

2614

BIBLIOTHEEK
HOOFDKANTOOR T. N. O.
10 JUNI 1959
S-GRAVENHAGE

DE INVLOED VAN HET KAKEN OP DE RIJPING
VAN GEZOUTEN MAATJESHARING

STELLINGEN

I

Door variaties in de kaakmanipulatie aan te brengen, kan de enzymatische rijping van gezouten maatjesharing beïnvloed worden.

Dit proefschrift, hoofdstuk VI.

II

Het bewijs dat bij de baars de afscheiding van trypsine in het pancreas plaats vindt, is niet door Schlottko geleverd.

E. Schlottko, Z. Fischer u. Hilfswiss. 38 (1940) 1—31.

Dit proefschrift, hoofdstuk VII.

III

Bij de beoordeling van de resterende activiteit van eiwitplitsende enzymen in bestraalde weefsels, dient rekening gehouden te worden met veranderingen die de weefseiwitten tijdens en eventueel na de bestraling kunnen ondergaan.

IV

Tegen de beschouwingen van Earl over de relatie tussen „bond character” en „bond order” zijn bezwaren aan te voeren.

J. C. Earl, Tetrahedron 3 (1958) 353—356.

V

De opvatting als zou de eiwitdenaturatie die in bevroren visweefsel optreedt een specifiek vriesverschijnsel zijn, is vooralsnog onbewezen.

A. F. M. G. Luijpen, Nature 180 (1957) 1422—1423.

VI

De door Milkey gegeven verklaring voor het verschil in doorlaatbaarheid voor infrarode straling van kaliumbromidetabletten die van op verschillende manieren gemalen kaliumbromidepoeder geperst zijn, is aan ernstige bedenkingen onderhevig.

R. G. Milkey, Anal. Chem. 30 (1958) 1931—1933.

VII

De hygiënische bezwaren tegen de voorgestelde toevoeging van tetracyclinen als conserveermiddel aan levensmiddelen, berusten uitsluitend op veronderstellingen.

VIII

Het stellen van microbiologische minimumeisen aan levensmiddelen dient beperkt te worden tot die produkten waarvan aan de consumptie reële risico's verbonden zijn.

F. S. Thatcher, *Food Technology* 12 (1958) 117—122.

IX

Consumptie van zeevis en uit zee afkomstige schaal- en schelpdieren is gecontraïndiceerd voor patienten bij wie organisch gebonden jodium in het bloedserum bepaald moet worden.

X

Wanneer bij de analyse van vismeel voedingsaspecten in het geding zijn, verdient bepaling van het vetzuurgehalte de voorkeur boven gravimetrische vetbepalingen.

A. F. M. G. Luijpen, D. Hooghiemstra—Brasser en A. C. Hindriks, *Fette — Seifen — Anstrichmittel* 60 (1958) 951—953.

XI

Voor het opslaan van de geijsde vangst in viskisten, behoeft de inrichting van de door de Nederlandse visserij gebruikte vaartuigen speciale aanpassingen.

XII

Het gehalte aan trimethylamine is geen norm voor het bederfstadium van ontdooide bevroren vis.

A. F. M. G. Luijpen, *J. Sci. Food Agric.* 9 (1958) 410—417.

XIII

Bij de academische opleiding van levensmiddelentechnologen dient de colloïdchemie een van de belangrijkste plaatsen in te nemen.

XIV

Door de toenemende veronachtzaming van de spraakkunstregels voor het gebruik van leestekens, dreigt de Nederlandse taal aan uitdrukkingmogelijkheid in te boeten.

**DE INVLOED VAN HET KAKEN OP DE
RIJPING VAN GEZOUTEN MAATJESHARING**
**THE INFLUENCE OF GIBBING ON THE RIPENING
OF MAATJES CURED HERRING**

WITH A SUMMARY IN ENGLISH

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE
WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE
UTRECHT, OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
DR. J. JONGBLOED, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER
GENEESKUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DE SENAAT DER
UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACUL-
TEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN OP
MAANDAG 22 JUNI 1959 DES NAMIDDAGS
TE 14.45 UUR PRECIES

DOOR

ANTONIUS FRANCISCUS MAURITIUS GERARDUS LUIJPEN
GEBOREN TE LOENEN AAN DE VECHT

1959

DRUKKERIJ SCHOTANUS & JENS — UTRECHT

PROMOTOR: PROF. DR. H. J. VONK

*Aan de roemrijke nagedachtenis van
Willem Beukelszoon van Bierliet.*

VOORWOORD

Bij het gereed komen van dit proefschrift maak ik gaarne van de gelegenheid gebruik, de Hoogleraren van de Faculteit der Wis- en Natuurkunde en hun medewerkers te danken voor hun bijdrage tot mijn wetenschappelijke vorming. Professor Winkler dank ik voor het onderricht in de microbiologie dat ik van hem mocht ontvangen.

De bezielende scheikundelessen van Ir. Eversmann zijn beslissend geweest voor de keuze van mijn studierichting; de nagedachtenis aan zijn persoonlijkheid zal ik steeds in ere houden. Ook alle anderen die mij op mijn universitaire studie hebben voorbereid, ben ik erkentelijk voor hun inspanning.

De waardering die ik mijn ouders verschuldigd ben voor de blijmoedigheid waarmee zij het mij mogelijk gemaakt hebben te studeren, ook toen dat door de omstandigheden langer duurde dan aanvankelijk voorzien kon worden, laat zich hier moeilijk onder woorden brengen. Het stemt mij tot vreugde dat althans mijn vader de voldoening van de bekroning van mijn studie in goede gezondheid mag beleven.

Bij de bewerking van het onderwerp van deze dissertatie heb ik van ieder op wie ik een beroep deed, veel medewerking en hulp ondervonden. Op deze voor mij zo belangrijke dag wil ik hun gaarne mijn erkentelijkheid betuigen.

Op de eerste plaats geldt dit mijn promotor, Professor Vonk, die zich zo diepgaand heeft willen interesseren voor dit onderzoek. Het heeft mij veel genoegen gedaan dat in het kader van deze studie enige aandacht kon worden besteed aan een onderwerp dat reeds lang zijn bijzondere belangstelling heeft.

Toen het onderzoek werd begonnen, was het huidige Instituut voor Visserijproducten T.N.O. nog een afdeling van het Centraal Instituut voor Voedingsonderzoek T.N.O. Voor de belangstelling die Dr. van Eekelen, destijds directeur van het C.I.V.O. en later voorzitter van de Voedingsorganisatie T.N.O., steeds voor mijn werk heeft getoond, ben ik zeer erkentelijk, evenals voor de gelegenheid die T.N.O. mij gaf, de resultaten in deze vorm te publiceren.

Tijdens gesprekken met Ir. van Mameren is het denkbeeld opgekomen dit onderzoek te ondernemen. Ook bij de uitvoering ervan mocht ik voortdurend profiteren van zijn praktische adviezen. Meer nog dan voor deze directe steun, wens ik mijn waardering uit te spreken voor de vriendschappelijke verstandhouding waarin ik met hem aan het onder zijn leiding staande instituut mag samenwerken.

Een aantrekkelijke bijkomstigheid van het onderwerp van dit proefschrift was, dat het mij in nauw contact bracht met het boeiend bedrijf van de haringvisserij. De noodzaak een deel van het materiaal aan boord op speciale wijze te bewerken, is door de tegemoetkomendheid die ik allerwege ondervond, zonder veel moeite gerealiseerd. De rederijen, schippers en bemanningen van de VO 1 „Willem Beukelszoon“, de KW 135 „Emma Wilhelmina“ en de KW 122 „Arie Ouwehand“ wil ik ook op deze plaats danken voor de gastvrijheid en daadwerkelijke hulp die ik aan boord van hun schepen genoot, of voor hun op andere wijze verleende medewerking aan het onderzoek. Erkentelijkheid voor hun assistentie en respect voor het werk van de visserman zijn er mede aanleiding voor mij toe geweest dit proefschrift op te dragen aan hun aller voorganger de grote haringkaker uit Biervliet, wiens nagedachtenis nochtans bij de verwerking van grote vangsten door velen van zijn nazaten niet steeds met evenveel waardering gememoreerd wordt.

De bereidwilligheid van de Heren Zijlstra en Postuma, mijn belangen met hun eigen onderzoek te combineren, heeft mij materiaal opgeleverd dat op andere wijze niet verkregen had kunnen worden. De weken met hen en andere medewerkers van het Rijksinstituut voor Visserijonderzoek gedurende 1957 en 1958 aan boord van de „Willem Beukelszoon“ doorgebracht, zal ik ook om andere redenen niet licht vergeten.

Dr. Engel en Dr. de Groot gaven mij waardevolle inlichtingen en adviezen toen de eerste enzymproeven mij op een terrein brachten dat ik voordien niet betreden had. Ook hun zij hier dank gebracht.

Bij de bewerking van het proefmateriaal, de uitvoering van de analyses en de verzorging van de tekst van dit proefschrift, is welhaast het gehele personeel van het Instituut voor Visserijprodukten T.N.O. betrokken geweest, zodat ik met een algemeen maar daarom niet minder hartelijk gemeend dankwoord aan hun adres meen te mogen volstaan.

Bij het persklaar maken van het manuscript profiteerde ik dankbaar van de deskundigheid en ervaring van Dr. Gorter.

I wish to express my thanks to Dr. Love from the Torry Research Station at Aberdeen, who was kind enough to correct the English summary for me.

INHOUD

	blz.
ALGEMENE INLEIDING	11
HOOFDSTUK I	
De Nederlandse haringvisserij op de Noordzee en het kaken en zouten van de haring	13
HOOFDSTUK II	
Methoden	20
HOOFDSTUK III	
De verdeling van de eiwitsplitsende enzymen over het lichaam van de haring	26
HOOFDSTUK IV	
De invloed van natriumchloride op de activiteit van de eiwit- splitsende enzymen van de haring	39
HOOFDSTUK V	
Veranderingen in gezouten maatjesharing tijdens bewaring .	53
HOOFDSTUK VI	
De betekenis van de afzonderlijke endopeptidasen voor de rijping van gezouten maatjesharing	61
HOOFDSTUK VII	
De fysiologische betekenis van de appendices pyloricae van vissen	74
SAMENVATTING	84
SUMMARY	87
LITTERATUUR	89

ALGEMENE INLEIDING

Tijdens de bewaring van met zout geconserveerde haring in vaten, veranderen de organoleptische eigenschappen van de verse rauwe vis ingrijpend, tot tenslotte een produkt met geheel andere en specifieke smaak, geur, uiterlijk en consistentie resulteert. Deze veranderingen worden niet als bederfprocessen, doch integendeel als gewenst beschouwd en als rijping betiteld.

Het eerste systematische onderzoek naar de rijping van gezouten haring werd door SCHMIDT-NIELSEN in 1901 gepubliceerd. Hij kwam tot de conclusie dat de rijping een autolyse van haringvlees en haringvet is, veroorzaakt door enzymen die afkomstig zijn uit de cellen van de spieren.

Onze landgenoot LIEBERT bestreed in 1913 deze laatste conclusie van SCHMIDT-NIELSEN en toonde aan dat haring waar de ingewanden bij het kaken geheel uit verwijderd waren, tijdens bewaring in gezouten toestand niet de gewenste organoleptische eigenschappen verkreeg. LIEBERT toonde ook aan dat het uit de ingewanden afkomstige enzym en meer in het bijzonder het eiwitsplitsend enzym van de *appendices pyloricae*, het in oplossing gaan van het haringeiwit in de pekels bevorderde, dat het opgeloste eiwit wanneer het enzym erop ingewerkt had, minder gecoaguleerd werd door koken en dat de enzymactiviteit van de pekels in uitgesproken zuur milieu het kleinst was. Zowel SCHMIDT-NIELSEN als LIEBERT spraken als hun mening uit, dat zo bacteriën al een rol spelen bij de rijping, hun betekenis slechts ondergeschikt is.

In tegenstelling hiermee kwam SHEWAN (1938) tot de conclusie, dat de bacterieflora een belangrijke rol speelt bij de rijping in het vat, in het bijzonder wat het aroma betreft. Bij het vervaardigen van steriele monsters verwijderde hij echter ook steeds de ingewanden. In één serie proeven voegde SHEWAN aan zijn monsters

een extract van maagaanhangsels toe. Slechts *deze* bacterievrije monsters verkregen enigermate het gewenste aroma.

ZAMYSLOV en SAVOST'YANOV (1936)¹⁾ verdedigden de conclusies van SCHMIDT-NIELSEN tegen de opvattingen van LIEBERT en spraken als hun mening uit dat de enzymen van het maag-darmkanaal geen wezenlijke rol spelen bij de afbraak van de eiwitten van het haringvlees, welke proteolyse volgens hen aan de activiteit van eiwitsplitsende enzymen uit het spierweefsel moet worden toegeschreven. Het materiaal waar deze auteurs mee experimenteerden is evenwel niet vergelijkbaar met de haring waar SCHMIDT-NIELSEN en LIEBERT mee werkten, doordat er azijnzuur aan toegevoegd werd. Hierdoor werden lage pH-waarden van 4 tot 5 bereikt, welke in normale rijpende haring nimmer optreden.

Mijn onderzoek bouwt voort op de grondslagen die door het werk van LIEBERT gelegd zijn. Het omvat een onderzoek naar de activiteit en de lokalisering van de eiwitsplitsende enzymen van de haring en naar de veranderingen die de endopeptidasen in gezouten maatjesharing teweeg brengen. Daar bij het haringkaken naar verkiezing een groter of kleiner deel van de ingewanden verwijderd kan worden, heeft men hier een mogelijkheid de enzymen min of meer te doseren en daardoor de rijping te beïnvloeden. Het onderzoek is in het bijzonder op het effect van deze kaakmanipulaties toegespitst. Andere factoren die de snelheid van de rijping beïnvloeden en die men binnen zekere grenzen in de hand heeft, nl. het zoutgehalte en de bewaartemperatuur, werden reeds in een vroeger onderzoek betrokken (LUIJPEN, 1953).

¹⁾ De Heer R. Belz, chem. drs., die dit artikel uit het Russisch vertaalde, dank ik voor zijn medewerking.

HOOFDSTUK I

DE NEDERLANDSE HARINGVISSERIJ OP DE NOORDZEE EN HET KAKEN EN ZOUTEN VAN DE HARING

„..... O, wat een gulden Neeringh!
en voedsel brengt ons toe de Conincklijke Heringh;
hoe menig duysend ziel bij dezen handel leeft
en winnende sijn brood God danck en eere gheeft”.

J. van den Vondel,

Lofsangh op den Scheepsvaart.

De Nederlandse haringvisserij speelt zich bijna geheel in de Noordzee en het Engels Kanaal af. De verplaatsing van de visserij binnen dit gebied hangt samen met de trek van de volwassen haring. Deze trek berust op twee drijfveren, nl. de drang naar steeds dezelfde paaiplaatsen tegen de tijd dat de haring geslachtsrijp is en het zoeken naar een gebied waar ruimschoots voedsel aanwezig is. De paaigrond en het voedselgebied vallen zelden samen. De oorzaak hiervan is, dat voor de twee gebieden geheel andere voorwaarden gelden (ZIJLSTRA, 1957).

Op de voedselgronden is in normale jaren het specifieke haringvoedsel *Calanus* gedurende enkele maanden in grote hoeveelheden aanwezig. Dit is voor de haring van bijzondere betekenis, omdat de vis slechts een korte tijd van het jaar en wel in de maanden mei tot en met juli intensief eet (GRAHAM, 1956). In de periode dat grote hoeveelheden voedsel geconsumeerd worden, neemt het vetgehalte van de vis snel toe. In enkele weken stijgt dit van 5 tot 20 % of meer. Dit vet is de reserve voorraad waar het dier de rest van het jaar op teert. De haring die in dit stadium verkeert wordt *maatjesharing* genoemd. Kenmerkend voor het maatjesstadium is

behalve de aanwezigheid van depôtvet in de spieren en in de buikholte, het geheel of nagenoeg geheel onontwikkeld zijn van de gonaden. Normaliter worden, vergeleken met de later aangevoerde andere soorten haring, voor de gezouten gekaakte maatjes de hoogste prijzen bedóngen. Voor de Nederlandse visserij liggen de vanggronden voor maatjesharing in het westelijk deel van de Noordzee tussen 60 en 54° N.B.

Gedurende de zomermaanden verplaatst de haringvisserij zich in zuidelijke richting. Naarmate het seizoen vordert, verandert de vangst geleidelijk van samenstelling. Het percentage maatjesharing vermindert en maakt plaats voor *volle haring*. Dit is haring waarvan de gonaden zich ontwikkeld hebben. Vanzelfsprekend wordt ook haring gevangen in alle stadia tussen maatjes en volle haring. Een laatste hoogtepunt in de haringvisserij wordt bereikt tijdens de *Engelse wal*-periode. Deze is afhankelijk van de maanstand en valt tussen eind oktober en begin december. Gedurende deze periode wordt tussen 53 en 51°30' N.B. een zeer goede kwaliteit volle haring gevangen. Na het Engelse wal-seizoen volgt nog de *Kanaalvisserij*, in december in het Engels Kanaal uitgeoefend. De kwaliteit van de haring wordt dan echter snel minder, doordat een groot percentage van de vangst uit *ijle haring* bestaat. Dit is uitgepaaid haring met een laag vetgehalte. Tussen de volle haring en de ijle haring staat de *hom- en kuitzieke haring* welke naam verband houdt met de toestand van de gonaden, die zich in dit stadium ledigen of op het punt staan dit te doen.

Het is wellicht nuttig deze zeer beknopte beschrijving van de beweging van de haringvisserij in de Noordzee niet te beëindigen alvorens op te merken dat de beweging van de vissersvloot niet zonder meer de beweging van de haringscholen volgt. De haring in de Noordzee valt uiteen in een aantal rassen die ieder hun eigen paaigebied en hun eigen trekweg hebben. De volle haring die in het najaar voor de Engelse wal gevangen wordt, is bv. niet van hetzelfde ras als de maatjesharing die in de voorzomer in het noorden gevist wordt (ZIJLSTRA, 1957).

In bovenstaand overzicht werd geen gewag gemaakt van de haringvisserij voor de Hollandse en Zeeuwse kusten. Deze visserij wordt weliswaar in het najaar en gedurende de eerste winter-

maanden bedreven, doch is wat rendement betreft veel minder belangrijk dan de visserij op de op grotere afstand gelegen gronden. Op het eerste gezicht is het daarom verwonderlijk dat juist de haringvisserij van de Nederlanden uit beoefend, gedurende de middeleeuwen ondanks alle moeilijkheden die destijds aan een visserij op zo grote afstand als bv. de Schotse wateren inherent geweest moeten zijn, zo belangrijk is geworden; belangrijk ook wanneer men de resultaten van de Hollandse en Vlaamse haringvisserij beziet in vergelijking met de prestaties van landen die voor deze visserij veel gunstiger gelegen zijn. Het is hier niet de plaats uitvoerig op de oorzaken in te gaan waardoor de Hollandse en ook de Vlaamse (DEGRIJSE, 1944) haringvisserij zulk een voor-aanstaande plaats hebben weten te veroveren. Er zij mee volstaan te constateren dat de erkenning van deze leidende positie zowel in oude (BOCK, 1769) als recente (CUTTING, 1955) literatuur algemeen is.

Van welke doorslaggevende betekenis de hoge vlucht van de Nederlandse haringvisserij geweest is voor de ontwikkeling van de Hollandse en Vlaamse overzeese handel en koopvaardij, mag genoegzaam bekend geacht worden. Nog onlangs werd hier bij de onthulling van een gedenksteen voor Willem Beukelszoon te Biervliet op gewezen (WILLEM BEUKELSZ-*gedenksteen in feestelijke sfeer onthuld*, 1958).

De uitvinding van het haringkaken die aan deze legendarische figuur wordt toegeschreven, is voor de opbloei van de haringvisserij van de Nederlanden van moeilijk te overschatten betekenis geweest.

Op de Nederlandse vissersvaartuigen geschiedt het kaken van de haring onmiddellijk na de vangst. Met een klein mesje worden in een enkele stekende, snijdende en trekkende beweging de kieuwbogen, het hart, de maag, de lever en de galblaas verwijderd; wanneer de bewerking althans correct uitgevoerd wordt. Sommige kakers snijden echter niet diep genoeg. In dat geval blijven de maag en de galblaas in de haring. In enkele gevallen wordt wel de maag verwijderd, doch blijven de kieuwbogen achter. Het verwijderen van de maagaanhangsels (*appendices pyloricae*) die zich aan de darm juist achter de maag bevinden, behoort

echter tot de hoge uitzonderingen. De Hollandse vissers noemen dit orgaan *rezel*. Hetgeen verwijderd wordt draagt de naam *gelletje*; het omvat echter veel meer dan alleen de galblaas, zoals boven reeds beschreven werd. In hoeverre in de dagen van Willem Beukelszoon het kaken overeen kwam met de manipulatie die thans in zwang is, kan moeilijk nagegaan worden. Oude beschrijvingen zijn op dit punt nogal vaag, zoals alles omtrent de precieze uitvoering van het haringzouten zoveel mogelijk in nevelen gehuld werd, om de verkregen voorsprong niet verloren te laten gaan. Een aanknopingspunt geeft echter het voorkomen van gekaakte haringen in het gemeentewapen van De Rijk, waar men bij deze haringen de maagaanhangsels uit de kaakopening ziet hangen (LIEBERT, 1913). Dit wapen dateert van 1607.¹⁾

De betekenis van het kaken voor het tegengaan van het bederf van gezouten haring is zonder meer duidelijk. Tijdens het zouten, hetgeen onmiddellijk na het kaken plaats vindt, vermengt het bloed zich met het vaste zout, waardoor direct pekels gevormd wordt. Doordat de lichaamsholte geopend is kan de pekels zonder meer in deze holte dringen. De haring wordt dus snel zowel van binnen als van buiten uit met een geconcentreerde zoutoplossing omgeven en het zout uit deze oplossing zal aanzienlijk sneller in de spierweefsels van de haring doordringen dan bij niet gekaakte of *gesteurde haring* oftewel *steurharing* het geval is. In het bijzonder wanneer de omgevingstemperatuur hoog is, bederft steurharing van binnen uit.

De consequenties die het kaken voor de rijping van de gezouten haring heeft, liggen minder voor de hand. LIEBERT (1913) heeft aangetoond dat de aanwezigheid van de maagaanhangsels in dit opzicht van bijzonder belang is. De betekenis van het haringkaken voor het rijpingsproces vormt het voornaamste onderwerp van de studie die aan deze dissertatie ten grondslag ligt.

Terloops werd reeds vermeld dat de haring direct na het kaken gezouten wordt. Dit geschiedt door ze in de *warbak* met zout te bestrooien en het geheel met de *warleutel*, een grote houten lepel, goed te mengen, zodat het zout aan alle kanten aan de haring plakt. Wordt dit onderdeel van het proces niet zorgvuldig uitgevoerd, dan

¹⁾ Voor gegevens betreffende de oorsprong van het gemeentewapen van De Rijk dank ik de Secretaris van die gemeente, de Heer D. B. A. Appel.

kan dit resulteren in *klevers*, haringen die zonder zout er tussen, in het vat tegen elkaar aangelegen hebben, waardoor plaatselijk symptomen van bederf merkbaar zijn. Na het warren wordt de haring in houten vaten, de *zeekantjes* gepakt. Dit pakken geschiedt bij de geaakte haring met veel zorg. De haringen worden laag voor laag naast elkaar op de rug liggend gepakt. In opeenvolgende lagen liggen de vissen kruiselings over elkaar. Tussen elk tweetal lagen wordt nog wat zout gestrooid. Vaten steurharing worden minder zorgvuldig gevuld. Men pakt de kantjes meer dan vol, met een kop, omdat de inhoud van het vat tijdens de pekelvorming krimpt. Men laat daarom de kantjes die bv. 's morgens gevuld zijn, nog tot 's avonds aan dek staan. Wanneer de haring dan gezakt is wordt het kantje met het deksel gesloten en in liggende stand in het tonnenruim bewaard.

De hoeveelheid zout waarmee de haring behandeld wordt, hangt af van de soort haring, het al of niet geaakt zijn, de temperatuur in het ruim dat eventueel mechanisch gekoeld wordt, van de vermoedelijke duur van de reis en van de bestemming van het produkt. De volumeverhouding zout : haring varieert van 1 : 18 tot 20 voor zeer licht gezouten maatjesharing, voor zeer spoedige consumptie bestemd, tot 1 : 4,5 tot 5 voor steurharing bestemd voor koelhuisopslag. De netto inhoud van de zeekantjes bedraagt 90 tot 94 kg haring.

