordt meestal buiten de afslag om via contracten aan afnemers geleverd.

Een honderdtal kleinere kotters zijn ingericht op de vangst van garnalen. De garnalen worden aan boord gekookt. Verhandeling vindt plaats via de veiling.

De gemiddelde prijs van de platvis, de bijvangst en de garnalen die met kotters wordt aangevoerd, ligt ongeveer op fl. 3,50 per kilo. De opbrengsten van haring en horsmakreel liggen aanmerkelijk lager.

De verwerking vindt plaats in industrie en handel.

Trawlers

Aantal: ca. 15

Lengte: tot ca. 100 meter

Vermogen: tot ca. 8000 kW

Aanvoer: diepvries.

Reisduur: ca. 3 weken.

De aangevoerde vis bestaat voornamelijk uit pelagische vis, die zeer selectief kan worden gevangen omdat ze leven in scholen. De vangstgrootten liggen meestal tussen de 50 en 200 ton per trek. Hierdoor is het noodzakelijk de vis te bufferen alvorens ze te kunnen invriezen. De buffertijd kan oplopen tot enkele dagen.

De gevangen vissoorten zijn kuit- en maatjesharing, makreel, horsmakreel en blauwe wijting. De vangsten worden door de reders zelf verwerkt dan wel doorverkocht.

De gemiddelde prijs bedraagt ongeveer fl. 0,85 per kilo.

De vis wordt industrieel verwerkt of direct geëxporteerd.

Industriële verwerking

De belangrijkste industrieën zijn:

- de platvisfileerderijen
- de rondvisfileerderijen
- de haringverwerkende industrie
- de rokerijen
- de diepvriesbedrijven
- de makreelverwerkende industrie
- de schaal- en schelpdierverwerkende industrie
- de garnalenverwerkende industrie.

Veel bedrijven huisvesten diverse industriële activiteiten. Veel voorkomende combinaties zijn fileren met diepvriezen, en haringverwerking met rokerij en makreelverwerking.

De platvisfileerderijen

Hier wordt voornamelijk schol verwerkt. Het fileren gebeurt handmatig, terwijl het machinaal onthuiden in toenemende mate in zwang komt. De geproduceerde filets worden voor een gedeelte, batchgewijze, behandeld met fosfaat om de houdbaarheid te vergroten. 70 à 80 % van de geproduceerde filets wordt ingevroren (zie 'De diepvriesbedrijven').

Er bestaat behoefte aan automatisering van het fileren. De thans beschikbare apparatuur hiervoor kan echter nog niet concurreren met het handmatige proces.

Ongeveer 90 % van de geproduceerde schol wordt geëxporteerd.

Diepvriesbedrijven

Deze zijn vaak gecombineerd met fileerderijen. Hier worden scholfilets ingevroren op bandvriezers en voorzien van een laagje ijs (geglaceerd) om het produkt tegen uitdroging te beschermen. Tevens vindt sortering op gewicht plaats. Van de scholfilets wordt ca. 10 % diepgevroren gepaneerd. De bandvriezers worden ook veel gebruikt om gedeeltelijk bewerkte vis in te vriezen (gestripte tong, ontkopte zeewolf).

Vriesruimten worden gebruikt voor het invriezen van verpakt produkt, zoals maatjesharing in emmers, en de opslag van diepgevroren produkten.

In vriestunnels (lucht of cryogeen) worden mosselen, kokkels, maatjesharing en garnalen ingevroren.

Haringverwerking

Een groot gedeelte van de haring wordt gemarineerd. Met behulp van azijn en zout worden produkten als zure haring, rolmops en braadharing gemaakt. Met name in het seizoen (medio mei tot augustus) wordt haring gevangen die geschikt is voor de produktie van maatjesharing. Uit diepgevroren haring die in die periode op zee is gevangen, wordt ook buiten het seizoen op beperkte schaal maatjesharing geproduceerd. De haring wordt in emmers diepgevroren of gefileerd verhandeld.

Wanneer de haring kuit vormt is zij op een zeker tijdstip geschikt voor de produktie van haringkuit. De kuit wordt gezouten en naar Japan geëxporteerd. Haringfilets in olie is een 'maatjesharing'-achtig produkt dat vooral naar Duitsland wordt geëxporteerd. De produktie hiervan vindt op beperkte schaal in Nederland plaats.

Steurharing is een traditioneel produkt, dat zijn houdbaarheid dankt aan een grote hoeveelheid zout. Het produkt is een halffabrikaat en wordt, na terugweken van een deel van het zout, verder verwerkt tot gerookte produkten. Het belang van dit produkt neemt sterk af door de beschikbaarheid van andere conserverings-technieken.

Haring wordt nog voor een klein deel ook verwerkt tot blikconserven.

Het fileerproces van haring is goed geautomatiseerd. Het verpakken van zure haring en de produktie van rolmops is een handmatig proces. De industrie zou gebaat zijn bij automatisering van deze processen. Ook haringkuit wordt handmatig geproduceerd. De waarde van de kuit loopt drastisch terug wanneer ze is beschadigd. Hierdoor mag het proces arbeidsintensief zijn. Aangezien de vraag de laatste 5 jaar sterk is gegroeid komt ook dit produktieproces in aanmerking voor automatisering.

Bij het fileren van haring resteert ca. 60 % van de vis, die voornamelijk voor de vismeelindustrie is bestemd. De voedingswaarde is hoog, maar de fileerresten hebben een zeer geringe handelswaarde, waardoor er weinig aandacht aan opslag wordt besteed. Valorisatie van de fileerresten is dringend gewenst.

Bij de zure-haringproduktie komt veel overtollig azijn en zout vrij, dat in het riool wordt geloosd en tot zware milieuheffingen leidt. Hergebruik zou gewenst zijn.

Veel haringverwerkende bedrijven zijn ook voorzien van een rokerij (zie ook 'Rokerijen').

Rokerijen

De belangrijkste produkten die worden gerookt zijn makreel, haring, paling, zalm en forel.

Makreel wordt (gestript of gefileerd) gestoomd. Stomen wordt ook wel 'heetroken' genoemd. Het produkt dankt zijn houdbaarheid voornamelijk aan pasteurisatie. Zwaar gezouten gestripte makreel wordt ook wel gerookt bij temperaturen onder de 30 °C, het zogenaamde 'koudroken'. De houdbaarheid van koudgerookte produkten wordt verkregen door zout en een verlaagd vochtgehalte.

Gestripte haring wordt koudgerookt tot bokking. Filets van haring worden koudgerookt tot brado's en kippers.

Paling, zalm en forel worden gerookt tot produkten met een hoog kwaliteits-
imago. Het gebruik van gekweekte vis is het afgelopen decennium sterk toegenomen.

De voorbereidingen zijn niet geautomatiseerd, de nabewerkingen – zoals snijden, afwegen en verpakken – in geringe mate, en de rookprocessen zijn voor een groot gedeelte geautomatiseerd.

Aangezien de rokerijen zich veelal in druk bevolkte gebieden bevinden worden ze nogal eens als 'overlast' ervaren.

Garnalenverwerking

Garnalen worden aan boord gekookt en (gekoeld) opgeslagen. Na aanlanding worden ze op de veiling voorzien van (relatief) veel conserveringsmiddel (ca. 1%). In EG-verband wordt voorgesteld deze grens te verlagen tot 0,3%. Dit zal zonder verdere maatregelen de houdbaarheid drastisch verkorten.

Het pellen van garnalen is een zeer arbeidsintensief proces. In het afgelopen decennium werd het pellen voornamelijk als thuiswerk uitgevoerd. Hierdoor ontstonden problemen met de kwaliteit, voornamelijk als gevolg van onvoldoende hygiëne. De overheid heeft op 1 juli 1990 een einde gemaakt aan het thuispellen. Hieraan ging een periode vooraf waarin de productie van pelmachines werd gestimuleerd. Deze machines zijn nu in groten getale geïnstalleerd. Veel garnalen worden echter (handmatig) in het buitenland gepeld. De komende jaren zal het economisch rendement van het machinaal pellen zich moeten bewijzen.

Na het pellen worden de garnalen verpakt en vers dan wel ingevroren verhandeld. Een belangrijk deel wordt geëxporteerd.

De houdbaarheid van de garnaal is steeds een bron van zorg geweest. Of het thuispelveverbod een kentering hierin tweek zal brengen zal binnen afzienbare tijd moeten blijken.

Schelpdierverwerking

De belangrijkste schelpdieren zijn mosselen en kokkels. Mosselen worden in het vangstseizoen (augustus tot februari) vers verpakt of tot half- of volconserven verwerkt. Kokkels worden voornamelijk in blik als volconserven geëxporteerd. De processen zijn voor een groot gedeelte geautomatiseerd.

De belangrijkste problemen waarmee deze industrie wordt geconfronteerd is de beschikbaarheid van grondstof, de verwijdering van zand uit de magen en het seizoenmatige karakter.

Handel

Op kleine en semi-industriële schaal wordt vis verwerkt tot verse visprodukten voor dagelijkse consumptie. De belangrijkste vissoorten hierbij zijn tong, kabeljauw en de (andere) bijvangsten, zoals wijting, schelvis, schar en poon.

In talloze bedrijfjes wordt de vis na inkoop op de veiling of als halffabriek van de industrie verder verwerkt. De verwerking bestaat vooral uit fileren en verpakken.

Bij dit onderwerp wordt nu niet stilgestaan omdat op dit terrein in de jaren negentig geen grote veranderingen mogen worden verwacht.

Distributie

Hierbij kan onderscheid worden gemaakt tussen export en binnenland.

De belangrijkste producten die worden geëxporteerd zijn:

- diepgevroren (gefileerde) schol
- gerookte haring
- zoute haringfilets (in olie)
- diepgevroren (hele) makreel
- diepgevroren (hele) horsmakreel
- diepgevroren (hele) haring
- ingeblikt en diepgevroren schelpdiervlees
- verse en diepgevroren garnalen
- ingeblikte haring en makreel
- steurharing
- maatjesharing
- haringkuit
- vers schelpdiervlees.

De binnenlandse markt bestaat voornamelijk uit:

- verse vis en visprodukten (ook garnalen en mosselen)
- zoute haring ('maatjes')
- gerookte makreel en haringprodukten
- verse produkten voor visbakkers (wijting, kabeljauw, schol, haringkuit en tong)
- gerookte forel, zalm en paling.

Verkoop

Voor wat betreft de verkooppunten mag worden geconstateerd dat onderbreking van de koelketen vaak de oorzaak is van versneld bederf. De vitrines vanwaaruit de visprodukten worden verkocht, hebben als doel het produkt zo lang mogelijk vers te houden. Hiervoor zijn beheersing van relatieve vochtigheid en temperatuur essentieel. In de praktijk blijken vitrines nog voor verbetering vatbaar.

Trends voor de jaren negentig

Naar aanleiding van het bovenstaande kunnen volgende uitdagingen voor de jaren negentig worden geselecteerd:

- verbetering van de kwaliteit
- betere benutting van de beschikbare hoeveelheid vis
- betere benutting van de fileerresten
- betere beheersing van de afvalstromen
- vergroting van de toegevoegde waarde
- vergroting van de beschikbare hoeveelheid vis.

Tevens zal, in het kader van een verenigd Europa, de vissector vanaf 1992 worden geconfronteerd met een aantal veranderingen.

Verbeteren van de kwaliteit

De kwaliteit van de aangevoerde vis kan aanzienlijk worden verbeterd door een snellere verwerking, optimale hygiënische omstandigheden en een snelle en afdoende inkoeling aan boord van schepen. Hiervoor moeten de vangstgrootten bij trawlers goed kunnen worden aangegeven en moet een goede discipline van de bemanning worden betracht omdat het onaantrekkelijk is een deel van de vangst te laten schieten.

Voor het gedeelte van de vangst dat niet binnen enkele uren kan worden ingevroren, dient een snel en efficiënt koelsysteem te worden gebruikt.

Tijdens de verwerking moet, zowel voor diepvries als voor verse vis, worden aangegeven op welk tijdstip de vis is verwerkt. De aangevoerde verse vis die het eerst is gevangen, kan dan ook het eerst verder worden verwerkt. Van de op zee ingevroren vis kan dan worden achterhaald hoe snel ze is verwerkt, hetgeen van belang is voor de verdere verwerking.

Op de veiling wordt de vis uit de viskisten gehaald, gesorteerd op lengte en afgewogen. Totdat het produkt is geveild is het niet meer van ijs voorzien, waardoor de temperatuur aanzienlijk kan oplopen. Er moet naar worden gestreefd de vis al op de kotters op lengte te sorteren en te wegen. Op de veiling is dan alleen nog afslag nodig en kan de vis gekoeld blijven.

Ook omdat de werkzaamheden aan boord zwaar en vaak gevaarlijk zijn, is het gewenst het proces aan boord in verregaande mate te automatiseren. Hierbij wordt gedacht aan een continu systeem van strippen, wassen, sorteren, wegen, beijzen en verpakken.

In de verwerkende industrie kan de kwaliteit van het eindprodukt worden verbeterd als men weet hoe lang de vis al op ijs is bewaard of hoe snel deze is ingevroren en als men daar op de juiste manier gebruik van maakt.

Andere belangrijke kwaliteitsaspecten zijn de fileerfouten in de vorm van graten en huidresten. Het is zeer arbeidsintensief deze fouten weg te nemen. Met behulp van beeldanalyse kunnen fileerfouten in de toekomst geautomatiseerd worden geëlimineerd.

In verband met de per definitie bederfelijke aard van vis is verbetering van de houdbaarheid van belang. Verpakking, koelketen en hygiëne verdienen meer aandacht.

Samenvattend kan worden gesteld dat invoering van kwaliteitssystemen en kwaliteitsborging hoge prioriteit verdienen.

Betere benutting van de beschikbare hoeveelheid vis

Als gevolg van de quoteringsmaatregelen is er een tekort aan bepaalde soorten vis. Tijdens de vangst wordt (voornamelijk door kotters) veel vis gevangen die men niet

(meer) mag aanvoeren. Tevens wordt door de schaarste steeds meer kleine vis aangevoerd.

Door selectief te vissen kan men de schaarse vissoorten sparen en de kleinere vissen laten groeien. Hiervoor is discipline nodig. Vissers weten vaak goed waar ze de vis die ze mogen aanvoeren moeten zoeken. Tevens kan door ontwikkeling van verbeterde vistuigen de selectiviteit (vissoort en grootte) worden verhoogd.

In de jaren negentig zullen steeds meer rederijen hun vriestrawlers naar nieuwe vangstgebieden sturen. Voorbeelden hiervan zijn de wateren rond de Falklands en bij Tunesië.

Diverse niet gequoteerde vissoorten worden niet of nauwelijks gebruikt voor menselijke consumptie. Onderzocht dient te worden hoe deze vissoorten tot hoogwaardige produkten kunnen worden verwerkt.

Betere benutting van fileerresten

De fileerresten van vis zijn rijk aan eiwit, kalk en fosfor. Zoals reeds werd vermeld blijft het gebruik voornamelijk beperkt tot de produktie van vismeel van matige kwaliteit. De aandacht die aan de fileerresten wordt besteedt, is minimaal omdat voor goede kwaliteit niet of nauwelijks meer wordt betaald.

Intensief zal moeten worden gespeurd naar mogelijkheden de fileerresten te verwerken tot produkten voor menselijke consumptie of tot hoogwaardige diervoeders.

Betere beheersing afvalstromen

De afvalstromen bestaan voornamelijk uit proceswater met, daarin opgelost, moeilijk af te scheiden eiwit, zout en azijnzuur. Ook rookuitstoot vormt een probleem.

Gebleken is dat lozing van de afvalstromen in verband met de kosten daarvan een steeds nijpender probleem wordt. Beheersing van de afvalstromen zal dan ook een belangrijk thema zijn voor de visverwerkers van de jaren negentig.

Hergebruik van stoffen als zout en azijn, vermindering en hergebruik van water en de ontwikkeling van rookprocessen met minder rook zijn belangrijke onderzoeksgebieden.

Vergroting van de toegevoegde waarde

De visverwerkende industrie en de visserij hebben een toegevoegde waarde per werknemer die ca. 40%, respectievelijk ca. 20 % lager liggen dan het gemiddelde in de voedings- en genotmiddelenindustrie (gegevens van 1988). Een belangrijke oorzaak hiervan is de vele handarbeid die in deze takken van industrie wordt verricht.

Verhoging van de produktiviteit is noodzakelijk. Een hogere automatiseringsgraad is een mogelijkheid om de produktiviteit te verhogen. In de jaren negentig komen met name het fileren, het verpakken van zure haring, de produktie van rolmops, het schoonmaken van haring en de verwerking aan boord in aanmerking

voor (verdere) automatisering. Tevens dienen productieprocessen gestroomlijnd te worden. Met name de fileerderijen die zijn gecombineerd met diepvriesverwerking, kunnen veel handarbeid besparen door het fileren, onthuiden, fosfateren, invriezen, sorteren en verpakken als continuproces uit te voeren.

Verhoging van de opbrengst als gevolg van produktinnovatie is ook een mogelijkheid om de toegevoegde waarde te verhogen. Produktinnovatie kan worden gerealiseerd door produkt- en procesontwikkeling. Het produktenpakket in de visverwerkende industrie is grotendeels verouderd. In de jaren negentig zal de industrie moeten investeren in produktontwikkeling. Vissoorten die niet zijn gequoteerd moeten hierbij een belangrijke rol spelen.

Tevens mag verwacht worden dat kwaliteitsverbetering waardeverhogend zal werken.

Vergroten van de beschikbare hoeveelheid vis.

De hoeveelheid beschikbare vis, met name kabeljauw, tong en schol, kan worden vergroot door op zee gebieden in te richten waar deze vissoorten onder strikte regels worden gekweekt. Ook het beheer van de oogst (vangst) van bepaalde gebieden zal kunnen worden toegewezen aan kottereigenaren.

Verenigd Europa 1992

De vissector zal worden geconfronteerd met een aantal veranderingen die het gevolg zijn van de harmonisering van eisen waaraan de visverwerkende bedrijven en hun produkten moeten voldoen. Voor alle visverwerkende bedrijven gaan uniforme eisen gelden voor produktie op zee, behandeling aan de wal, opslaghygiëne, inrichting, verpakking, etikettering, vervoer en distributie. Ook zullen er eisen worden gesteld die zijn gericht op de terugdringing van de verspreiding van viszieken.

