



Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen

Academiejaar 2013 – 2014

Gebruik van essentiële oliën in water in functie van de bacteriële kwaliteit van diverse voedingsmatrices

Niels Terrie

Promotors: Prof. dr. ir. I. Sampers en Prof. dr. ir. K. Raes

Tutor: ir. Kristof Vande Ginste

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de industriële wetenschappen: biochemie

Toelating tot bruikleen

De auteur en de promotor geven de toelating om deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik.

Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze masterproef.

6-06-2014

Niels Terrie

Prof. Dr. Imca Sampers

Voorwoord

Mijn masterproefonderwerp werd reeds twee jaar geleden gekozen omdat dit aansluitend was op de bachelorproef. Toen was dit uiteraard geen gemakkelijke keuze omdat dit onderwerp voldoende mijn interesse moest wekken om gedurende deze periode er enthousiast aan te werken. In het uitgebreide aanbod van sectoren heb ik uiteindelijk de voedingssector gekozen omdat hier mijn interesse naar uitgaat. Het gebruik maken van essentiële oliën in water om zo een verlaging te krijgen in microbiële lading op verse vis en verse kruiden sprak me wel aan. Dit onderzoek houdt zich bezig met het verbeteren van de voedselkwaliteit en –houdbaarheid. Dit geeft me voldoening omdat iedereen er belang bij heeft dat er een zo goed mogelijke kwaliteit en zo lang mogelijke houdbaarheid bereikt wordt.

De masterproef begon met het praktische gedeelte, waarna dan het theoretische gedeelte volgde. Dit praktische gedeelte lag niet voor de hand aangezien er een protocol aangeleerd moest worden in een zo kort mogelijke tijd. Hierbij wil ik dan ook Prof. dr. ir. Imca Sampers en ir. Kristof Vande Ginste bedanken om uitleg te geven omtrent dit protocol. Ook gaf Prof. dr. ir. Imca Sampers goede tips over het theoretische luik van deze masterproef. Ook wees ze terecht op enkele onduidelijkheden in dit werk en de resultaten. Prof. dr. ir. Katleen Raes wil ik ook bedanken voor haar kritisch oog op de resultaten en de hulp over de statistische verwerking van de resultaten.

Vervolgens wil ik iedereen bedanken die in het labo werkte tijdens het praktische deel van mijn masterproef, dit voor de uiterst goede sfeer in dit labo. In het bijzonder wil ik daarvoor Hanne Vandepitte, Quinten Christiaens, Ferialle Levecque, Valerie Deman, Gaël Ramon en Nicolas Bryon bedanken. Zonder deze goede sfeer was deze masterproef mentaal veel moeilijker verlopen.

Enkele familieleden wil ik ook nog bedanken. In eerste plaats mijn moeder, Rita Polet. Dit omdat ze mij als alleenstaande moeder de kans heeft gegeven om deze studies uit te voeren en voor alle geduld die ze had tijdens mijn moeilijke momenten, niet enkel tijdens de masterproef, maar ook gedurende heel mijn schoolcarrière. Ook mijn zus, Julie Terrie en mijn nonkel, Yvan Polet, wil ik bedanken voor het nalezen van dit werk. Tot slot wil ik hier ook nog Emma Scherpereel vermelden, haar geboorte tijdens de masterproef gaf me terug nieuwe energie om verder voor deze studies en dus voor deze masterproef te gaan.

Abstract

Food matrices such as fresh herbs (*Petroselinum crispum*) and fresh fish (*Solea solea* and *Salmo salar*) were submerged into an emulsion of essential oil (EO) in water. Submerging in an emulsion was used to reduce the number of micro-organisms present in the washing water and eventually on the food matrix itself. The microbial build-up in the washing water was simulated by submerging 20 successive food samples in the washing water. In the washing water of fish, as well as of herbs the microbial build-up above the detection limit of 2 log cfu/100ml was prevented by using an emulsion of 1% *Origanum compactum* and this against *L. monocytogenes* and the total viable count for fish, and against *E. coli*, total coliforms and total viable count for herbs. This concentration also led to a reduction below the detection limit on the herbs itself. However, on the fish no reduction was found. *Cymbopogon citratus*, which is another EO, has less antimicrobial properties against the tested micro-organisms in combination with the food matrices than *O. compactum* at the same concentration. Concentrations of 0,2 and 0,02% of *O. compactum* used in the washing water of herbs and on the herb matrix, were not effective against the micro-organisms. By submerging *Salmo salar* for a longer duration and using different antimicrobial agents, the best antimicrobial activity was obtained by a saturated salt solution in combination with 1% *O. compactum* and acidified to pH 4 with citric acid. This antimicrobial effect was oriented against the natural present coliforms as well as against the post-inoculated *L. monocytogenes*.

Samenvatting

Voedingmatrices als verse kruiden (*Petroselinum crispum*) en verse vis (*Solea solea* en *Salmo salar*) werden ondergedompeld in een emulsie van essentiële olie (EO) in water. Het onderdompelen in de emulsie had als doel het aantal micro-organismen aanwezig in het waswater en eventueel op de voedingsmatrices zelf te reduceren. Een microbiële opbouw in een wasbad werd gesimuleerd door 20 voedingsstalen opeenvolgend onder te dompelen. In het wasbad van zowel vis- als kruidenmatrix werd een microbiële opbouw boven de detectielimiet van 2 log kve/100ml voorkomen door het toepassen van 1% *Origanum compactum* en dit tegen zowel *L. monocytogenes* en het totale kiemgetal voor vis, als ook *E. coli*, totaal coliformen en het totale kiemgetal voor kruiden. Ook op de kruidenmatrix zelf veroorzaakte deze concentratie een reductie tot onder de detectielimiet. Echter op de vismatrix werd geen reductie teruggevonden. *Cymbopogon citratus*, wat een andere EO is, beschikt over minder antimicrobiële eigenschappen in combinatie met de voedingsmatrices tegen deze geteste micro-organismen dan *O. compactum* in dezelfde concentraties. Lagere concentraties als 0,2% en 0,02% aan *O. compactum*, toegepast in het wasbad en op de matrix van kruiden, waren niet werkzaam. Door *Salmo salar* langer onder te dompelen en gebruik te maken van verschillende antimicrobiële stoffen werd de beste antimicrobiële werking verkregen bij een verzadigde zoutoplossing in combinatie met 1% *O. compactum*, aangezuurd tot pH 4 met citroenzuur. Deze werking was zowel tegen de totaal coliformen als de post-geïnoculeerde *L. monocytogenes* gericht.

Inhoudsopgave

Toelating tot bruikleen.....	III
Voorwoord	V
Abstract	VII
Samenvatting.....	IX
Inhoudsopgave	XI
Lijst van symbolen en afkortingen	XIII
Lijst met tabellen.....	XV
Lijst met figuren	XV
1. Inleiding	1
2. Kruidenmatrix	3
2.1. Samenstelling van de voedingsmatrices	3
2.1.1. Aanwezigheid van antimicrobiële componenten in de kruidenmatrix.....	4
2.2. Aanwezige micro-organismen.....	6
2.2.1. Bedervers	7
2.2.2. Pathogenen	8
2.2.3. Fungi	10
2.2.3.1. Schimmels.....	10
2.2.3.2. Gisten.....	11
2.2.4. Virussen	11
2.2.5. Parasieten	11
2.2.6. Uitbraken van pathogenen op kruiden	11
3. Vismatrix.....	13
3.1. Samenstelling van de vismatrix.....	13
3.2. Aanwezige micro-organismen.....	13
3.2.1. Bacteriën	14
3.2.1.1. Bedervers	14
3.2.1.2. Pathogenen	14
3.2.2. Fungi	15
3.2.2.1. Schimmels.....	15
3.2.2.2. Gisten.....	15
3.2.3. Virussen	15
3.2.4. Parasieten	16
3.2.5. Uitbraken van micro-organismen op vis	16
4. Werking essentiële olie	17
4.1. Antimicrobiële werking.....	17
4.2. Invloeden van voedingsmatrix op werking essentiële olie	20
4.3. <i>Origanum compactum</i> en <i>Cymbopogon citratus</i>	21
5. Materiaal en methoden	27
5.1. Media en reagentia	27
5.1.1. Analyse op kruiden	27
5.1.2. Analyse op vis	27
5.1.3. Screening van verschillende antimicrobiële middelen en hun combinaties (hurdle effect) op zalm	28
5.2. Micro-organismen.....	28