Wanneer de haring voor de binnenlandse handel bestemd is, wordt ze dikwijls in de oorspronkelijke kantjes verkocht. Deze worden dan door het spongat bijgepekeld met een min of meer geconcentreerde zoutoplossing, omdat gedeeltelijk droogstaande haring snel bederft en met name sterk aan ransheid onderhevig is. Haring die door deze oorzaak in het vat bedorven is, noemt men *wrakke haring*. Voor export wordt de inhoud van de zeekantjes overgepakt in tonnen met een bruto inhoud van 102 liter. Een goed gepakte ton bevat ca. 100 kg haring. Ook de haring in de tonnen moet geheel met pekels bedekt zijn. Hiervoor gebruikt men de pekels uit de zeekantjes, de *bloedpekels*, zo genoemd ter onderscheiding van de *blanke pekels* die zonder meer een zoutoplossing is en voor het bijpekelen en voor aanvulling van het volume bloedpekels gebruikt wordt.

Van oudsher wordt de haring op de zo juist beschreven wijze behandeld. Slechts het zoutgehalte is voor een groot deel van de vangst aanzienlijk lager geworden sedert snelle schepen met gekoelde ruimen gebruikt worden. Ook de opslag aan de wal in koelhuizen laat een reductie van het zoutgehalte toe. In mechanisch gekoelde visruimen wordt doorgaans een temperatuur rond 0° C gehandhaafd. De temperatuur in haringkoelhuizen is meestal tussen —4 en —6° C. Tijdens langdurige koelhuisopslag verdampt een deel van het water uit de pekel. De vaten worden dan weer bijgevuld. Ook in het koelhuis worden de tonnen liggend bewaard.

Reeds ten dage van Willem Beukelszoon bestonden talrijke plaatselijke en gewestelijke wettelijke bepalingen die moesten verzekeren dat de haring, het zout, de vaten en de wijze van bewerking aan vastgestelde normen zouden voldoen (CUTTING, 1955). Ook ten tijde van de Republiek werden tot dit doel plakkatens en ordonantiën uitgevaardigd en zelfs in internationale verdragen uit die tijd komen bepalingen omtrent kwaliteitsgaranties voor gezouten haring voor (KRANENBURG, 1946). De van overheidswege gecontroleerde en gewaarborgde kwaliteit droeg niet weinig bij tot de gewildheid en de faam van het Hollandse produkt. Nochtans worden in oude kronieken vele rapporten omtrent overtreding van de bepalingen en over grieven van de afnemers vermeld en CUTTING noemt de vermindering van de kwaliteit als één van de oorzaken van de achteruitgang van de Hollandse haringvisserij na het midden van de zeventiende eeuw.

Momenteel is in Nederland de contrôle op de export van gezouten haring geregeld bij de Haringwet van 1927. Aanvankelijk bleef het toezicht op grond van deze wet uitgeoefend, beperkt tot contrôle op de maten en het gewicht van de geëxporteerde vaten haring. Sedert 1951 is het overheidstoezicht, dat in handen is van de Dienst der Nederlandse Haringcontrôle, uitgebreid tot de kwaliteit van het produkt (HEBERS, 1953). Alle haring die de leden van de Reedersvereniging voor de Nederlandsche Haringvisserij aanvoeren, wordt direct na het lossen door de keurmeesters van deze vereniging beoordeeld.

Tenslotte nog een enkel woord over de economische betekenis

van de zoute-haringvisserij en -handel. Volgens KRANENBURG (1946) was de haringvisserij ten tijde van de Republiek een van de voornaamste middelen van bestaan voor het gewest Holland. Op het hoogtepunt van de bloei, omstreeks 1630, bestond de haringvloot uit ongeveer 500 buizen met een bemanning van 14 koppen per schip. De totale aanvoer per jaar zou toen 20.000 last hebben bedragen ofwel $20.000 \times 14 = 280.000$ vaten. (Momenteel is een last haring 17 zeekantjes.) Rond 1600 bedroeg de gemiddelde prijs van een last haring aan de markt te Rotterdam ca. f 85,—. Overigens vertoonde de haringprijs ook in die tijd grote schommelingen. Omstreeks het jaar 1600 bedroeg de bruto besomming van alle Hollandse haringschepen tezamen ruim drie miljoen gulden.

In 1957 werden 756.404 kantjes gezouten haring aangevoerd met een gezamenlijke waarde van 28 miljoen gulden. 49 % hiervan was geakaat en 23 % bestond uit maatjesharing. 72 % van de zoute haring was afkomstig van de drijfnetvisserij die door 161 loggers werd uitgeoefend (PRODUKTSCHAP, 1958). Het aantal opvarenden van deze loggers kan op ca. 2600 koppen geschat worden. De overige 28 % was afkomstig van de trawlvisserij, die behalve haring ook andere vis aanvoert.

HOOFDSTUK II

METHODEN

1. DE BEPALING VAN DE ENDOPEPTIDASEN

De meting van de activiteit van de endopeptidasen werd volgens de methode van ANSON (1939) uitgevoerd. Met deze werkwijze worden niet zoals bij de vroeger veel gebruikte titratiemethoden, de produkten van de splitsing zowel door endopeptidasen als exopeptidasen bepaald, doch uitsluitend de met het fenol-reagens van FOLIN en CIOCALTEU (1927) kleurende afbraakprodukten die in trichloorazijnzuur oplosbaar zijn. Deze methode is dus in hoge mate specifiek voor de meting van de activiteit van de endopeptidasen, terwijl eventueel aanwezige exopeptidasen niet storend werken.

Het substraat hemoglobine werd volgens het voorschrift van ANSON uit runderbloed bereid, in eenheden van 50 ml in een snelvriesapparaat bevroren en bij -30° C bewaard. Korte tijd voor de enzymbepalingen werd het nodige hemoglobine ontdooid en met gedestilleerd water verdund tot een oplossing die 2,5 g per 100 ml bevatte. Aan deze oplossing werd 2,5 mg merthiolaat per 100 ml toegevoegd teneinde de groei van bacteriën gedurende het bewaren van de oplossing en tijdens het incuberen te onderdrukken. Deze hemoglobine-oplossingen kunnen vier weken in de ijskast bewaard worden.

Voor iedere meting werd 4 ml van de hemoglobine-oplossing met 2 ml bufferoplossing en 1 ml van het op passende wijze met gedestilleerd water verdunde enzymextract gedurende één of meerdere uren bij $37,0^{\circ}$ C in een thermostaat geïncubeerd.

Voor het gebied van pH 4 tot pH 8 werden 0,05 M citraat—0,1 M fosfaatbuffers gebruikt voor het instellen van de gewenste pH-waarde. Beneden pH 4 werd hier zoutzuur voor gebruikt en

boven pH 8 natriumhydroxyde. De pH werd steeds juist vóór het incuberen gemeten met behulp van een glaselectrode. Enkele malen werd de pH na het incuberen gecontroleerd. Hierbij bleek dat de pH bij incubaties gedurende maximaal 4 uur bij de mengsels met een pH lager dan 8,0 met niet meer dan 0,2 pH-eenheden verandert. Bij de mengsels met een hogere pH is de verandering onder deze omstandigheden aanzienlijk. Deze bedraagt tot 1,5 pH-eenheden.

De temperatuur in de waterthermostaat was gedurende de incubaties binnen 0,02° C constant.

De duur van de incubatie was afhankelijk van de activiteit van de extracten. Doorgaans bedroeg deze tijd 1 uur, in welk geval in niet afgesloten buizen geïncubeerd werd. Bij langere incubatietijden werden de buizen gesloten om volumeverandering door verdamping en ernstige infectie door micro-organismen uit de lucht te voorkomen.

Na de incubatie werd aan iedere buis 10 ml 5 % trichloorazijnzuuroplossing toegevoegd. Na krachtig schudden werd vervolgens na minstens een half uur gefiltreerd. Aan 5 ml filtraat werd 10 ml 0,5 N natriumhydroxyde toegevoegd en vervolgens onder omzwenken 3 ml van het verdunde fenol-reagens van FOLIN en CIOCALTEU. Na precies 10 minuten werd de extinctie gemeten in een Engel-colorimeter met gebruikmaking van het filter no. 66 (maximale doorlating bij ca. 660 m μ), tegen een blanco bestaande uit een niet geïncubeerd mengsel van substraat, enzymextract en water, op gelijke wijze behandeld als boven beschreven. De keuze van de cuvet hing af van de kleurintensiteit.

Voor exacte bepalingen van de endopeptidase-activiteiten dienen nog correcties aangebracht te worden voor de werking van het enzym op het eiwit dat het enzymextract bevat en voor de splitsing van het hemoglobinesubstraat onder invloed van de enzymen die dit substraat zelf bevat.

Van het aanbrengen van de eerste correctie werd om praktische redenen afgezien, daar dit een verdubbeling van iedere proefserie zou betekenen, terwijl het voor de vergelijkende onderzoeken die in dit proefschrift beschreven worden, niet belangrijk was dat behalve het hemoglobinesubstraat nog een hoeveelheid ander eiwit aanwezig was. Dat de verschillen tussen de splitsing van het hemoglobine en die van hemoglobine + eiwit uit het enzymextract

overigens aanzienlijke waarden kunnen bereiken, werd door SCHORMÜLLER c.s. (1954) aangetoond.

De splitsing die het hemoglobinesubstraat onder invloed van de eigen enzymen ondergaat, bleek zeer gering. Deze splitsing werd bepaald door dit substraat gedurende 24 uur bij verschillende pH-waarden bij 37° C te incuberen en op de boven beschreven wijze de extinctie te meten. In het gebied van pH 1 tot pH 10 bleek de maximale splitsing die na incubatie bij pH 2,9 optrad, gemeten in een 2 cm cuvet, in een extinctie van 0,045 te resulteren. In het geval dat deze splitsing relatief het belangrijkste is, nl. bij de meting van de endopeptidase-activiteit van het spierextract van maatjesharing (fig. 6) voor welke bepaling eveneens 24 uur geincubeerd moest worden, wordt noch de ligging, noch de grootte van het activiteitsmaximum door deze splitsing in enigszins belangrijke mate beïnvloed.

Bij de proeven omtrent de lokalisering van de endopeptidasen en omtrent de invloed van verschillende zoutconcentraties op deze enzymen, werd de endopeptidase-activiteit zonder meer als extinctie uitgedrukt. De endopeptidase-activiteiten die gedurende de verschillende bewaarproeven gemeten zijn, werden niet als extinctie opgegeven, daar de reactiviteit van het fenol-reagens van FOLIN en CIOCALTEU gedurende bewaring langzaam terugloopt. Vergelijkingen van metingen op verschillende tijdstippen worden daardoor onnauwkeurig. In deze gevallen is het noodzakelijk de extinctie via een ijklijn te herleiden tot de concentratie tyrosine die onder de meetomstandigheden dezelfde extinctie oplevert. Dergelijke ijklijnen werden gedurende de tijd dat eenzelfde charge van het reagens gebruikt werd, iedere zes weken opnieuw geconstrueerd.

Het aangeven van de activiteit in tyrosinehoeveelheden impliceert niet dat uitsluitend dit aminozuur met het fenol-reagens van FOLIN en CIOCALTEU gekleurd wordt. In de naam van het reagens komt dit trouwens reeds tot uiting.

2. DE BEPALING VAN DE EXOPEPTIDASEN

Voor de bepaling van de exopeptidase-activiteit werd de methode van GRASSMANN en HEYDE (1929) gekozen. Deze methode is een modificatie van de aminozuurtitratie van WILLSTÄTTER en WALDSCHMIDT-LEITZ (1921) en berust op het principe dat de amino-

groepen van aminozuren, peptiden en eiwitten in 90 % ethanolische oplossing getitreerd kunnen worden. De theorie van deze titratie, uitgaande van de opvatting dat de aminozuren in neutrale oplossing als Zwitterionen aanwezig zijn, werd door RICHARDSON (1934) en NEUBERGER (1934) besproken. Hoewel de diëlectriciteitsconstante in het titratiedium aanzienlijk lager is dan in water, is het effect hiervan op de dissociatie van de aminogroepen niet groot. De pK van de gebruikte indicator, thymolftaleïne, verschuift echter door de toevoeging van alcohol in de richting van hogere alkaliteit, waardoor de aminogroepen praktisch kwantitatief getitreerd worden vóór de indicator omslaat (DAVIS en SMITH, 1955).

De in hoofdstuk III genoemde peptiden werden met behulp van enig natriumhydroxyde opgelost en de pH werd op 7,6 of 6,3 ingesteld. De concentratie van de oplossingen bedroeg 0,1 mMol/ml voor de racematen en 0,05 mMol/ml voor de andere peptiden. 1 ml enzymextract werd met 2 ml van deze substraatoplossingen en 2 ml 1/15 M fosfaatbuffer pH 7,6 of pH 6,3 bij 37,0° C geïncubeerd. Aan de bufferoplossing werd 3 mg merthiolaat per 100 ml toegevoegd. Na beëindiging van de incubatie werd 1 ml van het mengsel met 0,2 N kaliumhydroxyde in 90 % ethanol, op thymolftaleïne als indicator, in duplo getitreerd uit een microburet met schaalverdeling in 0,02 ml. Zodra de indicator omsloeg werd 9 ml absolute ethanol toegevoegd, waarna de titratie werd voortgezet tot duidelijk blauwe kleur. Gedurende de titratie werd een stroom koolzuurvrij stikstofgas door de oplossing geleid. De activiteit werd uitgedrukt als percentage splitsing van het uit de L-vorm bestaande gedeelte van de substraten na aftrekking van de splitsing van de blanco's. Als blanco werd in rekening gebracht het loogverbruik van 1 ml van het niet geïncubeerde enzym-substraatmengsel, verhoogd met het verschil in titratiewaarde na en vóór incubatie van 1 ml van een mengsel van 1 ml enzymextract, 2 ml buffer en 2 ml gedestilleerd water. Voor nauwkeurige bepalingen dient ook nog de splitsing die het substraat tijdens incubatie zonder enzymextract ondergaat, in rekening te worden gebracht. Deze splitsing bleek echter binnen de grenzen van de titratiefout te liggen, hetgeen ongetwijfeld aan de conserverende werking van het merthiolaat toegeschreven moet worden.

Daar de omslag van de indicator niet zeer scherp is en de indi-

cator bovendien reeds begint om te slaan voor de titratie voltooid is, wordt in de literatuur aanbevolen door te titreren tot de kleur van de vloeistof met per 10 ml 2 druppels van een 0,5 % thymolftaleïne-oplossing, gelijk is aan die van 0,0025 M cuprichloride-oplossing. Bij de titraties die in het kader van de in dit proefschrift beschreven onderzoeken werden uitgevoerd, bleek echter dat de kleur van de titratievloeistof nimmer geheel gelijk wordt aan die van de vergelijkingsoplossing. De beste uitkomsten werden tenslotte verkregen door de eerste titratie van een serie te vergelijken met de bovengenoemde cuprichloride-oplossing, en vervolgens de overige titraties uit te voeren met de kleur van de eerste titratie als vergelijking. De erlenmeyer waar de oplossing die als vergelijkingsobject gebruikt wordt in getitreerd is, dient onmiddellijk nadat het doorleiden van koolzuurvrije stikstof beëindigd is, hermetisch gesloten te worden.

Bij titratie van oplossingen met bekend aminozuur- of peptidegehalte bleek de nauwkeurigheid waarmee de „omslag” van de indicator op deze wijze kon worden waargenomen, overeen te komen met een hoeveelheid van 0,02 ml 0,02 N loog. Een verschil in alkaliverbruik na en vóór incubatie van 1 ml 0,02 N loog voor 1 ml van de geïncubeerde vloeistof komt overeen met een splitsing van 100 % van het substraat. De onnauwkeurigheid van de titratie komt dus overeen met een fout van maximaal 2 %. Daar voor iedere bepaling vier verschillende titraties nodig zijn, kan de maximale fout in de einduitkomst 8 % bedragen.

Daar deze grote onnauwkeurigheid moeilijkheden op kan leveren bij de interpretatie van de proefuitkomsten (zie bv. hoofdstuk III, tabel III), werd getracht de nauwkeurigheid van de titratie op te voeren door in plaats van thymolftaleïne, een van de door ELLENBOGEN en BRAND (1955) aanbevolen indicatormengsels te gebruiken en wel gelijke delen 0,1 % fenosafranine in 40 % ethanol en 0,1 % thymolblauw in 95 % ethanol. Met deze mengindicator werden echter geen betere resultaten verkregen dan met thymolftaleïne.

3. DE BEPALING VAN OPGELOSTE STIKSTOF

In de gefiltreerde pekkel werd het stikstofgehalte bepaald volgens de kjeldahl-methode.

4. DE BEPALING VAN TYROSINE

Tyrosine werd met het fenol-reagens van FOLIN en CIOCALTEU (1927) bepaald volgens de niet specifieke colorimetrische methode van WOOD c.s. (1942).

Eerder in dit hoofdstuk werd bij de discussie van de endopeptidasebepaling reeds de betekenis van het met het reagens van FOLIN en CIOCALTEU bepaalde „tyrosinegehalte” uiteengezet.

5. DE BEPALING VAN VLUCHTIGE BASISCHE STIKSTOF EN TRIMETHYLAMINE-STIKSTOF

De bepaling van deze produkten, die bij visbederf ontstaan, vond plaats door micro-diffusie in conwayschalen volgens de methode van BEATTY en GIBBONS (1937). De basen werden uit de vis extraheerd door 10 g vis met ca. 5 g fijn zand en enig water in een mortier aan te wrijven en het geheel kwantitatief in een maatkolf van 50 ml over te brengen waarna 5 ml 25 % trichloorazijnzuur met een pipet toegevoegd werd aan de inhoud van de maatkolf, die vervolgens tot de streep gevuld werd met gedestilleerd water. Na mengen werd na 15 minuten gefiltreerd. In dit filtraat werden de vluchtige basen bepaald volgens het bovengenoemde voorschrift.

6. DE BEPALING VAN HET ZUURGETAL VAN HET VET

Het zuurgetal van het vet werd bepaald door titratie van een in een verhouding 1 + 1 met ethanol gemengd chloroformextract.

7. DE BEPALING VAN NATRIUMCHLORIDE

Het keukenzoutgehalte van de pekels en van de haring werd bepaald volgens de methode van Vollhard, met de door GERRITSMA c.s. (1950) aanbevolen voorbereiding.

8. DE BEPALING VAN HET VOCHTGEHALTE

Het vochtgehalte van de haring werd bepaald door het gehomogeniseerde weefsel, met uitgegloeid zand vermengd, bij 105° C tot constant gewicht te verhitten.

HOOFDSTUK III

DE VERDELING VAN DE EIWITSPLITSENDE ENZYMEN OVER HET LICHAAM VAN DE HARING

1. INLEIDING

Aangezien bij het haringkaken een deel van de ingewanden verwijderd wordt, hetgeen bovendien zoals in hoofdstuk I beschreven werd, niet steeds op uniforme wijze plaats vindt, is het niet slechts van belang te weten welke eiwitsplitsende enzymen in de haring vóórkomen, doch is het ook noodzakelijk gegevens te verzamelen betreffende de plaats in het haringlichaam waar de enzymen gelokaliseerd zijn.

2. DE ENDOPEPTIDASEN VAN DE HARING

2.1. *Litteratuuroverzicht*

Omtrent de endopeptidasen van de haring-ingewanden zijn uit de litteratuur enkele gegevens bekend, die volledig overeenstemmen met de resultaten van onderzoeken over de enzymen van andere vissen (VONK, 1927, 1937, 1941).

STIRLING (1884) toonde in de haringmaag pepsine en in de maagaanhangsels trypsine aan.

ALMY (1926) bepaalde de optimale pH van deze enzymen bij incubatie bij 37,5° C gedurende 1 uur, waarbij hij voor het pepsine fibrine en voor het trypsine gelatine als substraat gebruikte. Het optimum voor pepsine lag onder deze omstandigheden tussen pH 2,5 en 2,85 en voor het trypsine tussen pH 8,5 en 9,5. De activiteit van het pepsine bleek bij pH >4 zeer gering en de trypsine-activiteit was bij pH <6,85 eveneens slechts klein. Haring die op

het ogenblik van de vangst voedsel verteerde, bleek meer trypsine doch minder pepsine te bevatten dan haring met een leeg darmkanaal. De proefopzet van ALMY brengt echter met zich mee, dat het niet uitgesloten is dat een deel van de trypsine-activiteit van de maagaanhangsels op rekening komt van het voedsel van de haring.

De uitkomsten van het onderzoek van BATTLE (1935), die als substraat bij haar proeven met ingewand-extracten het zoöplankton gebruikte dat het natuurlijk voedsel van de haring is, bevestigen evenwel de verschillen in enzymactiviteit die ALMY bij haring met en zonder maag- en darminhoud gevonden had.

Over de endopeptidasen van de haringspieren is praktisch niets bekend. In het bovenvermelde artikel komt ALMY tot de slotsom dat de autolyse van spierweefsel slechts noemenswaard wordt bij aanwezigheid van trypsine.

MESNARD en ROSÉ (1920) vergeleken in het kader van een onderzoek naar de processen die zich afspelen bij de rijping van *nuoc-mam*, een in Zuidoost Azië regionaal zeer geliefd visautolysaat, de peptidase-activiteit van ingewanden en spierweefsel van sardines. In neutraal milieu waren extracten van de ingewanden in staat gelatine en geocoaguleerd kippeneiwit af te breken. Spierextracten misten dit vermogen.

Daar de hier genoemde auteurs zich hebben moeten behelpen met de destijds bekende methoden, waren hun methoden weinig specifiek voor endopeptidasen. Daarom werd besloten in het kader van dit proefschrift een systematisch onderzoek uit te voeren naar de endopeptidasen die in de haring vóórkomen en daarbij met name ook aandacht te besteden aan de lokalisering van deze enzymen.

2.2. Proefopzet

Aan boord van het onderzoekingsvaartuig „Willem Beukelszoon” werden onmiddellijk na de vangst uit maatjesharingen de ingewanden genomen en in gesloten buizen onder 70 % glycerine bij ca. 0° C tot het einde van de reis bewaard. Daar een deel van de haring zich klaarblijkelijk kort voor de vangst gevoed had, bevatten zowel de magen als de darmen van de meeste haringen gedeeltelijk verteerd voedsel. Zowel lege als volle organen werden in het onderzoek betrokken. Aan de wal werden de organen met de glycerine

gehomogeniseerd met behulp van een Ultra Turrax homogenisator Type TP 18/2 en vervolgens gecentrifugeerd. De glycerine-extracten werden zo nodig bewaard bij -5°C .

De activiteit van de verschillende extracten werd over het pH-gebied van 1 tot 12 bepaald volgens de methode van ANSON (1939). De gevolgde werkwijze werd beschreven in hoofdstuk II. Vóór de incubatie werden de met gedestilleerd water verdunde extracten celvrij gecentrifugeerd. De verdunning werd aangepast aan de te verwachten activiteit. In het volgende wordt onder „verdunning” steeds verstaan het aantal delen glycerine + water aan één deel weefsel toegevoegd.

2.3. Uitkomsten

In fig. 1 is het verband tussen de pH en de endopeptidase-activiteit van het extract van een compleet maag-darmkanaal met voedselresten weergegeven. De curve blijkt twee maxima te vertonen, nl. bij pH tussen 2,4 en 2,9 en bij pH tussen 9,2 en 10,7.

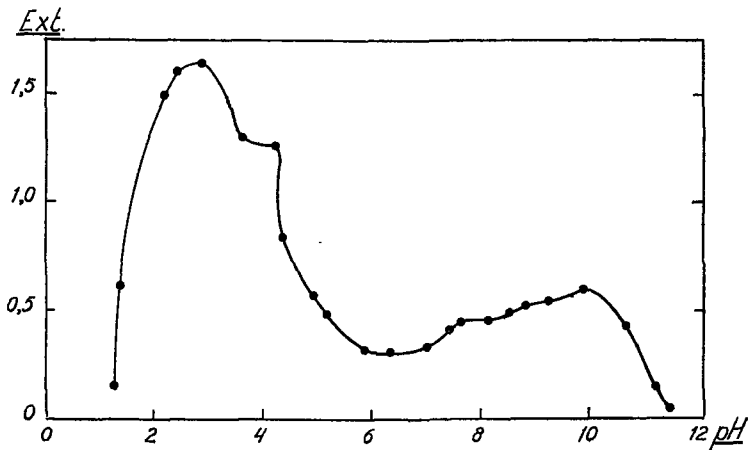


fig 1

De endopeptidase-activiteit van het maag-darmkanaal van
maatjesharing als functie van de pH.