Graan(bio)chemie en haar rol in de graan- en meelverwerkende industrie

R.J. Hamer

TNO-Voeding

Inleiding

Sinds mensenheugenis wordt er al tarwe geteeld en verwerkt tot bloem en meel. En natuurlijk wordt er ook al eeuwen brood gebakken. In dat kader zou je kunnen vragen wat er nog te doen is voor de moderne wetenschap op een terrein waarop al zoveel vakmanschap is ontwikkeld. Misschien kan het gemakkelijkst een antwoord op die vraag worden gegeven door eens te kijken op welke wijze één van de takken van die wetenschap, de (bio)chemie, in de afgelopen jaren een bijdrage heeft geleverd aan de graanverwerkende industrie. Op basis daarvan kan dan wellicht ook een indruk verkregen worden van het belang van de biochemie bij toekomstige ontwikkelingen in deze industrie. Bij deze analyse van de rol van de (bio)chemie zal gebruik worden gemaakt van voorbeelden uit het tarweonderzoek zoals dat in de afgelopen jaren binnen TNO-Voeding is uitgevoerd.

Onderzoeksterreinen

Over het algemeen zou je kunnen zeggen dat er twee terreinen zijn waarmee de graanchemie zich bezighoudt:

- het karakteriseren van de grondstof (korrels, bloem/meel);
- het leggen van relaties tussen grondstofeigenschappen en verwerkings- en produktkwaliteit.

De ontwikkelingen op deze beide gebieden worden in grote mate gestuurd door technische ontwikkelingen. Op het gebied van de analytische en biochemische technieken is in de afgelopen jaren sterke vooruitgang geboekt. Met de moleculaire biologie is zelfs een geheel nieuwe onderzoeksrichting tot ontwikkeling gekomen. Nieuwe methoden worden in de regel het eerst toegepast om de grondstof beter te karakteriseren.

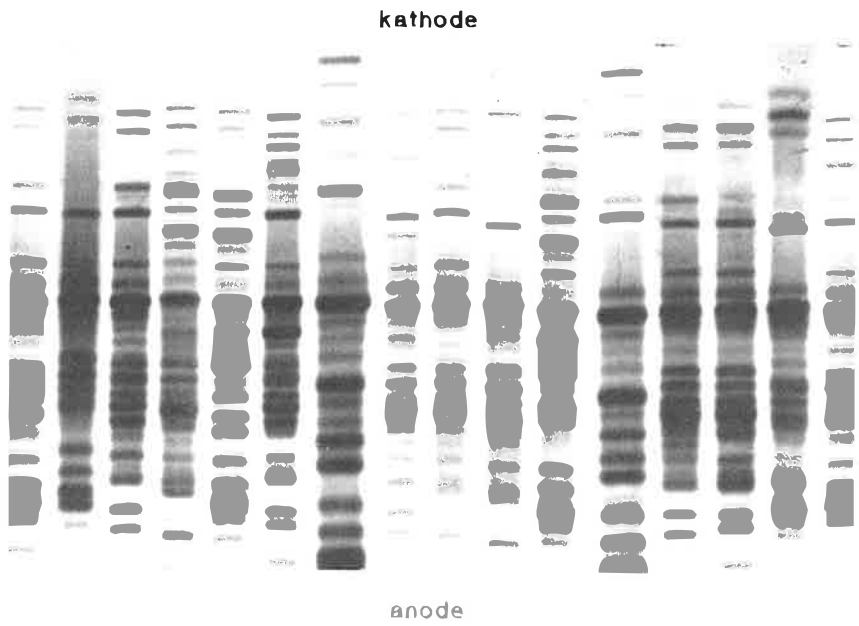
Het karakteriseren van de grondstof

Het is voor een gebruiker van tarwe van groot belang zijn grondstof te kennen. Dat geldt met name voor een zo aan verandering onderhevige grondstof als tarwe. Invloeden van ras, bemesting en oogstcondities spelen daarbij een zodanig grote rol

dat de industrie zich na elke oogst opnieuw moet instellen op de kwaliteit van de verschillende beschikbaar gekomen tarwes. Daarbij komt dat er duidelijk sprake is van een wereldmarkt. Het aantal mogelijke tarwes waaruit kan worden geselecteerd is dan ook groot. Eén van de belangrijkste selectiecriteria is het ras. Veel kwaliteitseigenschappen worden genetisch overgedragen en zijn derhalve raseigenschappen. Het is dan ook van groot belang van elk monster bloem of tarwe het ras te kunnen vaststellen. Nu kan de ervaren graandeskundige al aardig aan het uiterlijk van de korrel zien met welk ras hij te maken heeft, maar zijn kennis is van geen waarde meer zodra de korrels vermalen zijn. Het is op dit gebied dat de graanbiochemie zijn eerste sporen heeft verdiend. Elektroforetische technieken waarmee de in het meel aanwezige eiwitten zichtbaar konden worden gemaakt, bleken dermate complexe en karakteristieke patronen op te leveren dat hiermee een methode was ontstaan om een ras eenduidig te identificeren. In eerste instantie ging het hier om elektroforese van korrelextracten op een gel van zetmeel (figuur 1A). Deze lastige techniek is tegenwoordig geheel vervangen door de elektroforese op polyacrylamide-gels, waardoor een beter resultaat wordt verkregen (figuur 1B). Hiermee wordt een gedeelte van de tarwe-eiwitten als ingewikkelde patronen van bandjes zichtbaar. Door patronen van verschillende bekende rassen te vergelijken met het patroon van het te onderzoeken monster kan de identiteit van het monster worden vastgesteld. Deze techniek wordt regelmatig toegepast om rasechtheid vast te stellen en vragen met betrekking tot de herkomst van partijen tarwe op te lossen. Een recentere techniek is 'reversed phase' hoge-drukvlloeistofchromatografie (HPLC, figuur 2). In combinatie met moderne gegevensverwerkingstechnieken kan deze techniek worden gebruikt om niet alleen individuele rassen te identificeren, maar ook de samenstelling van niet al te complexe mengsels op te helderen. Zeer recent zijn ontwikkelingen rond FPLC-technieken, die wellicht in veel kortere tijd dezelfde resultaten kunnen opleveren als HPLC. DNA-hybridisatietechnieken zoals de RFLP-analyse ('restriction fragment length polymorphism') behoren weliswaar ook tot de mogelijkheden, maar lijken vooralsnog minder breed toepasbaar.

Naast het ras spelen teelt -en oogstcondities een belangrijke rol bij het ontstaan van de uiteindelijke kwaliteit van de tarwe. Samenstelling van de bodem, bemestingsregime en klimaat hebben elk hun invloed op de opbrengst per hectare, het eiwitgehalte, maar ook de samenstelling van de korrel. In figuur 3 wordt een voorbeeld gegeven van het effect van stikstofbemesting op het HPLC-eiwitpatroon. Uit de figuur blijkt dat er onder invloed van stikstofbemesting binnen één ras niet alleen verschillen optreden in hoeveelheid eiwit, maar ook in samenstelling van dit eiwit.

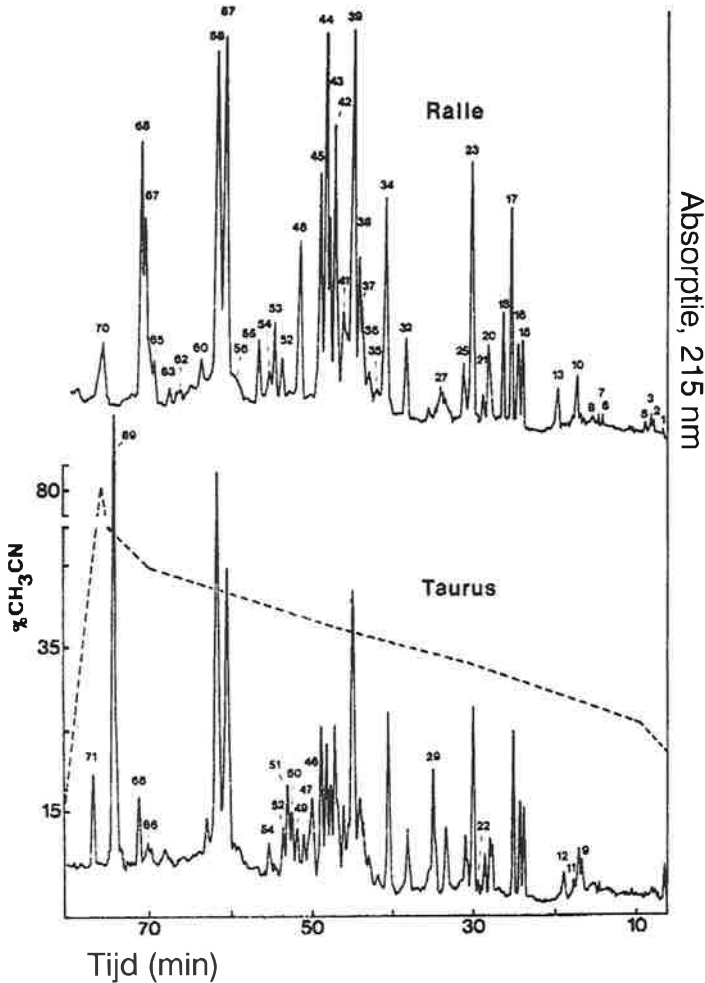
Het optreden van schot is in dit verband ook een belangrijke factor. Met schot wordt bedoeld: het vroegtijdig kiemen van de tarwekorrel op het veld. Hierdoor wordt de verwerkingswaarde van tarwe sterk verminderd. Bij het optreden van schot spelen naast het klimaat ook rasebonden eigenschappen een rol. Op dit moment is nog geen goede methode voorhanden om het schotrisico in Noord-West Europa te verkleinen. Door TNO is onlangs gestart met een project om analytische instrumenten te ontwikkelen die het mogelijk maken het gevaar van schot op het veld tijdig te onderkennen en tevens efficiënt rassen met een hoge schotresistentie te



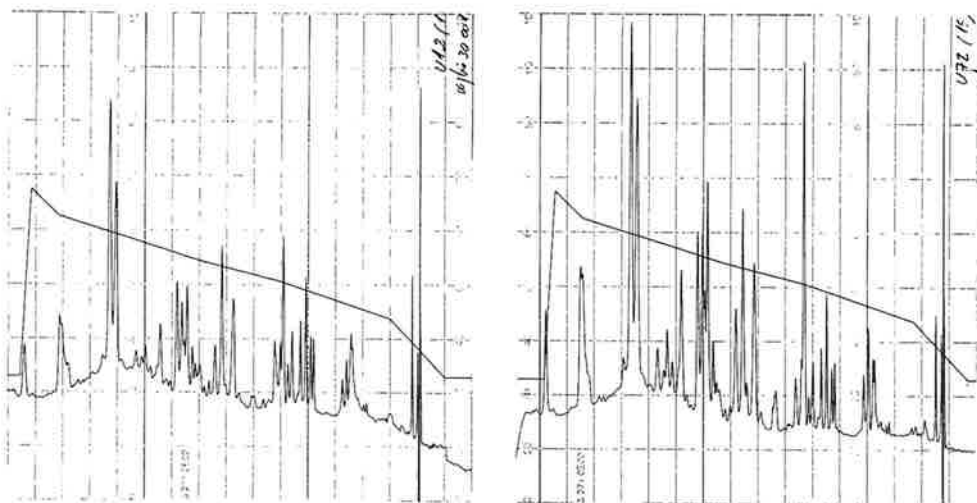
Figuur 1 (vorige pagina). Elektroforetische analyse van tarwe-eiwitten.

Figuur 1A (boven) laat het resultaat zien van elektroforese van geëxtraheerde tarwe-eiwitten op een gel van zetmeel. In de verschillende 'laantjes' zijn na kleuring voor de verschillende tarwerassen de eiwitten als patronen van bandjes zichtbaar. De laantjes corresponderen met de volgende rassen: 1, 3, 5, 7 en 9, Diplomat; 2, Capitole; 4, Maris Huntsman; 6, Rex; 8, Joss.

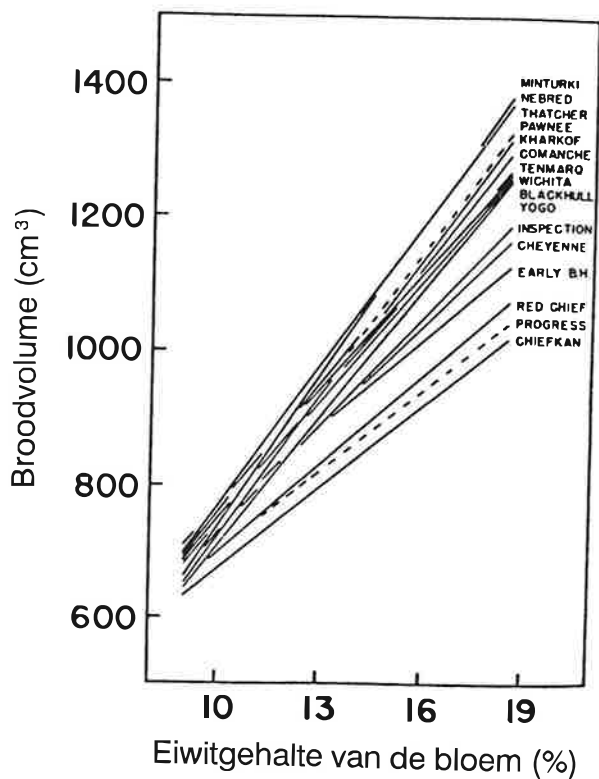
Figuur 1B (onder) laat het resultaat zien van elektroforese in een polyacrylamide-gel. Deze techniek wordt tegenwoordig veel gebruikt voor identificatie en controle op zuiverheid.



Figuur 2. 'Reversed phase' HPLC-analyse van tarwe-eiwitten. Bij de analyse van geëxtraheerde eiwitten met behulp van hoge-drukvlloeistofchromatografie worden de eiwitten gebonden aan een kolom en vervolgens daarvan afgespoeld met een verdringingsvlloeistof in een toenemende concentratie. De verschillende eiwitten die na elkaar van deze kolom af komen, worden zichtbaar als pieken in het chromatogram. In de figuur zijn de chromatogrammen afgebeeld van de tarwerassen Ralle en Taurus. Dergelijke chromatogrammen kunnen eveneens worden gebruikt voor identificatie en zuiverheidscontrole.



Figuur 3. 'Reversed phase' HPLC-analyse van twee monsters tarwe, afkomstig uit een stikstof-bemestingsproef. De chromatogrammen geven de kwantitatieve en kwalitatieve verschillen weer die ontstaan in het eiwitpatroon als gevolg van een toenemende stikstofbemesting. Het linker chromatogram is afkomstig van een tarwe geteeld zonder extra stikstofbemesting. Het rechter chromatogram geeft hetzelfde tarweras weer, maar nu geteeld met een hoge stikstofgift.



Figuur 4. Regressielijnen voor broodvolume en eiwitgehalte van 13 harde wintertarwerassen (—) en 2 harde zomertarwerassen (-----).

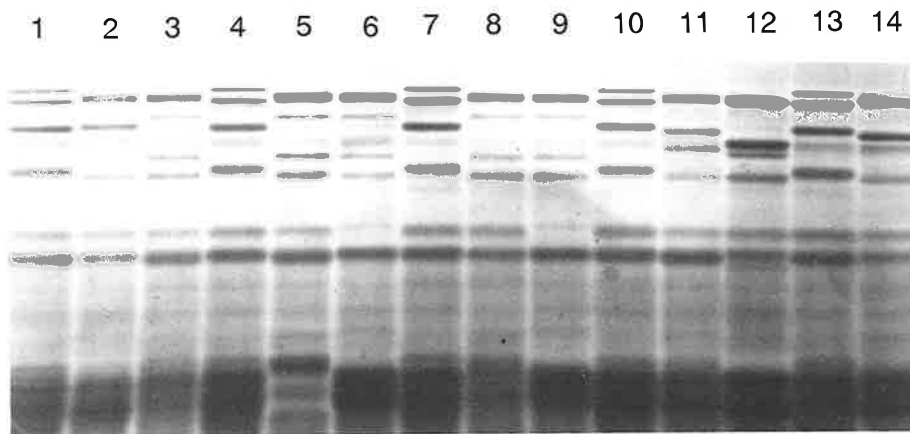
selecteren. Dit programma wordt gesubsidieerd door het Nederlands Graancentrum en de Europese Gemeenschap (ECLAIR).

Elektroforesetechnieken en HPLC-methoden stellen ons nu beter in staat de grondstof te definiëren. Van nog groter belang is echter dat inzicht wordt verkregen in de relatie tussen hetgeen wordt gemeten en de verwerkingskwaliteit van de tarwe. Voor het eiwitgehalte is deze relatie redelijk bekend. In figuur 4 wordt dit voor een aantal tarwerassen weergegeven. Hoewel er tussen eiwitgehalte en broodvolume steeds lineaire relaties worden gevonden, vallen de rasverschillen onmiddellijk op. Een groot deel van het biochemisch onderzoek is er dan ook op gericht geweest deze verschillen te kunnen verklaren.

Relaties tussen grondstofeigenschappen en verwerkings/produktkwaliteit

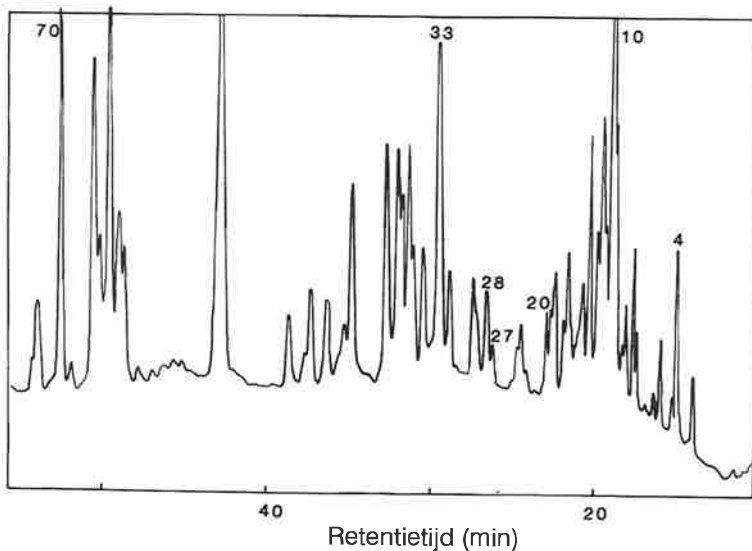
Het belang van verklarend onderzoek naar relaties tussen inhoudstoffen en verwerkingseigenschappen ligt in het verkrijgen van betere criteria. Deze criteria kunnen dan worden gebruikt om te definiëren welke tarwes dienen te worden gekweekt en geteeld, hoe moet worden geteeld (in verband met bijvoorbeeld het bemestingsregime) en hoe een verwerkingsproces kan worden geoptimaliseerd zodat een zo goed mogelijk product wordt verkregen.