5.3.	Methodes	28
5.3.1.	Analyse op kruiden.....	28
5.3.1.1.	Wassen van kruiden.....	28
5.3.1.2.	Staalvoorbereiding	29
5.3.1.3.	Uitplaten stalen	29
5.3.1.4.	Tellen van platen.....	30
5.3.2.	Aanmaken werkcultuur van <i>Listeria monocytogenes</i> voor inoculatie vis	30
5.3.3.	Analyse op vis	30
5.3.3.1.	Inoculeren stalen.....	30
5.3.3.2.	Wassen van visstalen	30
5.3.3.3.	Staalvoorbereiding	31
5.3.3.4.	Uitplaten stalen	31
5.3.3.5.	Tellen van platen.....	32
5.3.4.	Screening van verschillende antimicrobiële middelen en hun combinatie (hurdle effect) op zalm.....	32
5.3.4.1.	Behandelen van zalmstalen	32
5.3.4.2.	Staalvoorbereiding en uitplaten	33
5.3.4.3.	Tellen van platen.....	33
5.4.	Data verwerking	33
6.	Resultaten.....	35
6.1.	Kruidenmatrix.....	35
6.1.1.	Analyse van de kruidenmatrix	36
6.1.1.1.	Vergelijken van verschillende essentiële oliën.....	36
6.1.1.2.	Vergelijken van verschillende concentraties	38
6.1.1.3.	Vergelijken van verschillende batches.....	39
6.1.2.	Analyse van het waswater.....	41
6.2.	Analyse op vis	43
6.2.1.	Analyse van zalm- en tongmatrix	43
6.2.1.1.	Conclusie	47
6.2.2.	Analyse van wasbaden	47
6.2.2.1.	Algemeen conclusie	48
6.3.	Screening van verschillende antimicrobiële middelen en hun combinaties (hurdle effect) op zalm	48
7.	Discussie.....	53
7.1.	Kruidenmatrix	53
7.2.	Vismatrix	59
7.3.	Hurdle effect.....	63
8.	Referenties.....	65
9.	Bijlages	71

Lijst van symbolen en afkortingen

<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
BHI	Brain Heart Infusion
<i>C. botulinum</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>C. citratus</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EO	Essentiële olie
Ex.	Expiry date (vervaldatum)
Kve	Kolonie vormende eenheden
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LOD	Limit of detection (detectielimiet)
MAP	Modified atmosphere packaging
NaCl	Natriumchloride
ND	Niet detecteerbaar
<i>O. basilicum</i>	<i>Ocimum basilicum</i>
<i>O. compactum</i>	<i>Origanum compactum</i>
<i>P. crispum</i>	<i>Petroselinum crispum</i>
PCA	Plate count agar
<i>S. solea</i>	<i>Solea solea</i>
S.	<i>Salmonella</i>
Spp.	Species
V.	<i>Vibrio</i>
v/v	Volume/Volume
v/w	Volume/Weight
WB	Wasbeurten

Lijst met tabellen

Tabel 2-1 Hoofdcomponenten <i>O. basilicum</i> en <i>P. crispum</i>	3
Tabel 2-2 Beschrijving antimicrobiële componenten in procenten van <i>P. crispum</i> olie	5
Tabel 2-3 Beschrijving antimicrobiële componenten in procenten van <i>O. basilicum</i> olie ...	6
Tabel 2-4 Uitbraken van <i>Salmonella</i> spp. op verse kruiden.....	12
Tabel 3-1 Hoofdcomponenten rauwe tong en Atlantische zalm.....	13
Tabel 3-2 Uitbraken en ziektes veroorzaakt door bacteriën, virussen en parasieten aanwezig op vis in de Verenigde Staten tussen 1973 en 2006	16
Tabel 4-1 Samenstelling <i>Origanum compactum</i>	22
Tabel 4-2 Samenstelling <i>Cymbopogon citratus</i>	22
Tabel 7-1 Overzicht onderzoek naar de werking van EO op kruiden en bladgroenten	54
Tabel 7-2 Overzicht van onderzoek verricht naar de werking van EO op vis.....	61

Lijst met figuren

Figuur 2-1 <i>Ocimum basilicum</i>	3
Figuur 2-2 <i>Petroselinum crispum</i>	3
Figuur 2-3 Groepen van antimicrobiële componenten.....	4
Figuur 3-1 Tong (<i>Solea solea</i>)	13
Figuur 3-2 Atlantische zalm (<i>Salmo salar</i>).....	13
Figuur 4-1 Plaatsen in de bacteriecel waar essentiële oliën op inwerken	17
Figuur 4-2 <i>E. coli</i> via scanning elektronenmicroscop.....	18
Figuur 4-3 <i>B. subtilis</i> via scanning elektronenmicroscop	18
Figuur 4-4 Concentratie en tijd afhankelijke toxiciteit van essentiële olie op de morfologie van hyfen bij <i>T. rubrum</i> (40x vergroting lichtmicroscop)	19
Figuur 4-5 Beelden via scanning elektronenmicroscop van de morfologie van de hyfen van <i>A. fumigatus</i> behandeld met 0,04 % v/v van cinnamaldehyde	20
Figuur 6-1 Aantal <i>E. coli</i> aanwezig op kruiden, na onderdompeling in <i>O. compactum</i>	35
Figuur 6-2 Opstapeling van <i>E. coli</i> in het wasbad van <i>O. compactum</i> , na onderdompeling van een kruidenmatrix.....	36
Figuur 6-3 Totaal coliformen aanwezig op verse kruiden, afkomstig van bedrijf X, na onderdompeling in een 1% emulsie	37
Figuur 6-4 Totaal kiemgetal aanwezig op verse kruiden, afkomstig van bedrijf X, na onderdompeling in een 1% emulsie	37
Figuur 6-5 Totaal coliformen aanwezig op verse kruiden, afkomstig van bedrijf X, na onderdompeling in verschillende concentratie <i>O. compactum</i>	38
Figuur 6-6 Totaal kiemgetal aanwezig op verse kruiden, afkomstig van bedrijf X, na onderdompeling in verschillende concentratie <i>O. compactum</i>	39
Figuur 6-7 Vergelijken van de coliformen aanwezig op de kruidenmatrix afkomstig van verschillende bedrijven, staalname aan het begin van de wasreeks	40
Figuur 6-8 Vergelijken van het totale kiemgetal aanwezig op de kruidenmatrix afkomstig van verschillende bedrijven, staalname aan het begin van de wasreeks.....	41
Figuur 6-9 Reductie verkregen van de totaal coliformen door <i>O. compactum</i> na onderdompeling van een kruidenmatrix in het wasbad.....	41

Figuur 6-10 Opstapeling van micro-organismen in waswater, na onderdompeling van een kruidenmatrix.....	42
Figuur 6-11 Reductie verkregen van het totale kiemgetal door <i>O. compactum</i> na onderdompeling van een kruidenmatrix in het wasbad	42
Figuur 6-12 <i>L. monocytogenes</i> op zalmfilet, staalname aan begin van wasreeks	43
Figuur 6-13 Totaal kiemgetal aanwezig op zalm, staalname aan einde van wasreeks	44
Figuur 6-14 Vergelijking van het aantal <i>L. monocytogenes</i> op zalmfilet bij stalen genomen aan enerzijds het begin van de wasreeks met 1 % <i>Origanum compactum</i> en anderzijds het einde van de wasreeks.....	45
Figuur 6-15 <i>L. monocytogenes</i> aanwezig op tongfilet, staalname aan einde van de wasreeks.....	45
Figuur 6-16 Totaal kiemgetal aanwezig op tongfilet, staalname aan begin van de wasreeks.....	46
Figuur 6-17 Reducties van <i>L. monocytogenes</i> verkregen in het wasbad van <i>O. compactum</i> , na onderdompeling van visstalen	47
Figuur 6-18 Reductie van het totale kiemgetal verkregen in het wasbad van <i>O. compactum</i> na onderdompeling van visstalen	48
Figuur 6-19 Totaal coliformen aanwezig op de zalmmatrix na onderdompeling in verschillende wasbaden	49
Figuur 6-20 <i>Listeria monocytogenes</i> aanwezig op de zalmmatrix na onderdompeling in verschillende wasbaden	51

1. Inleiding

Micro-organismen kunnen zorgen voor het bederf van voedsel of het ziek maken van de consument. Voorzorgen worden veelvuldig genomen tijdens het verwerken van voedsel, om de micro-organismen op voedsel te verkleinen. Maar ondanks deze goede praktijken en conserveringsmethoden in de landbouw en productie is contaminatie niet uit te sluiten. Traditionele technieken als invriezen, verzuring, fermentatie en pasteurisatie zijn goed voor het onder controle houden van microbiel bederf van voedsel. Nieuwe technieken zijn ontwikkeld voor het vertragen of voorkomen van microbiële groei. Deze nieuwe technieken zijn bijvoorbeeld MAP-verpakkingen, bestraling.... De consument wil minimaal bewerkte voedingsmiddelen, met toevoeging van zo weinig mogelijk synthetische additieven.