Extract verdund 1 + 6, gedurende 1 uur met hemoglobinesubstraat bij 37°C
geïncubeerd. Extinctie gemeten in 1 cm cuvet

De volgende figuren geven de endopeptidase-activiteit van extracten van afzonderlijke organen en gedeelten van het maag-darmkanaal als functie van de pH. Uit fig. 2 blijkt dat in de maag een enzym met optimale activiteit in het zure pH-gebied aanwezig is. Aangenomen wordt dat dit enzym pepsine is. De optimale pH blijkt tussen 2,7 en 3,1 te liggen. Volgens de figuur is de activiteit van het extract van de volle maag iets kleiner dan die van het extract van de lege maag. Deze uitkomst kan echter niet beschouwd worden als een bevestiging van de eerder in dit hoofdstuk onder 2.1. aangehaalde resultaten van ALMY en van BATTLE, daar nog afgezien van het incidentele karakter van de waarneming, het gevonden activiteitsverschil zeer goed verklaard kan worden uit de geringe nauwkeurigheid waarmee men op zee aan boord van een vaartuig de verhouding van de hoeveelheden orgaan en extractievloeistof kan afmeten. Het afmeten van de hoeveelheid glycerine berust onder die omstandigheden op een schatting van het gewicht aan orgaan. Ook bij de interpretatie van de figuren 3, 4 en 5 dient dit in het oog gehouden te worden.

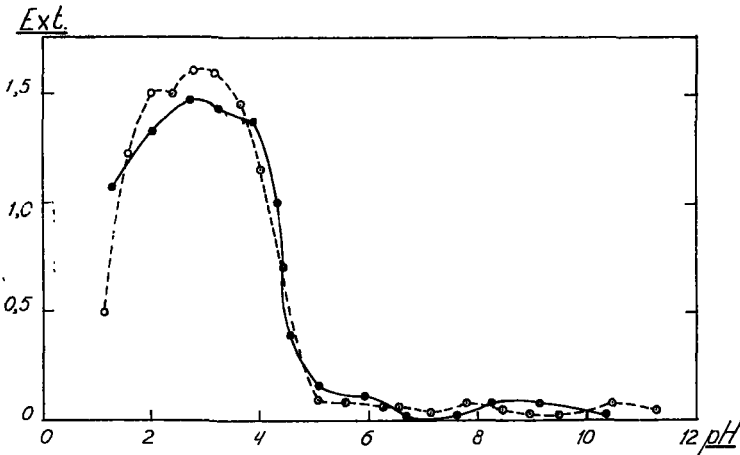


fig. 2

De endopeptidase-activiteit van de maag van maatjesharing als functie van de pH. Extracten verdund 1+9, gedurende 1 uur met hemoglobinesubstraat bij 37° C geïncubeerd. Extinctie gemeten in 1 cm cuvet

- — — — ○ — — — ○ extract van lege maag
- — — — ● — — — ● extract van volle maag

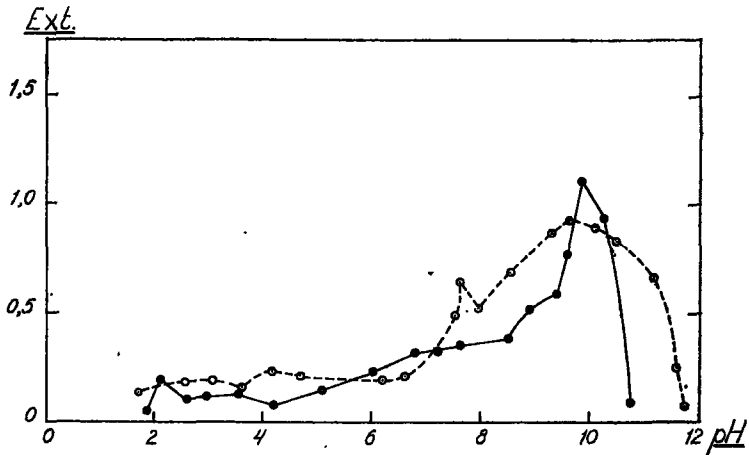


fig. 3

De endopeptidase-activiteit van de maagaanhangsels van maatjesharing als functie van de pH.

Extracten verdund 1+9, gedurende 1 uur met hemoglobinesubstraat bij 37° C geïncubeerd. Extinctie gemeten in 1 cm cuvet

- — — — ○ — — — ○ extract van maagaanhangsels van haring met lege maag
- — — — ● — — — ● extract van maagaanhangsels van haring met volle maag

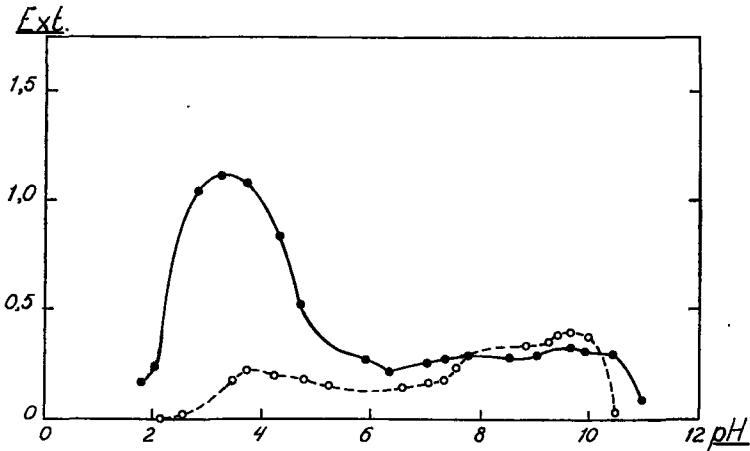


fig. 4

De endopeptidase-activiteit van de dunne darm van maatjesharing als functie van de pH.

Extracten verdund 1+5, gedurende 1 uur met hemoglobinesubstraat bij 37° C geïncubeerd. Extinctie gemeten in 1 cm cuvet

- — — — ○ — — — ○ extract van lege darm
- — — — ● — — — ● extract van zeer volle darm

Uit fig. 3 blijkt dat de pH-waarde waarbij het enzym in de maag-aanhangsels een optimale activiteit heeft, tussen 9,6 en 10,1 gelegen is. Aangenomen wordt dat dit enzym trypsine is. Het verschil tussen de activiteit van het enzym van de maagaanhangsels van haringen met respectievelijk lege en volle maag is te verwaarlozen.

Fig. 4 geeft de endopeptidase-activiteit weer van extracten van het gedeelte van de darm achter de maagaanhangsels, als functie van de pH. In het alkalische pH-gebied is er praktisch geen verschil tussen de activiteit van de extracten uit een lege en een volle darm. In het zure pH-gebied blijkt het extract van de volle darm aanzienlijk actiever te zijn dan dat van de lege darm. Dit verschil is zo groot dat het niet toegeschreven kan worden aan de boven in discussie gebrachte onnauwkeurigheden die inherent zijn aan de proefopzet. De meest aannemelijke verklaring voor het geconstateerde verschil is deze, dat het enzym met optimale activiteit in het zure pH-gebied pepsine is, dat met het voedsel uit de maag is meegevoerd.

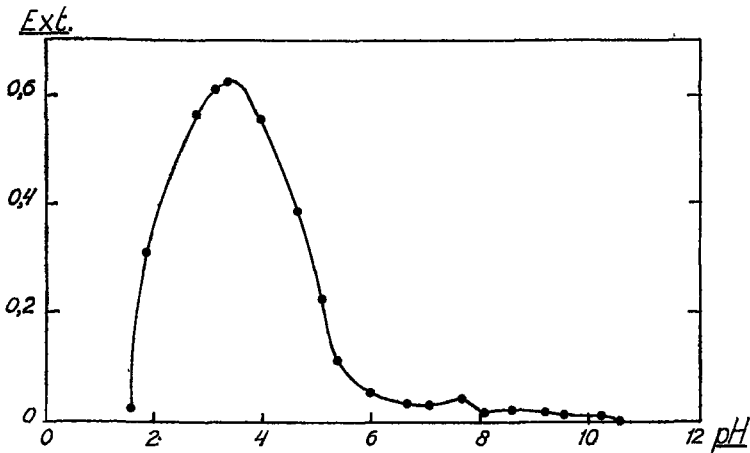


fig. 5

De endopeptidase-activiteit van de lever van maatjesharing als functie van de pH. Extract verdund 1 + 5, gedurende 1 uur met hemoglobinesubstraat bij 37° C geïncubeerd. Extinctie gemeten in 1 cm cuvet

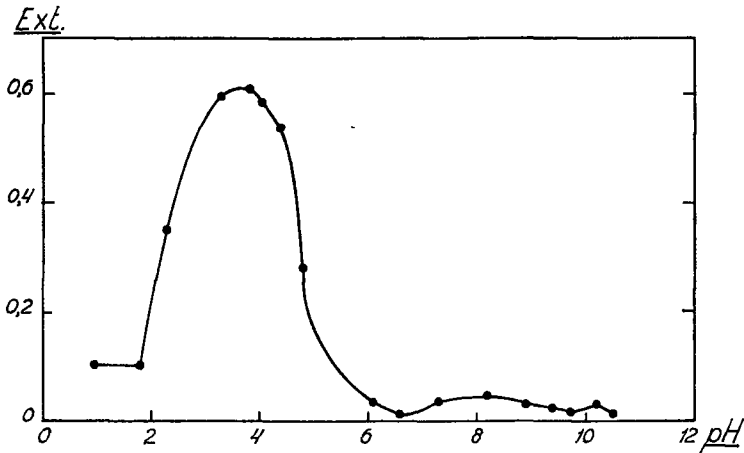


fig. 6

De endopeptidase-activiteit van het spierweefsel van maatjesharing als functie van de pH.

Extract verdund 1 + 3, gedurende 24 uur met hemoglobinesubstraat bij 37° C geïncubeerd. Extinctie gemeten in 1 cm cuvet

De endopeptidase uit de lever heeft volgens fig. 5 een activiteits-optimum bij een pH van ongeveer 3,5. Aangenomen mag worden dat het hier kathepsine betreft.

Uit fig. 6 blijkt dat in het spierweefsel een endopeptidase met activiteits-optimum bij pH tussen 3,3 en 4,0 aanwezig is. Ook dit enzym wordt geacht een kathepsine te zijn.

2.4. Discussie

Bij alle in dit hoofdstuk beschreven experimenten, is de werking van de endopeptidasen op het substraat hemoglobine in het spel. Bij de interpretatie van de resultaten van de proeven moet het voorbehoud gemaakt worden, dat hetgeen voor dit substraat geldt, nog niet het geval behoeft te zijn voor het substraat waar deze enzymen in het produkt gezouten haring op in werken, in casu haringeiwitten. Met name het verband tussen pH en activiteit kan van substraat tot substraat aanzienlijk verschillen (NORTHROP, 1923).

Bij de beschouwing van de figuren 2 t/m 5 dient op de eerste plaats in aanmerking genomen te worden in welke gewichtsverhouding de verschillende organen in het haringlichaam voorkomen. De

gewichtsverhouding lever : aanhangsel : maag : dunne darm is ongeveer als 18 : 9 : 3 : 1, alles gesteld dat de organen geen voedsel bevatten. Het gewicht van het spierweefsel is ongeveer tien maal zo groot als het gezamenlijke gewicht van de juist genoemde ingewanden. Bij de respectieve pH-optima is de pepsine-activiteit dusdanig veel hoger dan de trypsine-activiteit, dat het ondanks het feit dat het gewicht van de maagaanhangsels ongeveer het dubbele is van dat van de maag, te verwachten is dat de totale pepsine-activiteit enkele malen zo groot is als de totale trypsine-activiteit. De uiteindelijke verhouding van deze enzymactiviteiten is uit fig. 1 af te lezen. De op zich zelf reeds geringe trypsine-activiteit van de dunne darm wordt, vergeleken met de trypsine-activiteit van de maagaanhangsels, nog van minder belang in een haring waar beide organen bij het kaken in achterblijven, wanneer men het relatief laag gewicht van de dunne darm ten opzichte van de maagaanhangsels in aanmerking neemt.

Belangrijker dan de activiteitsverhoudingen bij de pH-optima zijn deze verhoudingen bij de pH van de haringpekels. Alle pH-waarden die in de loop van enkele jaren in haringpekels die geen organoleptische afwijkingen vertoonden in ons laboratorium gemeten werden, lagen tussen pH 5,5 en pH 6,9. Uit fig. 1 ziet men dat dit pH-traject samenvalt met het gebied rond het minimum van de curve. In dit pH-gebied is de endopeptidase-activiteit van het gehele maag-darmkanaal echter nog zeer goed aantoonbaar. Bij vergelijking van de figuren 2 en 3 blijkt dat de endopeptidase-activiteit in dit pH-gebied voor het grootste deel van trypsine afkomstig is.

De eigen kathepsine-activiteit van het spierweefsel is bijzonder klein bij de pH van de pekel en lijkt voor de rijping van de haring geheel te verwaarlozen, zolang ingewanden in de haring aanwezig zijn. Hetzelfde geldt voor het leverkathepsine.

3. DE EXOPEPTIDASEN VAN DE HARING

3.1. *Litteratuuroverzicht*

Over de exopeptidasen van de haring konden in de literatuur geen gegevens gevonden worden.

De resultaten van onderzoekingen omtrent de exopeptidasen van de ingewanden van andere vissen (VONK, 1927, 1937, SCHLOTKE

1939, 1940 a, b en c), sluiten geheel aan bij hetgeen van de exopeptidasen van de overige gewervelde dieren bekend is.

Bij hun reeds geciteerde onderzoek over de fabricage van nuocmam stelden MESNARD en ROSÉ (1920) vast, dat het vermogen van ingewand-extract om in neutraal milieu pepton af te breken, ongeveer vijftien maal zo groot was als dat van het enzym uit een gelijke hoeveelheid spierweefsel.

3.2. Proefopzet en uitkomsten

Op grond van de boven aangehaalde resultaten van VONK en van SCHLOTTKE kon verwacht worden dat in de ingewanden dipeptidase, aminopeptidase en carboxypeptidase aanwezig zouden zijn.

De bepaling van deze enzymen vond plaats volgens de modificatie van GRASSMANN en HEYDE (1929) van de methode van WILLSTÄTTER en WALDSCHMIDT-LEITZ (1921). De werkwijze werd beschreven in hoofdstuk II.

Door middel van een voorproef werd nagegaan welke peptiden als substraat voor de exopeptidasebepalingen geschikt waren. Ter beschikking stonden:

Voor de bepaling van dipeptidase:

glycylglycine, DL-leucylglycine en DL-alanylglycine.

Voor de bepaling van aminopeptidase:

DL-leucylglycylglycine en DL-alanylglycylglycine.

Voor de bepaling van carboxypeptidase:

chloor-acetyl-L-tyrosine en benzoylglycylglycine.

Een extract van het volledig maag-darmkanaal van een vers aanvoerde maatjesharing splitste bij 37° C en pH 7,5 het uit de L-vorm bestaande gedeelte van de substraten verhoudingsgewijze als volgt:

Dipeptidase:

glycylglycine 61 DL-leucylglycine 100 DL-alanylglycine 39

Aminopeptidase:

DL-leucylglycylglycine 88 DL-alanylglycylglycine 100

Carboxypeptidase:

chloor-acetyl-L-tyrosine 96 benzoylglycylglycine 100.

Op grond van deze uitkomsten en van overwegingen betreffende de prijs en de beschikbaarheid van de peptiden, werd besloten voor de bepalingen van dipeptidase DL-leucylglycine, voor de bepalingen

van aminopeptidase DL-leucylglycylglycine en voor de bepalingen van carboxypeptidase chloor-acetyl-L-tyrosine te gebruiken.

De organen die voor de bepaling van de exopeptidase-activiteit gebruikt werden, waren evenals het materiaal voor de endopeptidasebepalingen, aan boord van de „Willem Beukelszoon” verzameld en de voorbereiding en extractie vond op de reeds beschreven wijze plaats. De organen bevatten geen voedsel.

Eerst werd de exopeptidase-activiteit van een volledig maag-darmkanaal bepaald. Daar geen enkel aanknopingspunt omtrent de te verwachten grootte van de activiteit van de verschillende exopeptidasen aanwezig was, werd in eerste instantie een vrij geconcentreerd extract (1 + 9) gedurende geruime tijd, nl. 16 uur, geïncubeerd. Onder deze omstandigheden bleek de splitsing van het substraat voor alle drie de exopeptidase-activiteiten ongeveer 100 % te bedragen. De proef werd toen voortgezet met grotere verdunningen van het originele glycerine-extract tot redelijke uitkomsten verkregen werden. De resultaten van deze proef zijn in tabel I bijeengebracht.

TABEL I

Exopeptidase-activiteit van extract van maag-darmkanaal, uitgedrukt als procent splitsing van het substraat, bij 37° C gedurende 16 uur bij verschillende pH geïncubeerd

Enzym	Substraat	Verdunning			
		1 + 9 pH 7,5	1 + 19 pH 7,5	1 + 49 pH 7,5	1 + 99 pH 6,3
dipeptidase	DL-leucylglycine	97		79	36
aminopeptidase	DL-leucylglycylglycine	101		99	62
carboxypeptidase	chloor-acetyl-L-tyrosine	104	85	41	28

Behalve van het maag-darmkanaal werden ook glycerine-extracten van de lever en van de spier bereid, welke vervolgens eveneens op exopeptidase-activiteit onderzocht werden. De uitkomsten zijn in tabel II vermeld.

TABEL II

Exopeptidase-activiteit van extracten van lever en spier, uitgedrukt als procent splitsing van het substraat, bij pH 7,5 en 37° C geïncubeerd gedurende 16 uur

Enzym	Substraat	Verdunning 1 + 9	
		Lever	Spier
dipeptidase	DL-leucylglycine	— 5	16
aminopeptidase	DL-leucylglycylglycine	74	70
carboxypeptidase	chloor-acetyl-L-tyrosine	8	— 7

Tenslotte werd nog een onderzoek ingesteld naar de verdeling van de exopeptidase-activiteit over de verschillende delen van het maag-darmkanaal. Tot dit doel werden extracten gemaakt van magen, maagaanhangsels en dunne darmen. De betrokken organen werden uitsluitend van haring zonder voedselresten in het maag-darmkanaal genomen. In tabel III zijn de resultaten bijgebracht.

TABEL III

Exopeptidase-activiteit van verschillende orgaanextracten uitgedrukt als procent splitsing van het substraat, bij pH 7,5 en 37° C geïncubeerd gedurende 16 uur

Enzym	Substraat	Maag	Aanhangsels	Dunne darm
		Verd. 1 + 9	Verd. 1 + 99	Verd. 1 + 299
dipeptidase	DL-leucylglycine	— 5	7	22
aminopeptidase	DL-leucylglycylglycine	41	21	72
carboxypeptidase	chloor-acetyl-L-tyrosine	5	29	4

3.3. Discussie

In alle onderzochte delen van het haringlichaam werd exopeptidase-activiteit aangetoond. In de lever bleek deze activiteit beperkt te zijn tot die van aminopeptidase. In de spier werd behalve aminopeptidase ook dipeptidase gevonden.

De exopeptidase-activiteit van het maag-darmkanaal blijkt aanzienlijk groter te zijn dan die van de lever en het spierweefsel. Behalve aminopeptidase en dipeptidase is in de ingewanden ook carboxypeptidase aanwezig.

Uit de in tabel III verzamelde uitkomsten kan geconcludeerd worden dat de exopeptidase-activiteit van de maag praktisch be-

perkt is tot aminopeptidase. Het verschil in dipeptidase- en aminopeptidase-activiteit van de maagaanhangsels en de dunne darm is met inachtname van het concentratieverschil van de extracten significant. De dunne darm bevat meer van deze enzymen dan de maagaanhangsels. Het gevonden verschil in carboxypeptidase-activiteit is minder overtuigend dan men bij eerste beschouwing zou vermoeden. De vrij grote in hoofdstuk II besproken onnauwkeurigheid van de exopeptidasebepaling, is hier tezamen met het concentratieverschil van de extracten de oorzaak van. Op grond van hetgeen van andere diersoorten bekend is, lijkt het echter waarschijnlijk dat de carboxypeptidase-activiteit in de maagaanhangsels geconcentreerd is. In hoofdstuk VII wordt bij de bespreking van de enzyminhoud van pancreas en maagaanhangsels van de baars nader op dit onderwerp ingegaan. Het bewijs voor het zojuist gestelde zou voor de haringingewanden gemakkelijk te leveren zijn door vergelijking van de carboxypeptidase-activiteit van extracten van maagaanhangsels en dunne darm die even sterk verdund zijn. Voor deze proef waren echter geen ingewanden meer beschikbaar.

4. CONCLUSIES

De conclusie uit de in dit hoofdstuk beschreven experimenten met endopeptidasen is, dat in de toestand direct na de vangst van de haring, het trypsine de grootste bijdrage zal leveren tot de eiwitsplitsing. Daar het trypsine in hoofdzaak in de maagaanhangsels gelokaliseerd is, zal de aanwezigheid van deze organen na het kaken, van belang zijn voor een snelle rijping.

Deze conclusies gelden onder voorbehoud dat:

1. De splitsing van het substraat hemoglobine door de endopeptidasen uit de haring, een juist beeld geeft van het eiwitsplitsend vermogen van deze enzymen op het substraat haringeiwit.

2. De beïnvloeding van de endopeptidase-activiteit door natriumchlorideconcentraties zoals die in haringpekels voorkomen, voor de verschillende enzymen de activiteitsverhoudingen niet aanzienlijk wijzigt.

3. De snelheden waarmee de endopeptidase-activiteiten als functie van de tijd veranderen, eveneens de onderlinge activiteitsverhoudingen niet verstoren.

Uit de resultaten van de onderzoeken naar de lokalisering van exopeptidasen kan geconcludeerd worden, dat het al of niet verwijderen van de lever en de maag niet van grote invloed zal zijn op de rijping van gezouten maatjesharing, voorzover de betekenis van de exopeptidasen voor deze rijping in het geding is. De maag-aanhangsels die vermoedelijk op grond van hun endopeptidase-inhoud zeer belangrijk zijn voor de rijping, zijn wat hun gehalte aan exopeptidasen betreft waarschijnlijk van veel minder belang. De carboxypeptidase-activiteit wordt echter aanzienlijk verminderd, wanneer de maag-aanhangsels bij het kaken verwijderd worden.

Hoewel de concentratie van dipeptidase en aminopeptidase in de dunne darm het grootst is, staat daar tegenover, dat de gewichts-verhouding tussen de dunne darm en het spierweefsel dat deze enzymen ook bevat, zij het in veel geringere concentratie, dusdanig is dat de totale hoeveelheid van de betrokken enzymen in het spierweefsel een relatief aanzienlijke activiteit bezit ten opzichte van de dipeptidase- en aminopeptidase-activiteit van de dunne darm. Op grond hiervan lijkt de rol die de dunne darm, wat zijn gehalte aan exopeptidasen betreft, bij de rijping zou kunnen spelen, niet bijzonder belangrijk.

Ook hier dient, evenals bij de conclusies omtrent de endopeptidasen het geval was, weer het nodige voorbehoud gemaakt te worden ten aanzien van de invloed van keukenzout en bewaring in zouthoudend milieu op de activiteit en de stabiliteit van de enzymen.

HOOFDSTUK IV

DE INVLOED VAN NATRIUMCHLORIDE OP DE ACTIVITEIT VAN DE EIWITSPLITSENDE ENZYMEN VAN DE HARING

1. INLEIDING

In het vorige hoofdstuk is bij de discussie van de resultaten, in het bijzonder wat betreft de mogelijke betekenis van de verschillende enzymen voor de rijping van de gezouten maatjesharing, het voorbehoud gemaakt dat de aanzienlijke hoeveelheid natriumchloride die in haringpekels voorkomt, de activiteitsverhoudingen van de verschillende enzymen ingrijpend zou kunnen wijzigen. In dit hoofdstuk wordt de invloed van de zoutconcentratie op de activiteit van de enzymen nagegaan. Hierbij heb ik mij echter beperkt tot die enzymen waarvan op grond van de in het vorige hoofdstuk besproken proeven geconcludeerd mag worden dat ze inderdaad voor de rijping van belang zijn.