De broodbakwaliteit van de in Europa geteelde tarwerassen wordt grotendeels bepaald door het eiwitgehalte van de tarwes en door de kwaliteit van deze eiwitten.



Figuur 5. Elektroforese van glutenine-eiwitten. Met behulp van elektroforese onder denaturende omstandigheden kan een scheiding naar molecuulgrootte worden verkregen. De grootste eiwitten verplaatsen zich het langzaamst en zijn bovenaan in elk laantje zichtbaar. Deze eiwitten, de hoogmoleculaire glutenine A-banden, kunnen worden gerelateerd aan een hogere bakkwaliteit van tarwe. Met deze techniek kan de erfelijk bepaalde glutenine A-bandensamenstelling van een tarweras eenvoudig worden bepaald.

De 'laantjes' corresponderen met de volgende rassen: 1, Sicco; 2, Hardi; 3, Timmo; 4, Sicco; 5, Magnus; 6, Holme; 7, Sicco; 8, Hildur; 9, Starbe; 10, Sicco; 11, Sappo; 12, Pinqua; 13, Sicco; 14, Olympic.



Figuur 6. Invloed van gliadinen op de bakkwaliteit van tarwe. De variatie in broodbakkwaliteit van een groep tarwes met gelijke glutenine A-bandsamenstelling kan statistisch gezien vrijwel volledig worden verklaard door de relatieve gehalten van bepaalde gliadinen in deze tarwes. De gehalten van deze gliadinen worden bepaald met 'reversed phase' HPLC. In de tabel bij deze figuur wordt weergegeven welke gliadinepieken uit het chromatogram hier van belang zijn. In het chromatogram is de positie van deze pieken aangegeven.

Statistische verklaring van de variatie in broodvolume met behulp van de hoeveelheden van bepaalde gliadinen:

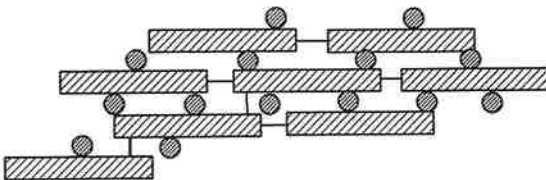
Aantal gliadinepieken in vergelijking	Pieken gekozen door statistisch programma	Gecorrigeerde R^2
1	70	0,398
2	33, 70	0,616
3	10, 33, 70	0,740
4	4, 10, 33, 70	0,818
5	4, 10, 28, 33, 70	0,878
6	4, 10, 27, 28, 33, 70	0,906
7	4, 10, 20, 27, 28, 33, 70	0,939

Dit maakt het de moeite waard eens aandacht te besteden aan de tarwe-eiwitten. Via fractioneringstechnieken kunnen tarwe-eiwitten worden gescheiden in globulinen, albuminen, gliadinen en gluteninen. Hiervan hebben met name de gluteninen in de afgelopen tien jaar veel aandacht gekregen. Aangetoond werd dat bepaalde glutenine-eiwitten consequent voorkomen in rassen met een betere bakkwaliteit. Dit gegeven – hoe beperkt ook – heeft in sterke mate bijgedragen aan het huidige, gerichte veredelingsonderzoek. Gluteninen kunnen met elektroforese worden herkend (zie figuur 5) en vervolgens in 'kwaliteitscategorieën' worden ingedeeld. De veredelaar

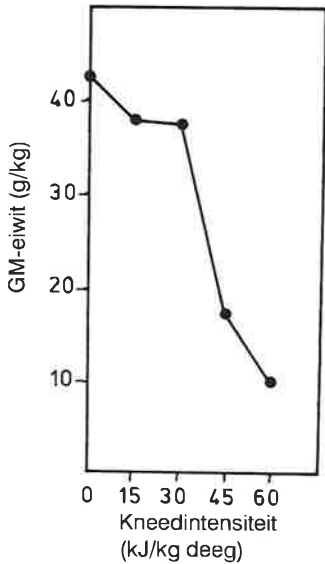
kan zo op de aanwezigheid van gewenste 'bandencombinaties' selecteren. Onderzoek van TNO (Moonen, 1984) heeft aanzienlijk tot deze techniek bijgedragen, maar daar inmiddels ook de nodige kritische noten bij geplaatst (Hamer et al., 1990). Niet alleen de aard, maar ook de totale hoeveelheid van deze glutenine-eiwitten is van belang voor de bakkwaliteit. Recent is bevestigd dat daarnaast ook gliadinen een belangrijke rol spelen. In figuur 6 wordt het resultaat weergegeven van een statistische studie naar de invloed van gliadinen op de bakkwaliteit van een groep tarwerassen van verschillende kwaliteit, maar met dezelfde gluteninensamenstelling. Het verschil in kwaliteit kan statistisch gezien nu vrijwel volledig worden verklaard op basis van verschillen in gliadinensamenstelling.

Hoewel deze studies duidelijk het belang van gluteninen en gliadinen onderstrepen, is het inzicht dat hieruit naar voren komt beperkt. Dit inzicht komt wel wat naderbij als we de eigenschappen van deze eiwitten wat meer in detail beschouwen. Van de meeste hoogmoleculaire gluteninen en van enkele gliadinen zijn nu de aminozuursequenties bekend. Daarnaast komt steeds meer structurele informatie beschikbaar. Hierdoor wordt bevestigd dat gluteninen bij uitstek polymere structuren kunnen vormen, die worden gestabiliseerd door disulfidebruggen. In figuur 7 wordt hiervan een schematische voorstelling gegeven. Hierin vormen de gluteninen een kop-staart-polymer van gigantische lengte. Daartussen zijn de gliadinen afgebeeld. Dit zijn monomere eiwitten die via merendeels hydrofobe interacties met dit netwerk geassocieerd zijn.

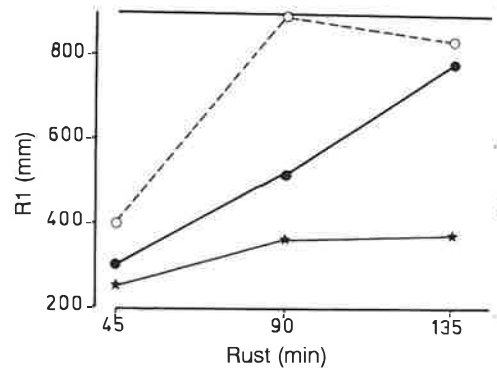
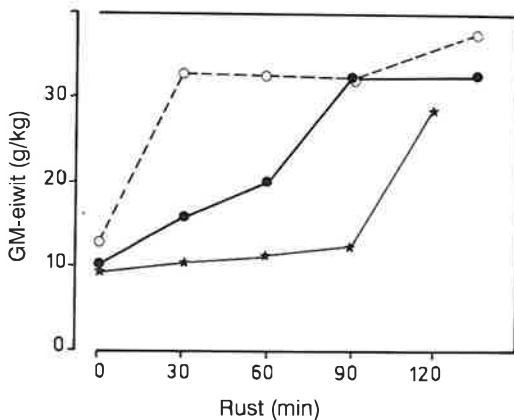
Het glutenine/gliadinemodel in figuur 7 vormt het centrale aangrijpingspunt voor het biochemische onderzoek naar de factoren die de kwaliteit van tarwe bepalen. We weten nu dat gluteninen zeer hoogmoleculaire complexen vormen, die tijdens het kneden van het deeg uit elkaar kunnen worden getrokken (zie figuur 8). Deze structuren worden tijdens het rusten van het deeg weer gevormd, hetgeen duidelijk gerelateerd is aan een toename van de rekweerstand van het deeg (zie figuur 9). Hiermee is een duidelijke relatie tussen een inhoudsstof en een verwerkings-eigenschap aan het licht gekomen. Dit uit elkaar getrokken worden en opnieuw gevormd worden van gluteninepolymeren is een proces dat zowel inzicht geeft in het kneedproces (figuur 8) als in de werking van meelverbetermiddelen zoals ascorbinezuur (figuur 9). Dit proces is niet alleen van belang bij de broodbereiding. Ook bij de bereiding van beschuit en biscuit en zelfs bij de winning van zetmeel uit tarwe blijkt dit proces een belangrijke rol te spelen. Bij de brood- en beschuitbereiding is het



Figuur 7. Schematische voorstelling van het gluteneiwitnetwerk. In deze tekening worden de gluteninemoleculen voorgesteld als staafjes die via kop-staartverbindingen een netwerk kunnen vormen. De gliadinen zijn getekend als bolletjes. Deze bolletjes zijn geassocieerd met dit netwerk.



Figuur 8. Afbraak van gluteninepolymeren door het kneden. Afhankelijk van kneedtijd en kneedintensiteit (in KJ/kg deeg) kunnen de zeer hoog moleculaire gluteninepolymeren uit elkaar worden getrokken en 'breken'. Dit leidt tot een afname in het gehalte aan 'GM-eiwit' (gluteninematrixeiwit, in g/kg deeg) zoals zichtbaar gemaakt in deze figuur.



Figuur 9. Vorming van deegeiwitten en deegsterkte tijdens het rusten. In figuur 9A (links) is de terugvorming van de gluteninematrixeiwitten weergegeven als functie van de tijd en als functie van het toegevoegde meelverbetermiddel (*-*: geen meelverbetermiddel; o - o: met het vroeger toegepaste meelverbetermiddel kaliumbromaat; ● - ●: met het tegenwoordig toegepaste ascorbinezuur). Figuur 9B (rechts) geeft de toename weer in de tijd van de reologische parameter R1 (de weerstand tegen uitrekking van een deeg na 5 cm). De symbolen zijn als in figuur 9A.

gewenst voldoende van deze structuren te hebben in verband met de viscoëlasticiteit van het deeg. Bij de biscuitbereiding zijn dergelijke elastische degen ongewenst en dienen de zeer grote gluteninepolymeren juist volledig afgebroken te zijn. Bij de scheiding van gluten en zetmeel is de snelheid van het zogenaamde coagulatieproces van belang. Hiermee wordt bedoeld op het samenklonteren van de bloemdeeltjes,

waarna vrijwel onmiddellijk de gluteninepolymeren worden gevormd. Een te langzame coagulatie geeft scheidingsproblemen.

Deeigenschappen kunnen voor een groot deel worden verklaard met behulp van het gluteninemodel. Van een deeg tot het uiteindelijke produkt is echter nog een lange weg. Een ander belangrijk proces bij bijvoorbeeld het broodbereidingsproces is het rijzen: het groter worden van de gascellen in het deeg onder invloed van koolzuurgasvorming door de gist. Ook hierbij speelt het gluteneiwit een rol. Er is echter geen directe relatie te vinden tussen de hoeveelheid hoogmoleculaire gluteninen en dit gashoudend vermogen. Ook vetten en lipiden zullen hierbij een rol spelen. Hoe deze componenten moeten worden ingebouwd in het glutenine/gliadine-model is echter nog niet bekend. Verder inzicht in deze materie kan alleen worden verkregen door de zogenaamde interacties tussen eiwitten, lipiden en vetten te bestuderen. Dit interactieonderzoek maakt deel uit van een langlopend onderzoeksprogramma bij TNO dat het doel heeft de diverse interacties die tussen tarwe-componenten optreden in kaart te brengen en hun relatie met deeg- en produkt-eigenschappen te bestuderen. In hetzelfde programma zullen ook de effecten van veel gebruikte additieven (met name emulgatoren) worden onderzocht.

De betekenis van de graan(bio)chemie nu en in de toekomst

In het voorgaande is een overzicht gegeven van een aantal technische en wetenschappelijke ontwikkelingen binnen de graanchemie. Deze ontwikkelingen hebben geleid tot een betere definiëring van grondstoffen en tot een beter inzicht in de veranderingen die zich tijdens de verschillende verwerkingsprocessen afspelen. Maar wat betekent nu deze kennis voor de graan- en meelverwerkende industrie?

De graan- en meelverwerkende industrie heeft behoefte aan constante en zo goedkoop mogelijke grondstoffen en aan een zo groot mogelijke flexibiliteit om snel op veranderingen in de markt te kunnen inspelen. Bij dat laatste spelen productie-efficiency en produktkwaliteit een belangrijke rol.

De inzichten die uit het graanchemisch onderzoek zijn voortgekomen hebben op een aantal terreinen mogelijkheden gegeven om aan deze behoeften tegemoet te komen. Een beter inzicht in kwaliteitseisen en kwaliteitsbepalende factoren van gluten hebben tot geleid tot een vervanging van – dure – Amerikaanse/Canadese tarwes door uit EG-tarwe geproduceerde gluten. In dat kader is door TNO een kwaliteitstest voor gluten ontwikkeld (Weegels & Hamer, 1989), onderzoek verricht naar kwaliteitsbepalende factoren voor gluten en naar mogelijkheden de kwaliteit van gluten te verbeteren. Ook is door TNO onderzoek verricht naar de geschiktheid van Nederlandse tarwe voor de glutenbereiding en naar mogelijkheden om met behulp van enzymen de verwerkbaarheid van mindere kwaliteiten tarwe te vergroten (Hamer et al., 1989). Resultaten van dit onderzoek worden al op brede schaal toegepast.

Een ander voorbeeld van graanchemisch onderzoek door TNO dat de basis vormt voor toepassingen in de praktijk, is het enzymonderzoek. Enzymen kunnen worden toegepast om de kwaliteit van de grondstof op het vereiste niveau te brengen, zodat een betere verwerkbaarheid en een betere produktkwaliteit wordt verkregen (Hamer,

1989). Door kennis van zowel enzymen als graanchemie is TNO bij uitstek in staat om enzymapplicaties voor de bakkerijsector te ontwikkelen. Op dit gebied werkt TNO dan ook al enkele jaren intensief samen met bedrijven uit deze sector.

Het huidige onderzoek van TNO richt zich meer op de toekomst. Het genoemde onderzoek waarin interacties tussen bloemcomponenten worden bestudeerd, is bedoeld om het fundament te leggen voor de ontwikkeling van gemakkelijke en lekkere produkten waarin de gehalten aan vetten en synthetische hulpstoffen is geminimaliseerd. In dat kader werkt TNO ook aan hulpstoffen die met behulp van enzymen worden bereid uit het tarwe-eiwit zelf. Deze natuurlijke hulpstoffen kunnen bijvoorbeeld worden gebruikt om proteasen of bepaalde chemische reductiemiddelen te vervangen. In Europees verband werkt TNO samen met onderzoeksinstituten uit bijna alle lidstaten van de EG om de kwaliteitseisen die de verschillende verwerkingsprocessen aan de tarwe of bloem stellen, te vertalen in biochemische parameters. Deze biochemische parameters kunnen vervolgens gebruikt worden in veredelingsprogramma's om precies die tarwes te kweken die de Europese markt nodig heeft. (In 1990 is TNO gestart met het ECLAIR-programma 'To explore and improve the industrial use of E. C. wheats'.)

Concluderend mag worden gesteld dat graan(bio)chemisch onderzoek een belangrijke stimulerende en ondersteunende rol speelt bij ontwikkelingen in de graan- en meelverwerkende industrie. De graanbiochemici van TNO zullen hieraan zowel nationaal als internationaal hun bijdragen blijven leveren.

Literatuur

- Hamer, R.J., 1989. Enzymen in de broodbereiding. *Koolhydraten in Nederland* 5 (augustus): 18 – 21.
- Hamer, R.J., Weegels, P.L., Marseille, J.P. & Kelfkens, M., 1989. A study of the factors affecting the separation of wheat flour into starch and gluten. In: Y. Pomeranz (ed.), *Wheat is unique: structure, composition, processing, end-use properties and products*, pp. 467 – 478. AACC, Minneapolis.
- Hamer, R.J., Weegels, P.L. & Marseille, J.P., 1990. Prediction of the bread-making quality of wheat. *Journal of Cereal Science*, geaccepteerd voor publicatie.
- Moonen, J.H.E., 1984. Eiwitsamenstelling en bakkwaliteit van tarwe. TNO-rapport 84-230.
- Weegels, P.L. & Hamer, R.J., 1989. Predicting the baking quality of gluten. *Cereal Foods World* 34: 210 – 212. (International Wheat Gluten Association Best Paper Award.)

Warmte- en stoftransport tijdens het verhitten van gerezen deegprodukten

U.A. de Vries, P. Sluimer en P. Verlaan

TNO-Voeding

Samenvatting

Warmte- en stoftransport in brood en cake zijn onderzocht tijdens het bakken. Het bleek dat stoftransport in de vorm van successievelijk verdamping en condensatie van water de belangrijkste bijdrage levert aan het warmtetransport in het produkt. Een fysisch-mathematisch model is ontwikkeld om het gecombineerde proces van warmte- en stoftransport in gerezen deegprodukten te beschrijven tijdens het verhitten (bakken). De resultaten van dit model komen goed overeen met de experimentele gegevens.

Inleiding

In de bakkerijsector is er een toenemende belangstelling voor zaken als beheersing van productieprocessen en produktkwaliteit, procesinnovatie en productieplanning. Centraal hierbij staat de behoefte aan inzicht in de relatie tussen produktkwaliteit en de uitvoeringsvorm van de procesapparatuur, in dit geval de oven.

Voor de jaarlijkse broodproductie in Nederland worden ca. 12,8 miljoen balen gebruikt (1 baal = 50 kg meel). Hiervan wordt ca. 40 % geproduceerd door bedrijven met continu-ovens (industriële sector) en 60 % door bedrijven die uitgerust zijn met charge-ovens (ambachtelijke sector). Daarbij wordt er jaarlijks ook nog zo'n 275 000 ton banket geproduceerd. Voor deze brood- en banketproductie is jaarlijks zo'n 5 PJ energie nodig (1 PJ (pentajoule) = 10^{15} J).