Er is dus nood aan een nieuwe, algemeen toegestane methode om op een natuurlijke wijze de microbiële lading, aanwezig op de voedingsmatrix of in het wasbad, te reduceren of inhiberen. Er wordt in het laboratorium Voedingsmicrobiologie en Biotechnologie aan de Universiteit Gent Campus Kortrijk onder leiding van Prof. Dr. Katleen Raes en Prof. Dr. Imca Sampers onderzoek verricht naar het gebruik van essentiële oliën als antimicrobiële middelen, mogelijks te gebruiken in de voedingsindustrie. TETRA-project nr. 110155 (Gebruik van essentiële oliën als tool voor de verwijdering van pathogene en bederfflora) onderzoekt zo een nieuwe methode, door toepassen van essentiële oliën in water. EO zijn secundaire metabolieten, geëxtraheerd uit plantaardig materiaal. Ze beschikken over een antibacteriële, antifungische, antivirale en/of antiparasitaire werkingen.

In deze thesis worden voedingsmatrices ondergedompeld in een emulsie van essentiële olie in water om de microbiële opbouw in het wasbad te simuleren. Het onderdompelen in de emulsie heeft als doel de invloed van een bepaalde concentratie aan EO op het aantal micro-organismen, aanwezig in het wasbad, te bekijken om zo kruiscontaminatie te vermijden. Bijkomstig wordt er gekeken naar de invloed op de microbiële lading, aanwezig op de voedingsmatrix. Als voedingsmatrices worden verse kruiden (*Petroselinum crispum*) en verse vis (*Solea solea* en *Salmo salar*) gebruikt. Een emulsie werd gemaakt met als essentiële oliën *Origanum compactum* of *Cymbopogon citratus*. Ook werd een screening uitgevoerd naar het effect van onderdompeling in verschillende antimicrobiële middelen (zout, zuur en EO) of hun combinaties ('hurdle effect') op de zalmmatrix.

In de thesis worden de verschillende voedingsmatrices besproken. De samenstelling van de voedingsmatrix speelt zo een belangrijke rol in de groei van micro-organismen. Er wordt ook uitgelegd hoe EO inwerken op micro-organismen om zo een reducerend of inhiberend effect te veroorzaken. Tot slot wordt het praktische deel van het onderzoek toegelicht, met verdere bespreking en discussies van de verkregen resultaten. Hierbij worden de toegepaste concentraties EO geëvalueerd, aan de hand van de voedingsmatrices en het waswater.

2. Kruidenmatrix

Eén van de voedingsmatrices waarop werd gefocust in deze thesis zijn verse kruiden, meer bepaald basilicum (*Ocimum basilicum*) en platte peterselie (*Petroselinum crispum*). *Ocimum basilicum* (figuur 2-1) wordt over heel de wereld gekweekt (Paton, 2013). *Petroselinum crispum* (figuur 2-2) heeft zijn oorsprong aan de Middellandse zee, het wordt tegenwoordig ook in landen gekweekt met een gematigd klimaat (Globinmed, 2013).



Figuur 2-1 *Ocimum basilicum*
(USDA, 2013e)



Figuur 2-2 *Petroselinum crispum*
(Allégrow, 2013)

2.1. Samenstelling van de voedingsmatrices

De samenstelling van de voedingsmatrix, meer bepaald van *O. basilicum* en *P. crispum*, is terug te vinden in tabel 2-1 (USDA, 2013a, USDA, 2013b). De tabel geeft de hoofdbestanddelen weer van beide kruiden. De samenstelling van beide kruiden loopt sterk gelijk, zowel van proteïnen als lipiden. Proteïnen en lipiden zijn componenten die een remmende factor kunnen hebben op EO (zie paragraaf 4.2). *P. crispum* heeft een hoger gehalte aan koolhydraten dan *O. basilicum*. Dit is echter geen remmende factor voor de werking van essentiële oliën (Gutierrez et al., 2008). Een verdere specifieke onderverdeling van samenstelling is terug te vinden in de bijlagen A tot en met D.

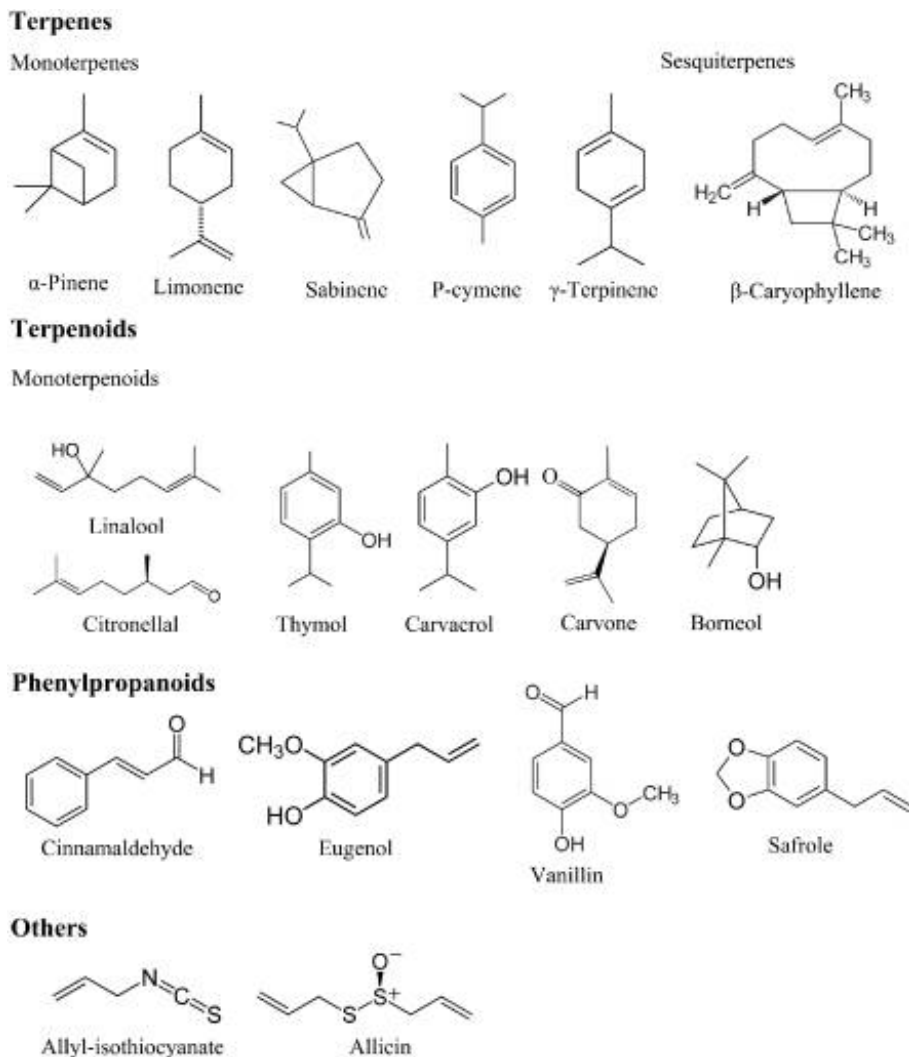
Tabel 2-1 Hoofdc componenten *O. basilicum* en *P. crispum*

Nutriënt	<i>Ocimum basilicum</i>		<i>Petroselinum crispum</i>	
	Waarde per 100 g (g)	Standaard deviatie	Waarde per 100 g (g)	Standaard deviatie
Water	92,06	1,105	87,71	0,668
Proteïnen	3,15	0,607	2,97	0,426
Lipide	0,64	0,030	0,79	0,267
As	1,49	0,060	2,20	-
Koolhydraten	2,65	-	6,33	-
Suiker	0,30	-	0,85	-
Vezels	1,60	0,195	3,30	-

2.1.1. Aanwezigheid van antimicrobiële componenten in de kruidenmatrix

In de kruiden zijn van nature antimicrobiële stoffen aanwezig. Deze worden door middel van stoomdestillatie uit het kruid geëxtraheerd, zodat er met deze componenten een essentiële olie bekomen wordt die een antimicrobiële werking heeft (Bagamboula et al., 2004).

In essentiële oliën zijn de actieve componenten die een antimicrobiële werking hebben in drie groepen in te delen: de terpenen, terpenoïden en de fenypropenen. Enkele andere moleculen die niet tot deze groepen behoren, kunnen ook over een antimicrobiële werking beschikken. Voorbeelden van de actieve componenten in elke groep zijn terug te vinden in figuur 2-3 (Bagamboula et al., 2004, Lv et al., 2011, Kaiser et al., 2013, Hyldgaard et al., 2012). De samenstelling van deze componenten is sterk afhankelijk van het chemotype van de kruidensoorten (Lv et al., 2011). Het verschil van chemotype van planten zorgt voor een verschil in samenstelling. Ook heeft het seizoen waarin de plant groeit een invloed op de samenstelling, dit is terug te vinden in tabel 2-2 (Hussain et al., 2008, Burt, 2004, Vokk et al., 2011). De geografische locatie, klimaat en ouderdom van de plant zijn eveneens factoren die invloed hebben (Lv et al., 2011, Hyldgaard et al., 2012).