2. DE ACTIVITEIT VAN DE ENDOPEPTIDASEN BIJ VERSCHILLENDE ZOUTCONCENTRATIES

2.1. *Litteratuuroverzicht*

Boven een zekere optimale concentratie, die echter zo laag ligt dat ze in het kader van deze studie niet van belang is, heeft toevoeging van natriumchloride een remmend effect op het eiwitsplitsend vermogen van de endopeptidasen. LEVITES (1906) onderzocht de invloed van natriumchloride op de splitsing van fibrine en albumine door maagsap van honden. Bij aanwezigheid van 5,8 % zout bedroeg de splitsing van fibrine nog 81,6 % van de hoeveelheid die

zonder zouttoevoeging gesplitst werd. Het effect van hogere concentraties zout op de activiteit van endopeptidasen schijnt niet dikwijls onderzocht te zijn; vermoedelijk omdat het fysiologisch van weinig betekenis is, terwijl bovendien moeilijk uit te maken is of de gemeten remming uitsluitend een gevolg is van de werking van het zout op het enzym. WEISZ (1904) heeft in zijn experimenten met trypsine echter ook hoge zoutconcentraties betrokken. Hij vond dat de splitsing van caseïne door pancreaspoeder bij een concentratie van 10 % natriumchloride 87,3 % en in 20 % zout 65,8 % bedroeg van de splitsing zonder zouttoevoeging.

Omtrent de invloed van natriumchloride op de activiteit van endopeptidasen uit vissen afkomstig, is slechts weinig in de literatuur beschreven.

LIEBERT (1913) toonde aan dat ook na langdurige bewaring het eiwitplitsende enzym in haringpekel nog actief was.

MESNARD en ROSÉ (1920) onderzochten de afname van de totale proteolytische activiteit van de ingewanden van sardines bij toenemende zoutconcentratie. De afbraak van gelatine in neutraal milieu werd gemeten met behulp van formoltitraties. Uitgedrukt als percentage van de activiteit zonder zouttoevoeging vonden zij bij 8 % NaCl 77 %, bij 11 % NaCl 65 %, bij 16 % NaCl 57 % en bij 26 % NaCl 36 % activiteit.

ZAMYSLOV en SAVOST'YANOV (1936) vonden dat toevoeging van 10 tot 15 % zout weinig invloed had op de autolyse van snoekbaarsspierweefsel bij pH tussen 4 en 5, doch dat 20 % zout de proteolyse aanzienlijk remde, terwijl bij zoutconcentraties van 25 tot 30 % de autolyse geheel geremd werd. Wanneer maagaanhangsels toegevoegd werden, was de remming door hoge natriumchlorideconcentraties minder volledig.

2.2. Proefopzet

De proeven die in het volgende beschreven worden, werden ondernomen in een tijd van het jaar dat geen verse maatjesharing beschikbaar was. Als uitgangsmateriaal werden daarom ingewanden gebruikt van verse volle haring. Deze haring bevond zich bij de vangst in hongerende toestand, hetgeen van invloed kan zijn op de totale enzymactiviteit van de ingewanden (ALMY 1926). Het is echter niet aannemelijk dat de activiteit van het aanwezige enzym

op andere wijze door natriumchloride beïnvloed zal worden dan bij maatjesharing het geval is.

De proeven werden beperkt tot die enzymen welke volgens de uitkomsten van hoofdstuk III bij de pH van de pekels een relatief grote activiteit vertonen. Dit is dus op de eerste plaats het trypsine uit de maagaanhangsels en vervolgens ook het pepsine uit de maag. De kathepsinen uit de lever en uit het spierweefsel, waarvan de activiteit onder deze omstandigheden veel geringer is, werden buiten beschouwing gelaten.

Op de gebruikelijke wijze werden van haringmagen en maagaanhangsels afzonderlijk glycerine-extracten gemaakt, welke extracten met gedestilleerd water verdund werden. De verdunning werd ook ditmaal weer aangepast aan de activiteit.

In eerste instantie werd de invloed van het zout op de enzymactiviteit bij de optimale pH van de enzymen onderzocht. Het te incuberen mengsel van enzymextract en hemoglobinesubstraat werd hiertoe met natriumhydroxyde respectievelijk met zoutzuur op pH 9,5 respectievelijk pH 2,7 gebracht. Aan deze mengsels werd de gewenste hoeveelheid vast natriumchloride p.a. toegevoegd. Door toevoeging van gedestilleerd water werd de totale gewichtshoeveelheid vloeistof in alle proefbuizen gelijk gemaakt. Vervolgens werd gedurende 1 uur bij 37 ° C geïncubeerd.

2.3. *Uitkomsten*

Fig. 7 geeft de trypsine- en pepsine-activiteit bij de optimale pH als functie van de zoutconcentratie.

Vervolgens werd deze proef herhaald bij pH 6,1, een pH-waarde die in haringpekels veelvuldig gemeten wordt. De incubatietijd werd aan de activiteit aangepast. Het maagextract werd 24 uur geïncubeerd, het maagaanhangselextract 5 uur. In fig. 8 zijn de uitkomsten van deze proef in beeld gebracht.

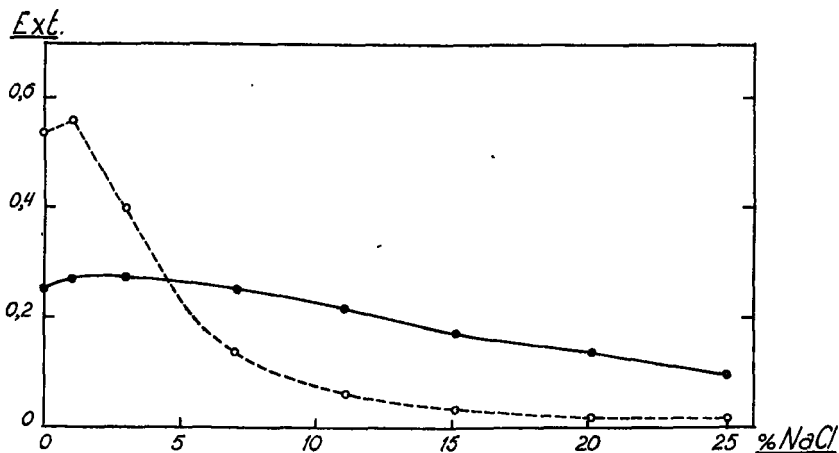


fig. 7

De endopeptidase-activiteit van organen van volle haring als functie van de concentratie NaCl.

Verdunde extracten gedurende 1 uur met hemoglobinesubstraat bij 37° C geïncubeerd. Extinctie gemeten in 1 cm cuvet

- — — ○ — — ○ maagextract verdund 1 + 14, geïncubeerd bij pH 2,7
- — — ● — — ● aanhangseextract verdund 1 + 9, geïncubeerd bij pH 9,5

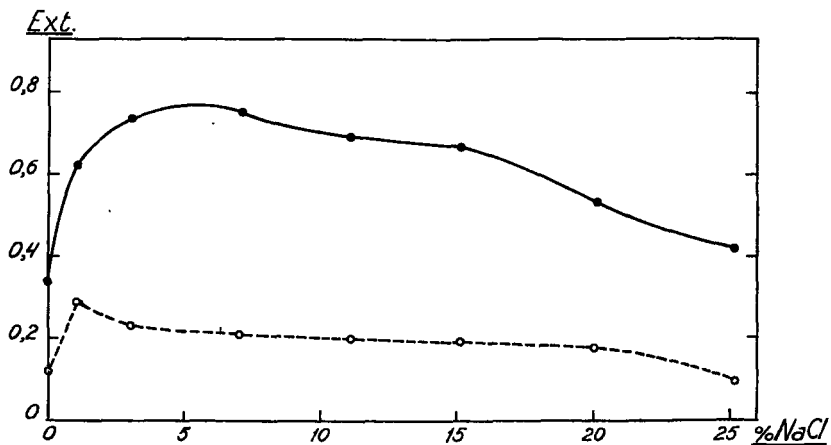


fig. 8

De endopeptidase-activiteit van organen van volle haring als functie van de concentratie NaCl.

Verdunde extracten met hemoglobinesubstraat bij pH 6,1 en 37° C geïncubeerd. Extinctie gemeten in 1 cm cuvet

- — — ○ — — ○ maagextract verdund 1 + 9, gedurende 24 uur geïncubeerd
- — — ● — — ● aanhangseextract verdund 1 + 3, gedurende 5 uur geïncubeerd

2.4. Discussie

Uit fig. 7 is af te leiden dat bij de optimale pH-waarden het pepsine aanzienlijk gevoeliger is voor toenemende zoutconcentraties dan het trypsine. Bij pH 6,1 blijkt volgens fig. 8 de gevoeligheid van het pepsine relatief kleiner te zijn dan bij pH 2,7. Wat het trypsine betreft, kan opgemerkt worden dat de endopeptidase-activiteit bij zoutconcentraties tussen 3 en 7 % optimaal is. Vooral bij pH 6,1 is de activiteit in dit concentratiegebied aanzienlijk hoger dan bij kleinere hoeveelheden natriumchloride het geval is.

Bij het trekken van conclusies uit deze proeven dient echter groot voorbehoud gemaakt te worden. Met de gebruikte methodiek wordt namelijk de resultante gemeten van de werking van de natriumchloride op het enzym en op het substraat. Denaturatie van het enzym zal in geringere activiteit resulteren, denaturatie van het substraat zal zich echter manifesteren als verhoogde enzymactiviteit. Ook de verandering van het iso-elektrisch punt van het substraat als gevolg van de zouttoevoeging kan belangrijke gevolgen hebben, terwijl tenslotte ook de pH nog afhankelijk is van de zoutconcentratie (ABDERHALDEN en FODOR, 1921). Deze verschillende effecten, die elkaar ten dele tegenwerken, zijn met de gebruikte methode niet afzonderlijk te meten.

3. DE VERANDERING VAN DE ENDOPEPTIDASE-ACTIVITEIT IN ZOUTOPLOSSINGEN TIJDENS BEWAREN BIJ LAGE TEMPERATUREN

De zo juist besproken experimenten geven slechts een indruk van de invloed van natriumchloride op de activiteit van de enzymen onmiddellijk na de toevoeging van het zout. Voor een beter begrip van hetgeen zich in een vat rijpende haring afspeelt, is het daarnaast ook van belang enig inzicht te verkrijgen in de snelheid waarmee de endopeptidase-activiteit gedurende de bewaring van haringpekels verandert. Deze verandering zal in het vat afhankelijk zijn van de snelheid waarmee de enzymen uit de organen in de pekel diffunderen en van de snelheid waarmee ze geïnactiveerd worden. De resultante van deze twee elkaar tegenwerkende processen zal in hoofdstuk V besproken worden. Thans wordt echter

nader ingegaan op de snelheid waarmee een eenmaal in een pekkel aanwezige hoeveelheid endopeptidase in activiteit vermindert.

Verwacht mag worden dat deze verandering zal afhangen van de pH van de pekkel, van het zoutgehalte en van de bewaartemperatuur. Bij de volgende proeven werden echter slechts één pH en één zoutconcentratie aangehouden.

3.1. Proefopzet en uitkomsten

Van tien verse maatjesharingen werden de magen en de maag-aanhangsels afzonderlijk verwerkt tot 10 % NaCl bevattende celvrije waterige extracten. De tien magen wogen samen 7 g, de tien aanhangsels 24 g. Het volume van beide extracten werd op 250 ml gebracht. Door gelijke volumedelen van deze extracten bijeen te voegen, werd een mengsel verkregen waarin de concentratie maag- en aanhangseextract de helft was van de overeenkomstige concentraties in de extracten waar het mengsel uit samengesteld was. De pH van alle drie de extracten was 6,8. Toen aan het einde van de bewaartijd de pH-waarden gecontroleerd werden, bleken deze aanzienlijk opgelopen te zijn, namelijk van het maagextract tot pH 8,4, van het aanhangseextract tot pH 8,6 en van het mengsel tot pH 8,8.

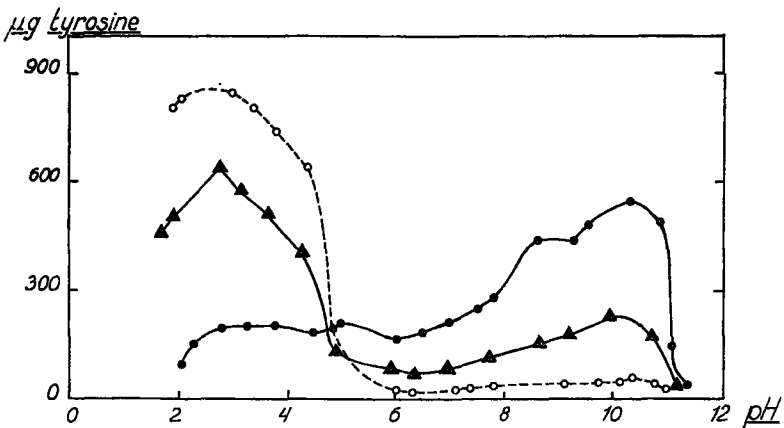


fig. 9

De endopeptidase-activiteit van verse 10 % NaCl bevattende extracten van organen van maatjesharing als functie van de pH.

Activiteit als µg tyrosine door het enzym in 100 mg pekkel bij incubatie gedurende 1 uur bij 37° C uit 100 mg hemoglobine vrij gemaakt

- — — — ○ — — — ○ maagextract
- — — — ● — — — ● aanhangseextract
- ▲ — — — ▲ — — — ▲ maag- + aanhangseextract 1 + 1

Onmiddellijk na de vervaardiging van de extracten werd op de gebruikelijke wijze de endopeptidase-activiteit bepaald in het gebied van pH 1,5 tot pH 11,5. De uitkomsten van deze bepalingen zijn in fig. 9 verwerkt.

De drie extracten werden in een precisiekoelkast bij een temperatuur van $-2 \pm \frac{1}{4}^{\circ}$ C opgeslagen. Tijdens de bewaring werd de endopeptidase-activiteit gemeten bij de pH-optima van het pepsine en het trypsine, respectievelijk pH 2,7 en pH 9,5 en bij pH 6,2. De uitkomsten van de activiteitsbepalingen gedurende de bewaring zijn in de figuren 10 en 11 in beeld gebracht.

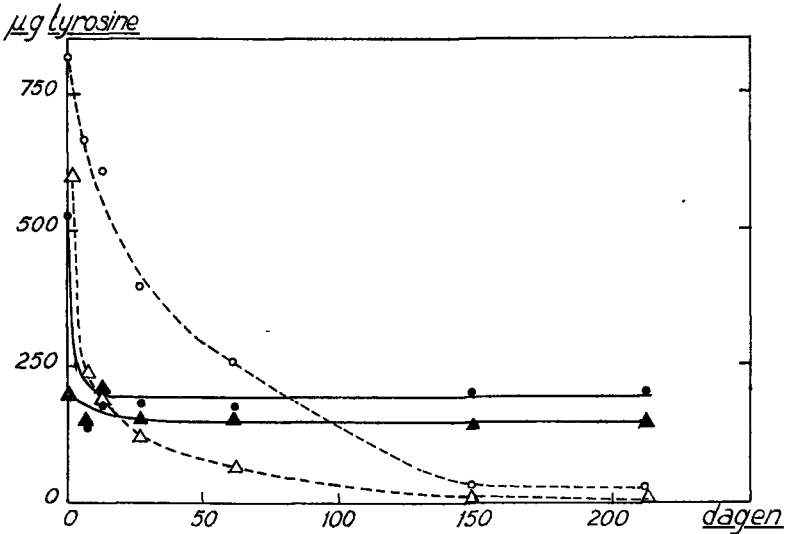


fig. 10

De verandering van de endopeptidase-activiteit van 10% NaCl bevattende extracten van organen van maatjesharing gedurende bewaring bij -2° C.

Activiteit als μ g tyrosine door het enzym in 100 mg pekkel bij incubatie gedurende 1 uur bij 37° C uit 100 mg hemoglobine vrij gemaakt.

pH bij het begin van de bewaring 6,8

- --- ○ --- ○ maagextract, geïncubeerd bij pH 2,7
- △ --- △ --- △ maag- + ahangseextract 1 + 1, geïncubeerd bij pH 2,7
- ▲ --- ▲ --- ▲ maag- + ahangseextract 1 + 1, geïncubeerd bij pH 9,5
- --- ● --- ● aahangseextract, geïncubeerd bij pH 9,5

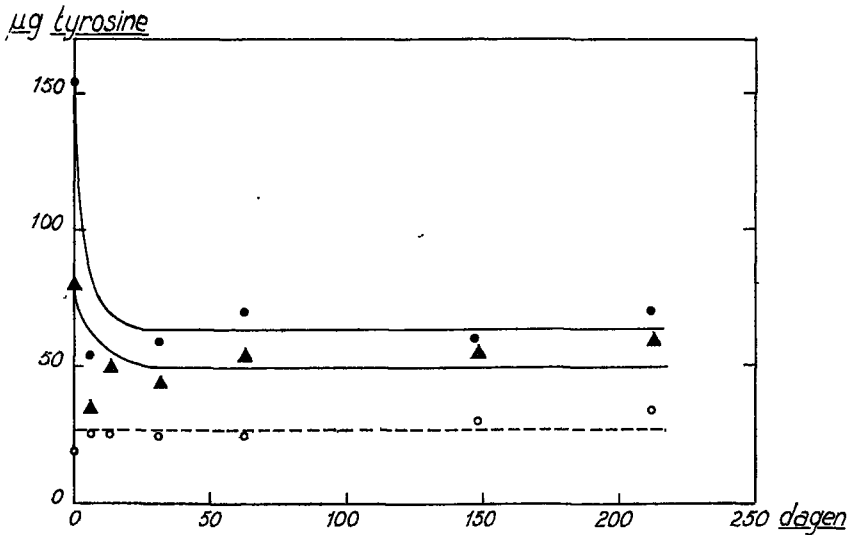


fig. 11

De verandering van de endopeptidase-activiteit van 10% NaCl bevattende extracten van organen van maatjesharing gedurende bewaring bij -2°C . Activiteit als μg tyrosine door het enzym in 100 mg pekels bij incubatie bij pH 6,2 en 37°C gedurende 1 uur uit 100 mg hemoglobine vrij gemaakt

- — — ○ — — ○ maagextract
- ▲ — — ▲ — — ▲ maag- + ahangseextract 1 + 1
- — — ● — — ● ahangseextract

Voor de proef die gegevens zou moeten verschaffen inzake de invloed van de bewaartemperatuur op de snelheid waarmee de endopeptidase geïnactiveerd worden, werd als uitgangsmateriaal een 10% NaCl bevattend celvrij waterig extract van tien magen plus tien maagaanhangsels van verse maatjesharing vervaardigd. De pH van de extracten werd met zoutzuur op 6,2 ingesteld. Bij controle aan het eind van deze proef bleek de pH opgelopen te zijn tot 7,3 in het extract dat bij -5°C bewaard was en tot 7,5 in het bij -2°C bewaarde extract. Het volume van het extract was 250 ml. De helft van dit extract werd bij $-5 \pm \frac{1}{4}^{\circ}\text{C}$ bewaard en de andere helft bij $-2 \pm \frac{1}{4}^{\circ}\text{C}$. Periodiek werd de endopeptidase-activiteit gemeten bij pH 2,7 en pH 9,5. De temperaturen van -5 en -2°C werden gekozen, omdat dit de grenzen zijn waarbinnen de temperatuur in een goed functionerend haringkoelhuis

schommelt. Daar uit de resultaten van voorproeven verwacht kon worden dat dit betrekkelijk kleine temperatuurverschil slechts weinig invloed op de vermindering van de endopeptidase-activiteit zou hebben, werd deze activiteit uitsluitend bij de optimale pH-waarden bepaald, omdat kleine activiteitsverschillen beter onder optimale omstandigheden gemeten kunnen worden dan bij de pH van de haringpekel.

De uitkomsten van deze bewaarproef zijn in tabel IV verzameld.

TABEL IV

Endopeptidase-activiteit van extracten van maag + maagaanhangsels in 10 % NaCl. Activiteit als μg tyrosine bij verschillende pH door het enzym in 100 mg pekel in 1 uur bij 37° C uit 100 mg hemoglobine vrij gemaakt

Bewaartijd Dagen	pH 9,5		pH 2,7	
	-5° C	-2° C	-5° C	-2° C
0	175	175	550	550
5	162	132	468	482
12	141	138	456	399
29	135	135	348	354
61	138	146	326	300
121	122	113	201	147
189	122	111	120	111

3.2. Discussie

Fig. 9 geeft een beeld van de activiteit van de enzymen aan het begin van de bewaring. Daar in het maagextract evenveel magen aanwezig zijn als aanhangsels in het aanhangseextract, geeft de verhouding van de activiteit van deze extracten een aanwijzing inzake de verhouding waarin in haringpekels magen en maagaanhangsels tot de totale endopeptidase-activiteit bijdragen, aangenomen dat al het enzym gelijktijdig of in gelijke verhouding uit de betrokken organen in de pekel zou diffunderen. Uit de uitkomsten blijkt weer dat in het pH-gebied dat voor de praktijk belangrijk is, nl. van pH 5,5 tot pH 6,8, de activiteit van het aanhangseextract duidelijk groter is dan die van het maagextract.

Daar pepsine bij pH 6 en hoger instabiel is, kon verwacht worden dat de pepsine-activiteit van de extracten geleidelijk zou vermindern. Uit fig. 10 blijkt dat deze afname snel plaats vindt, in het

bijzonder in het mengsel van maag- en maagaanhangsextract, waar trypsine in aanwezig is, dat bij pH 5,5 en hoger, het pepsine aantast. Ook de trypsine-activiteit neemt snel af, doch slechts gedurende korte tijd. Uit fig. 11 blijkt dat de constante resterende activiteit van het aanhangsextract ongeveer twee maal zo groot is als die van het maagextract. Hier zou men uit willen concluderen dat niet alleen tijdens het eerste stadium van de rijping, maar ook later, tijdens voortgezette bewaring, het trypsine een grotere rol speelt dan het pepsine. Men dient echter in het oog te houden dat de pH van de extracten tijdens de bewaring is opgelopen tot waarden die veel hoger zijn dan ooit in een haringpekkel gemeten worden en dat bij deze hoge pH de afbraak van het pepsine door het trypsine betrekkelijk sneller verloopt dan bij de pH van haringpekels het geval is. Dit blijkt ook wanneer men de afname van de pepsine-activiteit gedurende de bewaring van de extracten bij verschillende temperatuur in tabel IV hier mee vergelijkt. De pH van deze laatste extracten was gedurende de bewaring weliswaar ook hoger dan de pH van normale haringpekels, doch aanzienlijk lager dan die van het extract waar fig. 11 betrekking op heeft, met als gevolg dat een veel groter deel van de pepsine-activiteit behouden bleef. In hoofdstuk VI zal blijken dat in haringpekels inderdaad en ook bij langdurige bewaring, de pepsine-activiteit lang niet zo sterk afneemt als men wel uit deze modelproef zou willen concluderen. Steeds zal echter de trypsine-activiteit bij pH 6,2 groter blijken te zijn dan de activiteit van het enzym uit de maag. Ook bij aanwezigheid van pepsine zal dus vermoedelijk de door LIEBERT (1913) geponeerde stelling dat het enzym uit de maagaanhangsels voor de rijping verantwoordelijk is, in grote lijnen opgaan, althans voorzover uitsluitend de endopeptidasen in het geding zijn.

De veronderstelling dat de bij pH 6,3 gemeten endopeptidase-activiteit van het maagextract aan pepsine moet worden toegeschreven, blijkt bij nadere beschouwing van de figuren 10 en 11 aan ernstige bedenkingen onderhevig te zijn. Het verloop van de lijn die in fig. 11 de activiteit van het maagextract bij pH 6,2 als functie van de tijd aangeeft, is namelijk geheel anders dan dat van de lijn die in fig. 10 dezelfde functie bij pH 2,7 in beeld brengt. Bij pH 2,7 werd gedurende 150 dagen een regelmatige activiteitsvermindering waargenomen. Bij pH 6,2 is de activiteit van het begin

af constant. Aannemend dat de endopeptidase-activiteit bij pH 2,7 aan het pepsine uit de maag moet worden toegeschreven, blijkt nu dat de op zichzelf reeds geringe endopeptidase-activiteit van het maagextract bij pH 6,2 slechts voor een klein deel door pepsine veroorzaakt wordt. Op den duur wordt de activiteit bij pH 6,2 zelfs iets groter dan die bij pH 2,7.