In 1989 vormde het hierboven gestelde aanleiding voor het IGMB-TNO om in samenwerking met de NOVEM te komen tot een plan van onderzoek waarin beheersing van de produktkwaliteit en de ontwikkeling van de 'ideale oven' centraal staat (Verlaan et al., 1989). Afgeleide doelstellingen van dit plan zijn vermindering van het energieverbruik en een beperking van de milieuoverlast (geuremissie).

Centraal in dit plan staat de ontwikkeling van een fysisch-mathematisch model dat met name het stof- en warmtetransport tijdens het bakken beschrijft. Dit model zal een essentiële rol spelen bij het beheersen van het bakproces en de ontwikkeling van nieuwe ovens. Op deze manier kan op termijn het bakproces worden geregeld op basis van produktparameters en niet, zoals thans het geval is, op basis van machineparameters.

Om dit te realiseren zal het model een geïntegreerde beschrijving moeten geven van de vier verschillende niveaus waarop het bakproces zich afspeelt:

- I. De ovenschil. Op dit niveau worden de processen in het warmteopwekkings- en warmtedistributiesysteem beschreven.
- II. De bakruimte en het microklimaat rond het produkt. Op dit niveau wordt de warmteoverdracht van de ovenatmosfeer naar het produktoppervlak beschreven.
- III. Het produkt op macroschaal. Op dit niveau wordt transport van warmte, vocht en aromacomponenten in het produkt beschreven.
- IV. Het produkt op microschaal. Op dit niveau worden chemische reacties en fysische verschijnselen beschreven, zoals verstijfseling van zetmeel, denaturatie van eiwit, vorming van kleurcomponenten, aromastoffen enz.

Voor het onderdeel II hebben Krist-Spit & Sluimer (1987) een studie verricht naar de bijdragen van de mechanismen straling en convectie aan de totale warmteoverdracht naar een busbrood in een gewone convectie-oven. De effecten van stofoverdracht zijn niet bestudeerd. Voor wat betreft het onderdeel III is door verschillende auteurs reeds over de warmtegeleidbaarheid in broodkruim en -korst gerapporteerd. Rask (1990) geeft een overzicht van de beschikbare gegevens en de literatuur op dit gebied. Sluimer & Krist-Spit (1987) hebben aangetoond dat warmtegeleiding in de vloeistoffase van het deeg niet het enige mechanisme voor warmtetransport kan zijn. Zij introduceerden het gecombineerde optreden van verdamping en condensatie als het mechanisme dat verantwoordelijk is voor het relatief snelle warmtetransport in het produkt tijdens het bakken. Dit mechanisme, dat ook bekend staat als het principe van Watt, verklaart tevens het waargenomen vochttransport naar de kern van het produkt.

Modellering van warmte- en stofoverdracht in het produkt

Het warmtetransport in deeg en kruim (dat wil zeggen deeg dat in kruim is overgegaan tijdens het bakken) wordt verondersteld een gevolg te zijn van twee verschillende vormen van warmteoverdracht:

- geleiding in de continue vloeistoffase
- verdamping-condensatie in de gasfase (principe van Watt).

Het verdamping/condensatiemechanisme wordt in het model verondersteld het enige mechanisme te zijn dat bijdraagt aan vochttransport in het produkt. Volgens de wet van Fourier is het warmtetransport, in dit geval de warmteflux door geleiding, evenredig met de temperatuurgradiënt. Voor een gecombineerde beschrijving van warmte- en vochttransport door het verdamping/condensatiemechanisme moet de snelheidsbepalende stap eerst bekend zijn. Daartoe is er een lokaal thermodynamisch evenwicht verondersteld tussen de gasfase en de vloeistoffase, terwijl diffusie in de gasfase als snelheidsbepalend wordt aangemerkt. Hierdoor wordt, uitgaande van de wet van Fick, warmtetransport evenredig met de vochtigheidsgradiënt in de gasfase.

Met behulp van de bovengenoemde veronderstellingen kunnen de stof- en de energiebalans in het produkt worden opgesteld:

$$\frac{\partial x_g}{\partial t} = \frac{1}{z_R^2} \frac{\partial}{\partial \varrho} \left(r^2 \frac{\partial x_g}{\partial \varrho} \right) - \frac{\partial x_l}{\partial t} \quad (1)$$

$$c \frac{\partial T}{\partial t} = \frac{1}{z_R^2} \frac{\partial}{\partial \varrho} \left(r^2 k \frac{\partial T}{\partial \varrho} \right) + L \frac{\partial x_l}{\partial \varrho} \quad (2)$$

waarin:

- X_g en X_l = waterconcentratie in respectievelijk de gasfase en de vloeistoffase (kg/kg [dm])
 ϱ = dimensieloze coördinaat verbonden aan de droge stof
 D en k = getransformeerde diffusiecoëfficiënt respectievelijk warmtegeleidingscoëfficiënt
 z_R = waarde van de coördinaat verbonden aan de droge stof op het oppervlak.

Aangezien de gasfase expandeert tijdens het verhitten, beïnvloedt de porositeit van het gefermenteerde (gerezen) deegproduct het warmteoverdrachtsproces aanzienlijk. Immers, het is het verdamping/condensatiemechanisme in de gasfase dat de belangrijkste bijdrage levert aan het totale warmtetransport. Om hiermee rekening te houden is tijdens de berekening gebruik gemaakt van een meebewegend coördinatiestelsel, dat gekoppeld is aan de droge stof van het deeg.

Philip & de Vries (1957) gebruikten enkel een warmtebalans met een effectieve warmtegeleidingscoëfficiënt gecorrigeerd voor het verdamping/condensatie-effect. Een nadere bestudering van zo'n effectieve geleidingscoëfficiënt geeft een aanwijzing over de grootte van de individuele bijdragen van de verschillende warmtetransportmechanismen:

$$k_{eff} = k_l + k_g + k_{vc}$$

$$= \tau_l (1-\epsilon) \cdot k_l^0 + \tau_g \cdot \epsilon \cdot k_g^0 + \tau_g \cdot \epsilon \cdot L \cdot D \cdot \frac{\delta h}{\delta T} \quad (3)$$

waarin k_l , k_g en k_{vc} de bijdragen van respectievelijk geleiding in de vloeistoffase, geleiding in de gasfase en van verdamping en condensatie zijn. k_g^0 en k_l^0 zijn de geleidingscoëfficiënten in de gasfase, respectievelijk de vloeistoffase. τ is de tortuositeitfactor, ϵ de porositeit, L de verdampingswarmte, D de diffusiecoëfficiënt van waterdamp in CO_2 , h de waterdampconcentratie in de gasfase en T de temperatuur.

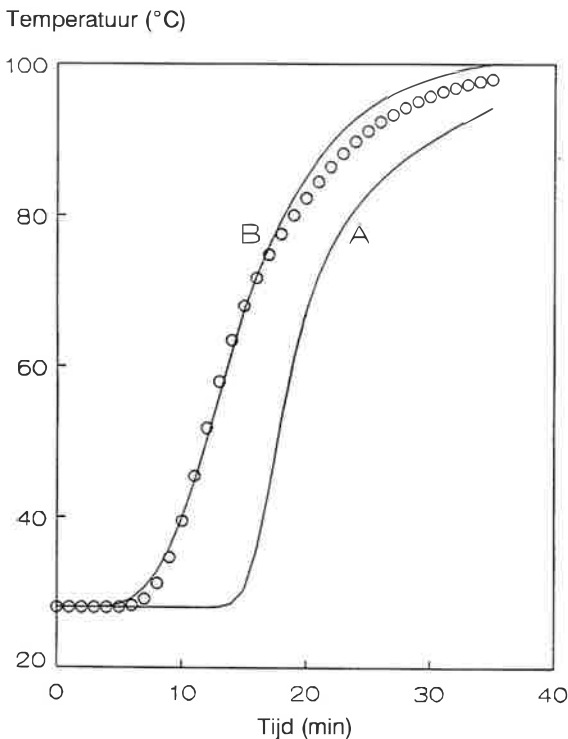
Vergelijking 3 laat zien dat warmteoverdracht in een poreus deeg of kruim een functie is van de temperatuur, de druk (diffusie in de gasfase is omgekeerd evenredig met de druk) en de porositeit van het materiaal.

Toetsing van het model aan de praktijk

De massa en warmtebalans (volgens formules 1 en 2) zijn numeriek opgelost met behulp van de voorwaartse differentiëmethode. Experimentele gegevens van bakexperimenten met wit- en volkorenbrood en cake zijn gebruikt om het model te verifiëren. De brooddegen zijn bereid volgens de methode van de Vries et al. (1988). De initiële condities waren: temperatuur 28°C, vochtgehalte 0,78 kg per kg droge

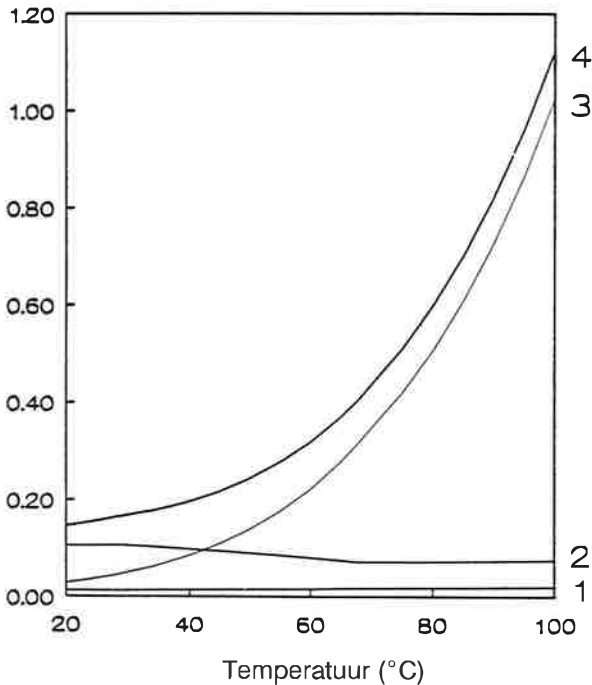
stof, diameter van de deegcilinder 100 mm, porositeit 0,77. Aan het eind van het bakproces was de porositeit 0,84. Gegevens over de thermische eigenschappen zijn ontleend aan de literatuur (de Vries et al., 1988). De wateractiviteit is gelijk gesteld aan één. Voor het cakebeslag zijn de initiële condities als volgt vastgelegd: temperatuur 21 °C, vochtgehalte 0,39 kg per kg droge stof, porositeit 0,43. Aan het eind van het bakproces bedroeg de porositeit 0,77. De cakes werden gebakken in blikken met een gemiddelde diameter van 70 mm. De simulaties zijn gedaan op basis van een cilindergeometrie met een diameter gelijk aan de bovengenoemde diameter. De thermische eigenschappen van het beslag zijn berekend met het COSTHERM-programma. De waarden voor de wateractiviteit zijn berekend met behulp van het Oswin-model.

De berekeningen gebaseerd op de formules 1 en 2 en volgens de methoden zoals omschreven komen goed overeen met de experimentele gegevens zoals uit figuur 1 blijkt. Uit figuur 1 blijkt ook dat, hoewel het verdamping/condensatiemechanisme de belangrijkste bijdrage levert aan de warmteoverdracht, warmtegeleiding niet kan worden verwaarloosd. In figuur 2 zijn de afzonderlijke bijdragen van geleiding en verdamping/condensatie aan de totale warmteoverdracht weergegeven in de vorm



Figuur 1. Experimenteel en berekend temperatuurverloop in de kern van een brooddeeg. o - o - o experimenteel; _____ berekend. A: verdamping - condensatie; B: verdamping - condensatie + geleiding.

Warmtegeleidingscoëfficiënt (J/mKs)



Figuur 2. Numerieke waarden van de individuele bijdragen van de effectieve warmtegeleidingscoëfficiënten. 1 = k_g ; 2 = k_f ; 3 = k_{vc} ; 4 = k_f (vgl. formule 3).

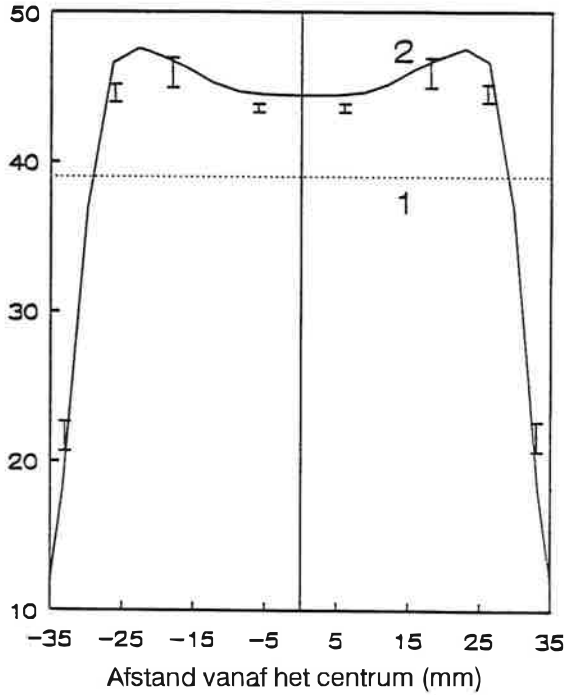
van de warmtegeleidingscoëfficiënt als functie van de temperatuur. Uit figuur 2 blijkt dat het warmteoverdrachtsproces bij lage temperaturen hoofdzakelijk wordt bepaald door warmtegeleiding en bij hoge temperaturen door het verdamping/condensatiemechanisme. De bijdrage van geleiding in de gasfase (CO_2/H_2O) is relatief gering.

In figuur 3 is het berekende vochtprofiel in cake weergegeven, samen met de experimenteel verkregen gegevens. Om deze experimentele gegevens te verkrijgen werd een cakebeslag bereid met een vochtgehalte van 0,39 kg per kg droge stof. Dit beslag werd gebakken tot cake en onmiddellijk na het bakken zijn concentrische cilindersegmenten uit de cake gestoken waarvan het vochtgehalte werd bepaald.

In figuur 3 is duidelijk te zien dat het vochtgehalte van de drie binnenste segmenten duidelijk boven dat van het oorspronkelijke beslag ligt. Het maximum in de curve is te verklaren door het feit dat het verdamping/condensatiemechanisme juist bij hoge temperaturen een significante bijdrage levert aan het warmte- en stoftransport. Hierdoor zal de vochtmigratie aan de randen aanvankelijk snel verlopen terwijl meer naar het centrum, waar de temperatuur lager is, dit proces trager zal verlopen.

Aangezien het beslag een porositeit had van 0,43 en de hieruit bereide cake een porositeit had van 0,77 is voor de modelberekeningen uitgegaan van een lineaire

Vochtgehalte (kg/kg droge stof)



Figuur 3. Berekende en experimentele waarden voor de vochtverdeling in cake vóór en na het bakken. 1, beslag; 2, na het bakken.

toename van de porositeit tussen de initiële temperatuur van 20°C en de temperatuur van 68°C waarbij wordt aangenomen dat fixatie van de structuur optreedt.

Conclusie

Het gepresenteerde fysisch-mathematische model voor gecombineerde warmte- en stoftransport in deeg en kruim komt goed overeen met de praktijk. Met behulp van dit model is aangetoond dat het verdamping/condensatiemechanisme de belangrijkste bijdrage levert aan de warmteoverdracht in gerezen deegproducten. Tevens is aangetoond dat warmte- en vochttransport in deze producten toeneemt naarmate de temperatuur stijgt en de porositeit een grotere waarde heeft.

Literatuur

- Krist-Spit, C.E. & Sluimer, P., 1987. Heat transfer in ovens during the baking of bread. In: I.D. Morton (ed.), *Cereals in a European context*, pp. 344 – 354. Ellis Horwood, Chichester.
- Philip, J.R. & de Vries, D.A., 1957. Moisture movement in porous materials under temperature gradients. *Transactions, American Geophysical Union* 38 (2): 222 – 232.
- Rask, C., 1990. Thermal properties of dough and bakery products – A review of published data. *Journal of Food Engineering* (geaccepteerd).
- Sluimer, P. & Krist-Spit, C.E., 1987. Heat transport in dough during the baking of bread. In: I.D. Morton (ed.), *Cereals in a European context*, pp. 355 – 363. Ellis Horwood, Chichester.
- Verlaan, P., de Vries, U.A., Rouwen, W. & Krist-Spit, C.E., 1989. Basisinformatie ten behoeve van het meerjarenraamplan van activiteiten gericht op energiebesparing in de brood- en banketindustrie. IGMB-TNO rapport I 89-74, april 1989.
- Vries, U.A. de, Sluimer, P. & Bloksma, A.H., 1988. A quantitative model for heat transport in dough and crumb during baking. *Proceedings van een internationaal symposium, 'Cereal Science and Technology in Sweden', Ystad, Zweden, 13 – 16 Juni 1988.*

‘Predictive modelling’ van microbiële groei in voedingsmiddelen

M.H. Zwietering¹ en J.H.J. Huis in 't Veld²

¹Landbouwniversiteit Wageningen; ²TNO-Voeding

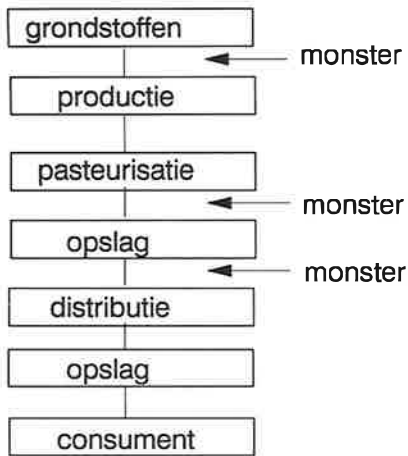
Inleiding

In de gang van grondstof tot consument ondergaat een voedingsmiddel verschillende behandelingen. Vaak worden grondstoffen bewerkt (zoals verhitten, koelen, drogen, conserveren, mengen, kruiden, enz.), op verschillende plaatsen opgeslagen (fabriek, distributiecentrum, winkel, consument), en gedistribueerd (zie figuur 1).