Figuur 2-3 Groepen van antimicrobiële componenten (Hyldgaard et al., 2012)

Tabel 2-2 Beschrijving antimicrobiële componenten in procenten van *P. crispum* olie (met ND = niet detecteerbaar < 0,01 %) (Vokk et al., 2011)

	Winter	Zomer
α-Pineen	0.46	1.49
Sabineen	0.12	0.14
β-Pineen	0.31	0.90
β-Myrceen	8.73	4.25
α-Fellandreen	1.70	1.22
p-Cymeen	0.19	0.35
Limoneen	ND	1.97
β-Fellandreen	35.88	21.83
(E)-β-Ocimeen	0.08	0.27
γ-Terpineen	0.13	0.21
p-cymeneen	ND	2.68
Terpinoleen	0.82	0.80
p-1,3,8- Menthatrieen	5.39	9.97
Linalool	0.03	0.04
α-Terpineol	0.12	0.54
Estragol	ND	0.26
Bornyl acetaat	0.11	0.25
(E,E)-Decadienal	-	2.65
α-Copaeen	0.16	0.21
2,5-Dimethyl-p-cymeen	0.20	0.66
2,5-Dimethoxy-p-cymeen	3.16	0.90
(E)-β-Caryofylleen	-	0.31
β-Ionon	0.34	0.07
Germacreen D	1.04	0.12
α-Bergapteen	1.40	0.29
Myristicine	30.67	42.65
α-Cadinol	0.14	0.06
β-Selineen	0.20	-
α-Muuroleen	0.10	0.65
Elemicine	2.46	0.15
Germacreen D-4-ol	-	0.24
δ-Cadinol	0.14	0.06
Apiol	1.76	0.11
Ftalide isomeer	0.16	-

Er zijn veel verschillende samenstellingen te vinden van de antimicrobiële componenten in *P. crispum* en *O. basilicum*. De samenstelling is afhankelijk van de gebruikte bronnen, dit omdat de verschillende kruiden een verschillend groeiproces ondergingen.

In *Petroselinum crispum* zijn het de flavonoïden en coumarines die een antimicrobiële werking hebben (Kaiser et al., 2013). Volgens Kaiser et al. (2013) zijn de antimicrobiële componenten p-coumarinezuur-4-O-hexoside, apigenine-7-apiosylglucoside, diosmetine-apiosylglucoside, apigenine-malonylapiosylglucoside en p-coumaroyl-malonylapiosylglucoside. Hiervoor zijn echter geen percentages voor de samenstelling weergegeven in deze bron. Het is echter zo dat de aanwezige antimicrobiële componenten in de plant verschilt met deze in de olie, geëxtraheerd uit de plant. Vokk et al. (2011) beschrijft in tabel 2-2 de samenstelling van *P. crispum* olie. Myristicine en β -fellandreen zijn de grootste antimicrobiële componenten aanwezig in de olie (Vokk et al., 2011, Hussain et al., 2008, Burt, 2004).

In de plant van *O. basilicum* zijn volgens Lee en Scagel 2-kaffeoyl-L-wijsteenzuur, cinnamyl appelzuur, feruloyl wijnsteenzuur, cafeïnezuur, chicoric zuur, salvianolzuur, rutine en rozemarijnzuur de fenolische componenten die een antimicrobiële werking hebben. Wanneer de olie uit de plant geëxtraheerd wordt, is de samenstelling afhankelijk van de bron. Twee verschillende samenstellingen van de olie worden beschreven in tabel 2-3. Beide bronnen geven aan dat estragol, linalool en eucalyptol aanwezig zijn in de olie (Gutierrez et al., 2008, Bagamboula et al., 2004). Volgens Bagamboula et al. (2004) hebben eugenol en linalool de beste antimicrobiële werking op verschillende micro-organismen.

Tabel 2-3 Beschrijving antimicrobiële componenten in procenten van *Ocimum basilicum* olie

	(Bagamboula et al., 2004)	(Gutierrez et al., 2008)
Estragol	20,5	26,9
Linalool	16,1	42,3
Methyl kaneelzuur	8,6	-
Eucalyptol	8,3	8,1
Eugenol	3,9	-
Methyl cinnamaat	8,6	-
Methyl eugenol	8,02	-
α -Bergamoteen	2,9	-

2.2. Aanwezige micro-organismen

Op een voedingsmatrix komen verschillende micro-organismen voor die de kwaliteit en/of veiligheid van de voeding doen dalen. De micro-organismen die op een voedingsmatrix voorkomen, zijn het gevolg van contaminatie. Deze contaminatie kan gebeuren met zowel bacteriën, fungi als parasieten (McKee, 1995). Er zijn twee types organismen die een probleem vormen voor voedsel: de bederfveroorzakende organismen en de pathogene organismen. De bederfveroorzakende organismen zorgen voor een verandering van smaak, geur, uitzicht... van de matrix. Pathogenen zorgen voor voedselinfecties bij de consument (Madigan et al., 2009, Huis in't Veld, 1996).

Kruiden zijn planten die op het veld of in de serre, tijdens de verwerking (zoals oogsten, versnijden, wassen) en/of transport gecontamineerd worden met micro-organismen. Deze contaminatie dient uiteraard zo laag mogelijk gehouden te worden (Lapidot et al., 2006). Kruiden hebben echter een beschermende structuur aan hun oppervlak waardoor afbraak

bemoelijk wordt. Deze structuur bestaat uit cellulose, chemi-cellulose en pectine. Het bederf treedt op doordat micro-organismen over een lytisch enzym beschikken dat deze polysacchariden afbreekt. Door dit lytisch enzym zal het intracellulair vocht vrijkomen, samen met de andere componenten uit de cel zoals nutriënten die de organismen nodig hebben om te groeien. Dit is microbiel bederf voor de plant (Barth et al., 2010). Door het versnijden van de kruiden komt eveneens dit intercellulaire vocht vrij, dit bevordert het microbiële bederf.

2.2.1. Bedervers

Microbiel bederf wordt gekenmerkt door rotting, vlekken, slijmontwikkeling... (Huis in't Veld, 1996, Roberts et al., 2005b). Enkele bedervers die op bladstructuren, zoals kruiden, voorkomen zijn *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas marginalis*, *Xanthomonas* spp. en melkzuurbacteriën (Roberts et al., 2005b, Madigan et al., 2009, Huis in't Veld, 1996, Barth et al., 2010). Enkele species van *Pseudomonas* en *Clostridium* zijn naast bedervers ook humane pathogenen (Madigan et al., 2009, Roberts et al., 2005a). Door microbiële activiteit is er een verlies van één-vijfde van het wereldaanbod aan voedsel, wat een groot financieel verlies betekent (Huis in't Veld, 1996).

Niet alle bedervers komen op elke matrix voor. De micro-organismen herkennen de structuur van het plantenoppervlak, waardoor deze op specifieke oppervlakken kunnen binden (Barth et al., 2010).

- *Pseudomonas* spp. zijn Gram-negatieve langwerpige staven, die voorkomen op aerobisch opgeslagen voedsel met een hoog watergehalte en een neutrale pH. *Pseudomonas* zijn terug te vinden in de bodem en in water, inclusief zeewater en pekelwater met een hoog zoutgehalte (Huis in't Veld, 1996). *Pseudomonas cichorii* leven bij een optimale pH van 6,8 tot 7,1 maar kunnen eveneens overleven bij een minimum pH van 5,0 en een maximale pH van 9,4. De staven hebben afmetingen van 0,75 tot 1,5 op 1,5 tot 3,75 micrometer. *Pseudomonas marginalis* groeit optimaal bij temperaturen van 25-26 °C, maar kan overleven tussen een range van 0 en 38 °C (Breed et al., 1957).
- *Erwinia* spp. zijn beweeglijke staafvormige bacteriën die zuur produceren uit verscheidene suikers. *Erwinia* spp. zijn Gram-negatieve organismen. De optimale pH is gelegen tussen 6 en 7,5. *Erwinia carotovora* groeit optimaal bij temperaturen van 27 °C, maar kan eveneens overleven bij temperaturen met als minimum 6 °C en als maximum 37 °C. Een zoutgehalte van 7% remt de groei. De aerobe staven hebben afmetingen van 0,7 bij 1,0 tot 2 micrometer (Breed et al., 1957).
- *Clostridium* spp. zijn bedervers die niet groeien bij koelkasttemperaturen onder de 5 °C. Bij hogere temperaturen wordt er gas geproduceerd (CO₂ en H₂). Ook worden er zuren gevormd, zoals boterzuur en azijnzuur. *Clostridium* spp. zijn staafvormig, Gram-positieve bacteriën (Breed et al., 1957, Huis in't Veld, 1996). *Clostridium botulinum* is een sporenvormende bacterie die eveneens pathogeen is en aanleiding kan geven tot botulisme, die het autonome zenuwstelsel blokkeert welke de ademhaling en hartritme

controleert. Het is niet de bacterie zelf die dit veroorzaakt, maar de toxines dat dit organisme produceert. *Clostridium botulinum* zijn anaërobe, staafvormige organismen, met afmetingen van 0,5 tot 0,8 bij 3 tot 8 micrometer. De optimale groeitemperatuur is tussen 28 en 30 °C, maar kan overleven tussen 10 °C en 45 °C. De pH range waarbij *C. botulinum* kan bij overleven ligt tussen 5 en 9 pH eenheden. Het is niet bestand tegen een zoutconcentratie hoger dan 10%. Het organisme is strikt anaëroob (Roberts et al., 2005b, Madigan et al., 2009, Breed et al., 1957, Voedsel en warenautoriteit, 2008, Roberts et al., 2005a).