Het zou onjuist zijn deze bevindingen te interpreteren als een argument voor het aannemen van de aanwezigheid van een door BUCHS (1947) beschreven maagkathepsine, waarvan het bestaan overigens door CREBOLDER C.S. (1951) en GEILENKIRCHEN en ELBERS (1951) bestreden werd. Alle maagextracten waarvan in dit proefschrift sprake is, werden nl. van de gehele maag, dus ook van de spier, vervaardigd. De aanwezigheid van kathepsine in deze extracten is dus zeer goed verklaarbaar en geeft geen aanleiding tot de veronderstelling dat in de haringmaag behalve pepsine een tweede endopeptidase afgescheiden zou worden.

Uit de in tabel IV verzamelde uitkomsten blijkt dat de snelheid waarmee de endopeptidasen geïnactiveerd worden, slechts in geringe mate door temperatuurverschillen beïnvloed wordt. In het bijzonder de afname van de trypsine-activiteit is binnen de grenzen van de proefomstandigheden nauwelijks of in het geheel niet afhankelijk van de bewaartemperatuur.

4. DE ACTIVITEIT VAN DE EXOPEPTIDASEN BIJ VERSCHILLENDE ZOUTCONCENTRATIES

4.1. *Litteratuuroverzicht*

NORTHROP en SIMMS (1929) bepaalden de activiteit van dipeptidase in varkenserepsine in aanwezigheid van natriumchloride. 5,8 % zout bleek de hydrolyse van glycyglycine tot 35 % van de hydrolyse zonder zouttoevoeging te reduceren.

ABDERHALDEN en FODOR (1921) hadden voordien voor dipeptidase uit gist een aanzienlijk grotere activiteit, nl. van 40 tot 60 % bij aanwezigheid van 20 % zout gevonden. Zij toonden echter tevens aan dat de mate waarin keukenzout remmend werkt op de dipeptidase uit gist, zeer sterk afhangt van de colloïdchemische toestand waar het enzym in verkeert.

MESNARD en ROSÉ (1920) bepaalden het peptonsplitsend ver-

mogen van een extract van sardine-ingewanden in neutraal milieu, in aanwezigheid van verschillende concentraties natriumchloride. De splitsing van het substraat werd gemeten door middel van formoltitratie. Uitgedrukt als percentage van de peptonsplitsing zonder NaCl-toevoeging, bedroeg de activiteit bij 8 % NaCl 83 %, bij 11 % NaCl 60 %, bij 16 % NaCl 52% en bij 21 % NaCl 30 %. Deze uitkomsten geven uiteraard geen inlichtingen omtrent de invloed van het zout op de onderscheiden exopeptidasen afzonderlijk.

Andere onderzoeken betreffende de invloed van zout op de exopeptidasen van visingewanden werden niet in de literatuur gevonden.

4.2. *Proefopzet en uitkomsten*

Uit de resultaten van het onderzoek naar de lokalisering van de verschillende enzymen bleek, dat bij het kaken van de haring relatief aanzienlijk kleinere hoeveelheden exopeptidasen dan endopeptidasen verwijderd worden. Dit geldt echter in mindere mate voor de carboxypeptidase dan voor de dipeptidase en de aminopeptidase. Daar het onderwerp van deze studie in het bijzonder de invloed van het kaken op het rijpingsproces is, werd op grond van het boven betoogde besloten, het onderzoek van de exopeptidasen vrij sterk te beperken vergeleken met de aandacht die aan de endopeptidasen besteed werd.

Voor het onderzoek naar de invloed van natriumchloride op de exopeptidase-activiteit, werd hetzelfde glycerine-extract van complete maag-darmkanalen van maatjesharing gebruikt als voor de in hoofdstuk III onder 3.2. beschreven proeven waarvan de uitkomsten in tabel I vermeld werden. Aan het substraat + enzymextract werd de gewenste hoeveelheid vast natriumchloride p.a. toegevoegd. De bepaling van de splitsingsgraad van de als substraat gebruikte synthetische peptiden vond na incuberen bij 37° C gedurende 16 uur, op de gebruikelijke wijze plaats. De uitkomsten van deze proef zijn in tabel V verzameld.

TABEL V

Exopeptidase-activiteit van verschillende verdunningen van een extract van het maag-darmkanaal, uitgedrukt als procent splitsing van het substraat, met verschillende concentraties zout bij pH 7,5 en pH 6,3 gedurende 16 uur bij 37° C geïncubeerd

Sub-straat	Verdunning 1 + 49						Verdunning 1 + 99					
	pH 7,5			pH 6,3			pH 7,5			pH 6,3		
	0	10	20	0	10	20	0	10	20	0	10	20 % NaCl
LG	79	58	-4	36	23	7						
LGG	99	104	41	62	51	16	76	86	18	43	29	7
ChIT	41	32	3	28	26	-5						

LG = DL-leucylglycine (voor de dipeptidase)

LGG = DL-leucylglycylglycine (voor de aminopeptidase)

ChIT = chloor-acetyl-L-tyrosine (voor de carboxypeptidase)

4.3. Discussie

Uit deze uitkomsten blijkt dat bij aanwezigheid van 10 % natriumchloride nog een aanzienlijk deel van de exopeptidase-activiteit behouden blijft. Bij zeer hoge zoutconcentratie verdwijnt de activiteit van dipeptidase en carboxypeptidase geheel of bijna geheel. De aminopeptidase-activiteit wordt minder sterk door toenemende natriumchlorideconcentraties beïnvloed dan de activiteit van de beide andere exopeptidasen. Ook bij de zeer hoge concentratie van 20 % zout blijft de activiteit van de aminopeptidase meetbaar.

De activiteit van de exopeptidasen blijkt bij pH 6,3 aanzienlijk kleiner dan bij pH 7,5.

5. CONCLUSIES

Onder voorbehoud dat modelproeven met hemoglobinesubstraat voldoende representatief zijn voor hetgeen zich in haringpekels afspeelt, kan uit de beschreven onderzoeken afgeleid worden dat in aan natriumchloride verzadigde haringpekels nog een relatief aanzienlijke afbraak van eiwitten door endopeptidasen kan optreden.

Zowel de pepsine- als de trypsine-activiteit nemen tijdens bewaring van pekels bij koelhuistemperaturen aanvankelijk snel af, doch de daarna nog resterende activiteit blijft zeer lang behouden. De

trypsine-activiteit is kwantitatief aanzienlijk belangrijker dan de resterende activiteit van de andere endopeptidasen.

Kleine variaties in de koelhuistemperatuur zullen van weinig invloed zijn op het gehalte aan endopeptidasen van haringpekels.

Met hetzelfde voorbehoud als ten aanzien van de endopeptidasen gemaakt werd, kan vastgesteld worden dat de activiteit van de exopeptidasen sterker door natriumchloride geremd wordt dan de activiteit van de endopeptidasen. Dit geldt echter in mindere mate voor aminopeptidase dan voor dipeptidase en carboxypeptidase.

HOOFDSTUK V

VERANDERINGEN IN GEZOUTEN MAATJESHARING TIJDENS BEWARING

1. INLEIDING

Naarmate de haring langer in het vat gezeten heeft, verandert het produkt van bijna rauwe vis tot sterk gerijpte haring. Zowel in de beide uiterste toestanden als in alle tusseliggende stadia vindt het produkt afnemers, die echter dikwijls een uitgesproken voorkeur hebben voor een bepaald rijpingsstadium. Het is onmogelijk een duidelijke beschrijving van de organoleptisch waarneembare veranderingen te geven, daar de maatjesharing een geheel eigen aroma heeft. In het volgende worden echter enkele termen die in de verslagen van de organoleptische keuringen in dit en in het volgende hoofdstuk voorkomen, iets nader toegelicht.

Maatjesharing die slechts enkele dagen in het vat geweest is, noemt men *groen*. Deze haring heeft nog vele eigenschappen van de niet gezouten vis, hetgeen met name het geval is met de consistentie. Het typische aroma van de gerijpte haring is nog slechts in eerste aanleg aanwezig. Haring die voor verkoop als groene haring bestemd is, wordt zeer licht gezouten en zo snel mogelijk, liefst in gekoelde tonnenruimen aan de wal gebracht. Doordat het produkt slechts zeer licht gezouten is (1 deel zout op 18 tot 20 delen haring), behoeft het zout vóór de consumptie niet uit de haring geëxtraheerd te worden.

Wanneer de haring langer in het vat verblijft, veranderen uiterlijk, geur, smaak en consistentie. Het vlees dat bij de groene haring nog blank en enigszins transparant is, wordt donkerder en ondoorschijnend. De vetlaag die onder de huid aanwezig is, wordt daarentegen tijdens de bewaring juist transparanter.

De geur lijkt aanvankelijk op die van zeewater, doch gaat al snel over in het specifieke maatjesaroma dat zich niet laat omschrijven. Zeer lang bewaarde haring ruikt naar oude kaas en naar ansjovis. De smaak laat zich evenmin als de geur goed omschrijven. Tijdens de rijping ontwikkelt zich de typische maatjesharingsmaak steeds sterker tot deze langzamerhand, evenals de geur, aan zeer oude kaas en ansjovis doet denken. Wanneer tenslotte een zoet element aan de smaak toegevoegd wordt, beschouwt men de haring niet langer als geschikt voor consumptie. Soms treedt ongeveer tegelijkertijd met de zoete smaak ook een bittere bijsmaak op.

De consistentieverandering tijdens de rijping is voor de praktijk zeer belangrijk en vormt vaak het criterium bij de beoordeling van de graad van rijpheid. Liefhebbers van groene of licht gerijpte haring (*nieuwe haring*) vinden in het bijzonder de slapheid van de gerijpte maatjes onaanvaardbaar. De consistentie van groene maatjes wijkt slechts weinig af van die van rauwe haring. Tijdens het rijpingsproces wordt de vis voortdurend slapper en zachter, welk proces tenslotte eindigt met het bijna volledig oplossen van het spierweefsel.

2. DE INVLOED VAN DE TEMPERATUUR OP DE RIJPING VAN DE MAATJESHARING

Uit de praktijk is bekend dat de snelheid waarmee de bovenbeschreven veranderingen plaats vinden, sterk afhankelijk is van het zoutgehalte en de opslagtemperatuur. Het effect van temperatuurverschillen van enkele graden rond 0° C werd in de volgende proef nagegaan.

2.1. Proefopzet

Aan boord van een trawllogger werd op 4 juli een half kantje maatjes op de normale wijze door de bemanning gezaakt en gezouten in een verhouding van 1 volumedeel zout op 10 volumedelen haring. Na het sluiten van het vat werd dit in het gekoelde tonnenruim bewaard tot het einde van de reis op 6 juli. Op 7 juli werd in het laboratorium de inhoud van het vat verdeeld over een aantal conservenblikken. In ieder blik werden drie haringen gepakt en de in het vat aanwezige pekkel werd zo nauwkeurig mogelijk over de blikken verdeeld. Het gemiddeld gewicht van de haringen was 123 g en ieder blik werd bedeed met 40 ml van de originele pekkel.

Teneinde de haring geheel te bedekken werd nog 50 ml 11,0 % NaCl oplossing aan de inhoud van ieder blik toegevoegd. Vervolgens werden de blikken dichtgefelst. Het bleek onvermijdelijk dat hierbij een deel van de pekelen verloren ging. De blikken werden een nacht voorgekoeld in een koelcel bij +1° C en daarna verdeeld over vier precisiekoelkasten, die ingesteld waren op resp. —5, —2, +1 en +4° C. De maximale afwijking van de ingestelde temperatuur van deze kasten is $\frac{1}{4}^{\circ}$ C naar boven en naar beneden.

Voor de organoleptische keuringen en het biochemisch onderzoek werden op gezette tijden uit iedere kast drie blikken genomen. Uit ieder blik werd een haring voor de organoleptische keuring gereserveerd. De overige haringen werden gezamenlijk in een cutter gehomogeniseerd. De pekelen van de drie blikken werd bijeengevoegd en gemengd.

De voor de organoleptische keuring bestemde haring werd op smaak ontzouten en zo spoedig mogelijk na het schoonmaken gekeurd door twee of drie personen die grote ervaring hebben in het beoordelen van gezouten maatjes. De keurders spraken onafhankelijk van elkaar hun oordeel uit over uiterlijk, geur, smaak en consistentie, alsmede over de graad van rijpheid van het produkt. Na iedere keuring werd een gemeenschappelijke conclusie opgesteld, waarbij steeds een hoge mate van overeenstemming bleek te bestaan.

In de pekelen uit de blikken werden de volgende analyses uitgevoerd:

Bepaling van het tyrosinegehalte.

Meting van de pH.

Bepaling van de endopeptidase-activiteit bij pH 9,5.

Bepaling van de endopeptidase-activiteit bij de pH van de pekelen variërend van pH 6,9 tot pH 6,2.

Bepaling van het gehalte natriumchloride.

In de gehomogeniseerde haring werd bepaald:

Het tyrosinegehalte.

Het zoutgehalte.

De zoutbepalingen werden uitgevoerd, omdat bij voorproefjes gebleken was dat bij de beschreven proefopzet enige schommelingen in het zoutgehalte niet te vermijden waren. Deze schommelingen zijn het gevolg van het feit dat de haring in het vat niet geheel regelmatig gezouten is, hetgeen des te meer van invloed is wanneer

de haring slechts kort in het vat geweest is, zoals in het onderhavige geval. Ook het reeds vermelde pekerverlies tijdens het dichtfelsen van de blikken is van invloed. Verschillen in zoutgehalte zijn belangrijk voor de uitkomsten, daar de activiteit van de endopeptidasen afhankelijk is van de zoutconcentratie.

2.2. *Uitkomsten en discussie*

Organoleptische keuring

Bij aankomst in het laboratorium kon de haring reeds niet meer groen genoemd worden. Waarschijnlijk is de koeling van het tonnenruim aan boord in het ongereede geraakt, daar van haring die 1 op 10 gezouten is en bij een temperatuur van even onder 0° C bewaard geweest is, na 3 dagen nog enkele eigenschappen van groene haring verwacht kunnen worden, voor zover men tenminste hier bij de hantering, van het begrip groen van de strikte beperking tot zeer licht gezouten haring af wil zien.

Na 6 dagen was reeds een verschil in rijpheid tussen de bij $+4^{\circ}$ C bewaarde en de overige monsters te constateren.

Na 13 en 24 dagen werd ook weer de bij $+4^{\circ}$ C bewaarde haring door de keurders als de rijpste aangewezen. Tussen de andere drie monsters bleken geen ondubbelzinnig aanwijsbare verschillen te bestaan.

Na 45 dagen wezen de keurders unaniem de bij $+4^{\circ}$ C bewaarde haring als de rijpste en de bij -5° C bewaarde haring als de minst rijpe aan. Bij deze keuring waren alle drie de keurders zeer beslist in hun mening dat het bij -2° C bewaarde monster rijper was dan het bij $+1^{\circ}$ C bewaarde. Later bleek dit te kloppen met de hogere tyrosinewaarde van het bij -2° C bewaarde monster (zie tabel VII).

Bij deze keuringen werd steeds een voortschrijdende rijping waargenomen. Vanwege de reeds besproken sterk uiteenlopende waardering van in verschillende mate gerijpte haring door verschillende consumenten, werd aan de keurders niet gevraagd een subjectieve waardering van de graad van rijpheid te geven. Na 66 dagen evenwel werd de bij $+4^{\circ}$ C bewaarde haring wegens te ver voortgeschreden rijping en begin van bederf onaanvaardbaar voor de consumptie bevonden. De andere monsters werden zonder moeite in volgorde van bewaartemperatuur gezet.

Bij de keuring na 87 dagen was de beoordeling van het monster dat bij + 4 ° C bewaard was, gelijk aan die bij de vorige keuring. Over de rangschikking van de andere monsters bestond verschil van mening. De verschillen in rijpheid werden niet groot geacht.

Na 133 dagen werd ook de bij +1° C bewaarde haring afgekeurd wegens begin van bederf. Het bij —5° C bewaarde monster werd rijper bevonden dan het monster dat bij —2° C bewaard werd, hetgeen weer in overeenstemming is met de hogere tyrosinewaarde van de bij —5° C bewaarde haring.

Bij de volgende keuringen werden de bij +4 en +1° C bewaarde monsters niet meer organoleptisch gekeurd. Na 197 dagen was de bij —2° C bewaarde haring duidelijk rijper dan de bij —5° C bewaarde.

Na 271 dagen werden de twee overgebleven monsters zeer rijp bevonden, zonder duidelijk verschil.

Na 342 dagen werden de monsters onaanvaardbaar bevonden wegens zeer ver voortgeschreden rijping.

Het pH-verloop in de pekel

De resultaten van de pH-metingen zijn in tabel VI vermeld.

TABEL VI
pH in bij verschillende temperaturen
bewaarde haringpekels

Bewaartijd Dagen	Bewaartemperatuur			
	— 5° C	— 2° C	+ 1° C	+ 4° C
6	6,8	6,8	6,9	6,8
13	6,7	6,9	6,9	6,8
24	6,7	6,8	6,8	6,9
45	6,8	6,9	6,8	6,9
66	6,7	6,8	6,8	6,8
87	6,8	6,8	6,8	6,8
133	6,4	6,5	6,6	6,4
197	6,3	6,4	6,4	6,2
282	6,3	6,3	6,4	6,3
342	6,2	6,2	6,3	6,8

De pH die lange tijd praktisch constant bleef, nam na 133 dagen significant af. De hoge pH van de pekel van de bij de + 4 ° C

bewaarde monsters na 342 dagen wijst misschien op een sterke toename van basische produkten bij ver voortgeschreden bederf.

Tyrosine in pekelen en haring

Daar evenals bij de endopeptidasebepaling de niet specifieke tyrosinebepaling volgens FOLIN en CIICALTEU een maat is voor de afbraak van het substraat door het enzym, kan ook bij deze proef de hoeveelheid tyrosine uit de haring vrijgemaakt, beschouwd worden als index voor de intensiteit van de werking van de endopeptidasen. De uitkomsten van de tyrosinebepalingen zijn in tabel VII verzameld. Bovendien zijn in deze tabel tevens de zoutgehalten van de pekelen en haringmonsters opgenomen.

De tyrosinegehalten blijken tijdens bewaring bij alle bewaar-temperaturen regelmatig hoger te worden. Tevens blijkt uit de tabel dat het tyrosinegehalte bij hogere temperatuur sneller toeneemt. De onregelmatigheden in de toename van de hoeveelheden tyrosine kunnen gedeeltelijk verklaard worden uit een vrij aanzienlijk afwijkend NaCl-gehalte van de betrokken monsters van het gemiddeld zoutgehalte.

Enzymactiviteit

Het verloop van de endopeptidase-activiteit in de pekelen wordt in tabel VIII weergegeven.

TABEL VIII

Endopeptidase-activiteit van bij verschillende temperaturen, in contact met haring bewaarde pekels, gemeten bij verschillende pH-waarden
Activiteit als μg tyrosine door het enzym in 100 mg pekelen in 1 uur bij 37° C uit 100 mg hemoglobine vrijgemaakt

Bewaartijd Dagen	pH van de pekelen (Tabel VI)				pH 9,5			
	- 5° C	- 2° C	+ 1° C	+ 4° C	- 5° C	- 2° C	+ 1° C	+ 4° C
6	22	39	47	49	61	83	91	99
13	20	71	57	61	43	110	103	120
24	43	78	75	67	79	116	118	106
45	101	122	106	114	144	180	155	163
66	94	127	118	106	158	196	196	175
87	109	141	141	151	169	218	218	201
133	68	68	75	41	197	156	177	95
197	80	71	79	8	188	161	151	90
282	76	76	38	38	128	128	90	38
342	52	52	22	38	90	82	38	52

De enzymactiviteit blijkt een maximum te vertonen, dat in grootte en tijdstip van optreden niet veel verschillend is voor de onderscheiden bewaartemperaturen. Wel is het vrij duidelijk dat na het doorlopen van het maximum in de bij $+4^{\circ}$ C bewaarde monsters de enzymactiviteit sneller afneemt dan bij de andere bewaartemperaturen.

Verscheidene factoren zijn van invloed op het verloop van de enzymactiviteit tijdens de bewaring en daardoor ook op de onregelmatigheden in dit verloop. Het optreden van een maximum is het gevolg van twee elkaar tegenwerkende processen, nl. enerzijds een geleidelijke extractie van de enzymhoudende organen door de pekel en anderzijds de in hoofdstuk IV besproken activiteitsvermindering van het enzym. Hoe de snelheid waarmee de endopeptidasen geïnactiveerd worden, met de zoutconcentratie samenhangt, is niet door mij onderzocht, doch het is waarschijnlijk dat er een verband bestaat.

In hoofdstuk IV is aangetoond dat de snelheid waarmee de endopeptidase-activiteit afneemt, slechts weinig van de temperatuur afhangt. Uit het geringe verschil in de grootte van het activiteitsmaximum volgt dat ook de andere grootte waardoor grootte en plaats van het maximum bepaald worden, nl. de diffusiesnelheid van het enzym uit de enzymhoudende organen in de pekel, binnen de grenzen van de proef slechts weinig van de temperatuur afhankelijk is.

3. CONCLUSIES

Binnen het temperatuurgebied van -5 tot $+4^{\circ}$ C is een verschil in bewaartemperatuur van 3° C van onmiskenbare praktische betekenis voor de snelheid waarmee gezouten maatjesharing rijpt. De verschillen in rijpheid die tengevolge van een dergelijk verschil in bewaartemperatuur optreden, zijn zowel organoleptisch als door middel van tyrosinebepalingen aantoonbaar.

De trypsine-activiteit van haringpekels neemt tijdens bewaring in contact met normaal gekaakte haring aanvankelijk toe en daarna weer af. Deze verandering hangt niet sterk af van de bewaartemperatuur.

HOOFDSTUK VI

DE BETEKENIS VAN DE AFZONDERLIJKE ENDOPEPTIDASEN VOOR DE RIJPING VAN GEZOUTEN MAATJESHARING

1. INLEIDING

Bij de beschrijving van het haringkaken in hoofdstuk I werd vermeld, dat wanneer men de bewerking correct uitvoert, de maag uit de haring verwijderd wordt. Het behoort in de praktijk echter geenszins tot de uitzonderingen dat de maag geheel of gedeeltelijk in de gekaakte haring achterblijft. Dit is in het bijzonder het geval wanneer grote vangsten verwerkt moeten worden. Bij enkele steekproeven in vaten commercieel gekaakte haring bleek het percentage haringen met maag van 10 tot 50 te variëren.

Een gevolg van deze slordigheid bij het kaken is dat in de pekel steeds pepsine aanwezig zal zijn. Uit de in hoofdstuk III besproken proeven blijkt dat in het pH-gebied dat voor de praktijk van belang is, de activiteit van het pepsine zeer veel kleiner is dan die van het trypsine. Op grond van deze uitkomsten kan dan ook verwacht worden dat het achterblijven van magen in het gekaakte produkt niet veel invloed zal hebben op de eiwitafbraak.

De aanwezigheid van de maagaanhangsels, die tezamen met het pancreasweefsel waarmee ze overdekt zijn trypsine bevatten, zal van veel meer belang zijn voor de veranderingen in het haringeiwit, daar bij de pH van de haringpekels het trypsine de endopeptidase is met verreweg de grootste activiteit.

Wanneer men bij het kaken alle ingewanden verwijdert, kan men verwachten dat de rijping sterk vertraagd zal worden, daar dan nog slechts de zeer geringe kathepsine-activiteit hiertoe zal bijdragen.

2. PROEFOPZET

Teneinde proefondervindelijk na te gaan in hoeverre de verschillende endopeptidasen een rol spelen bij de rijping van gezouten maatjes, werd aan boord van het onderzoekingsvaartuig „Willem Beukelszoon” een partij maatjesharing op verschillende wijze voorbehandeld en daarna op gelijke wijze verder verwerkt.