Voor de uiteindelijke microbiologische kwaliteit van zo'n voedingsmiddel zijn al deze fasen van belang. Van belang zijn de omstandigheden tijdens deze fasen (temperatuur, pH, wateractiviteit (a_w), enz.) alsook besmetting door toevoegingen (bijvoorbeeld kruiden) of door apparatuur (bijvoorbeeld via dode hoeken). Het is dus een erg ingewikkelde zaak de uiteindelijke kwaliteit van een voedingsmiddel te voorspellen, aangezien er binnen de gehele keten erg veel parameters van invloed zijn. Meestal wordt de microbiologische kwaliteit van voedingsmiddelen bepaald op verschillende punten in de keten (zie figuur 1). Deze metingen geven een beeld van de microbiologische kwaliteit van het voedingsmiddel en eventuele veranderingen of fluctuaties in kwaliteit. Ze geven echter nauwelijks inzicht in het verloop van de groei van de micro-organismen en over de uiteindelijke kwaliteit. De resultaten van deze metingen kunnen daarom niet worden teruggekoppeld. Voorts geeft een te groot aantal organismen in het voedingsmiddel geen uitsluitsel over waar nu het probleem zit. Deze metingen kunnen dus niet worden gebruikt voor optimalisatie van de keten. Een volgend nadeel van deze procedure is dat er altijd een lange tijd zit tussen het nemen van het monster en het microbiologische resultaat. Dit heeft tot gevolg dat een produkt gekoeld moet worden bewaard totdat de uitslag van de metingen bekend is. Door het gebruik van voorspellende microbiologische modellen zouden deze nadelen misschien kunnen worden opgelost.

Voorspellende modellen

Eerder is vermeld dat het een ingewikkelde zaak is de uiteindelijke microbiologische kwaliteit en houdbaarheid van een voedingsmiddel te voorspellen aangezien er erg veel factoren van invloed kunnen zijn op deze kwaliteit. Het gebruik van modellen kan hier uitkomst bieden. Modellen zijn een vereenvoudigde voorstelling van de werkelijkheid. Aangezien de werkelijkheid onmogelijk precies te beschrijven is,



Nadelen

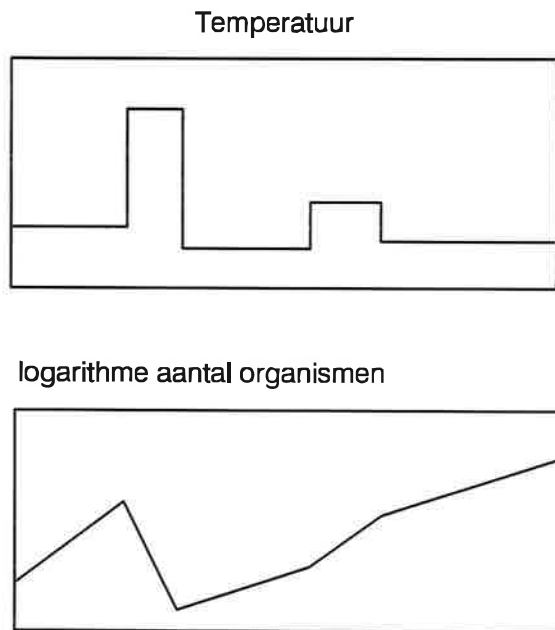
- geen inzicht in proces
- geen feed-back
- geen optimalisatie
- time-lag tussen sample en actie

Figuur 1. Voorbeeld van een schematische productie- en distributieketen met de nadelen van de huidige procesvoering.

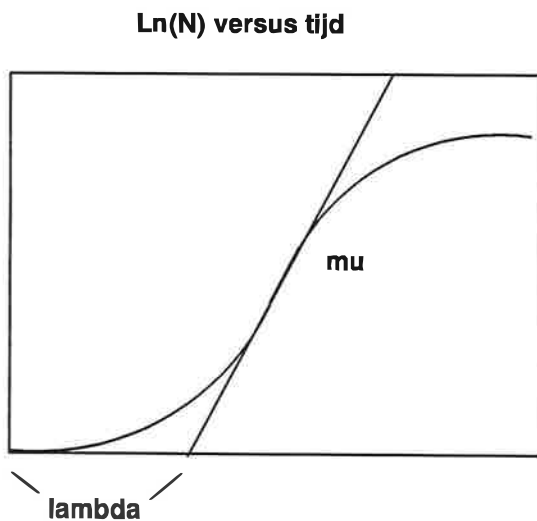
worden veronderstellingen gedaan over de belangrijkste processen die de kwaliteit bepalen. Deze veronderstellingen kunnen leiden tot een verzameling vergelijkingen die het systeem beschrijven. Met behulp van experimenten kunnen deze veronderstellingen worden getoetst en kunnen parameters uit de vergelijkingen worden bepaald. Deze parameters en vergelijkingen kunnen nu worden gebruikt om voorspellingen te doen over de microbiologische houdbaarheid van een produkt en over de effecten van veranderingen in het proces. Met behulp van zo'n model kunnen we nu inzicht verkrijgen in het verloop van het aantal organismen (figuur 2). We kunnen ook een proces optimaliseren en een voorspelling maken ten aanzien van het aantal organismen. Hiervan zullen later enkele voorbeelden volgen.

De invloed van de temperatuur

De bewaartemperatuur is een erg belangrijke factor voor de microbiologische houdbaarheid van gekoelde voedingsmiddelen. Alhoewel de pH, a_w , gassamenstelling, verpakking en dergelijke ook belangrijk zijn, heeft de temperatuur in veel gevallen de grootste invloed op de microbiologische kwaliteit. De temperatuur kan ook relatief eenvoudig worden aangepast zonder de produkteigenschappen te wijzigen. Als de modellen die de invloed van de temperatuur beschrijven zijn getoetst en blijken te voldoen, kunnen modellen voor

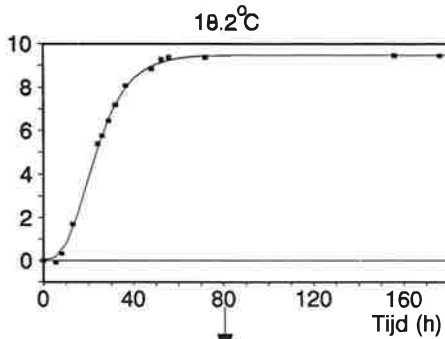


Figuur 2. Verloop van de temperatuur gedurende verschillende processtappen en het resulterende verloop van de logaritme van het aantal organismen.



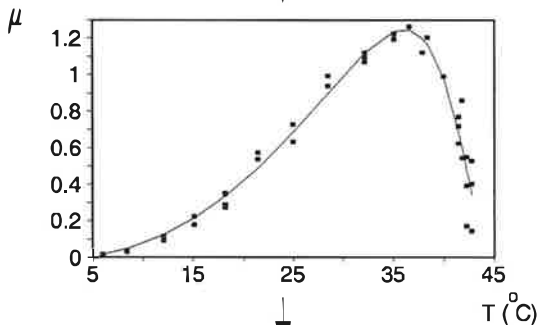
Figuur 3. Sigmoidaal verloop van de logaritme van het aantal organismen in de tijd, met de 'lag time' (λ), de specifieke groeisnelheid (μ) en het eindniveau (asymptoot).

LN(N/No)



N (t)

$$\mu \quad A \quad \lambda$$

 $\mu (T)$

$$\mu = b^2 (T - T_{\min})^2 (1 - \exp(-c(T - T_{\max})))$$

$$\ln N = A \exp\left(-\exp\left(\frac{\mu}{A}(\lambda - t) + 1\right)\right)$$

Figuur 4. Verloop van de verschillende bewerkingsstappen. Van boven naar beneden:

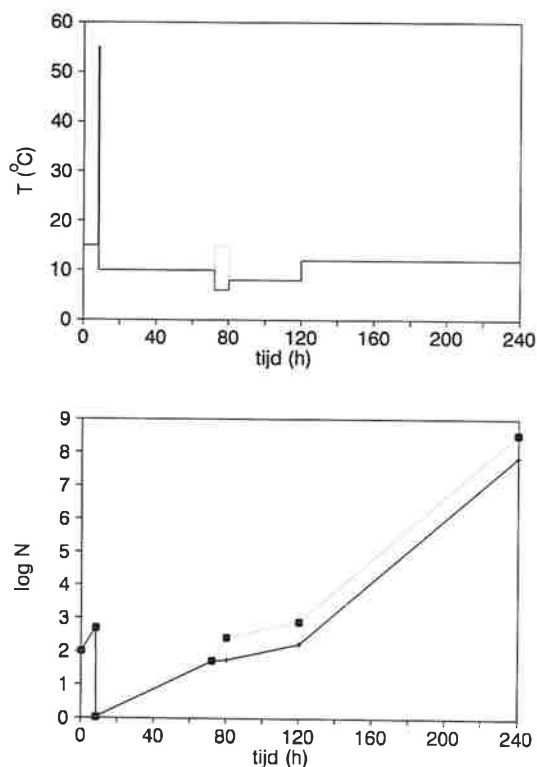
- groeicurven bij verschillende temperaturen,
- bepaling van de groeisnelheid (μ), 'lag time' (λ) en asymptoot (A) uit deze curven,
- grafische weergave van een van deze groeiparameters (μ) als functie van de temperatuur,
- model om deze groeisnelheid als functie van de temperatuur te beschrijven,
- het gemodificeerde model van Gompertz om het verloop van het aantal organismen te beschrijven als functie van de tijd als de parameters μ , λ en de asymptoot bij die temperatuur bekend zijn.

andere variabelen worden toegevoegd. Het eerste doel is dus, bij een gegeven temperatuur-tijd-profiel van een bepaald productie- en distributieproces, het verloop van het aantal organismen te berekenen (zie figuur 2). Hiertoe moeten groeicurven worden gemeten bij verschillende temperaturen. Deze experimenten kunnen worden uitgevoerd in een temperatuurgradiënt-incubator en met behulp van plaattellingen.

Uit deze plaattellingen worden groeicurven verkregen (figuur 3) waaruit de vertragingstijd ('lag time', λ), groeisnelheid (μ) en asymptoot (A) kunnen worden geschat. Hiervoor is het gemodificeerde model van Gompertz gebruikt (Zwietering et al., 1990), dat het beste het S-vormige gedrag van een groeicurve bleek te beschrijven.

Als deze parameters nu bij verschillende temperaturen worden bepaald kunnen deze parameters tegen de temperatuur worden uitgezet en kunnen verschillende modellen worden getoetst in de beschrijving van de datapunten. Uiteindelijk kunnen dan modellen worden geselecteerd die de afhankelijkheid van de temperatuur beschrijven (figuur 4).

Als deze bekend zijn kan bij elke temperatuur een schatting worden gemaakt van de groeisnelheid, de 'lag time' en de asymptoot. Hierna kan, met behulp van het gemodificeerde model van Gompertz voor de beschrijving van een groeicurve, de groeicurve bij die temperatuur worden geschat. We kunnen nu met deze modellen



Figuur 5. Verloop van de temperatuur tijdens een fictief productie- en distributieproces en het verloop van het aantal organismen. De doorgetrokken lijn behelst een proces met gekoelde distributie; de stippellijn geeft een proces met ongekoelde distributie.

een (fictief) productie- en distributieproces simuleren (figuur 5). Met behulp van dit soort simulaties komen de voordelen van het modelleren duidelijk naar voren: we krijgen inzicht in het proces, we kunnen zien waar de grootste groei van micro-organismen plaatsvindt en of er misschien een fase is waar de groei het sterkst toeneemt (kritisch punt). Als dat zo is, kunnen we bijvoorbeeld de temperatuur verlagen of de verblijftijd in die fase proberen te verkorten, of anderszins maatregelen treffen. Dit is een voorbeeld van 'feedback'. Als we bijvoorbeeld de temperatuur tijdens distributie verlagen van 15 naar 6°C, zien we een ander verloop van het aantal organismen (figuur 5). Uiteraard zien we een verbetering van de kwaliteit van ons produkt en een verlengde houdbaarheid. Aangezien deze verbetering gekwantificeerd is kunnen we deze verandering in het proces afwegen ten opzichte van de kosten (bijvoorbeeld meer energie). Dit is een voorbeeld van het gebruik van de modellen voor optimalisatie. We kunnen deze modellen ook koppelen aan andere modellen, bijvoorbeeld met die voor warmteoverdracht en -geleiding. Dit wordt toegelicht met een voorbeeld (tabel 1 en figuur 6).

We zien dat de beginbesmetting in de grondstof redelijk hoog is ($\log(N) = 5$) en tijdens het proces nog toeneemt ($\log(N) = 7$). Het zou dus nuttig kunnen zijn de grondstoffen bijvoorbeeld een hittebehandeling te geven ('feedback'). We kunnen dit doen door de grondstoffen twee uur lang in een stoof van 65°C te plaatsen (tabel 2). We zien in figuur 7 dat dit geen positief effect heeft op de microbiologische kwaliteit. Het midden van het produkt bereikt slechts temperaturen van 40°C en er vindt daar helemaal geen afsterving plaats. De buitenkant van het produkt komt op 55°C en er vindt daar slechts heel beperkt afsterving plaats. Al gauw komt men dan op het idee niet met hete lucht te behandelen, maar met bijvoorbeeld heet water, omdat dan de warmteoverdrachtscoëfficiënt veel hoger is. Als we dit simuleren (figuur 8) blijkt de temperatuur van de buitenkant van het produkt werkelijk op 65°C te komen en sterven ook alle organismen af (het bederfor organisme was een vegetatieve bacterie *Lactobacillus plantarum*). De binnenkant komt tot ongeveer 57°C, en de afsterving is ook daar behoorlijk. Daarna vindt er midden in het produkt toch nog enige groei plaats ($\log(N) = 4$).

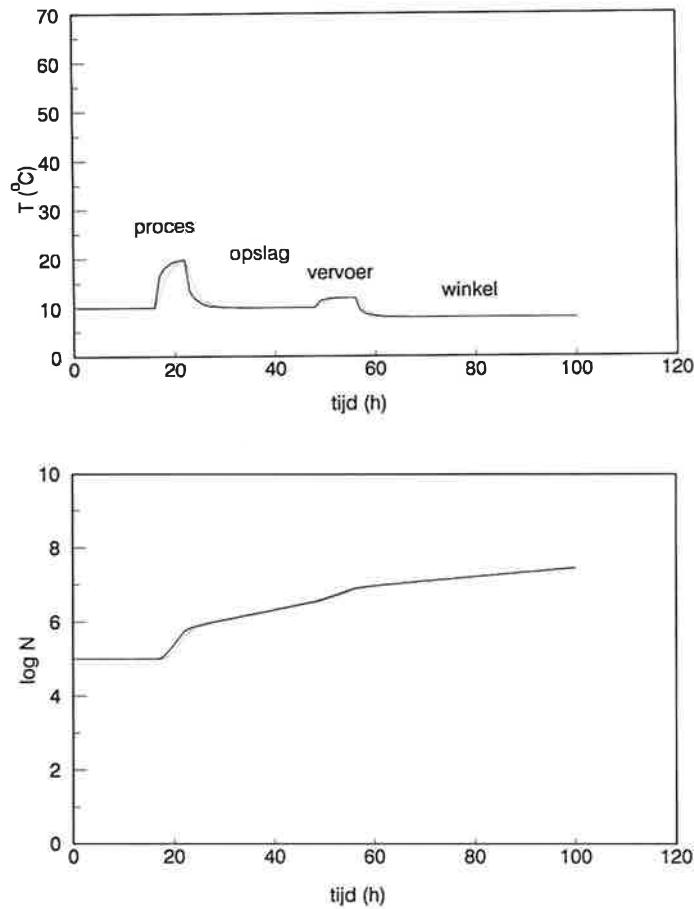
Op deze manier kunnen snel verschillende omstandigheden worden doorgerekend en kunnen de voordelen van veranderingen in het proces worden gekwantificeerd. Het ontwerpen van een optimaal proces, met relatief eenvoudige middelen, kan een aanzienlijk financieel voordeel opleveren. Simulatie is veel goedkoper dan laboratoriumwerk of 'pilot plant'-experimenten.

Andere variabelen

Zoals gezegd, zijn ook verschillende andere variabelen van invloed op de microbiologische houdbaarheid van voedingsmiddelen, zoals pH, a_w , gassamenstelling en verpakking. Het effect van deze variabelen op de bacteriële groei kan natuurlijk ook worden gemeten en gekwantificeerd, en ook hiervoor kunnen modellen worden opgesteld, zodat deze ook bij een eventuele optimalisatie of voorspelling kunnen worden betrokken. Zo modelleert de groep van Roberts

Tabel 1. Fictief productie- en distributieschema.