De richtlijn voor het totale kiemgetal van aërobe psychrotrofen dat aanwezig mag zijn op kruiden is 10^7 kve/g. Echter wordt er een tolerantie toegestaan tot 10^8 kve/g (Uyttendaele et al., 2010).

Melkzuurbacteriën zijn Gram-positieve organismen welke de anaërobe fermentatie van glucose naar lactaat uitvoeren, met als mogelijke bijproducten ethanol en CO₂. Onder de melkzuurbacteriën horen de genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Weissella* en *Leuconostoc* (Yang et al., 2010). Melkzuurbacteriën zijn bestand tegen hoge zoutconcentraties. De bacteriën groeien het best bij een pH van 7, maar zijn eveneens zuurbestendig en kunnen zo groeien tot onder een pH waarde van 3,5 (FAO, 1998). Op kruiden wordt als doel gesteld de aanwezigheid van melkzuurbacteriën onder 10^3 kve/g te houden, er heerst echter een tolerantie tot 10^5 kve/g (Uyttendaele et al., 2010).

2.2.2. Pathogenen

Voor pathogenen als *Listeria* en *Salmonella* is een afwezigheid gewenst, echter kan voor enkele een tolerantie toegestaan worden (Madigan et al., 2009, Uyttendaele et al., 2010). Pathogenen zijn afkomstig van een rechtstreekse of onrechtstreekse contaminatie met feces (Elviss et al., 2009).

Verse kruiden kunnen besmet geraken met de volgende pathogene bacteriën: *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Clostridium perfringens* en *C. botulinum*. Dit zijn de belangrijkste pathogene bacteriën die kunnen voorkomen. Er zijn echter veel meer pathogene bacteriën die op kruiden kunnen aanwezig zijn, deze omschrijving is dus niet volledig (Elviss et al., 2009, McKee, 1995, Tajkarimi, 2007, Roberts et al., 2005b, Scollard et al., 2013). Hieronder volgt een bespreking van de voornaamste pathogenen aanwezig op kruiden.

- *Escherichia coli* is een indicatororganisme voor de contaminatie van het voedsel met fecaliën. Er is een kans dat bij het voorkomen van *E. coli* er ook pathogene bacteriën aanwezig zijn op de voeding. De contaminatie met feces kan indirect gebeuren, bijvoorbeeld via spoelwater dat in contact is geweest met de uitwerpselen (Elviss et al., 2009). De meeste stammen van *E. coli* zijn niet pathogeen, ze komen ook voor in de darmen van mensen. Andere stammen zijn dan wel weer pathogeen en produceren krachtige enterotoxinen, zo een stam is bijvoorbeeld *E. coli* O157:H7. *E. coli* O157:H7 nestelt zich in de dunne darm van de mens waar het dan verotoxine produceert. Dit verotoxine veroorzaakt bloedige diarree en nierfalen (Madigan et al.,

2009, Foodsafety.gov). De niet-pathogene vormen van *E. coli* mogen in beperkte mate aanwezig zijn op kruiden. Hier wordt als doel gesteld 10^2 kve/g, met tolerantie tot 10^3 kve/g. De pathogene vorm *E. coli* O157:H7, dient afwezig te zijn op 25 gram voedsel (Uyttendaele et al., 2010).

Escherichia coli zijn staafvormige organismen met afmetingen van 0,5 bij 1 tot 3 micrometer. De optimale temperatuur ligt tussen 30 en 37 °C. Groei vindt echter ook plaats tussen 10 en 45 °C (Breed et al., 1957). Voor de pathogene vorm O157:H7 is de optimale pH 6,7. Een zoutgehalte van 5% bij 12 °C inhibeert de groei van de pathogene vorm (Ministry of Health by ESR Ltd, 2001).

- *Salmonella* is een Gram-negatieve bacterie, die de oorzaak is van de meeste bacteriële voedselinfecties (Tajkarimi, 2007). Het organisme is aanwezig in de feces van warmbloedige dieren. Het komt in de voedselketen terecht door contaminatie van het voedsel met feces. *Salmonella* nestelt zich in de dunne en dikke darm en de symptomen hiervan zijn het plots opkomen van hoofdpijn, braken, koude rillingen en diarree (Madigan et al., 2009). Onder de species van *Salmonella* zijn er nog verschillende serotypes terug te vinden. Er zijn meer dan 2400 gekende serotypes. Deze serotypes zijn nodig om de verschillende species te kunnen onderscheiden, want elke specie heeft een ander antigeen. De antigenen kunnen betrekking hebben op de celwand, op de buitenste polysaccharidelaag of het flagel (Tajkarimi, 2007). Enkele serotypes die terug gevonden zijn op verse kruiden zijn *S. Senftenberg*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Durban*, *S. Javiana*, *S. Mgulani*, *S. Montevideo* en *S. Virchow* (Elviss et al., 2009).

De optimale groei temperatuur voor *Salmonella* is 35 – 37 °C met een range tussen 5 en 45 °C. *Salmonella* Typhimurium heeft een verminderde groei bij zoutconcentraties hoger dan 2%. De optimale pH ligt tussen 6,5 en 7,5 maar er is eveneens tolerantie tussen pH 3,6 tot 9,5. *S. Typhimurium* is staafvormig met afmetingen van 0,5 bij 1,0 tot 1,5 μm (Tajkarimi, 2007, Breed et al., 1957, Lund et al., 2000). Er mag geen *Salmonella* aanwezig zijn op 25 gram kruiden (Uyttendaele et al., 2010).

- *Listeria monocytogenes* veroorzaakt listeriose, wat een gastro-intestinale voedselvergiftiging is die kan leiden tot meningitis of bacteriëmie. De optimale groeitemperatuur is 37 °C, maar het organisme kan ook groeien bij temperaturen lager dan 2,5 °C. Dit geeft als probleem dat zijn groei niet geremd wordt in koelkasten en dus zal blijven groeien (Madigan et al., 2009, Breed et al., 1957). Het is in staat om 8 weken te overleven bij een 20% zoutconcentratie bij 4 °C. De optimale zuurtegraad voor het organisme is 7 pH eenheden, maar kan overleven tussen 4,4 en 9,4 pH eenheden. *L. monocytogenes* zijn smalle staven met afmetingen van 0,4 tot 0,5 bij 0,5 tot 2,0 micrometer. Het organisme is Gram-positief en is afkomstig uit warmbloedige dieren (Breed et al., 1957). Er dient een afwezigheid te zijn van *Listeria monocytogenes* op kruiden. Op het einde van de houdbaarheid wordt er een tolerantie van 10^2 kve/g toegestaan (Uyttendaele et al., 2010).

- *Bacillus* zijn Gram-positieve organismen die in staat zijn endosporen te ontwikkelen. Het micro-organisme is aeroob of facultatief anaëroob. *Bacillus cereus* leeft bij een pH range tussen 4,9 en 9,3 en een optimale temperatuur van 30 °C. De maximumtemperatuur van overleven is 48 °C. Het kan in zoutconcentraties van 7,5% overleven, sommige tolereren zelfs 10%. *Bacillus cereus* is staafovormig met afmetingen van 1 tot 1,2 en 3 tot 5 µm. Deze pathogene bacterie is terug te vinden in de bodem en op het plantenoppervlak (Breed et al., 1957). *Bacillus cereus* produceert een toxine die diarree of misselijkheid en braken veroorzaakt (Foodsafety.gov, 2013). Op *P. crispum* komt *Bacillus cereus* voornamelijk in aantallen van 10^2 tot 10^4 cellen/g voor (McKee, 1995).
- Coagulase positieve *Staphylococce*n zijn toegelaten op een kruidenmatrix. Als doel wordt gesteld om de aanwezigheid van *Staphylococcus* onder 10^2 kve/g te houden, met tolerantie tot 10^3 kve/g (Uyttendaele et al., 2010).

2.2.3. Fungi

Fungi kunnen voorkomen op planten, in dit geval meerbepaald op kruiden. Onder fungi wordt hier voornamelijk schimmels en gisten bedoeld. De meeste fungi zijn parasieten, die leven van de planten. Fungi worden verspreid door middel van insecten en regen, zo worden planten gecontamineerd. Fungi kunnen ook ziekteverwerkers zijn voor de mens. Deze fungi zijn echter meestal minder pathogeen voor de mens dan pathogene bacteriën (Madigan et al., 2009, Roberts et al., 2005a).