De maatjes werden begin juli met het trawl-net aan de oostzijde van het Buchandeeep gevangen. Onmiddellijk na de vangst werd de haring op vier verschillende manieren geakaakt. Alle haring werd ontdaan van de kieuwbogen, het hart en de lever. Bij een deel van de haring werd verder niets verwijderd. Bij een tweede deel werd ook de maag met de galblaas verwijderd. Bij een derde deel werden de maagaanhangsels en de galblaas verwijderd en bij het vierde deel werden maag, galblaas en maagaanhangsels verwijderd. Op deze wijze werden vier varianten verkregen, nl. haring met:

1. maag + maagaanhangsels + galblaas + dunne darm
2. maagaanhangsels + dunne darm
3. maag + dunne darm
4. dunne darm.

Onder dunne darm wordt hier de gehele darm achter de maagaanhangsels verstaan.

In de partij 1 werd de galblaas niet opzettelijk achtergelaten. De techniek van het kaken bracht dit met zich mee en eerst na aankomst van de monsters in het laboratorium werden wij erop opmerkzaam dat de galblaas in deze partij haring nog aanwezig was. De dunne darm werd opzettelijk achtergelaten, voornamelijk omdat het technisch niet uitvoerbaar is deze uit de met 2 en 3 genummerde partijen te verwijderen zonder alle verbindingen van de maag en de maagaanhangsels met het haringlichaam te verbreken. Bovendien zou met de dunne darm ook een deel van het vetdepôt in de buikholte verwijderd worden, hetgeen mogelijk de smaak zou beïnvloeden. Door de aanwezigheid van de dunne darm werd echter wel een hoeveelheid endopeptidase in de haring achtergelaten. (Zie hoofdstuk III, 2.3).

Na het kaken werd de haring op de gebruikelijke wijze verder bewerkt. Bij het zouten werd de verhouding 1 gewichtsdeel zout op 11 gewichtsdelen haring aangehouden. De haring werd gepakt in

achtjes. Dit zijn vaatjes die ca. 12,5 kg haring + pekels kunnen bevatten. De vaatjes werden gedurende 10 dagen in ijs opgeslagen.

In het laboratorium werden de maatjes overgepakt in blikken op de wijze als in hoofdstuk V vermeld. Het zoutgehalte van de blanke pekels die in de blikken toegevoegd werd, was weer aangepast aan het zoutgehalte van de bloedpekels uit de vaatjes. Alle blikken werden bij -2° C opgeslagen.

De bemonstering en het organoleptisch onderzoek hadden plaats zoals in hoofdstuk V beschreven. Behalve de organoleptische keuringen werden periodiek de volgende analyses uitgevoerd:

In de pekels:

Meting van de pH.

Bepaling van de endopeptidase-activiteit bij pH 2,7, pH 9,5 en bij de pH van de pekels.

Bepaling van totaal aan opgeloste stikstof.

Bepaling van vluchtige basische stikstof.

Bepaling van trimethylamine-stikstof.

Bepaling van natriumchloride.

Het verschil van het totaal gehalte opgeloste stikstof en het gehalte vluchtige basische stikstof wordt geacht eiwitstikstof te zijn en uit dit laatste stikstofgehalte werd het percentage opgelost eiwit berekend.

In de haring:

Bepaling van tyrosine.

Bepaling van het zuurgetal van het vet.

Bepaling van natriumchloride.

3. UITKOMSTEN EN DISCUSSIE

Organoleptische keuring

10 dagen na de vangst vond de eerste keuring plaats. De haring zonder maag en aanhangsels bezat het uiterlijk en de consistentie van groene haring en de smaak en de geur hadden ook veel overeenkomst met die van groene haring. De overige monsters waren eveneens nog vrij hard. Het monster met maag en aanhangsels werd harder gevonden dan de monsters die òf magen òf aanhangsels bevatten.

Na 20 dagen was het monster zonder maag en aanhangsels nog

steeds bijzonder hard. Het uiterlijk geleek nog veel op dat van groene haring, maar het karakteristiek groene aroma was grotendeels verdwenen zonder dat het normale aroma van rijpende haring er voor in de plaats was gekomen. Het monster met maag-aanhangsels doch zonder maag, was duidelijk het zachtst en het meest gerijpt. De haring met maag en aanhangsels was merkwaardigerwijze weer harder en minder gerijpt dan de monsters die slechts één van beide organen bevatten. De haring met maag was minder rijp dan de haring met maagaanhangsels. Er bestond twijfel onder de keurders of de haring met maag een afwijkend aroma had.

Na 46 dagen was het algemeen oordeel dat de haring zonder maag en aanhangsels een onaanvaardbaar produkt was, dat wat uiterlijk en consistentie betrof nog wel op groene haring geleek, doch elk aroma miste. De haring met maagaanhangsels was zacht en rijp. Het aroma van de haring met maag en aanhangsels geleek veel op dat van de haring met alleen aanhangsels, doch wat consistentie betreft werd de haring weer wat steviger bevonden. De haring met maag was matig gerijpt en steviger dan de monsters met aanhangsels alleen en dan die met maag en aanhangsels. Eén van de keurders bemerkte weer een bijsmaak aan dit monster.

Bij de keuringen die tot dit tijdstip toe plaats gevonden hadden, werd zoals vermeld steeds de onverwachte waarneming gedaan, dat de haring met maag en aanhangsels harder was dan de haring met aanhangsels alleen. Uit de uitkomsten van de enzymbepalingen bleek dat dit overeenkwam met een geringere endopeptidase-activiteit in de pekels van de haring met beide organen tezamen. Dit onverwachte fenomeen bleek tenslotte verklaard te kunnen worden uit het niet eerder aan het licht gekomen feit dat bij het kaken van deze proefvariëteit het maag-darmkanaal nergens doorgesneden of op andere wijze geopend was, waardoor de enzymen uit de ingewanden slechts na passage door de wanden van de verschillende organen in de pekels konden geraken. Uit haringen waar of de maag of de maag-aanhangsels uit verwijderd zijn, kunnen de enzymen uit de achtergebleven organen veel gemakkelijker in de pekels diffunderen, daar er bij het kaken een opening gemaakt is in het maag-darmkanaal, door welke opening de pekels in de organen kan dringen.

Na 74 dagen was de rijping van alle monsters verder voort-

geschreden. De bij de vorige keuring gevonden verschillen werden wederom geconstateerd. Het verschil in consistentie tussen de haring met alleen maagaanhangsels en die met maag en maagaanhangsels was echter kleiner geworden.

Na 108 dagen was dit verschil geheel verdwenen. Beide monsters waren zacht en zeer rijp en waren uiterlijk donkerder en glanzender dan de haring zonder maag en aanhangsels en die met alleen magen. De laatste haring was nog stevig en blank en was ook naar de smaak te oordelen, aanzienlijk minder gerijpt. Eén van de keurders bespeurde wederom een bijmaak aan dit monster. De haring zonder maag of aanhangsels was iets gerijpt, doch was nog steeds onaanvaardbaar wegens gebrek aan aroma.

Bij de keuring die na 151 dagen plaats vond, bleken de monsters met alleen maagaanhangsels en die met maag en aanhangsels zeer zacht en zeer rijp te zijn. De haring met alleen aanhangsels was iets rijper dan de andere juist genoemde. De haring met alleen magen was vrij zacht geworden en was nog iets blanker dan de beide juist besproken monsters. De smaak van deze haring werd vrij goed genoemd. Het monster zonder maag of aanhangsels begon in dit stadium duidelijk rijpingsverschijnselen te vertonen, doch was nog weinig aromatisch.

Ook na 193 dagen had dit monster nog steeds weinig aroma. De haring met uitsluitend magen was bij deze keuring zeer zacht en gesterkt gerijpt. De smaak was nog wat verbeterd vergeleken bij de vorige keuring. De haring met alleen maagaanhangsels was zeer zacht en overrijp. Er trad een zoetige bijmaak op. De haring met maag en aanhangsels was eveneens zeer zacht doch iets minder rijp en had geen bijmaak.

Bij de keuring na 235 dagen werden de monsters met uitsluitend maagaanhangsels en uitsluitend magen niet gegeten wegens begin van bederf. De haring met magen en aanhangsels was overrijp en zeer zacht en aromatisch. Het aroma van de haring zonder maag en aanhangsels was zover toegenomen dat het produkt wat de smaak betreft aanvaardbaar was geworden, zonder evenwel attractief te zijn.

Bij de laatste keuring, 279 dagen na de vangst, vonden de keurders de haring zonder maag en aanhangsels een beter produkt dan bij de vorige keuringen. Het uiterlijk van deze haring was

gedurende de gehele proef weinig veranderd. De haring maakte een vrij rauwe indruk en was nog steeds blank van kleur. Wat consistentie betreft was het produkt vrij zacht geworden. Het aroma was echter veel zwakker dan bij normaal behandelde haring met deze zachtheid het geval is. De haring met maag en aanhangsels was donker, zeer zacht en had een bittere bijmaak.

De pH van de pekel

Bij vorige proeven was reeds gebleken dat de pH tijdens bewaring van gezouten maatjes slechts zeer weinig verandert. Op grond van deze ervaring werd de pH van de pekels niet tegelijk met iedere keuring gemeten. De uitkomsten van de pH-metingen zijn vermeld in tabel IX.

TABEL IX
pH van pekels van op verschillende manieren geëete haring,
bewaard bij -2°C

Bewaartijd Dagen	Haring met :			
	Maag + aanhangsels	Maagaanhangsels	Maag	Leeg
0	6,3	6,1	6,2	6,2
46	6,4	6,2	6,1	6,3
151	6,2	6,1	6,1	6,3
193	6,4	6,2	6,3	6,1
235	6,2	6,3	6,4	6,3

De endopeptidase-activiteit van de pekel

Evenals bij de vorige proef werd de endopeptidase-activiteit van de pekels zowel bij de pH waarbij de enzymen hun optimale activiteit bezitten, als bij de eigen pH van de pekel gemeten. Als pH-optima werden de in hoofdstuk III gevonden waarden aangehouden, nl. voor het pepsine pH 2,5 en voor het trypsine pH 9,5. Daar de pH-waarden van de pekels onderling slechts weinig verschil vertoonden en ook weinig veranderden, werd gedurende de gehele proef pH 6,3 als eigen pH van alle pekels aangehouden. De uitkomsten van de metingen zijn in tabel X vermeld.

Het activiteitsverloop als functie van de tijd zou voor de pekel van de op normale wijze geëete haring (pekel 2), in principe

ongeveer overeenkomstig de uitkomsten van het in hoofdstuk V behandelde experiment moeten verlopen. Vergelijkt men tabel X met tabel VIII dan mist men in tabel X het maximum dat in de waarden van tabel VIII optreedt. Vermoedelijk wordt dit veroorzaakt doordat de haring van de in dit hoofdstuk besproken proef zeer zorgvuldig geakaat is, waardoor het maag-darmkanaal van alle haringen precies op de plaats waar de maagaanhangsels in de darm overgaan, opengesneden is. De diffusie van het trypsine in de pekell kan dus zeer gemakkelijk verlopen. Deze opvatting wordt gesteund door de waarneming dat in de waarden van tabel X die op pekell 1 betrekking hebben, wel een maximum optreedt. Zoals eerder in dit hoofdstuk beschreven, was het maag-darmkanaal van de haring waar deze pekell van afkomstig is, niet op deze plaats aangesneden.

TABEL X

Endopeptidase-activiteit van pekells van op verschillende manieren geakaate haring, bewaard bij -2°C
 Activiteit als μg tyrosine door het enzym in 100 mg pekell bij verschillende pH in 1 uur bij 37°C uit 100 mg hemoglobine vrijgemaakt

Bewaartijd Dagen	pH 6,3				pH 2,5				pH 9,5			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
20	32	54	12	8	336	84	516	90	68	132	8	14
46	72	60	21	12	344	—	488	100	112	124	—	8
74	72	64	28	12	304	—	488	104	122	124	—	32
108	69	51	15	15	294	—	474	103	117	126	—	15
151	75	56	18	18	265	—	407	96	120	123	—	27
193	93	66	40	2	324	—	484	87	153	144	—	2
235	51	57	20	12	279	—	387	114	105	120	—	6
279	54	40	24	14	252	—	381	114	95	105	—	4

1 = Haring met maag + maagaanhangsels + galblaas + dunne darm

2 = Haring met maagaanhangsels + dunne darm

3 = Haring met maag + dunne darm

4 = Haring met dunne darm

Ook de uitkomsten van hoofdstuk IV, betrekking hebbende op de verandering van de activiteit van de endopeptidasen in pekellooplossingen, vindt men in grote lijnen in tabel X terug. Het zeer snelle teruglopen van de trypsine-activiteit gemeten bij pH 9,5

gedurende de eerste 10 dagen, komt hier uiteraard niet tot uiting, daar de eerste meting pas na 20 dagen plaats vond. Daarna blijft de trypsine-activiteit van de pekels die maagaanhangsels bevatten, dus de pekels 1 en 2, binnen de onvermijdelijke schommeling, eigen aan de proefopzet, constant. Vóór de pekel van de haring met volledig maag-darmkanaal (pekel 1) deze constante waarde bereikt heeft, verliepen enkele weken; dit moet weer toegeschreven worden aan de langzame diffusie. Daarna is de trypsine-activiteit van de beide pekels echter nagenoeg gelijk, hetgeen weer in overeenstemming is met het in fig. 10 gegeven beeld.

In de pekels die afkomstig zijn van haring die magen bevat, dus de pekels 1 en 3, loopt de pepsine-activiteit, gemeten bij pH 2,5 geleidelijk terug. Ook hier is de pepsine-activiteit van de pekel die alleen maagextract bevat (pekel 3) hoger dan die van de pekel die tevens extract van maagaanhangsels bevat (pekel 1). Opgemerkt kan worden dat behalve de in hoofdstuk IV onder 3.3 besproken aantasting van het pepsine door trypsine, ook het verschil in diffusie hier een rol bij kan spelen. Dat dit verschil van grote betekenis zou zijn lijkt echter onwaarschijnlijk gezien het zo juist besproken feit dat de trypsine-activiteit van pekel 1 (magen + aanhangsels) bij pH 9,5 na de eerste weken gelijk is aan de overeenkomstige activiteit in pekel 2 (alleen aanhangsels), terwijl het aannemelijk is, dat de diffusie van pepsine en trypsine in resp. pekel 3 (alleen magen) en pekel 2 (alleen aanhangsels) ongeveer even gemakkelijk zal verlopen.

Bij pH 6,3 zijn de activiteiten van de pekels die extract van maagaanhangsels bevatten, groter dan de activiteiten van de pekels zonder dit extract. Dit is weer in overeenstemming met hetgeen reeds enkele malen in voorafgaande hoofdstukken werd opgemerkt, nl. dat bij de eigen pH van de pekel de activiteit van het enzym uit de maagaanhangsels aanzienlijk hoger is dan de activiteit van het enzym uit de maag en het enzym uit de dunne darm.

De produkten van de eiwitplitsing

De uitkomsten van de bepalingen van opgelost eiwit in de pekel en tyrosine in de haring zijn in tabel XI en XII verzameld. Tevens worden hier de uitkomsten van zout- en vochtbepalingen vermeld,

daar schommelingen in het zoutgehalte verantwoordelijk kunnen zijn voor onregelmatigheden in het verloop van de eiwitplitsing. Zie bv. pekel 1 na 235 dagen.

TABEL XI

Zout en opgelost eiwit in pekels van op verschillende manieren geëkaakte haring, bewaard bij -2°C

Bewaartijd Dagen	Pekel 1		Pekel 2		Pekel 3		Pekel 4	
	Zout %	Eiwit %	Zout %	Eiwit %	Zout %	Eiwit %	Zout %	Eiwit %
20	9,8	3,3	9,1	4,0	9,4	3,2	9,4	3,1
46	9,0	5,7	9,2	5,1	9,5	4,4	9,5	4,4
74	9,2	6,3	8,7	6,3	9,1	5,0	9,7	5,2
108	8,1	7,4	8,5	7,8	8,6	6,6	10,4	6,4
151	8,7	9,0	8,8	8,5	9,3	6,7	8,9	6,6
193	8,0	10,3	8,8	9,2	9,1	7,7	9,7	6,9
235	9,2	8,9	8,5	10,2	8,4	8,2	9,3	7,2
279	8,1	9,6	8,6	9,5	9,1	7,7	8,7	8,4

1 = Haring met maag + maagaanhangsels + galblaas + dunne darm

2 = Haring met maagaanhangsels + dunne darm

3 = Haring met maag + dunne darm

4 = Haring met dunne darm

TABEL XII

Zout, vocht en tyrosine in op verschillende manieren geëkaakte haring, bewaard bij -2°C

Bewaartijd Dagen	Haring 1			Haring 2			Haring 3			Haring 4		
	Zout %	Vocht %	Tyr. mg %	Zout %	Vocht %	Tyr. mg %	Zout %	Vocht %	Tyr. mg %	Zout %	Vocht %	Tyr. mg %
20	5,9	55,4	84	5,7	56,6	83	6,1	59,0	78	6,0	57,9	63
46	5,3	56,9	129	5,8	59,1	127	6,4	58,8	103	6,5	59,0	92
74	5,6	57,5	131	5,8	58,2	137	6,1	58,9	96	6,5	57,6	86
108	5,5	57,3	176	5,5	58,9	182	5,7	61,0	136	6,2	58,1	105
151	6,1	57,5	197	6,1	57,3	196	6,5	60,6	139	6,2	59,9	117
193	5,5	56,0	230	6,1	56,9	245	7,2	59,2	177	7,0	59,3	120
235	6,3	57,5	276	5,8	56,6	260	5,6	58,8	198	6,5	60,2	145
279	5,8	57,6	239	6,1	57,8	255	6,5	61,3	205	6,3	59,8	170

1 = Haring met maag + maagaanhangsels + galblaas + dunne darm

2 = Haring met maagaanhangsels + dunne darm

3 = Haring met maag + dunne darm

4 = Haring met dunne darm

Uit de uitkomsten blijkt dat er binnen een proefreeks en tussen de verschillende reeksen onderling geen grote verschillen in de zoutconcentraties optraden.

Wat het opgelost eiwit in de pekels betreft, kan geconstateerd worden dat er geen significant verschil is tussen de eiwitgehalten van de pekels 1 en 2 (beide met maagaanhangsels) en ook niet tussen die van 3 en 4 (beide zonder maagaanhangsels). Tussen de hoeveelheden eiwit in enerzijds de pekels 1 en 2 en anderzijds de pekels 3 en 4 bestaat wel een duidelijk verschil. De eiwitpercentages in de pekels 3 en 4 zijn steeds lager dan die van de pekels 1 en 2. Dit komt overeen met het gevonden verschil in endopeptidase-activiteit tussen enerzijds de pekels 1 en 2 en anderzijds de pekels 3 en 4.

Voor de hoeveelheden tyrosine in de verschillende monsters haring geldt hetzelfde als juist voor de eiwitgehalten in de pekel vastgesteld werd. Bovendien is het tyrosinegehalte in haring 4 (alleen dunne darm) lager dan dat in haring 3 (tevens met maag). Dit verschil in tyrosinegehalte is duidelijker dan het verschil tussen de endopeptidase-activiteiten van de pekels 3 en 4, hetgeen ook wel weer verklaarbaar is, daar een klein verschil in endopeptidase-activiteit op den duur toch duidelijk merkbaar kan worden in de hoeveelheid van een eiwitafbraakprodukt.

Vergelijkt men de objectieve bepalingen, dus zowel van de enzymactiviteit als van de eiwitafbraakprodukten met de resultaten van de organoleptische keuring, dan blijkt dat de organoleptisch vastgestelde verschillen in rijpheid redelijk goed correleren met de objectieve bepalingen. De relatieve verschillen in rijping tussen de vier reeksen zijn zowel in de bepalingen van de endopeptidase-activiteit in de pekel als in de bepaling van tyrosine in de haring terug te vinden. Hetzelfde geldt, zij het ook in mindere mate, voor de correlatie met het gehalte oplosbaar eiwit in de pekel. Uit deze correlaties mag geconcludeerd worden, dat het voor de bepaling van de endopeptidase-activiteit gebruikte hemoglobline redelijk geschikt is als modelsubstraat voor de bestudering van de inwerking van de endopeptidasen van de haring op de haringeiwitten.

Bij vergelijking van de tyrosinewaarden in de haring, met de uitkomsten van de organoleptische bepalingen, worden zoals boven reeds vermeld, de verschillen in rijpheid die op ieder keurings-

tijdstip organoleptisch tussen de vier monsters vastgesteld werden, redelijk goed teruggevonden in de verschillen die op dezelfde momenten tussen de hoeveelheden tyrosine in de haring gevonden werden. Het verschil in consistentie dat tijdens de eerste keuringen tussen de monsters 1 (met maag + aanhangsels) en 2 (met aanhangsels) optrad, komt echter niet tot uiting in de uitkomsten van de tyrosinebepaling. Het is moeilijk vast te stellen of een bepaalde tyrosinewaarde in verschillende monsters op verschillende tijden gevonden, ook overeenkomt met een ongeveer gelijke rijping van die monsters op de betrokken tijdstippen. De opzet van dit experiment laat dergelijke conclusies niet toe, doch de indruk is dat er geen correlatie is tussen het tyrosinegehalte en het aroma als maat van rijpheid, doch dat de consistentie in grote lijnen redelijk samenhangt met het tyrosinegehalte.

De haring zonder maag en maagaanhangsels, rijpte steeds aanzienlijk sterker dan bij het beramen van de proefopzet voorzien was. Zoals reeds eerder in dit hoofdstuk vermeld werd, was in deze haring de dunne darm achtergebleven. Dit maakt het resultaat toch wel verklaarbaar. LIEBERT (1913) stelt evenwel dat op deze wijze geaakte haring in het geheel niet rijpt. De haring waar hij mee werkte was echter veel zwaarder gezouten dan de haring in deze proef.

De voor bederf kenmerkende verbindingen

De vluchtige basische verbindingen met als voornaamste ammoniak en trimethylamine worden als min of meer specifiek voor bederf van vis en ook van gezouten haring beschouwd (LUIJPEN, 1953). Ze worden gevormd bij de afbraak van eiwitten en de reductie van trimethylamineoxide, terwijl het zuurgetal een maat is voor de doorgaans in levensmiddelen ongewenste vetsplitsing.

Voor de manier waarop deze verbindingen bepaald werden, wordt verwezen naar hoofdstuk II. Het verschil tussen de totale hoeveelheid vluchtige basische verbindingen en het trimethylaminegehalte werd geacht ammoniak te zijn. De uitkomsten van deze bepalingen zijn samengevat in de tabellen XIII en XIV.

De hoeveelheid trimethylamine nam tijdens de bewaring niet veel toe. Het gehalte in pekels 4, afkomstig van de haring zonder maag en zonder aanhangsels, was echter lager dan in de pekels

afkomstig van haring met ingewanden. Het ammoniakgehalte nam in alle monsters regelmatig toe. De verschillen tussen de waarden in de onderscheiden pekels zijn onderling echter klein en met uitzondering van de waarden voor pekels 1 en 2 ten opzichte van de andere pekels bovendien onregelmatig. Deze proef geeft dus geen aan-

TABEL XIII

Trimethylamine-stikstof (T.M.A.—N) en ammoniakstikstof (NH₃—N) in pekels van op verschillende manieren geaakte haring, bewaard bij — 2° C

Bewaartijd Dagen	Pekel 1		Pekel 2		Pekel 3		Pekel 4	
	T.M.A.—N mg %	NH ₃ —N mg %	T.M.A.—N mg %	NH ₃ —N mg %	T.M.A.—N mg %	NH ₃ —N mg %	T.M.A.—N mg %	NH ₃ —N mg %
20	9,4	24,4	13,5	28,0	17,2	25,7	13,7	23,2
46	20,5	39,1	14,2	33,1	22,2	29,2	13,7	25,2
74	18,2	41,2	21,7	43,0	24,2	36,4	10,7	29,8
108	22,4	60,1	21,1	59,5	30,2	54,7	14,3	36,7
151	21,0	52,4	16,7	49,5	21,0	36,2	17,1	37,9
193	29,8	75,3	18,6	59,6	25,0	54,6	14,7	34,7
235	21,2	69,1	25,7	79,3	30,0	73,0	17,2	45,4
279	25,0	69,9	18,4	68,5	23,7	68,3	20,8	59,7

- 1 = Haring met maag + maagaanhangsels + galblaas + dunne darm
 2 = Haring met maagaanhangsels + dunne darm
 3 = Haring met maag + dunne darm
 4 = Haring met dunne darm

TABEL XIV

Zuurgetal van het vet in op verschillende manieren geaakte haring, bewaard bij — 2° C

Bewaartijd Dagen	mg KOH/g vet			
	Haring 1	Haring 2	Haring 3	Haring 4
20	5,6	6,0	4,7	3,9
46	6,1	7,4	5,2	5,5
74	7,1	7,5	6,2	6,1
108	7,5	7,9	8,0	7,2
151	7,9	7,2	7,4	7,8
193	7,9	7,6	8,9	8,3
235	9,3	8,1	7,2	9,0
279	10,2	9,7	9,3	8,9

- 1 = Haring met maag + maagaanhangsels + galblaas + dunne darm
 2 = Haring met maagaanhangsels + dunne darm
 3 = Haring met maag + dunne darm
 4 = Haring met dunne darm

leiding te veronderstellen dat ammoniakvorming een grote rol speelt bij de ontwikkeling van het aroma tijdens de rijping.