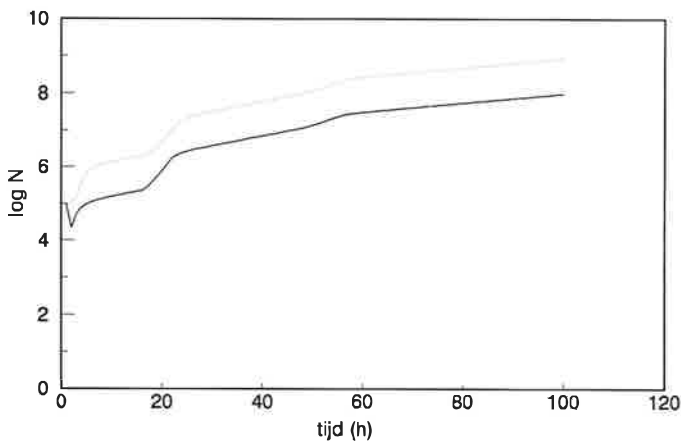
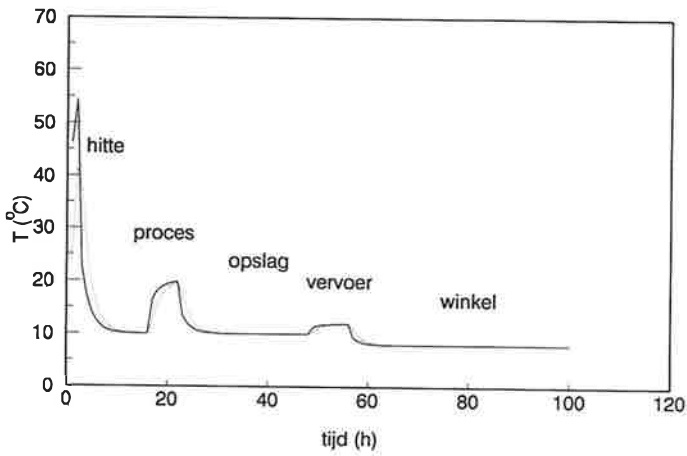
Processtap	Tijdsduur processtap (uren)	Tijdsduur cumulatief (uren)	Temperatuur (°C)
Opslag grondstof	2	2	10
Opslag grondstof	14	16	10
Productie	6	22	20
Opslag produkt	26	48	10
Distributie	8	56	12
Winkel	45	101	8



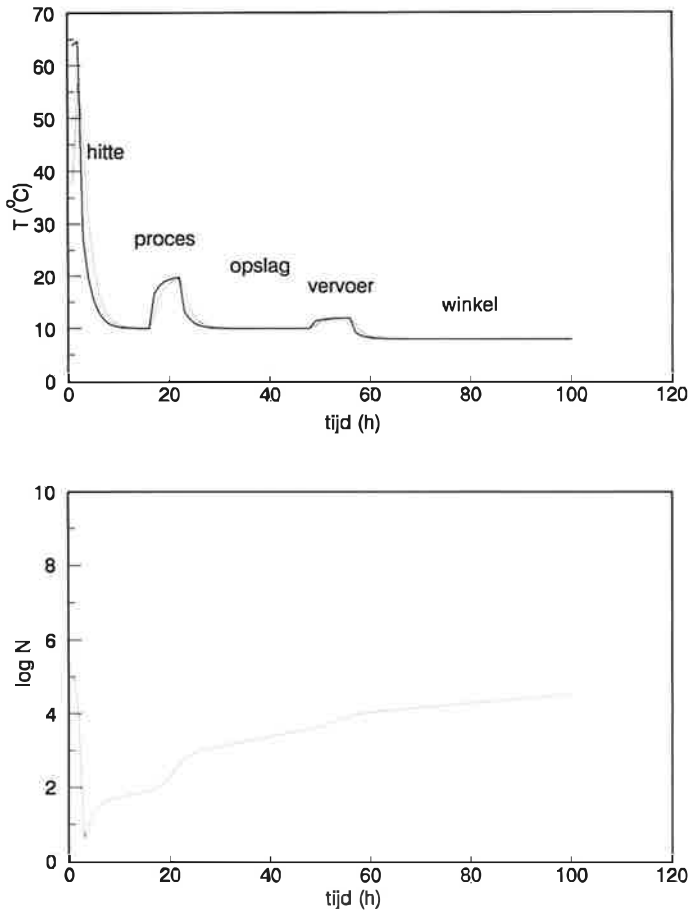
Figuur 6. Verloop van de temperatuur en het aantal organismen bij een fictief proces en distributieschema (zie tabel 1). De doorgetrokken lijn is het verloop aan de buitenkant van het product; de stippellijn is het verloop midden in het product.

Tabel 2. Fictief productie- en distributieschema, met hittebehandeling.

Processtap	Tijdsduur processtap (uren)	Tijdsduur cumulatief (uren)	Temperatuur (°C)
Hittebehandeling	2	2	65
Opslag grondstof	14	16	10
Productie	6	22	20
Opslag produkt	26	48	10
Distributie	8	56	12
Winkel	45	101	8



Figuur 7. Hittebehandeling met hete lucht (vgl. figuur 6 en tabel 2).



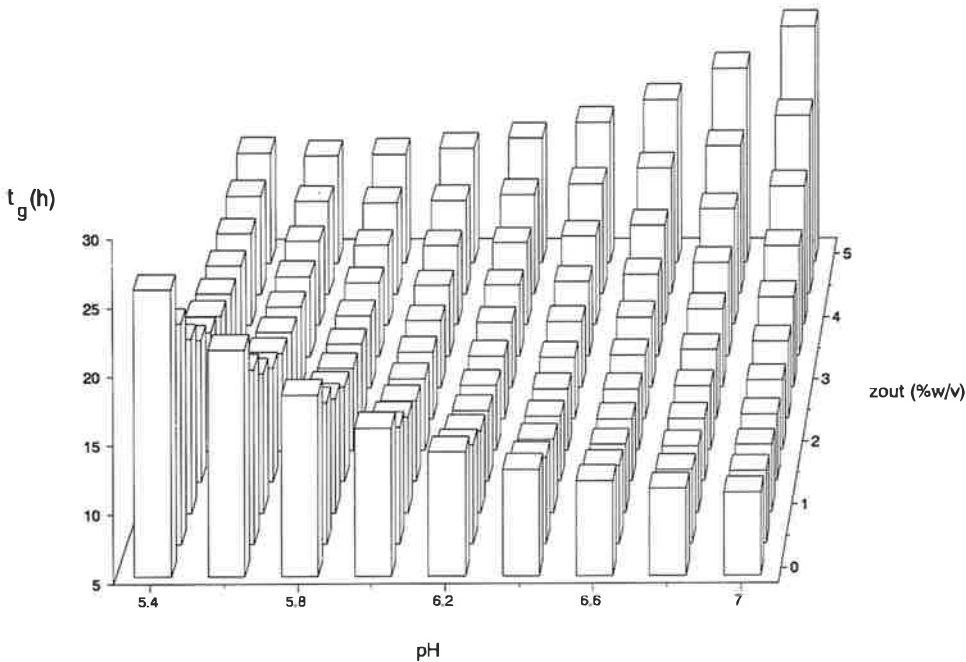
Figuur 8. Hittebehandeling met heet water (vgl. figuur 6 en tabel 2).

(Bratchel et al., 1989) de effecten van pH, zout en temperatuur op verschillende organismen. Een voorbeeld van hun resultaten wordt gegeven in figuur 9.

Het huidige onderzoek

Landbouwniversiteit

In de sectie Proceskunde van de Landbouwniversiteit wordt, in nauwe samenwerking met de sectie Levensmiddelenmicrobiologie en Unilever Research in Vlaardingen, onderzoek gedaan naar modellen die de invloed van de temperatuur



Figuur 9. Effect van pH en zoutgehalte op de generatietijd van *Salmonella* (uit: Brachel et al., 1989).

beschrijven. Hierbij ligt de nadruk op het doen van metingen, het selecteren van modellen en het ontwerpen van nieuwe modellen. Er wordt gewerkt aan eenvoudige simulatieprogramma's voor het berekenen van microbiële groei, alsook aan uitgebreidere modellen die ook de invloed van warmteoverdracht en geleiding in het produkt meenemen. Verder wordt de invloed van de logistiek van een proces op de microbiologische kwaliteit bestudeerd. Voorts wordt aandacht geschonken aan de ontwikkeling van een intelligent systeem, dat kan aangeven welke organismen mogelijk in welk produkt kunnen voorkomen en welke waarden de groeiparameters voor deze organismen in dat produkt ongeveer zullen hebben.

TNO-Voeding en de Universiteit van Utrecht

TNO-Voeding (tot voor kort de Hoofdgroep Voeding en Voedingsmiddelen TNO) en de vakgroep Voedingsmiddelen van Dierlijke Oorsprong van de Faculteit Diergeneeskunde van de RUU doen gezamenlijk onderzoek naar de modellering van de houdbaarheid van vlees en vleeswaren.

De bederfflora van vleeswaar (meestal lactobacillen) is minder complex dan die van vlees. Naast temperatuur als belangrijke factor dienen tevens parameters zoals pH en a_w bij dit modelleren te worden betrokken. Er is een begin gemaakt met het meten van groeicurves van specifieke bederf-micro-organismen onder verschillende condities, waarna vergelijkingen met praktijksituaties worden uitgevoerd. Hierbij wordt tevens aandacht geschonken aan de gevolgen van interacties tussen verschillende conserveringstechnieken voor de microbiële groei. Het modelleren van

deze variabele omstandigheden kan het onderzoek naar de stabiliteit en veiligheid van nieuwe producten aanzienlijk vereenvoudigen.

Ogenschijnlijk complexer lijkt het modelleren van de houdbaarheid van rauw vlees. Wegens de hoge wateractiviteit en het in voldoende mate aanwezig zijn van nutriënten is de belangrijkste houdbaarheidsbepalende factor voor rauw vlees de bewaartemperatuur. De temperatuur kan tijdens de verschillende stadia, zoals bewerking, opslag, distributie en verkoop, nogal variëren, hetgeen betekent dat de houdbaarheid van vlees op elk willekeurig moment wordt bepaald door de cumulatieve temperatuureffecten van de achterliggende periode. Voor een zinvolle voorspelling van de houdbaarheid worden daarom de temperatuurschommelingen continu gevolgd. Deze mogelijkheid wordt geboden door apparaten die bekend zijn als 'time/temperature integrators'. Op basis van de zojuist beschreven modellen kunnen we de effecten van de gemeten temperatuurschommelingen omzetten in een maat van bederf. Zo is op elk willekeurig tijdstip een schatting te geven van de resterende houdbaarheid van het vlees. Een probleem hierbij is echter dat deze bederfflora niet alleen complex is, maar ook in de tijd nogal varieert. Dit stelt extra hoge eisen aan de mathematische modellen. Voorwaarde is tevens dat de pH van het vlees relatief constant blijft.

'Predictive modelling' kan een wezenlijke bijdrage leveren aan het opsporen en elimineren van zwakke plekken in bijvoorbeeld de koelketen, waardoor een effectievere integrale ketenbewaking en een maximale houdbaarheid kan worden verkregen.

Europese samenwerking.

In het kader van een FLAIR-project zoeken verschillende onderzoeksinstituten en bedrijven contact om nauwer samen te gaan werken binnen het gebied van de modellering van de microbiologische kwaliteit. Men probeert onderzoeksprogramma's beter op elkaar af te stemmen, resultaten beter uitwisselbaar te maken en op de hoogte te blijven van elkaars vorderingen.

Literatuur

- Bratchel, N., Gibson, A.M., Truman, M., Kelly, T.M. & Roberts, T.A., 1989. Predicting microbial growth: The consequences of the quantity of data. *International Journal of Food Microbiology* 8: 47 – 58.
- Stekelenburg, F. & Huis in 't Veld, J.H.J., 1990. De praktische betekenis van voorspellende modellen voor de vleesindustrie. *Vleesdistributie en Vleestechnologie* 25: 48 – 50.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. & van 't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 6: 1875 – 1881.
- Zwietering, M.H., Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C. & van 't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth as function of temperature. Aangeboden aan: *Applied and Environmental Microbiology*.

Ontwikkeling van DNA-probes voor de detectie van micro-organismen in de voedingsmiddelenmicrobiologie

H. Hofstra

TNO-Voeding

Inleiding

In een zeer recente publikatie van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene wordt gesproken van een geschat aantal van 4,5 miljoen gevallen van voedselvergiftiging per jaar in ons land (Hoogenboom-Verdegaal & Notermans, 1990). Slechts een 5 % van deze gevallen zijn zo ernstig dat hulp van de huisarts ingeroepen moet worden. Dit betekent echter nog altijd enige honderdduizenden gevallen per jaar. Voor de overige 95 % betekent het waarschijnlijk één of enkele dagen werk- of schoolverzuim. Daarmee zijn voedselvergiftigingen in onze streken na de gewone verkoudheid waarschijnlijk de voornaamste oorzaak van ziekteverzuim.

De ontwikkeling van snellere bepalingmethoden voor de microbiologische kwaliteit van voedingsmiddelen is daarom van belang voor de volksgezondheid. Ook in economisch opzicht is deze ontwikkeling belangrijk, met het oog op kwaliteitsborging en kosten-beheersing bij productie en opslag. Voortdurende bewaking van de microbiologische kwaliteit tijdens de productie kan directe distributie mogelijk maken en maakt controle van het eindproduct grotendeels overbodig. Zulk onderzoek kan in een productieproces worden ingepast in het HACCP-concept ('Hazard Analysis Critical Control Point'). Hierbij worden specifieke risico's in een productielijn gedefinieerd ('hazard analysis') en op de kritische controlepunten worden passende snelle tests toegepast om zo een integrale bewaking van de productieketen te realiseren.

Een aantal snelle tests, gebaseerd op verschillende meetprincipes, leent zich voor toepassing in de voedingsmiddelensector en in het HACCP-concept (Huis in't Veld et al., 1988). Dit zijn bijvoorbeeld conductometrie, impedimetrie en turbidimetrie, die reeds enigermate ingang in routinematige voedselanalyses hebben gevonden. Deze technieken, die berusten op het detecteren van bacteriële groei in een bepaald medium, kunnen slechts in zeer beperkte mate worden toegepast voor de detectie van specifieke bacteriën. Ook bioluminescentie, de meting van bacterieel ATP, geeft in principe geen andere informatie dan een ruw kiemgetal. Een methode die meer en andere informatie geeft, is de 'direct epifluorescence test' (DEFT). In DEFT worden bacteriën direct in het monster behandeld met een fluorescerende stof, die de levende micro-organismen aankleurt. De bacteriën worden vervolgens geteld met

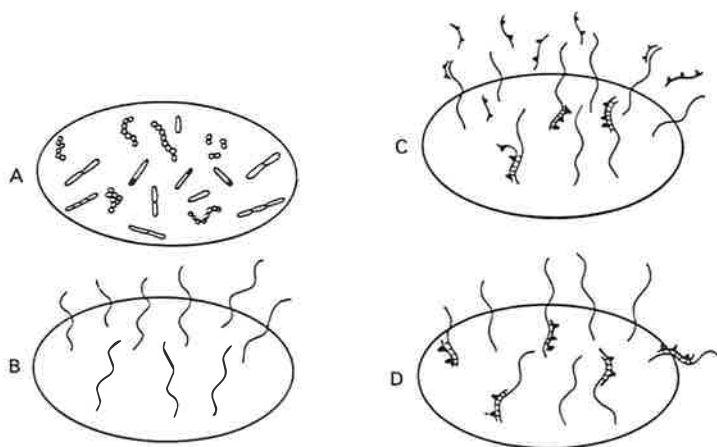
behulp van een fluoresceentiemicroscop. Ook DEFT heeft echter nog een beperkte selectiviteit in de bacteriële analyses.

Daarentegen geven methoden gebaseerd op immunologische principes of op nucleïnezuurhybridisaties de mogelijkheid informatie te verkrijgen op alle gewenste niveaus: van een totaal kiemgetal tot bacteriespecies, subspecies en toxine-vormende of anderszins pathogene virulentietypen. DNA- of RNA- diagnostiek detecteert een micro-organisme op het niveau van de genetische code. Expressie van de genen is daardoor niet nodig, zodat toxine-vormende bacteriën kunnen worden aangetoond ook als het toxine (nog) niet gevormd is. De DNA-hybridisatietechnologie is gebaseerd op de specificiteit van DNA-‘probes’ die zijn geconstrueerd uit het erfelijk materiaal van het micro-organisme dat wordt opgespoord en geïdentificeerd.

Toepassingen van DNA-hybridisatietechnologie

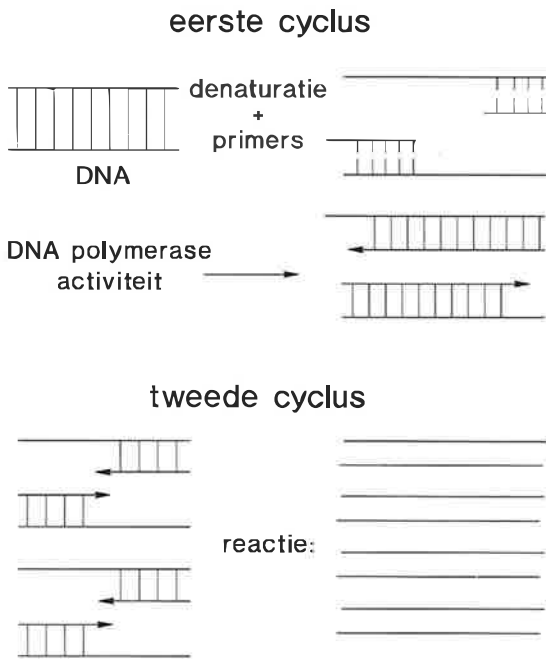
Filterhybridisatie

De meest eenvoudige en tot op heden ook meest gebruikte aanpak is de hybridisatie met een DNA-probe, gelabeld met een radioactieve of niet-radioactieve label. In deze DNA-probetechniek, die de filterhybridisatie- of ‘dot blot’-methode wordt genoemd, worden de bacteriën, of het monster met daarin de bacteriën, op een filter gefixeerd. Na lysis van de bacteriën hecht het DNA zich aan het filter. Vervolgens worden de DNA-‘dots’ behandeld met de gelabelde probes. Als het DNA dat overeenkomt met de probe, op het filter aanwezig is, treedt hybridisatie op en kan de label vervolgens worden aangetoond (figuur 1). In dit type reactie wordt de gevoelig-



Figuur 1. In de filter- of ‘dot blot’-hybridisatietest worden micro-organismen op een filter aangebracht (A). Na lysis van de bacteriën hecht het DNA zich aan de filter (B). Na toevoeging van gelabelde DNA-probes hybridiseren deze met hun complementaire DNA-streng, indien aanwezig (C). Ten slotte kan het gehybridiseerde DNA door middel van de label worden gedetecteerd of gekwantificeerd (D).

heid bepaald door de hoeveelheid bacterieel DNA in het monster en de kwaliteit van de labelingsmethode. De snelheid van de detectie wordt bepaald door de tijd die heengaat met het opkweken of verzamelen van voldoende micro-organismen uit het monster (de monstervoorbereiding). De bepaling zelf kan in ongeveer een dag worden uitgevoerd. Dit is een zeer aanzienlijke bekorting vergeleken met de vier tot zes dagen die een klassieke bepaling voor een micro-organisme vergt. Cruciaal is de monstervoorbewerking. Doordat de voorgekweekte monsters door filtratie op een membraan worden aangebracht, is verstopping van membranen door monster-materiaal een algemeen probleem. Hieronder zal daarop nader worden ingegaan. Bij reingekweekte micro-organismen doen zulke problemen zich niet voor. Daarom is de methode bij uitstek geschikt voor de snelle identificatie van reine bacterieculturen.