Fungi zijn chemo-organotrofen, die hun nutriënten halen uit een geïnfecteerde plant door dat deze fungi over extracellulaire enzymen beschikken. Die enzymen zorgen voor het afbreken van polysacchariden en proteïnen tot hun monomere componenten, respectievelijk suikers en aminozuren. De celwand van fungi is naar basisstructuur te vergelijken met de celwanden van planten maar de chemische samenstelling is echter anders. In plaats van de polysaccharide cellulose is hier chitine terug te vinden, een polymeer van de glucosederivaat van N-acetylglucosamine. De celwand van deze fungi bestaan dus uit chitine in combinatie met proteïnen, lipiden, polyfosfaten en anorganische ionen (Madigan et al., 2009).

2.2.3.1. Schimmels

Schimmels komen voor op kruiden. De meeste schimmels zijn onschuldig en horen bij het bederven van de kruiden, zoals rotten of schimmelgroei op het oppervlak. Enkel de schimmels die toxines produceren zijn ziekteverwekkers voor de mens. Enkele veel voorkomende schimmels bij kruiden zijn *Aspergillus fumigatis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Emericella nidulans*, *Rhizomucor pusillus*, *Malbranchea pulchella*, *Humicola grisea*, *Talaromyces dupontii*, *Absidia corymbifera*, *Penicillium citrinum*.... De geslachten *Aspergillus* en *Penicillium* produceren aflatoxines en zijn dus ziekteverwekkers voor de mens (Mircea et al., 2008, Boer et al., 1985, McKee, 1995).

Kruiden met hoge aantallen aan schimmels zoals dragon, rozemarijn, selderij, salie en witte peper bevatten meer dan 10^5 kve/g schimmels. Deze hoge aantallen aan schimmels vormen een gezondheidsrisico. *O. basilicum* en *P. crispum* staan niet in de bron vermeld (Boer et al., 1985). Het doel wordt gesteld om slechts 10^3 kve/g aan schimmels op kruiden aanwezig te hebben, de tolerantie laat echter toe tot 10^4 kve/g (Uyttendaele et al., 2010).

2.2.3.2. Gisten

Gisten behoren ook tot de fungi, deze komen eveneens voor op voedsel. *Saccharomyces* spp., *Hanseniaspora* spp., *Pichia* spp., *Kloeckera* spp., *Candida* spp. en *Rhodotorula* spp. zijn enkele voorbeelden van vaak voorkomende gisten (Roberts et al., 2005a, Roberts et al., 2005b). Kruiden met hoge gistaantallen zoals dille, basilicum, curie, paprika en kervel bevatten meer dan 10^4 kve/g. Hierbij staat *P. crispum* niet vermeld (Boer et al., 1985). Het doel voor de aanwezigheid van gisten op kruiden is 10^4 kve/g, maar de tolerantie laat toe om tot 10^5 kve/g aanwezig te hebben (Uyttendaele et al., 2010).

2.2.4. Virussen

Virussen zijn de oorzaak van de meeste voedselinfecties. Enkele voedingsvirussen zijn het norovirus, het rotavirus, astrovirus en hepatitis A en E virussen. Deze virussen zijn aanwezig in de darmen. Voedsel wordt snel gecontamineerd met virussen wanneer het in aanraking komt met feces. Virussen kunnen enkel groeien in specifieke gastheercellen, en vermenigvuldigen zich in deze cellen. Virussen zijn bestand tegen omgevingsfactoren zoals hoge temperaturen, hoge of lage pH, droogte..., zonder over een beschermende mantel te beschikken. Om mensen te besmetten zijn er slechts 10 – 100 virale deeltjes nodig (Madigan et al., 2009, Stals et al., 2012).

2.2.5. Parasieten

Parasieten komen ook voor op kruiden. Enkele parasieten die kunnen aangetroffen worden zijn *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora* spp., *Toxocara* spp., *Microsporidium* spp., *Ascaris* spp., *Giardia* spp., *Hymenolepis nana*... Kruiden worden hoofdzakelijk voor het oogsten besmet met parasieten, vaak door contact met besmette mest, irrigatiewater... (El Said Said, 2012).

2.2.6. Uitbraken van pathogenen op kruiden

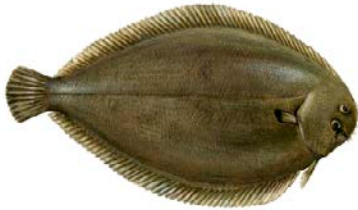
Dat pathogenen voorkomen op kruiden is bewezen door uitbraken van voedselinfecties in het verleden. Deze uitbraken werden veroorzaakt door *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. en *Cryptosporidium parvum* (Roberts et al., 2005a). Enkele uitbraken van voedselinfecties wereldwijd over een periode van ongeveer 20 jaar zijn weergegeven in tabel 2-4. Er wordt hier vooral gewezen op de twee uitbraken van *Salmonella* op verse basilicum in 2006 en 2007 (Zweifel and Stephan, 2012). Er zijn ook al verschillende voedselinfecties geweest op *Petroselinum crispum*, maar hiervan zijn geen datums bekend. De uitbraken waren het gevolg van *Shigella sonnei* (Roberts et al., 2005b). Deze gegevens geven aan dat pathogenen op verse kruiden een probleem vormen, niet enkel voor *O. basilicum* en *P. crispum* maar ook voor andere kruiden.

Tabel 2-4 Uitbraken van *Salmonella* spp. op verse kruiden

Jaartal	Pathogeen	Aantal gevallen van besmetting	Getroffen land	Besmette producten
2009-2010	<i>Salmonella</i> Montevideo	272	VS	Zwarte en rode peper
2009	<i>Salmonella</i> Rissen	87	VS	Witte peper
2007	<i>Salmonella</i> Senftenberg	51	UK, Denemarken, VS en Nederland	Verse Basilicum
2006	<i>Salmonella</i> Anatum	>200	Denemarken	Verse Basilicum (pesto)
2002-2003	<i>Salmonella</i> Agona	42	Duitsland	Anijs bevattende kruidenthee
1999	<i>Salmonella</i> Thompson	76	VS	Verse Cilantro
1993	Verschillende <i>Salmonella</i> soorten	>1000	Duitsland	Paprika en paprika poeder op chips

3. Vismatrix

Een tweede voedingsmatrix waarop gefocust wordt in deze thesis is deze van vis, meer bepaald tong (*Solea solea*) en Atlantische zalm (*Salmo salar*). Tong (Figuur 3-1) is een platvis die voornamelijk voorkomt in het oosten van de Atlantische Oceaan van Senegal tot het zuiden van Noorwegen. Eveneens in de gehele Middellandse zee is de tong terug te vinden. De Atlantische zalm komt voornamelijk voor bij de kusten van de Atlantische zee, nabij Groenland en IJsland (Diopere et al., 2013).



Figuur 3-1 Tong (*Solea solea*)
(Commission, 2013)



Figuur 3-2 Atlantische zalm (*Salmo salar*)
(Biopix, 2013)

3.1. Samenstelling van de vismatrix

De samenstelling van vis, meer bepaald *Solea solea* en *Salmo salar*, is terug te vinden in tabel 3-1 (USDA, 2013c, USDA, 2013d). De tabel geeft de hoofdbestanddelen weer van beide vissen. Zalm bevat meer lipiden en proteïnen tegenover tong, die op zijn beurt dan weer over meer water beschikt. Echter beïnvloedt een hoger gehalte aan lipiden en proteïnen de werking van EO (zie paragraaf 4.2) (Burt, 2004). Een verdere specificatie van de vismatrix is terug te vinden in de bijlagen E tot en met G.

Tabel 3-1 Hoofdcomponenten rauwe tong en Atlantische zalm (USDA, 2013d, USDA, 2013c)

	<i>Solea solea</i>	<i>Salmo salar</i>
Nutriënt	Waarde per 100 g (g)	Waarde per 100 g (g)
Water	84,63	68,50
Proteïnen	12,41	19,84
Lipide	1,93	6,34
Koolhydraten	0,00	0,00
Suiker	0,00	-

3.2. Aanwezige micro-organismen

Vis beschikt over een korte houdbaarheid. Een oorzaak van deze korte houdbaarheid is de aanwezigheid van micro-organismen die zorgen voor microbiel bederf (Miladi et al., 2010). Bij het consumeren van vis, en ander voedsel, is er altijd een mogelijkheid tot eten van gecontamineerd voedsel. Vis beschikt over een hoog proteïnegehalte, hierdoor zal er ook een groot gehalte aan vrij beschikbare aminozuren aanwezig zijn. De organismen zullen deze aminozuren gebruiken om producten als ammoniak, organische zuren, ketonen... aan te maken. De aanwezige lipiden, aanwezig bij vette vis, kunnen afgebroken worden, waardoor een slechte geur ontwikkeld wordt. Dit zijn symptomen van bederf van het voedsel (Doyle, 2007).

Bij sommige producten is er een groter risico dan bij andere tot het eten van gecontamineerd voedsel. Veel factoren hebben een invloed op welke organismen er voorkomen, en in welke aantallen. Enkele factoren voor vis zijn: het milieu van leven, het voedsel voor de vis, het seizoen, het vangen van de vis, het verwerken in de firma.... Voedselinfecties zijn vooral het gevolg van bacteriën en virussen. Om deze reden volgt er een overzicht van deze micro-organismen die op vis aanwezig zijn (Mahmoud et al., 2004, Iwamoto et al., 2010).