Hetzelfde geldt voor de vetsplitsing. Gedurende de eerste drie maanden was het zuurgetal van het vet uit de maagaanhangsels bevattende monsters wat hoger dan bij de andere haring, doch daarna was er geen verschil meer. De vetsplitsing is dus blijkbaar slechts van ondergeschikt belang voor het aroma.

4. CONCLUSIES

In overeenstemming met hetgeen op grond van de uitkomsten van hoofdstuk III verwacht kon worden, blijkt het al of niet verwijderen van de maagaanhangsels van zeer grote invloed te zijn op de rijping, hetgeen zeer duidelijk tot uiting komt in het verschil in organoleptische eigenschappen tussen maatjesharing met en zonder maagaanhangsels. De op normale wijze geëete haring, dus met maagaanhangsels, rijpt het snelste en verkrijgt het beste aroma.

Het al of niet aanwezig zijn van de maag is wellicht van invloed op het aroma van het produkt. Het achterlaten van de maag in de geëete haring is zeker niet van positieve betekenis voor de kwaliteit van de haring.

Wanneer bij het kaken het maag-darmkanaal niet aangesneden wordt, verloopt de rijping langzamer dan wanneer de maatjes normaal geëet worden. Wellicht kan toepassing van deze variatie op het normale kaken in enkele gevallen van praktisch belang zijn. Voordien zal echter onderzocht moeten worden of de houdbaarheid van het op deze wijze verkregen produkt niet achter staat bij die van normaal geëete maatjesharing.

Haring waar maag en aanhangsels uit verwijderd worden blijft langer groen dan normaal geëete haring. Opslag van de aldus bewerkte haring resulteert echter in een organoleptisch onaanvaardbaar produkt.

Het tyrosinegehalte van de haring is wellicht een bruikbare objectieve maatstaf voor de consistentie; een samenhang met het aroma ontbreekt evenwel.

Vorming van trimethylamine en ammoniak en vetsplitsing zijn van ondergeschikt belang voor de ontwikkeling van het specifieke aroma van gezouten maatjesharing.

HOOFDSTUK VII

DE FYSIOLOGISCHE BETEKENIS VAN DE APPENDICES PYLORICAE VAN VISSSEN

1. INLEIDING

In het verloop van het in de voorafgaande hoofdstukken beschreven onderzoek werd steeds een aanzienlijke trypsine-activiteit in de extracten van de appendices pyloricae (maagaanhangsels) gevonden. Daar bij de gewervelde dieren het trypsine als trypsinogeen in het pancreas wordt gevormd, leek het van belang enige aandacht aan de herkomst van het haringtrypsine en aan de fysiologische betekenis van de appendices pyloricae te besteden.

Lange tijd heeft men gemeend dat de haring, evenals een groot aantal andere vissen, geen pancreas zou bezitten en dat de maagaanhangsels de functie van het pancreas overgenomen hadden. Nadat incidenteel bij enkele vissen met maagaanhangsels een pancreas waargenomen was, welke bevindingen de heersende mening echter niet vermochten te wijzigen, vond LEGOUIS (1873) in een groot aantal vissen waarvan men tot dan toe meende dat ze geen pancreas bezaten, dit orgaan als een fijn vertakt weefsel. LAGUESSE (1891, 1894) bevestigde de uitkomsten van Legouis door histologisch onderzoek. KRÜGER (1904) herhaalde de vroegere onderzoekingen en breidde deze uit tot nog meer vissoorten. Steeds vond hij langs morfologische, histologische en fysiologische weg in alle vissen een pancreas, ook in die met maagaanhangsels.

In de haring vond KRÜGER het pancreas in de vorm van strengen die zich van de galgang naar de maagaanhangsels uitstrekken en deze tot een vaste massa verbinden en voorts als strengen van de maag naar de verbinding tussen maag en zwemblaas en langs de

dunne darm tot aan het einde van de darm. De pancreasstrengen langs de maagaanhangsels en de dunne darm stonden met elkaar in verbinding. Histologisch of fysiologisch onderzoek van het haringpancreas werd niet door KRÜGER uitgevoerd, vermoedelijk mede omdat het pancreas van de haring uiterst moeilijk van de maagaanhangsels los geprepareerd kan worden. Gedurende het deel van het jaar dat de buikholte met vet gevuld is, kan men het pancreas macroscopisch in het geheel niet volgen.

Voor experimentele verificatie van de opvatting van VONK (1937) als zou de produktie van trypsinogeen ook bij vissen met maagaanhangsels tot het pancreasweefsel beperkt zijn, is de haring om de bovenvermelde redenen een vrij ongeschikt object. Vissen waarbij het diffuse pancreas goed zichtbaar is en gemakkelijk van de maagaanhangsels los geprepareerd kan worden, lenen zich aanzienlijk beter voor dit doel. Dergelijke onderzoeken zijn door SCHLOTTKE uitgevoerd aan de puitaal (1939), de baars (1940a), de forel (1940b) en de karper (1938, 1940c). Uit het verband tussen de trypsine-activiteit van de verschillende delen van het maag-darmkanaal en de inhoud daarvan, met de voeding van hongerende vissen, concludeerde hij o.a. dat het in de maagaanhangsels aanwezige trypsine uit het pancreas afkomstig moest zijn. Het directe bewijs hiervoor werd echter niet door SCHLOTTKE geleverd; integendeel kon hij slechts verhoudingsgewijs zeer kleine hoeveelheden endopeptidase in door hem geïsoleerd pancreasweefsel aantonen. Wel wijzen de resultaten van SCHLOTTKE erop dat in de maagaanhangsels van de door hem onderzochte vissen voedsel opgenomen wordt.

Histologisch onderzoek van het maag-darmkanaal van de baars door WINTER (1936) gaf eveneens aanwijzingen dat de maagaanhangsels dezelfde functie hebben als de darm en als aanpassingsverschijnsel aan de ruimteverhoudingen in de buikholte gezien moeten worden.

KENYON (1925) toonde trypsine aan in het pancreas van de karper en de snoek, door extracten van het betrokken weefsel bij pH 8,4 op gecoaguleerd kippeneiwit te laten inwerken. In andere delen van de ingewanden vond hij op deze wijze slechts zeer geringe hoeveelheden trypsine.

CHESLEY (1934) ondernam bij verschillende vissoorten een ver-

gelijkend onderzoek naar de verhouding van de enzymactiviteiten van pancreas en maagaanhangsels. Deze verhouding bleek van vissoort tot vissoort sterk te variëren. Bij de makreel, een vis met een compact pancreas, was de trypsine-activiteit van het pancreas veel groter dan die van de aanhangsels. Bij de menhaden (*Brevortia* Sp.), de scup (*Stenotomus chrysops*) en de sea-robin (*Prionotus carolinus*) was de enzymactiviteit van de aanhangsels gelijk aan of groter dan die van het pancreas. Uit de publikatie van CHESLEY is echter niet op te maken of de onderzochte maagaanhangsels van het daar als een netwerk over vertakte pancreas ontdaan waren.

BONDOUY (1899) heeft waargenomen dat extracten van het weefsel dat zich tussen de appendices pyloricae van forellen bevindt, sneller fibrine verteerden dan de extracten van de appendices zelf. De betrokken publikatie bevat echter geen kwantitatieve gegevens.

2. PROEFOPZET

In de bovenstaande inleiding werd reeds gewezen op de moeilijke toegankelijkheid van het haringpancreas voor fysiologisch-chemisch onderzoek. Bij pogingen om uit maatjesharing pancreasweefsel te isoleren, werden dezelfde moeilijkheden ondervonden die vroegere auteurs ontmoet hebben bij hun onderzoek naar de anatomie van het haringpancreas. Daar het niet mogelijk bleek pancreasweefsel te isoleren uit de vetmassa die zich tussen de maagaanhangsels bevond, werd besloten het onderzoek aan de baars uit te voeren.

Van een aantal regelmatig met vlees gevoerde baarzen werden onmiddellijk na het doden het pancreasweefsel en de slijmvliezen die de binnenbekleding vormen van de maagaanhangsels en van de dunne darm, geïsoleerd en op de gebruikelijke wijze met glycerine geëxtraheerd, met uitzondering van het darmslijmvlies, waar een extract in fysiologische zoutoplossing van gemaakt werd voor het activeren van het trypsinogeen in het pancreasextract. Voor de trypsinebepaling werd het verdunde pancreasextract geactiveerd door het gedurende een half uur bij 37° C te incuberen met het in gelijke mate verdunde darmextract. In de betrokken uitkomsten

is de eigen trypsine-activiteit van het darmextract in mindering gebracht van de trypsine-activiteit van het pancreas.

Met behulp van de in hoofdstuk II beschreven methoden werd de activiteit van het trypsine en van de verschillende exopeptidasen in de extracten van pancreas en van het slijmvlies van de maagaanhangsels bepaald. De activiteit van het trypsine in pancreas en maagaanhangsels werd bij een aantal pH-waarden tussen 2 en 11 gemeten. De exopeptidase-activiteiten werden bepaald bij pH 7,5. Deze proef werd twee maal uitgevoerd.

Later werden dezelfde bepalingen gedaan in glycerine-extracten van het pancreas, van het slijmvlies van de maagaanhangsels en van het darmslijmvlies van baarzen die gedurende 6 dagen niet gevoederd waren. De meting van de activiteiten vond plaats bij de pH-optima van de enzymen.

Met deze laatste proef werd de brug geslagen naar het onderzoek van de enzymactiviteit van de organen van niet vette haring. Voor deze proef werd volle haring van de Engelse wal-visserij gebruikt. Aangenomen mag worden dat deze haring sedert enkele maanden bijna geen voedsel tot zich genomen had (zie hoofdstuk I).

De haring werd 12 uur na de vangst snelgevroren en bewaard tot het moment van onderzoek.

Uit dit materiaal kon enig pancreasweefsel van de appendices los geprepareerd worden. Uit vijftien haringen werd in totaal slechts 80 mg verkregen. Er is wel meer aanwezig, doch het pancreas dat zich als een netwerk over en tussen de appendices bevindt, is zeer moeilijk los te krijgen. Ter vergelijking diene, dat uit een baars van 100 tot 200 g ongeveer 50 mg pancreas verkregen werd.

Het bleek niet mogelijk aanhangsels geheel vrij van pancreasweefsel te maken. Er kon daardoor geen direct vergelijkend onderzoek naar de activiteitsverhouding van de enzymen van pancreas en aanhangsels uitgevoerd worden. Daarom werd besloten de activiteit van het pancreas te vergelijken met die van appendices die met pancreasweefsel overdekt waren.

Behalve rond de appendices bevinden zich ook nog weefselstrengen die macroscopisch aan pancreas doen denken, langs de maag en langs de darm. Ook van deze weefsels werd een hoeveelheid los geprepareerd.

Gezien de kleine hoeveelheden haringpancreas die ter beschikking stonden, moest het onderzoek beperkt worden tot de bepaling van de trypsine-activiteit bij pH 9,0. De extracten werden niet geactiveerd.

Teneinde zekerheid te verkrijgen omtrent de aard van het weefsel dat als vermoedelijk pancreas geïsoleerd was, werden microscopische preparaten vervaardigd van deze weefsels van de baars en van de maatjesharing.¹⁾

3. UITKOMSTEN

Het verband tussen pH en endopeptidase-activiteit van de extracten van pancreas en maagaanhangsels van de gevoerde baarzen is in fig. 12 weergegeven.

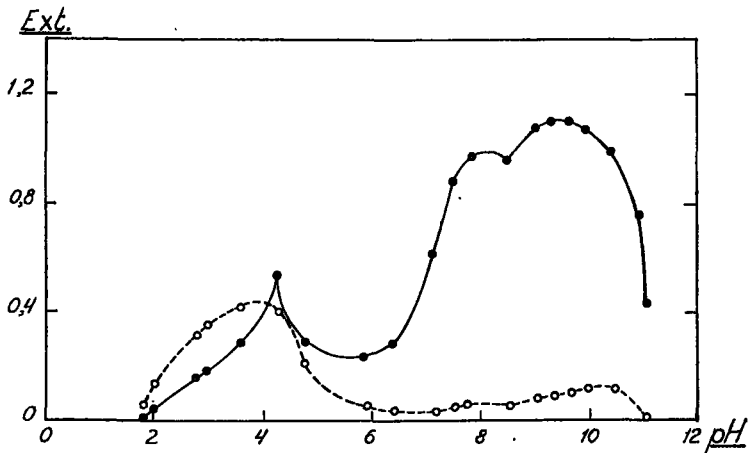


fig. 12

De endopeptidase-activiteit van pancreasweefsel en slijmvlies van de maagaanhangsels van de baars als functie van de pH.

Extracten verdund 1 + 40, gedurende 4½ uur met hemoglobinesubstraat bij 37° C geïncubeerd. Extinctie gemeten in ½ cm cuvet

● — — — ● — — — ● pancreas
○ - - - ○ - - - ○ slijmvlies maagaanhangsels

¹⁾ De preparaten werden door Mej. H. A. Esveld vervaardigd en Prof. Dr. L. Bretschneider maakte de microfoto's. Beiden dank ik ten zeerste voor het uitvoeren van deze voor mij vreemde technieken.

De uitkomsten van de bepalingen van de trypsine-activiteit van de extracten van pancreas en slijmvlies van de appendices pyloricae zijn in tabel XV verzameld.

TABEL XV

Trypsine-activiteit van extracten van pancreas en van slijmvlies van appendices pyloricae van baarzen. Activiteit als mg tyrosine bij pH 9,0 door het enzym in 8 mg weefsel bij incubatie bij 37° C uit 100 mg hemoglobine vrij gemaakt

No proef	Incubatielijd Uren	Activering	Activiteit	
			Pancreas	Appendices
1	4 ¹ / ₂	niet geactiveerd	1,41	0,11
2	4	niet geactiveerd	0,69	0,22
2	4	geactiveerd	1,48	
3	4	niet geactiveerd		0,04
3	4	geactiveerd	0,05	

Proef no 1: baarzen regelmatig gevoerd, in oktober onderzocht

Proef no 2: baarzen regelmatig gevoerd, in november onderzocht

Proef no 3: baarzen 6 dagen hongerend, in februari onderzocht

TABEL XVI

Exopeptidase-activiteit van extracten van pancreas, van slijmvlies van maag-aanhangsels en van darmslijmvlies van baarzen. Activiteit als procent splitsing van 5 ml van een substraat dat 0,01 m aeq. splitsbaar peptide per ml bevat, bij 37° C en pH 7,5 gedurende 16 uur met het enzym uit 4 mg weefsel geïncubeerd

No proef	Enzym	Substraat	Activiteit		
			Pancreas	Appendices	Darm
2	dipeptidase	DL-leucylglycine	21	76	—
2	aminopeptidase	DL-alanylglucylglycine	15	95	—
2	carboxypeptidase	chloor-acetyl-L-tyrosine	20	28	—
3	dipeptidase	DL-leucylglycine	6	42	69
3	aminopeptidase	DL-leucylglucylglycine	9	55	84
3	carboxypeptidase	chloor-acetyl-L-tyrosine	34	14	11

Proef no 2: baarzen regelmatig gevoerd, in november onderzocht

Proef no 3: baarzen 6 dagen hongerend, in februari onderzocht

In tabel XVI zijn de exopeptidase-activiteiten van de extracten van het pancreas, van het slijmvlies van de appendices pyloricae en van het darmslijmvlies vermeld.

De uitkomsten van de bepalingen van de trypsine-activiteit van de extracten van maagaanhangsels en pancreasweefsel afkomstig uit verschillende delen van de haring, zijn in tabel XVII ondergebracht.

TABEL XVII

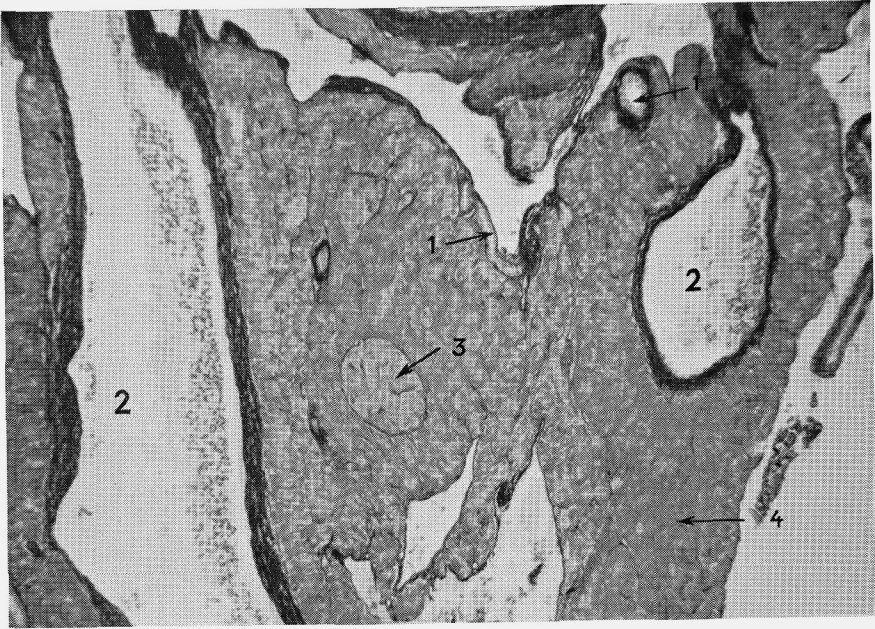
Trypsine-activiteit van extracten van maagaanhangsels en van pancreasweefsel dat op verschillende plaatsen uit ingewanden van volle haring los geprepareerd werd. Activiteit als mg tyrosine bij pH 9,0 door het enzym in 8 mg weefsel bij incubatie gedurende 24 uur bij 37° C uit 100 mg hemoglobine vrijgemaakt

Geëxtraheerd orgaan	Activiteit
appendices + verbindend pancreasnetwerk	6.10
van de appendices los geprepareerd pancreasnetwerk	4.05
pancreas langs darm	1.60
pancreas langs maag	1.60

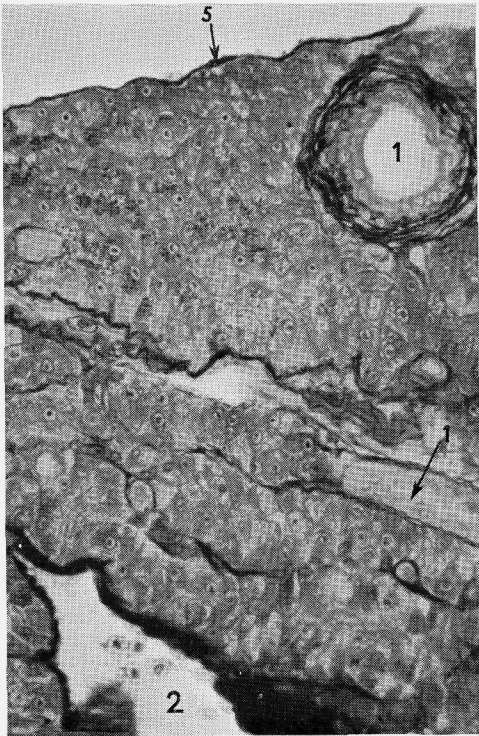
Microfoto's van gedeelten van het pancreas van de baars en van gedeelten van het pancreas en twee der appendices van haring zijn afgebeeld op de platen I en II.

Op plaat IA (baars) wordt het grootste gedeelte van de afbeelding ingenomen door exocrien klierweefsel, waartussen bij 3 een eilandje van Langerhans (endocrien) zichtbaar is, omgeven door een bindweefselmembraan. Een dergelijk eilandje is ook zichtbaar bij 3 op plaat IC. Verder zijn in alle figuren van plaat I uitvoergangen (1) en bloedvaten (2) zichtbaar, de laatste deels gevuld met bloedlichaampjes. Zeer duidelijk zijn enkele kernhoudende rode bloedlichaampjes zichtbaar in fig. B bij 2. De uitvoergangen (1) worden begrensd door een epithelium uit kubische cellen, waaromheen een laag bindweefsel (donker gekleurd). Dit is vooral goed zichtbaar bij 1 rechts boven in fig. B. Zymogeengranula in de exocriene cellen zijn goed zichtbaar in C rechts boven het eilandje van Langerhans (3). In de vrij grote kernen van deze cellen is hun donker gekleurde nucleolus zichtbaar.

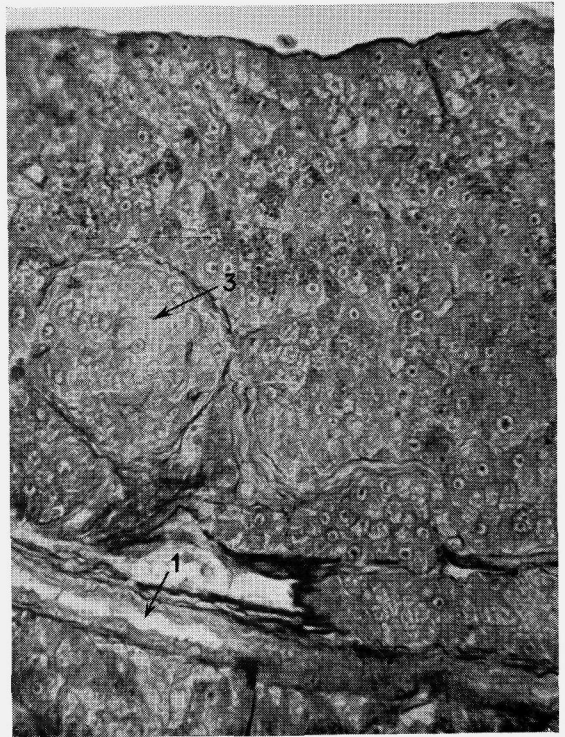
Plaat II (haring) fig. A geeft een overzichtsbeeld waarvan de



A



B



C

PLAAT I

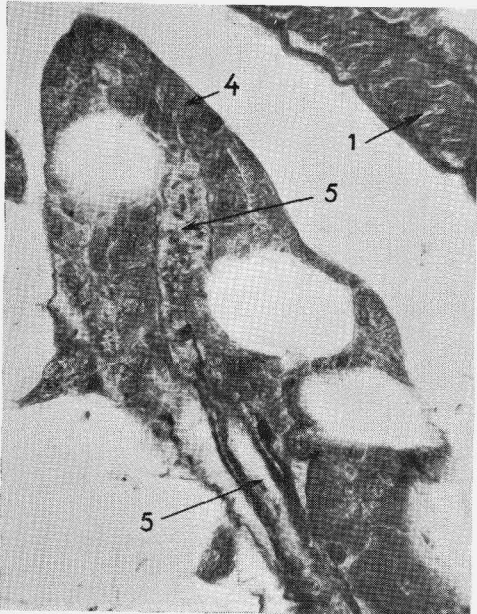
Pancreas baars

1. ductus pancreaticus (uitvoergang) 2. bloedvaten (venea) 3. eiland van Langerhans
4. exocrien klierweefsel 5. peritoneum

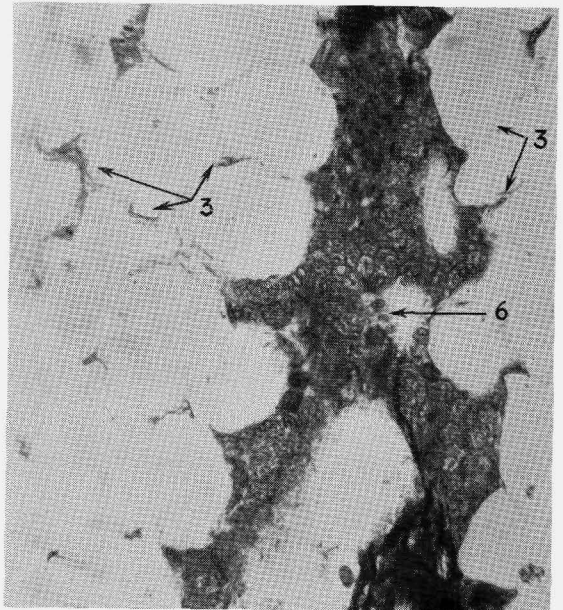
Fixatie Bouin, kleuring Azan. Vergroting A = 85 ×, B en C = 350 ×



A



B



C

PLAAT II

Pancreas en appendices maatjesharing

1. appendix 2. mesenterium met bloedvat en ductus pancreaticus 3. vetweefsel
 4. pancreas (exocrien weefsel) 5. bloedvaten 6. ductus pancreaticus (uitvoergang)
 Fixatie Bouin, kleuring Azan. Vergroting: A = 85 X, B en C = 350 X

helft links boven en het donkere gedeelte rechts onder een deel van de lengtedoorsnede van twee der appendices afbeeldt. Van hun binnenwand gaan vlokken (villi) uit, die het grootste gedeelte van hun lumen innemen. Tussen de beide appendices ligt (grotendeels los daarvan) vetweefsel (3), uit welks cellen het vet door de impregnatiemiddelen is opgelost. De exocriene pancreascellen liggen, meest met weinige cellen bijeen, temidden van dit vetweefsel. In A bij 2 en in B en C zijn meer compacte kleine strengen pancreas te zien. In of naast deze strengen verlopen steeds bloedvaten (5 in fig. B). De grote lege holten in het pancreasweefsel van fig. B zijn gevuld (of gevuld geweest) met vet. Vooral A geeft een indruk van de buitengewoon diffuse bouw en de sterke verspreiding van het pancreas bij de haring en van de geringe afmetingen der pancreascellen.