Figuur 2. In de polymerase-kettingreactie (PCR) wordt DNA enkelstrengs gemaakt (gedenatureerd) door verhitting. Kleine DNA-probes (primers) worden toegevoegd die op enige afstand van elkaar op de tegenover elkaar liggende strengen hybridiseren. De enzymatische activiteit van een hitte-stabiel DNA-polymerase vult vervolgens de ontbrekende strengen aan vanuit de primers, zodat de oorspronkelijke hoeveelheid specifiek DNA wordt verdubbeld. In de tweede cyclus vindt opnieuw een verdubbeling plaats, enzovoorts.

Amplificatie in vitro

Een toepassing binnen de DNA-hybridisatietechnologie die niet afhankelijk is van de filtreerbaarheid van een monster, is de vermeerdering in vitro van specifieke DNA-fragmenten door middel van de 'polymerase-kettingreactie' ('polymerase chain reaction', PCR; Saiki et al., 1988). In de PCR-techniek wordt het te bepalen DNA-fragment, indien aanwezig, miljoenen malen gekopieerd vanuit twee eindstandige DNA-probes ('primers'; figuur 2). Dit kan het voorkweken van micro-organismen grotendeels overbodig maken. Bovendien geschiedt de vermeerdering in vitro veel sneller dan door kweken, zodat deze bepalingmethode in principe een hoge specificiteit koppelt aan een hoge gevoeligheid en een bepalingduur van uren in plaats van dagen. PCR-diagnostiek is bij TNO-Voeding momenteel in ontwikkeling voor het detecteren van *Salmonella* spp. en *Campylobacter jejuni*.

Okk bij de toepassing van DNA-vermeerdering in vitro is monsterveroerbewerking een belangrijk punt. De methode vereist een zekere minimale zuiverheid van het monster-DNA vóór de start van de PCR. De noodzakelijke monsterveroerbewerking loopt daarom sterk uiteen tussen verschillende matrices. Bij de meeste produkten zal moeten worden voorgekweekt om de micro-organismen van het produkt te scheiden en DNA van voldoende zuiverheid in handen te krijgen. Voorkweken voor PCR geeft bovendien de mogelijkheid levende bacteriën te onderscheiden van 'dood' bacterieel DNA, dat in een produkt aanwezig kan zijn als gevolg van microbiële besmetting van een grondstof. Ondanks de noodzaak van monsterveroerbewerking, lijkt PCR de aangewezen methode voor snelle detectie van micro-organismen.

Tabel 1. Selectie van DNA-probes.

-
1. 'Random' DNA-fragmenten: specificiteit als criterium voor de selectie
Bacteriën zonder groepsspecifieke virulentie-eigenschappen
Salmonella
Campylobacter
 2. Specifieke virulentiefactoren: chromosomaal of plasmide-gecodeerd
Bacteriën met groepsspecifieke virulentie-eigenschappen.
Escherichia coli : enterotoxigeen
Escherichia coli : entero-invasief
Escherichia coli : enterohaemorrhagisch
Yersinia enterocolitica
Shigella spp.
Listeria monocytogenes
 3. Homologe genen: variabele gebieden in geconserveerde genen
Omp-genen en phoE in Enterobacteriaceae
Ribosomaal RNA-genen
RNA-polymerase-subunits enz. in Eubacteria
-

Een bijzondere toepassing van DNA-analyses is de restrictie-enzymanalyse (RE-analyse). Deze methode is gebaseerd op de lengteverschillen tussen de fragmenten die ontstaan door de digestie van DNA met restrictie-endonucleases. Deze enzymen knippen het DNA op plekken die exact worden bepaald door de basenvolgorde. Kleine verschillen, zoals het verwisselen van één enkele base, resulteren al in lengteverschillen bij de fragmenten die ontstaan door RE-digestie. De verschillen in de 'knippatronen' kunnen zichtbaar worden gemaakt door kleuring of door hybridisatie met DNA-probes. Met een DNA-probe kan men zo specifiek kijken naar lengteverschillen bij restrictiefragmenten in het gebied waaruit de DNA-probe afkomstig is. Men spreekt dan van 'restrictiefragmentlengte-polymorfisme'-analyses (RFLP-analyses). De complexiteit van de RFLP-patronen varieert van één band per patroon tot een zeer complexe streepjescode. In dit laatste geval wordt gesproken van DNA-'fingerprinting'.

Door de grote breedte van het toepassingsgebied kunnen RFLP-analyses worden gebruikt voor identificeren van bacteriële geslachten (genera), soorten (species) en ondersoorten (subspecies), maar ook van klonen van genetisch gemodificeerde organismen (GMO's). RFLP-methoden hebben als nadeel dat ze alleen toe te passen zijn op gezuiverd DNA afkomstig uit reingekweekte organismen en dat de analyse tijdrovend is. Daardoor is de methode geen alternatief voor snelle microbiologische detectiemethoden. Door het hoge oplossende vermogen is de techniek echter zeer geschikt voor de epidemiologie van micro-organismen op stamniveau, zoals pathogenen, industriële micro-organismen of GMO's in industriële processen en in het milieu. In het onderzoek naar de risico's van het gebruik van GMO's is deze monitoring-techniek één van de aangewezen benaderingen.

Ontwikkeling van DNA-probes bij TNO-Voeding

De keuze van het DNA dat als probe wordt gebruikt, hangt sterk af van de gewenste specificiteit (tabel 1). Voor detectie op soortniveau kunnen specifieke probes worden geselecteerd uit een bank van 'random'-fragmenten van het totale DNA van het betreffende micro-organisme. Zeker voor bacteriën die geen duidelijke gemeenschappelijke virulentiefactoren bezitten, zoals *Salmonella* en *Campylobacter*, is dit de aangewezen methode. Wanneer een micro-organisme zich wél onderscheidt door

Tabel 2. Specificiteit van probes ontwikkeld uit *Campylobacter*-DNA.

-
1. *Campylobacter jejuni*
 2. *Campylobacter coli*
 3. *Campylobacter jejuni* en *C. coli*
 4. Thermofiele *Campylobacter*-typen
 5. Eubacteria
-

typische virulentie-eigenschappen, is het gebruik van het DNA dat hiervoor codeert, een logische benadering. Dit geldt bijvoorbeeld voor de vele plasmide-gecodeerde virulentie-eigenschappen van *Escherichia coli*. Het aantonen van pathogene *E. coli*-typen met behulp van probes gebaseerd op deze genen is een welkom alternatief voor de conventionele virulentietests met proefdieren of celkweek, die moeizaam, tijdrovend en/of onethisch zijn (Hofstra & Huis in 't Veld, 1988). Een laatste belangrijke bron van probes ligt in de vergelijking van de basenvolgorde van homologe genen in nauw verwante micro-organismen. Homologe genen in verwante bacteriën, bijvoorbeeld de genen voor de buitenmembraaneiwitten in de familie Enterobacteriaceae, hebben gebieden die sterk geconserveerd zijn tijdens de evolutie, terwijl andere gebieden meer variatie vertonen. De variabele gebieden tonen een hoge specificiteit voor het betreffende organisme. Hetzelfde principe is ook van toepassing op ribosomaal RNA. Ook hier worden zeer sterk geconserveerde gebieden afgewisseld door iets meer variabele DNA-volgorde, die als bron voor DNA-probes kunnen worden gebruikt (Giovannoni et al., 1988).

Al deze principes werden ook in dit onderzoek toegepast voor de ontwikkeling van DNA-probes. *Salmonella*-probes werden ontwikkeld uit DNA-fragmenten van verschillende *Salmonella*-typen uit Subgenus I (humaanpathogenen). Een universele *Salmonella*-probe werd geselecteerd en getest door middel van hybridisaties met grote aantallen *Salmonella*-isolaten, andere Enterobacteriaceae en overige micro-organismen. Met deze probe werden tot op heden geen vals-positieve of vals-negatieve resultaten geconstateerd. De nucleotidenvolgorde van deze probe werd volledig opgehelderd. Vervolgens werden, voor de constructie van PCR-‘primers’, geconserveerde gebieden van deze probe in kaart gebracht en vergeleken met de homologe gebieden bij andere *Salmonella*-typen. De nucleotidensequenties van deze gebieden bij verschillende *Salmonella*-typen van subgenus I bleken onderling vrijwel geen verschillen te vertonen. *Salmonella*-typen uit de andere subgenera vertoonden slechts 1 – 3% heterologie. Uit deze fragmenten werden de PCR-primers geselecteerd die nu in het onderzoek ten behoeve van de monstervoorbereiding worden toegepast.

Voor *Campylobacter* werden eveneens probes geselecteerd uit banken met chromosomale DNA-fragmenten uit *C. jejuni* en *C. coli*. Fragmenten uit de banken werden op filters gefixeerd en door hybridisatie met gelabeld DNA van andere *Campylobacter*-soorten geanalyseerd. Fragmenten met de gewenste specificiteit werden verder onderzocht. Er werd speciaal gezocht naar probes die specifiek zijn voor de meest relevante *Campylobacter*-typen: de thermofielen en in het bijzonder *C. jejuni* en *C. coli*. Ook werden probes geselecteerd die met alle thermofielen reageren, of zelfs met alle eubacteriën waarop werd getest (zie tabel 2). Voor het evalueren van de geselecteerde probes werden ze gehybridiseerd met zoveel mogelijk verschillende type-stammen. In deze evaluatie werden met deze probes geen vals-positieve of vals-negatieve resultaten gevonden (van der Plas & Hofstra, 1990).

Van één van de probes werd de nucleotidenvolgorde bepaald. Op basis van deze sequentie werden PCR-primers gesynthetiseerd die werden gebruikt in het onderzoek naar de invoering van PCR-detectie voor *Campylobacter* (van der Plas et al., 1990).

Naast deze probes en primer-sets werden probes ontwikkeld voor de identificatie van de entero-invasieve bacterie *Shigella*. Deze probe detecteert eveneens de entero-invasieve types van *E. coli*. Ook voor enterotoxische *E. coli*-bacteriën zijn probes aanwezig. Ten slotte worden, in samenwerking tussen de Rijksuniversiteit Utrecht en TNO-Voeding, probes ontwikkeld uit de buitenmembraanewit-coderende genen van een aantal bacteriën uit de familie Enterobacteriaceae, zoals *Shigella*, *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella* en *Enterobacter* (Spierings et al., 1989). Deze probes zijn met name geschikt voor een snelle identificatie van reingekweekte micro-organismen, zowel in klinische als in andere analytisch-microbiologische routinelaboratoria.

Toepassing van probedetectie op *Salmonella*

Er zijn een aantal toepassingsgebieden voor DNA-hybridisaties in de routine-voedingsmiddelendiagnostiek. De DNA-hybridisaties op filters worden toegepast na een ophoping en/of een selectieve kweek van het micro-organisme. De voorlopige procedure voor monstervoorbewerking voor *Salmonella* is geënt op de klassieke *Salmonella*-bepaling en bestaat uit de volgende stappen:

- een resuscitatie/voorkweek in gebufferd peptonwater (BPW) van 4–6 uur bij 25°C
- toevoeging van driemaal geconcentreerd Rappaport-Vasiliadis-medium (RV-medium) tot de normale concentratie, gevolgd door selectieve kweek op BPW-RV gedurende de nacht bij 37°C
- ‘dot blot’-hybridisatie met 100 µl uit de voorkweek (6 uur).

De totale bepalingstijd is anderhalf tot twee dagen, exclusief eventuele extra behandelingen tussen voorkweek en analyse om de filtreerbaarheid van de monsters te verbeteren. Als maatregelen om filtratie van de monsters mogelijk te maken, werden onder meer getest:

- a) een voorkweek in compartimenten gescheiden door filters
- b) verdunning van het monster in nutriëntmedium en doorkweken om weer op voldoende hoog niveau te komen
- c) isolatie van bacterieel DNA na de voorkweekprocedure.

Deze tests werden onder meer uitgevoerd met melkpoeder, kipfilet, gehakt en cacaoschroot. In het algemeen gaf voorbehandeling c, een snelle isolatie van het bacterieel DNA, een goed resultaat. Melkpoeder en cacaoschroot gaven echter ook na verlengde voorkweek (b) geen problemen meer.

De resultaten geven aan dat een korte resuscitatie en ophoping, gevolgd door een selectieve kweek gedurende de nacht, in de meeste gevallen voldoende bacteriën oplevert om de aan- of afwezigheid van *Salmonella* met een DNA-probe betrouwbaar aan te tonen. Een algemene conclusie is tevens dat voor vrijwel elk product een eigen voorbehandelingsprocedure zal moeten worden vastgesteld.

De probes werden in deze experimenten gelabeld met een niet-radioactieve label, volgens de voorschriften van de fabrikant (Boehringer). De bereikte detectiegrens kwam op 10^4 tot 10^5 *Salmonella*-bacteriën. Ook wanneer in het beginmonster de verhouding tussen *Salmonella* en andere bacteriën (stoorflora) 1 op 10^4 tot 1 op 10^5 was, werd *Salmonella* in deze procedure zonder veel problemen aangetoond. Als

stoorflora werden in deze experimenten verwante en minder verwante micro-organismen gebruikt, zoals *E. coli*, *Citrobacter freundii* en *Proteus mirabilis*.

Toepassing van de PCR-detectie

De PCR-test draagt de mogelijkheid in zich zeer snel de aan- of afwezigheid van bepaalde bacteriesoorten of virulentietypen te bepalen. Een zeer gering aantal bacteriecellen is voldoende om de reactie te starten. Met reingekweekte *Salmonella enteritidis*, verdund met een fysiologische zoutoplossing, werd met behulp van de huidige PCR-primers voor *Salmonella* een gevoeligheid vastgesteld van 2 – 6 bacteriën per monster van 10 µl. Voor de PCR test voor *Campylobacter* konden met de nu beschikbare primers eveneens minder dan 10 bacteriën per monster worden aangetoond. Het is niet interessant deze detectiegrens verder te verlagen, onder andere omdat het risico van een vals-positief signaal afkomstig van dode cellen of uit de achtergrond bij deze geringe aantallen erg groot wordt.

In de praktijk zullen zelden reingekweekte micro-organismen door middel van PCR worden bepaald. Bekend is dat DNA van onvoldoende zuiverheid PCR kan remmen en dus vals-negatieve resultaten kan veroorzaken. Toepassing van de PCR in de microbiologische routine is daarom een zaak van onderzoek naar de monster-voorbewerking en niet van probe-ontwikkeling. DNA- primers zijn immers reeds beschikbaar voor een redelijk groot aantal bacteriesoorten.

Het toepassingsonderzoek voor de PCR-detectie bij *Salmonella* en *Campylobacter* moet leiden tot een minimale voorbehandeling van verschillende monstermatrices voorafgaand aan de PCR-test. Een norm, zoals die bestaat voor *Salmonella*, van minder dan 1 bacterie per 25 gram monster betekent in de praktijk een benodigd besmettingsniveau van 25 000 kiemen per monster bij de start van de PCR-detectie. Voorkweken van monsters blijft dus noodzakelijk, zeker bij lage besmettingsniveaus. In het algemeen is ook hier een resuscitatie/voorkweek van één nacht voldoende om de gewenste bacteriedichtheid te bereiken.

Verder onderzoek naar minimale voorbehandeling van diverse monsters is nu in gang gezet. Om storing van de PCR voor *Salmonella* door monstercomponenten te meten werden experimenten uitgevoerd met een drietal levensmiddelen (melkpoeder, kip en gehakt), met een grondstof (cacaoschroot) en met kippefaeces. Een verdunningsreeks van een 1:10 suspensie van de monsters werd besmet met 10^4 *Salmonella*-bacteriën. Vervolgens werd de PCR- reactie direct in het (verdunde) monster uitgevoerd. De conclusie uit deze voorlopige screening was dat een 1:10 suspensie van melkpoeder de PCR slechts in geringe mate stoorde. Kippemest en gehakt stoorden in sterkere mate, terwijl kippevlees en cacaoschroot verder moesten worden verdund om storing door monstercomponenten te voorkomen.

Verder onderzoek naar de monstervoorbereiding werd in een meer praktijkgerichte opzet uitgevoerd ten behoeve van de PCR- detectie van *Campylobacter*. Om storing door monstercomponenten in een praktijksituatie te testen, werd een eenvoudige PCR-test voor *Campylobacter* opgezet voor kip. Kipfilets werden kunstmatig besmet vanuit een reine culture van *C. jejuni*. De bacteriën werden, na opslag in de koelkast (30 minuten), met pepton-fysiologisch zout van de filet

afgewassen en vervolgens geteld door uitplaten op selectieve bloedagar en getest met PCR.

De efficiëntie van de spoelmethode voor het reïsoleren van levende bacteriën bleek, indien bepaald door middel van de telplaten, 50 – 75% te bedragen. Directe toepassing van PCR op de spoelvloeistof van de monsters had geen goed resultaat. Blijkbaar komen ook bij relatief simpele methoden, zoals het oppervlakkig spoelen van kippevlees, reeds voldoende storende componenten vrij om directe PCR negatief te beïnvloeden. Ook hier bleek, zoals bij de 'dot blot'-hybridisatie, een snelle DNA-extractie voorafgaand aan de PCR-test de problemen op te lossen.

De PCR-procedure voor *Campylobacter* kon nog betrouwbaarder worden uitgevoerd door een modificatie in de PCR-test zelf aan te brengen. Dit hield in dat een interne standaard aan het reactiemengsel werd toegevoegd, voorafgaand aan de PCR-test. De interne standaard bestaat uit een kunstmatig, specifiek DNA-fragment waarin een knipplaats voor een restrictie-endonuclease is aangebracht. De standaard wordt met dezelfde efficiëntie nagemaakt als het natuurlijke DNA. Na de PCR-test wordt het geamplificeerde DNA met een restrictie-endonuclease behandeld. De verhouding tussen geknipt DNA van de interne standaard en ongeknipt monster-DNA geeft nu een maat voor de oorspronkelijke besmetting van het monster, onafhankelijk van de efficiëntie van de test. Dit geeft de mogelijkheid de invloed van remmende componenten te meten en tegelijkertijd de PCR-test tot een kwantitatieve bepaling te maken.