3.2.1. Bacteriën

Bacteriën komen eveneens voor op vis. Bederf veroorzakende bacteriën zorgen voor het verkorten van de houdbaarheid. Deze dienen onder controle gehouden te worden door de vis te bewaren in gekoelde ruimtes. Deze lage temperaturen zijn van cruciaal belang voor de microbiologische kwaliteit van het voedsel (Alfaro et al., 2013). Ook pathogene komen voor, deze zorgen voor een risico voor de consument. Dit kan gaan van maag- en darmklachten tot levensbedreigende symptomen (Iwamoto et al., 2010).

3.2.1.1. Bedervers

Op *Salmo salar* zijn de melkzuurbacteriën, meer bepaald *Lactococcus piscium*, vertegenwoordigd. Ook komen op zalm *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens*, *Brochothrix thermosphacta* en *Shewanella putrefaciens* voor. Tot slot komen ook nog *Enterobacteriaceae* voor, meer bepaald *Serratia proteamaculans*, en Gram-negatieve fermentatieve bacteriën, meer bepaald *Photobacterium phoshoreum* (Macé et al., 2013, Alfaro et al., 2013).

Naast *Carnobacterium*, *Serratia* en *Shewanella* spp., komen algemeen op vis ook nog *Yersinia* spp. voor (Alfaro et al., 2013). Op vis en visserijproducten mag er een totaal kiemgetal van aërobe psychrotrofen aanwezig zijn van 10^5 kve/g, er wordt echter een tolerantie toegestaan tot 10^6 kve/g. Bij voorverpakte visproducten wordt er als doel 10^2 kve/g voor psychrotrofe melkzuurbacteriën gesteld, de tolerantie gaat tot 10^3 kve/g. Ook de aantallen van *E. coli* dienen beperkt te worden, als doel wordt gesteld 10^2 kve/g, er is echter een tolerantie tot 10^3 kve/g (Uyttendaele et al., 2010).

3.2.1.2. Pathogenen

Er zijn verschillende pathogenen die op zeevoedsel, waaronder vis, voorkomen (Iwamoto et al., 2010).

- Een eerste groep zijn de *Vibrio* spp., meer bepaald *V. parahaemolyticus* en *V. vulnificus*. De *Vibrio*'s komen voornamelijk voor in maritieme milieu's, en groeien het best wanneer het water warm is. *Vibrio* spp. kunnen niet geassocieerd worden met fecale contaminatie (Iwamoto et al., 2010, Huss et al., 2003). *Vibrio parahaemolyticus* groeit het best bij een temperatuur van 37 °C, maar kan eveneens groeien tot een temperatuur van 5 °C. De minimale pH waar het tegen bestand is, is 4,8 pH eenheden. De minimale wateractiviteit-waarde bedraagt 0,93 en kan tegen een maximaal 10% zoutoplossing.

- *Salmonella* komt ook voor op vis. Vissen geraken ermee besmet door in contact te komen met vervuild water. Eveneens kan het ook besmet geraken tijdens het bewaren of het bewerken van de vis. De symptomen ervan werden eerder besproken in paragraaf 2.2.1.2 Pathogenen (Iwamoto et al., 2010). *Salmonella* dient absoluut afwezig te zijn op een visstaal van 25 gram (Uyttendaele et al., 2010)
- Aan *Listeria monocytogenes* moet eveneens aandacht besteed worden. Dit organisme dient absoluut afwezig te zijn in 25 gram voedsel. Tegen het einde van de houdbaarheid wordt de tolerantie aangepast tot maximaal 100 kve/g (Uyttendaele et al., 2010). Verdere uitleg over deze pathogeen is terug te vinden in paragraaf 2.2.1.2 Pathogenen.
- Andere pathogenen als *Shigella* spp. en *Clostridium* spp. komen ook voor op vis. Voor *Clostridium* spp. is dit meer bepaald *C. botulinum* en *C. perfringens* (zie paragraaf 2.2.1.2 Pathogenen). Ook *Bacillus cereus* en *Staphylococcus aureus* zijn terug te vinden op vis. Het doel voor de Coagulase positieve *Staphylococce*n is 10^2 kve/g met tolerantie tot 10^3 kve/g. Sulfietreducerende *Clostridia* dienen beperkt te worden tot 10^2 kve/g, met tolerantie tot 10^3 kve/g (Uyttendaele et al., 2010)

3.2.2. Fungi

Contaminatie van voedsel met fungi is de belangrijkste oorzaak van bederf. Bederf treedt op doordat de fungi gebruik maken van de proteïnen en de lipiden van de vis, die er rijkelijk aanwezig zijn (A. Hassan et al., 2011). Onder de fungi wordt voornamelijk gisten en schimmels bedoeld (Madigan et al., 2009).

3.2.2.1. Schimmels

Enkele vaak voorkomende schimmelsoorten op verschillende vismatrices zijn *Alternaria* spp., *Penicillium citrinum*, *Penicillium expansum*, *Cladosporium* spp. en *Aspergillus* spp., meer bepaald *A. flavus* en *A. niger* (A. Hassan et al., 2011). Eveneens zijn er normen opgesteld voor de aanwezigheid van schimmels op vis. Als doel wordt er gesteld 10^2 kve/g, met een tolerantie tot 10^3 kve/g (Uyttendaele et al., 2010).

3.2.2.2. Gisten

Gisten komen eveneens voor op vis. Enkele genera die kunnen voorkomen op dit soort matrix zijn: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* en *Trichosporon* (Bruce and Morris, 1973). Op vis en visserijproducten dient het aantal gisten beperkt te worden tot 10^2 kve/g. Hier geldt echter een tolerantie tot 10^3 kve/g (Uyttendaele et al., 2010).

3.2.3. Virussen

Er zijn twee virussen die kunnen leiden tot voedselinfecties bij de mensen, namelijk het norovirus en het hepatitis A virus. Voor beide virussen is de infectieuze dosis voor de mens laag. De vis wordt ermee besmet door (on)rechtstreeks contact te maken met fecaliën van mensen. De mens is echter de enige drager van de virussen (Iwamoto et al., 2010)

3.2.4. Parasieten

Op vis komen verschillende soorten parasieten voor. *Diphyllbothrium* is een wormvormige parasiet die aanwezig kan zijn op vis. Deze wormvormige parasieten komen veel voor in zee- en zoet water, waardoor veel mariene dieren besmet zijn ermee. Andere parasieten die kunnen voorkomen zijn *Giardia* spp., *Paragonimus*... (Iwamoto et al., 2010).

3.2.5. Uitbraken van micro-organismen op vis

Pathogenen, virussen en zelfs parasieten kunnen nadelig zijn voor de gezondheid van de consument. Dit blijkt uit cijfers uit de VS van tussen 1973 en 2006. Tijdens deze periode waren er 188 uitbraken van voedselinfecties, welke geassocieerd werden met het eten van zee producten. Deze 188 uitbraken zorgden ervoor dat 4020 mensen ziek werden, 161 mensen opgenomen werden in het ziekenhuis en 11 mensen overleden. Tabel 3-2 beschrijft meer specifiek het aantal uitbraken ten gevolge van micro-organismen in de VS op visproducten tussen 1973 en 2006. Hierbij werd ook telkens het veroorzakende organisme vermeld (Iwamoto et al., 2010).

Tabel 3-2 Uitbraken en ziektes veroorzaakt door bacteriën, virussen en parasieten aanwezig op vis in de Verenigde Staten tussen 1973 en 2006 (Iwamoto et al., 2010)

Organisme		Aantal (%) uitbraken	Aantal (%) ziektes	Aantal (%) opnames
Bacteriën				
	<i>Bacillus cereus</i>	2 (3)	7 (1)	0 (0)
	<i>Campylobacter</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>Clostridium botulinum</i>	43 (59)	152 (13)	61 (66)
	<i>Clostridium perfringens</i>	1 (1)	46 (4)	0 (0)
	<i>Escherichia coli</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>Salmonella</i>	10 (14)	261 (22)	15 (16)
	<i>Shigella</i> spp.	6 (8)	259 (21)	17 (18)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (4)	7 (1)	0 (0)
	<i>Vibrio</i> spp.	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Totaal	65 (89)	732 (60)	93 (100)
Virussen				
	Norovirus	4 (5)	418 (35)	0 (0)
	Hepatitis A virus	1 (1)	7 (1)	0 (0)
	Totaal	5 (7)	425 (35)	0 (0)
Parasieten				
	Anisakidae	1 (1)	14 (1)	0 (0)
	<i>Giardia lamblia</i>	1 (1)	29 (2)	0 (0)
	<i>Paragonimus</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>Diphyllbothrium</i>	1 (1)	10 (1)	0 (0)
	Totaal	3 (4)	53 (4)	0 (0)
Totaal (1973-2006)		73 (100)	1210 (100)	93 (100)

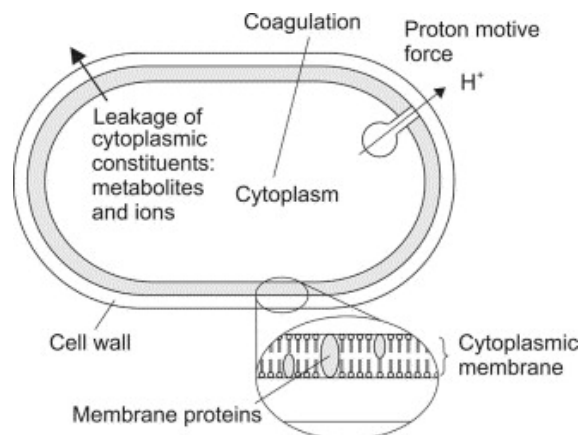
4. Werking essentiële olie

Essentiële oliën zijn natuurlijke producten die over een antimicrobiële eigenschap beschikken. Er worden nog steeds studies uitgevoerd om het werkingsmechanisme van de actieve componenten op organismen te begrijpen, want deze zijn nog niet allemaal duidelijk (Burt, 2004).