De haring waarvan deze preparaten zijn vervaardigd, was in het maatjesstadium. Eerder in dit hoofdstuk werd reeds opgemerkt dat het onmogelijk bleek pancreasweefsel te isoleren uit de vetmassa die de appendices in dit stadium van de jaarcyclus omgeeft. Uit deze afbeeldingen wordt dit direct duidelijk, evenals het feit dat in de winterperiode, wanneer het vet grotendeels verdwenen is, de totale massa pancreasweefsel die van de appendices los geprepareerd kan worden, gering is.

4. DISCUSSIE

Zowel uit het in fig. 12 weergegeven verband tussen pH en endopeptidase-activiteit, als uit de uitkomsten van de trypsinebepaling in de extracten van appendices en pancreas van baarzen (tabel XV), blijkt dat de trypsine-activiteit van de ingewanden van gevoerde baarzen hoofdzakelijk in het pancreas zetelt. Bij de interpretatie van de in tabel XV verzamelde uitkomsten dient nog bedacht te worden, dat in de baars naar ruwe schatting vier maal zoveel pancreasweefsel als binnenbekleding van de appendices aanwezig is. De tyrosineverhouding tussen pancreas en appendices wordt voor het pancreas dus nog aanzienlijk gunstiger dan de verhouding van de cijfers die aan de tabel ontleend kunnen worden.

In de ingewanden van de hongerende baarzen blijkt bijna geen

trypsine aanwezig te zijn. Voorzover het de appendices en de dunne darm betreft, is dit resultaat in overeenstemming met de uitkomsten van SCHLOTTKE (1940a). De trypsine-activiteit van het pancreas werd door SCHLOTTKE niet bepaald.

Volgens de in tabel XVI vermelde uitkomsten van het onderzoek naar de exopeptidase-activiteit van de verschillende ingewandsdelen, is er een groot verschil tussen de activiteiten van de dipeptidase en de aminopeptidase in het pancreas enerzijds en in de slijmvliezen van de appendices en van de dunne darm anderzijds. Bij de gevoerde baarzen is het verschil in carboxypeptidase-activiteit niet overtuigend, doch bij de hongerende baarzen is dit duidelijker.

Nadat bij de baars reeds gevonden was dat de trypsine-activiteit van de ingewanden van hongerende dieren zeer klein is, was van de uitkomsten van het overeenkomstig onderzoek aan hongerende haring niet veel resultaat te verwachten. De uitkomsten billijken deze pessimistische zienswijze. De trypsine-activiteit blijkt in alle onderzochte weefsels gering te zijn. Nochtans zou men uit de gegevens van tabel XVII na aftrekken van de activiteit van het pancreasnetwerk van de activiteit van de maagaanhangsels met verbindend pancreasnetwerk, willen concluderen dat ook bij de hongerende haring per gewichtseenheid weefsel in dit pancreas meer trypsine aanwezig is dan in de maagaanhangsels. Daar de hoeveelheid macroscopisch waarneembaar pancreasweefsel ten opzichte van de appendices zeer klein is, moet deze conclusie voor het gehele dier echter herzien worden. De uitkomst van dit deel van het onderzoek is dus in strijd met hetgeen omtrent de lokalisatie van trypsine-activiteit bij de baars gevonden werd.

Bij de interpretatie van de uitkomsten van de proeven die in dit hoofdstuk beschreven worden, dient men echter te bedenken dat de gestelde vraag door dit soort proeven slechts benaderend te beantwoorden is. Uit fysiologisch oogpunt bezien, is het primair van belang te weten welke hoeveelheden van de peptidasen *afgescheiden* worden door pancreas, appendices en darm. De hoeveelheden die daar onder verschillende omstandigheden *in voorraad worden gehouden* geven geen zekere maatstaf voor de afscheiding.

De afgebeelde microfoto's tonen aan dat het netwerk rond de

appendices van de haringmaag inderdaad uit pancreasweefsel bestaat. Eveneens blijkt dat het slijmvlies van de maagaanhangsels van de haring de structuur van darmslijmvlies heeft en dat het uit de baars als vermoedelijk pancreas los geprepareerd weefsel inderdaad de voor dit orgaan specifieke bouw vertoont.

5. CONCLUSIES

Uit de resultaten van het onderzoek naar de lokalisatie van trypsine en exopeptidasen in de verschillende ingewandsdelen mag besloten worden dat de appendices pyloricae van de baars geen pancreasfunctie bezitten; hun fysiologische betekenis is nauw verwant aan die van de dunne darm.

Het was niet mogelijk fysiologisch-chemisch onderzoek naar de functie van de maagaanhangsels van de haring uit te voeren aan dieren die in het maatjesstadium verkeerden. Overeenkomstig onderzoek aan volle haring leverde weinig overtuigende resultaten op, doordat het trypsinegehalte van de ingewanden van hongerende vissen zeer klein is. Uit de uitkomsten van het histologisch onderzoek kan geconcludeerd worden dat het slijmvlies van de appendices pyloricae van de haring de structuur van darmslijmvlies heeft en dat het pancreas de appendices als een fijn netwerk omgeeft.

SAMENVATTING

In de schaarse literatuur die aan de rijpingsprocessen in gezouten haring gewijd is, heerst geen eenstemmigheid ten aanzien van de rol die de eiwitplitsende enzymen hierbij spelen.

Na een beschrijving in hoofdstuk I van de bewerking die de maatjesharing sedert eeuwen aan boord van de Nederlandse vissersschepen ondergaat, wordt in hoofdstuk II een overzicht gegeven van de methoden die bij het onderzoek gebruikt werden. De belangrijkste daarvan zijn de bepaling van de activiteit van de endopeptidasen en van de exopeptidasen, welke respectievelijk uitgevoerd werden volgens ANSON en volgens GRASSMANN en HEYDE.

Met behulp van deze methoden werd een in hoofdstuk III beschreven onderzoek ingesteld naar de aanwezigheid van eiwitplitsende enzymen in het spierweefsel en in de ingewanden van de haring. Onmiddellijk na de vangst van de maatjesharing blijkt de bijdrage van het trypsine in de appendices pyloricae (maagaanhangsels) tot de bij de pH van de pekel gemeten totale endopeptidase-activiteit, het grootst te zijn. In de maag is weliswaar een aanzienlijke hoeveelheid pepsine aanwezig, doch de activiteit van dit enzym is bij de pH-waarden die in haringpekels voorkomen, van weinig betekenis. De activiteiten van de kathepsinen in de lever en in de spier zijn vergeleken met die van de endopeptidasen uit het maag-darmkanaal te verwaarlozen. Dit geldt niet voor de exopeptidasen van het spierweefsel. De totale hoeveelheid dipeptidase en aminopeptidase in de spieren, is groter dan de hoeveelheid van deze enzymen in het maag-darmkanaal. De carboxypeptidase-activiteit is voornamelijk in de appendices pyloricae geconcentreerd.

In hoofdstuk IV wordt verslag uitgebracht van proeven inzake

de invloed van natriumchloride op de activiteit van de enzymen. Bij de zoutconcentraties die in gezouten maatjesharing normaal zijn, blijkt de resterende activiteit van de endopeptidasen nog zeer aanzienlijk. De activiteit van de exopeptidasen wordt sterker geremd dan die van de endopeptidasen. Volgens de uitkomsten van bewaarproeven met zouthoudende endopeptidase-extracten nemen zowel de trypsine- als de pepsine-activiteit onder deze omstandigheden aanvankelijk snel af. De resterende trypsine-activiteit is van deze twee het grootst. Een temperatuurverschil van enkele graden C heeft bij koelhuistemperatuur weinig invloed op de snelheid waarmee de activiteit van de enzymen terugloopt.

In hoofdstuk V worden de veranderingen van de endopeptidase-activiteiten bij bewaring van gezouten maatjesharing behandeld, alsmede de veranderingen die de haring zelf onder invloed van de endopeptidasen ondergaat. De uitkomsten tonen aan dat de trypsine-activiteit van de pekel een maximum doorloopt. De trypsine-activiteit blijkt binnen de grenzen van de proef weinig afhankelijk te zijn van de bewaartemperatuur. Door middel van organoleptische keuring en bepaling van tyrosine in de haring, werd aangetoond dat de temperatuur wel van grote invloed is op de snelheid waarmee de haring rijpt.

In de praktijk worden bij het haringkaken niet steeds dezelfde delen uit het haringlichaam weggesneden, met als gevolg dat de verhouding waarin de eiwitplitsende enzymen in een vat haring voorkomen, niet constant is. Ook door opzettelijk variaties op de gebruikelijke wijze van kaken aan te brengen, kan men de betrokken verhouding beïnvloeden. In overeenstemming met hetgeen op grond van de conclusies van de vorige hoofdstukken verwacht kon worden, bevestigden de uitkomsten van een in hoofdstuk VI beschreven bewaarproef met op verschillende manieren geaakte maatjesharing, de opvatting van LIEBERT dat de aanwezigheid van de maagaanhangsels essentieel is voor de ontwikkeling van de gewenste organoleptische eigenschappen van gerijpte haring. Maatjesharing die zodanig geaakt werd dat de maagaanhangsels alleen of tezamen met de maag verwijderd werden, leverde na opslag in gezouten toestand produkten van minder goede kwaliteit.

Naar aanleiding van het voorkomen van trypsine in de met pancreasweefsel overdekte maagaanhangsels van de haring, werd

in hoofdstuk VII getracht de vraag te beantwoorden of het tryptine in het pancreas, dan wel rechtstreeks in de appendices pyloricae afgescheiden wordt. Toepassing van fysiologisch-chemische methoden leverde geen bevredigende uitkomsten op. Bij toepassing van dezelfde methoden op de ingewanden van de baars, werden duidelijke aanwijzingen verkregen dat het slijmvlies van de appendices pyloricae geen pancreasfunctie heeft, doch nauw verwant is aan het darmslijmvlies. Door middel van enkele microscopische preparaten van de maagaanhangsels en het weefsel dat deze organen als een netwerk overgroeit, kon een verregaande analogie in de structuur van enerzijds de appendices van de baars en de haring en van anderzijds het bovengenoemde netwerk bij beide vissen vastgesteld worden. Uit deze preparaten blijkt dat het netwerk dat de appendices pyloricae van de haring omgeeft, uit pancreasweefsel bestaat.

SUMMARY

In the few publications which deal with the reactions that occur during the ripening of salted herring, there is no unanimity about the part played by proteolytic enzymes.

After a description in Chapter I of the way in which maatjes herring have been cured for centuries aboard the Dutch fishing ships, a survey is given in Chapter II of the methods of analysis used in the course of the investigations. The most important of these were the determinations of the activity of the endopeptidases by the method of ANSON and of the activity of the exopeptidases by the method of GRASSMANN and HEYDE.

Using these methods, an investigation described in Chapter III was set up into the existence of proteolytic enzymes in the muscles and intestines of the herring. In freshly caught maatjes herring, the trypsin in the pyloric caecae makes the most substantial contribution to the total endopeptidase activity, as measured at the pH values normally found in herring brines. Although considerable quantities of pepsin are present in the stomach, the activity of this enzyme in the pH range of herring brines is of little importance. The activities of the katepsins in the liver and in the muscles are negligible compared with those of the endopeptidases in the intestines. This is not true for the exopeptidases of the muscles, however. The total amounts of dipeptidase and aminopeptidase are greater in the muscles than in the intestines. The carboxypeptidase activity is chiefly concentrated in the pyloric caecae.

Chapter IV deals with experiments showing the influence of sodium chloride on the activities of the enzymes. At salt concentrations that are normal in maatjes cured herring, the activities of the endopeptidases are still considerable. The activities of the exopeptidases are more strongly inhibited than those of the endopeptidases. Storage experiments with endopeptidase extracts containing sodium chloride show that initially the activity of the trypsin as well as that of the pepsin decreases rapidly, under the conditions of the experiment, but that ultimately the trypsin has the greater residual

activity of the two. At temperatures usually encountered in herring cold stores, differences of a few centigrade degrees have little influence on the velocities with which the activities of the enzymes decrease.

In Chapter V the changes in the activities of the endopeptidases during storage of maatjes cured herring are described, as well as the changes the herring itself undergoes because of the enzyme action. The results show that the trypsin activity of the brine passes through a maximum, and appears to be but little dependent on the storage temperature, within the limits investigated. Organoleptic testing and determinations of tyrosine showed that the velocity with which the herring was ripening was markedly influenced by temperature.

When gibbing herring in practice, not always the same parts of the fish are cut away, so that the proportions of the proteolytic enzymes in the barrels are not constant. Hence the proportions can also be changed intentionally by varying the usual gibbing procedure. The results of the storage experiments with maatjes cured herring, gibbed in different ways as described in Chapter VI, prove that LIEBERT was right in stating that the presence of pyloric caecae was necessary for the development of the desired organoleptic properties of salted herring. Maatjes herring gibbed in such a manner that the pyloric caecae were cut away, either alone or together with the stomach, resulted in an inferior product after storage in the cured condition.

Chapter VII deals with attempts to find out whether the trypsin is secreted in the pancreatic tissue that grows like a network over the pyloric caecae, or directly in the caecae themselves. Application of biochemical methods gave no decisive answer to this question. The same methods applied to the intestines of perch showed that the mucous membrane of the caecae had no pancreatic function, but was closely related to the mucous membrane of the long gut. Examination of microscopic preparations proved that the structures of, on the one hand, the caecae of perch and herring, and on the other, the pancreatic tissue growing over the caecae of both species were highly analogous. From the slides it was clear that the network over the pyloric caecae of herring consisted of pancreatic tissue.

LITTERATUUR

- Abderhalden, E. und A. Fodor, Der Einfluss von Zusätzen auf den fermentativen Abbau von Dipeptiden durch Hefeauszug. *Fermentforschung* 4 (1921) 191—208.
- Almy, L. H., The role of the proteolytic enzymes in the decomposition of the herring. *J. Am. chem. Soc.* 48 (1926) 2136—2146.
- Anson, M. L., The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. gen. Physiol.* 22 (1939) 79—89.
- Battle, H. I., Digestion and digestive enzymes in the herring (*Clupea harengus* L.). *J. biol. Board Can.* 1 (1935) 145—157.
- Beatty, S. A. and N. E. Gibbons, The measurement of spoilage in fish. *J. biol. Board Can.* 3 (1937) 77—91.
- Bock, F. S., Versuch einer vollständigen Natur- und Handlungsgeschichte der Heringe. Königsberg, 1769.
- Bondouy, Th., Du rôle des tubes pyloriques dans la digestion chez les téléostéens. *Arch. Zool. exp. et gén. III^{me} Sér.* 7 (1899) 419—460.
- Buchs, S., Die Biologie des Magenkathepsins. Basel, S. Karger A. G., 1947.
- Chesley, L. C., The concentrations of proteases, amylase, and lipase in certain marine fishes. *Biol. Bull.* 66 (1934) 133—144.
- Creboldér, A. J. M., Chr. Engel and C. J. Otten, The proteolytic enzyme(s) of human gastric juice. *Enzymologia* 15 (1951) 103—108.
- Cutting, C. L., Fish saving. London, Mackay and Co. Ltd., 1955.
- Davis, N. C. and E. J. Smith, Assay of proteolytic enzymes. *Methods of biochem. Anal.* 2 (1955) 215—257.
- Degrijse, R., Vlaanderens haringbedrijf in de Middeleeuwen. Antwerpen, De Nederlandsche Boekhandel N.V., 1944.
- Ellenbogen, E. and E. Brand, Determination of neutral equivalents by titration in alcohol. *Anal. Chem.* 27 (1955) 2007.
- Folin, O. and V. Ciocalteu, On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. biol. Chem.* 73 (1927) 627—650.
- Geilenkirchen, W. L. M. and P. F. Elbers, Digestion of edestan and some other protein-substrates by pig stomach extract. *Enzymologia* 14 (1951) 304—310.
- Gerritsma, K. W., J. H. van de Kamer en J. Willems, Snelle bepaling van natriumchloride in voedingsmiddelen die eiwit bevatten. *Chem. Weekbl.* 46 (1950) 213—216.

- Graham, M., *Sea fisheries*. London, Arnold, 1956.
- Grassmann, W. und W. Heyde, Alkalimetrische Mikrobestimmung der Aminosäuren und Peptide. *Z. physiol. Chem.* **183** (1929) 32—38.
- Hebers, J., Over de taak van de Dienst der Nederlandse Haringcontrole. *Visserijnieuws* **6** (1953) 43—45.
- Kenyon, W. A., Digestive enzymes in poikilothermal vertebrates. *U.S. Bur. Fisheries, Bull.* **41** (1925) 181—200.
- Kranenburg, H. A. H., *De zeevisscherij van Holland in den tijd der Republiek*. Amsterdam, Paris, 1946.
- Krüger, A., *Untersuchungen über das Pankreas der Knochenfische*, Inauguraldissert., Kiel, 1904.
- Laguesse, E., Structure du pancréas et pancréas intra-hépatique chez les poissons. *Compt. rend. Acad. sci. Paris* **112** (1891) 440—442.
- Laguesse, E., Développement du pancréas chez les poissons osseux. *J. Anat. et Physiol.* **30** (1894) 79—116.
- Legouis, P., Recherches sur les tubes de Weber et sur le pancréas des poissons osseux. *Ann. Sci. nat. Vme Sér.* **17** (1873) art. no. 8 en **18** (1873) art. no. 3.
- Levites, S., Ueber den Einfluss neutraler Salze auf die peptische Spaltung des Eiweisses. *Z. physiol. Chem.* **48** (1906) 187—191.
- Liebert, F., Over de rol der enzymen bij de bereiding van pekelharing. *Rapp. Verhand. Rijksinst. Visserijonderz.* **1** No. 1 (1913) 124—132.
- Luijpen, A. F. M. G., Changes in Dutch salted matjesherring during storage and spoilage. *Proc. Symp. cured frozen Fish Techn. Swed. Inst. Food Preserv. Research Göteborg*, Publ. No. **100** (1953) Ch. IV, p. 1—12.
- Mesnard, J. et E. Rosé, Recherches complémentaires sur la fabrication du nuocmam. *Ann. Inst. Pasteur* **34** (1920) 622—649.
- Neuberger, A., Electrometric titration of amino-acids in aqueous-alcoholic solution. *Proc. roy. Soc. B* **115** (1934) 180—199.
- Northrop, J. H., The mechanism of the influence of acids and alkalies on the digestion of proteins by pepsin or trypsin. *J. gen. Physiol.* **5** (1923) 263—274.
- Northrop, J. H. and H. S. Simms, The effect of the hydrogen ion concentration on the rate of hydrolysis of glycyl glycine, glycyl leucine, glycyl alanine, glycyl asparagine, glycyl aspartic acid, and biuret base by erepsin. *J. gen. Physiol.* **12** (1929) 313—328.
- Produktschap voor Vis en Visprodukten, *Verslag over het jaar 1957*. 's-Gravenhage, 1958.
- Richardson, G. M., The principle of formaldehyde, alcohol and acetone titrations. *Proc. roy. Soc. B* **115** (1934) 121—141.
- Schlottke, E., Die Aenderungen der Fermentstärke im Karpfendarm während der Verdauung. *Sitz. ber. und Abh. naturforsch. Ges. Rostock* **3 F.** **7** (1938) 27—88.
- Schlottke, E., *Untersuchungen über die Verdauungsfermente der Quappe (Lota vulgaris L.)*. *Fischerei u. Hilfswiss.* **37** (1939) 381—394.

- Schlottke, E., Untersuchungen über die Verdauungsfermente des Fluszbarsches (*Perca fluviatilis*). Z. Fischerei u. Hilfswiss. 38 (1940a) 1—31.
- Schlottke, E., Untersuchungen über die Verdauungsfermente der Regenbogenforelle, *Trutta iridea* (W. Gibb). Z. Fischerei u. Hilfswiss. 38 (1940b) 33—69.
- Schlottke, E., Die Verdauungsfermente im Karpfendarm und ihre Aenderungen während des Sommers. Z. Fischerei u. Hilfswiss. 38 (1940c) 323—344.
- Schmidt-Nielsen, S., Ueber den Reifungsvorgang beim Fökeln von Häringen. Kgl. Norske Videnskab. Selskabs Skrifter No. 5 (1901).
- Schormüller, J., R. Wieske und H. Winter, Beiträge zur Biochemie der Käse- reifung. VIII. Mitt. Die Proteinasen des Sauermilchkäses und deren Akti- vität im Verlauf der Reifung. Z. Lebensm. — Untersuch. u. — Forsch. 99 (1954) 437—460.
- Shewan, J. M., The salt curing of herring. Dept. Sci. Ind. Research Rept. Food Investig. Board 1938 p. 115-117.
- Stirling, W., On the ferments or enzymes of the digestive tract in fishes. J. Anat. Physiol. 28 (1884) 426—435.
- Vonk, H. J., Die Verdauung bei den Fischen. Acad. Proefschrift, Utrecht, 1927.
- Vonk, H. J., The specificity and collaboration of digestive enzymes in metazoa. Biol. Revs. 12 (1937) 245—284.
- Vonk, H. J., Die Verdauung bei den niederen Vertebraten. Advances in Enzymol. 1 (1941) 371—417.
- Weiss, H. R., Zur Kenntnis der Trypsinverdauung. Z. physiol. Chem. 40 (1904) 480—491.
- Willem Beukelsz-gedenkteken in feestelijke sfeer onthuld. Visserijwereld 17 (1958) No. 37 pp. 3, 7 en 18.
- Willstätter, R. und E. Waldschmidt-Leitz, Alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden. Ber. deut. chem. Ges. 54 (1921) 2988—2993.
- Winter, R., Ueber den Darmkanal von *Perca fluviatilis*. Z. Fischerei u. Hilfswiss. 34 (1936) 639—645.
- Wood, A. J., G. J. Sigurdsson and W. J. Dyer, The surface concept in measure- ment of fish spoilage. J. Fish. Res. Board Can. 6 (1942) 53—62.
- Zamyslov, A. D. en Savost'yanov, Over de proteolyse bij het zouten van haring (In het Russisch). Biokhimiya 1 (1936) 401—410. Ref. Chem. Abstr. 31 (1937) 5889^s.
- Zijlstra, J. J., Verdwijnt de haring? Amsterdam, Stichting I.V.I.O., 1957 (A.O. Reeks No. 662).