Slotconclusies

Experimentele toepassing van de nu beschikbare DNA-analyses, van de eenvoudige filterhybridisatie test tot een kwantitatieve PCR-analyse, op een reeks meer of minder toegankelijke monstermaterialen toont aan dat de monstervoorbereiding het cruciale punt is bij de toepassing van deze moderne en snelle DNA-analyses in de voedingsmiddelenmicrobiologie. De benodigde 'gereedschappen', d.w.z. de DNA-probes en de PCR-primers, hebben we nu voor de meest relevante micro-organismen volop ter beschikking, hoewel ook hier de ontwikkeling voortgaat. Dit geldt zeker voor het gebied van de DNA-patroonontwikkeling (RFLP) voor epidemiologische en monitoring-doeleinden van pathogene, industriële of genetisch gemodificeerde micro-organismen.

In het onderzoek naar een snellere en betere monstervoorbereiding zal de nadruk liggen op de ontsluiting van micro-organismen uit de vaak complexe matrices van de monstermaterialen, of op de snelle isolatie van DNA van voldoende zuiverheid uit de voorgekweekte of bewerkte monsters. Daarbij lijkt de 'dot blot' of filterhybridisatie vooral geschikt voor identificatiedoeleinden, namelijk voor de bevestiging van min of meer reine cultures. PCR-bepalingen en de kwantitatieve PCR echter zullen meer geschikt blijken voor de snelle detectie van bacteriën in een veelheid van monsters.

Literatuur

- Giovannoni, S.J., DeLong, E.F., Olsen, G.J. & Pace, N.R., 1988. Phylogenetic group-specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology* 170: 720 – 726.
- Hofstra, H. & Huis in't Veld, J.H.J., 1988. Methods for the detection and isolation of *Escherichia coli* including pathogenic strains. *Journal of Applied Bacteriology (Symposium Supplement)*: 197S – 212S.
- Hofstra, H., ten Bosch, C., Havekes, M., van der Plas, J. & Huis in 't Veld, J., 1990. Monoclonale antilichamen en DNA hybridisatie in de levensmiddelen microbiologie. *Ware(n)chemicus* 20: 67 – 73.
- Hoogenboom-Verdegaal, A.A.M. & Notermans, S.H.W., 1990. Incidentie en onderzoek Voedselvergiftigingen, een nieuwe aanpak. *Food Management*, juli: 25 – 27.
- Huis in't Veld, J., Hartog, B. & Hofstra, H., 1988. Changing perspectives in food microbiology: Implementation of rapid microbiological analyses in food microbiology. *Food Reviews International* 4: 271 – 329.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R.H., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487 – 491.
- Spierings, G., Hofstra, H., Huis in't Veld, J., Hoekstra, W. & Tommassen, J., 1989. Development of *Enterobacterium*-specific oligonucleotide probes based on the surface-exposed regions of outer membrane proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 3250 – 3252.
- Van der Plas, J. & Hofstra, H. Rapid detection and identification of *Campylobacter* species in food using DNA probes. In: *Agricultural biotechnology in focus in the Netherlands*. Pudoc, Wageningen, in druk.
- Van der Plas, J., Timmer, C., van Rijn, J., Huis in 't Veld, J. & Hofstra, H., 1990. Detectie van *Campylobacter* door middel van de polymerase ketting reactie. *Ware(n)chemicus* 20: 60 – 66.

Patroonherkenningstechnieken en de inzichtelijkheid van de biotechnologie

J. van der Greef, S.G.A.F. Angelino en A.C. Tas

TNO-Voeding

De huidige vraagstelling binnen de analytische chemie richt zich niet alleen op uiterst selectieve meting op ultrasporenniveau, maar in steeds belangrijker mate op het karakteriseren en monitoren van complexe (bio)chemische systemen. Deze laatste problematiek vergt juist een brede, weinig selectieve analytische aanpak omdat er a priori geen kennis bestaat van de componenten die betrokken zijn bij de eigenschappen van dergelijke systemen. Voorbeelden van complexe systemen zijn micro-organismen, cellen, voedsel, plantenmaterialen, fossiele bestanddelen, lichaamsvloeistoffen en weefsels. In zijn algemeenheid zijn de bouwstenen van deze mengsels sterk verschillend met betrekking tot hun fysico-chemische eigenschappen. Hierdoor is een aanpak gebaseerd op scheiding van de individuele componenten slechts mogelijk indien er voldoende voorkennis omtrent de probleemstelling aanwezig is.

Karakteriseren van dergelijke systemen door thermische degradatie, aangeduid als pyrolyse, is een alternatief waarbij een grote variatie aan verbindingen tegelijkertijd kan worden gemeten zonder uitgebreide monstervoorbewerking. De pyrolytisch gevormde brokstukken worden bij voorkeur geanalyseerd met een massaspectrometer, waarbij na zachte ionisatie van het pyrolysaat een molecuulgewichtsverdeling wordt gegenereerd. De detectie is zeer gevoelig, terwijl aangetoond is dat door modificatie van de pyrolyse-omstandigheden hoogmoleculaire fragmenten kunnen worden gemeten (Tas et al., 1989). In de studie van Tas et al. is tevens aangegeven dat de te onderzoeken matrix eenvoudigweg kan worden aangebracht op een platina draadje, dat na positionering in de massaspectrometer snel wordt verwarmd, waarna de gevormde producten direct kunnen worden geïoniseerd en gedetecteerd. Als voorbeeld kan worden genoemd de detectie van degradatieproducten van membraanfosfolipiden uit *Salmonella*-bacteriën (Tas et al., 1987), die kunnen worden gebruikt voor de differentiatie van bacteriestammen of voor de analyse van genetisch gemanipuleerde micro-organismen. De gebruikte methode is snel, krachtig en simpel uitvoerbaar.

De beschreven pyrolyse – massaspectrometrietechniek levert een karakteristieke ‘vingerafdruk’ van de geanalyseerde matrix, maar deze vingerafdruk is complex en bevat zeer veel informatie (van der Greef et al., 1986): zo’n duizend kenmerken worden vastgelegd in één enkele meting. Voor het volgen van een proces worden diverse metingen uitgevoerd, en aldus ontstaat er een gegevensbestand dat visueel niet meer te doorgronden is: de kans bestaat dat dan 99 % of meer van de informatie verloren zou gaan! Teneinde inzicht te krijgen in deze complexe systemen is het dus

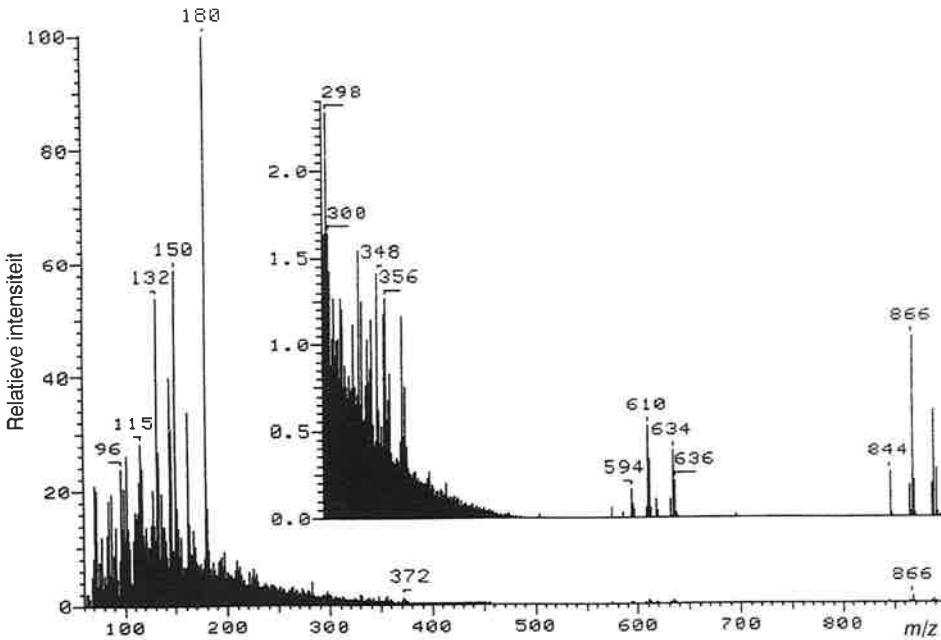
zaak de inzichtelijkheid van de karakteristieke patronen te verbeteren. Hiertoe zijn patroonherkenningstechnieken de aangewezen weg, omdat hiermee een eenvoudige weergave van grote gegevensbestanden mogelijk is met slechts geringe informatie-verliezen. Vele patroonherkenningmethoden berusten op 'display'-technieken waarbij de informatie wordt samengevat in tweedimensionale figuren, zodat het unieke menselijke vermogen om visueel verbanden en onregelmatigheden te detecteren optimaal kan worden benut (Windig et al., 1983). Systematische trends, het bestaan van clusters, het detecteren van uitschieters ('outliers') of het vóór-komen van relevante componenten voor waargenomen effecten zijn in deze aanpak direct zichtbaar.

Bij bestudering van bijvoorbeeld biotechnologische processen kan men via de hierboven beschreven analytische aanpak aanwijzingen verkrijgen over de relevante componenten die tijdens een proces of bij optredende verschillen in eigenschappen een rol spelen. De eenduidige bevestiging van de identiteit van een component is echter niet voldoende; er is nog een extra stap vereist. In het pyrolysaat bevinden zich immers vele componenten en bij het vaststellen dat een bepaalde piek relevant is voor de vraagstelling, is alleen informatie over het molecuulgewicht aanwezig, en bij toepassen van metingen met een hoge resolutie ook nog de elementsamenstelling. Extra structuurinformatie, aangereikt door structuurfragmenten, gaat verloren in het complexe pyrogram. Het toepassen van 'tandem'-massaspectrometrie, twee aan elkaar gekoppelde massaspectrometers, levert deze mogelijkheid wèl. Het principe berust op het selecteren van de interessante component in de eerste massaspectrometer, waarna via interactie met botsingsgas de component uiteenvalt in brokstukken die de structuur onthullen. Vervolgens worden deze brokstukken met de tweede massaspectrometer geanalyseerd. Zo wordt een interferentie-vrij massaspectrum verkregen, waaruit de structuur kan worden afgeleid (Tas et al., 1987).

De analytische strategie bestaat uit een drietal duidelijk te onderscheiden fasen. In fase 1 wordt de vingerafdruk van de matrix met pyrolyse – massaspectrometrie vastgelegd, in fase 2 wordt de gegevensverwerking met patroonherkenning gerealiseerd, terwijl in fase 3 de gedetailleerde structuuropheldering van de belangrijkste componenten plaatsvindt (de Waart et al., in druk).

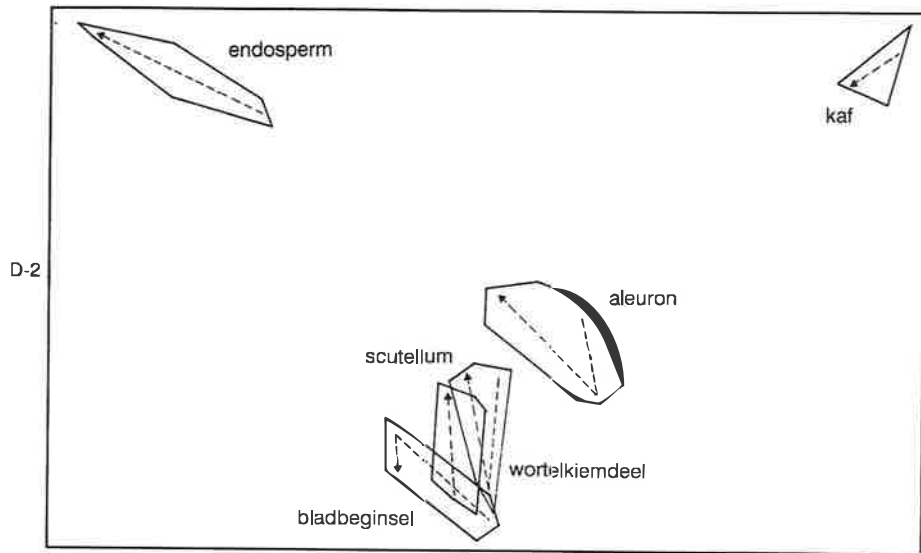
In een recente studie werden de nieuwe analytische mogelijkheden benut om de kenmerken van brouwgerst tijdens het vermouten van twee gerstrassen te bestuderen, waarbij de aandacht in het bijzonder was gericht op de diverse korrelonderdelen. Bij de twee gerstrassen Golf en Triumph werden kaf, aleuron, endosperm, scutellum, wortelkiemdeel en bladbeginsel gemeten vóór het vermoutingsproces, na vier dagen vermouten en na het eesten op dag 7.

Een typische vingerafdruk van het korrelonderdeel scutellum wordt weergegeven in figuur 1. Dit pyrogram geeft de intensiteiten weer van verbindingen met een verschillend molecuulgewicht (X-as). De clusterpieken rond de massa's 840 – 900 zijn opgebouwd uit triglyceriden, de cluster by 570 – 640 bestaat uit diglyceriden en de pieken bij massa (m/z) 180 en 150 tonen de aanwezigheid aan van hexose- en pentose-eenheden. Deze vingerafdruk bevat daarnaast nog honderden andere componenten, hetgeen de complexiteit van de korrelonderdelen onderstreept.

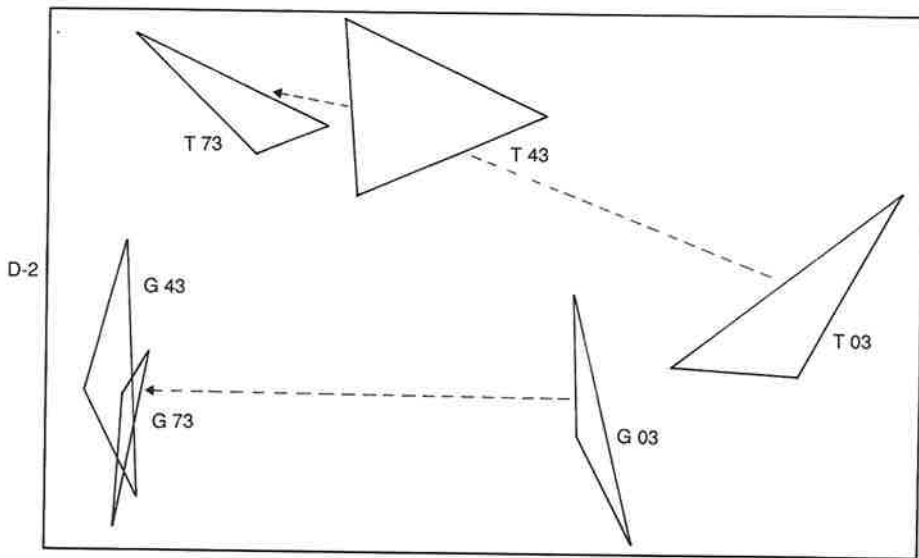


Figuur 1. Vingerafdruk (pyrogram) van het gerstkorrelonderdeel scutellum van het ras Triumph. De x-as geeft in dit experiment de molecuulgewichten van de gevormde componenten weer, de y-as de intensiteiten (concentraties).

Het vermoedingsexperiment levert rond de honderd pyrogrammen op, zodat de toepassing van patroonherkenning – in dit geval de combinatie van principale-componentenanalyse en discriminantanalyse – de enige zinvolle weg voor de gegevensverwerking is. Het resultaat van een dergelijke analyse wordt weergegeven in figuur 2a. Elk spectrum resulteert in een punt in de figuur en de verschillende metingen voor een bepaald korrelonderdeel zijn omlind terwijl met een pijl de trend tijdens het vermoedingsproces is aangegeven. Punten (pyrogrammen) die dicht bijeen liggen lijken sterk op elkaar, terwijl ver uit elkaar gepositioneerde punten duidelijke verschillen vertonen. Het meest duidelijk is dat de verschillen tussen de korrelonderdelen het beeld domineren. Voor het verkrijgen van gedetailleerde informatie over de biochemische veranderingen tijdens het proces moet ingezoomd worden op elk van de individuele korrelonderdelen, hetgeen voor endosperm in figuur 2B is weergegeven. In deze weergave zijn duidelijk de verschillen in begin- en eindstadium tussen de twee gerstrassen te traceren alsmede de verschillen wat betreft het doorlopen van het vermoedingsproces, terwijl de richting van de trend wèl gelijk is. Met name zijn kenmerkende verschillen gevonden in peptidegehalten van beide gerstrassen. Daarnaast werden aanwijzingen verkregen voor verschillen in vertakkingsgraad van het zetmeel.



D-1



D-1

Figuur 2. Het patroonherkenningresultaat van de analyse van de vermouting (aangegeven met een pijl) voor de verschillende korrelonderdelen (omlijnd) (figuur 2A, boven) en voor endosperm alleen (figuur 2B, onder) waarin T en G respectievelijk de gerstrassen Triumph en Golf aanduiden, vóór de vermouting (T 03, G 03), na vier dagen vermouten (T 43, G 43) en na het eesten op dag 7 (T 73, G 73).

Literatuur

- Greef, J. van der, Tas, A.C., Bouwman, J. & ten Noever de Brauw, M.C., 1986. Pattern recognition of complex matrix profiles generated by soft ionization pyrolysis. *Advances in Mass Spectrometry* 10: 1227 – 1228.
- Tas, A.C., de Waart, J., Bouwman, J., ten Noever de Brauw, M.C. & van der Greef, J., 1987. Rapid characterization of *Salmonella* strains with direct chemical ionization pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 11: 329 – 340.
- Tas, A.C., Kerkenaar, A., La Vos, G.F. & van der Greef, J., 1989. Pyrolysis – direct chemical ionization mass spectrometry of some biopolymers in the positive and negative ionization mode. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 15: 55 – 70.
- Waart, J. de, Tas, A.C., La Vos, G.F. & van der Greef, J., Characterization of algae by pyrolysis – direct chemical ionization (tandem) mass spectrometry. *Journal of Applied Pyrolysis* (in druk).
- Windig, W., Haverkamp, J. & Kistemaker, P.G., 1983. Interpretation of sets of pyrolysis mass spectra by discriminant analysis and graphical rotation. *Analytical Chemistry* 55: 81 – 88.