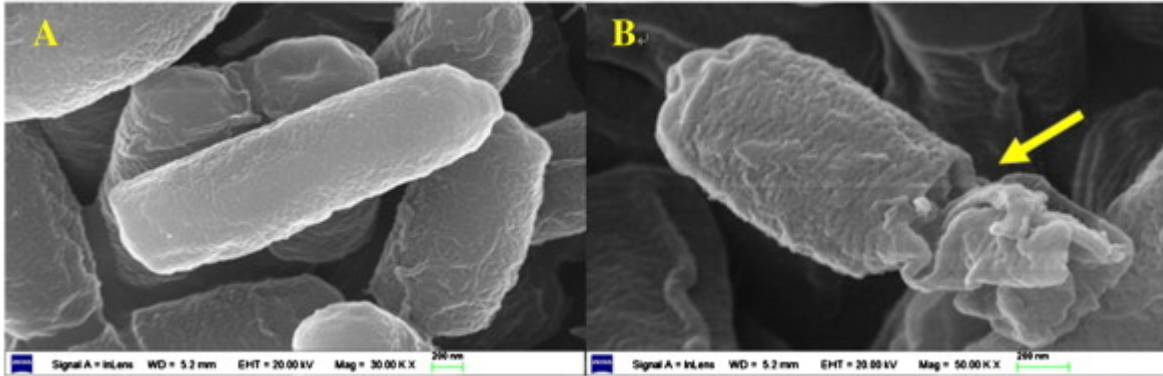
4.1. Antimicrobiële werking

De benodigde concentratie aan EO is afhankelijk van het type, geslacht, soort en stam van het organisme dat geïnhibeerd of gedood moet worden. De graad van contaminatie van het voedsel (Negi, 2012) en de afkomst van de olie spelen eveneens een rol. Essentiële oliën hebben een betere werking op Gram-positieve, dan op Gram-negatieve bacteriën. De reden hiervan is dat Gram-negatieve bacteriën nog over een extra membraan beschikken van hydrofiele lipopolysacchariden, dat een barrière vormt tegen macromoleculen en hydrofobe componenten. De hydrofiele mantel is beter bestand tegen de hydrofobe antimicrobiële componenten van de essentiële olie. Bij fungi is hier nog minder over beschreven (Burt, 2004, Hsouna et al., 2011, Hyldgaard et al., 2012).

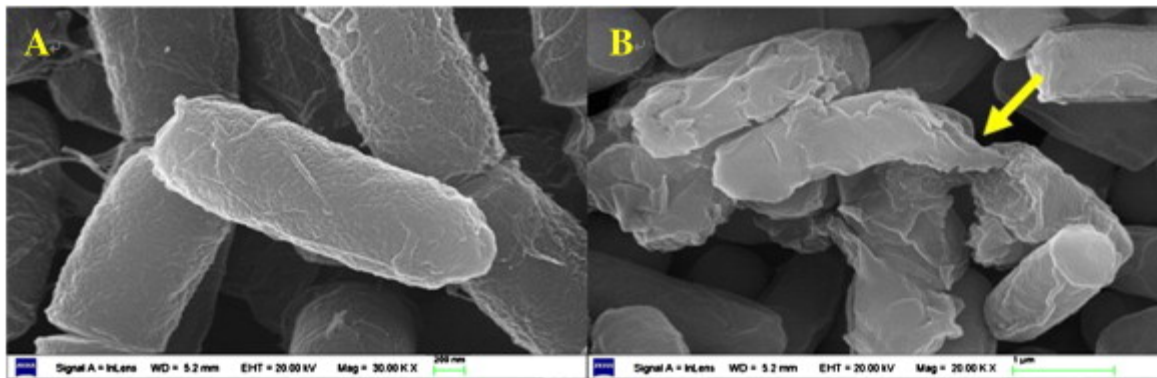
Bij bacteriën wordt er verondersteld dat deze oliën op verschillende plaatsen in de bacteriecel inwerken. Deze plaatsen zijn aangeduid in figuur 4-1. De componenten die in het celmembraan van het organisme binnendringen, zullen de structuur verstoren en zo de permeabiliteit doen stijgen. Dit zorgt voor lekkages, wat voor een verstoring zorgt van het enzymatische systeem waardoor de cel afsterft of geïnhibeerd wordt. Enkele lekkages zijn terug te vinden op scanning elektronenmicroscopiebeelden in figuur 4-2 en figuur 4-3. Bij deze laatste figuur is lyse van het membraan waar te nemen. De componenten kunnen ook inwerken op celeiwitten die in het cytoplasmamembraan gelegen zijn. In het cytoplasmamembraan zijn enzymen als ATPase gelegen, begrensd door lipidemoleculen. Het correcte mechanisme hiervan is nog niet gekend. Een theorie zegt dat de lipofiele koolwaterstofmoleculen ophopen in de lipide dubbellaag en zo de membraaneiwitten verstoren. Een andere plaats waar de componenten inwerken is de celwand. Er vindt ook coagulatie van het cytoplasma plaats en er is mogelijks uitputting van de protonenpomp (Burt, 2004, Lv et al., 2011).



Figuur 4-1 Plaatsen in de bacteriecel waar essentiële oliën op inwerken (Burt, 2004)

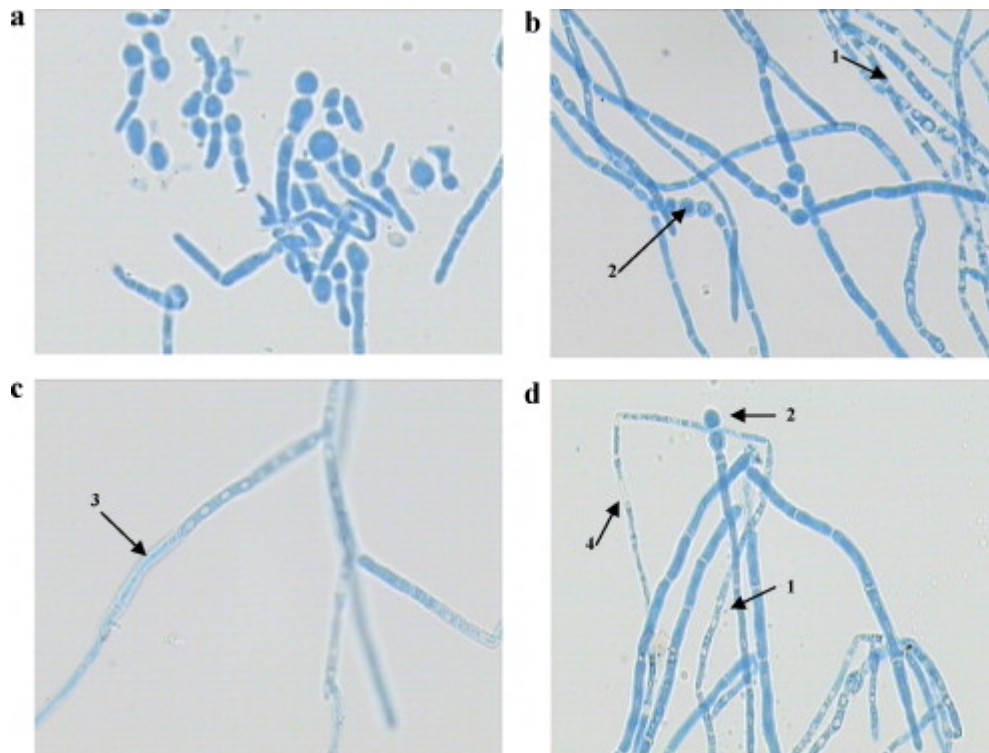


Figuur 4-2 *E. coli* via scanning elektronenmicroscop met A is voor behandeling met essentiële oliën, B na behandeling met essentiële oliën (Lv et al., 2011)



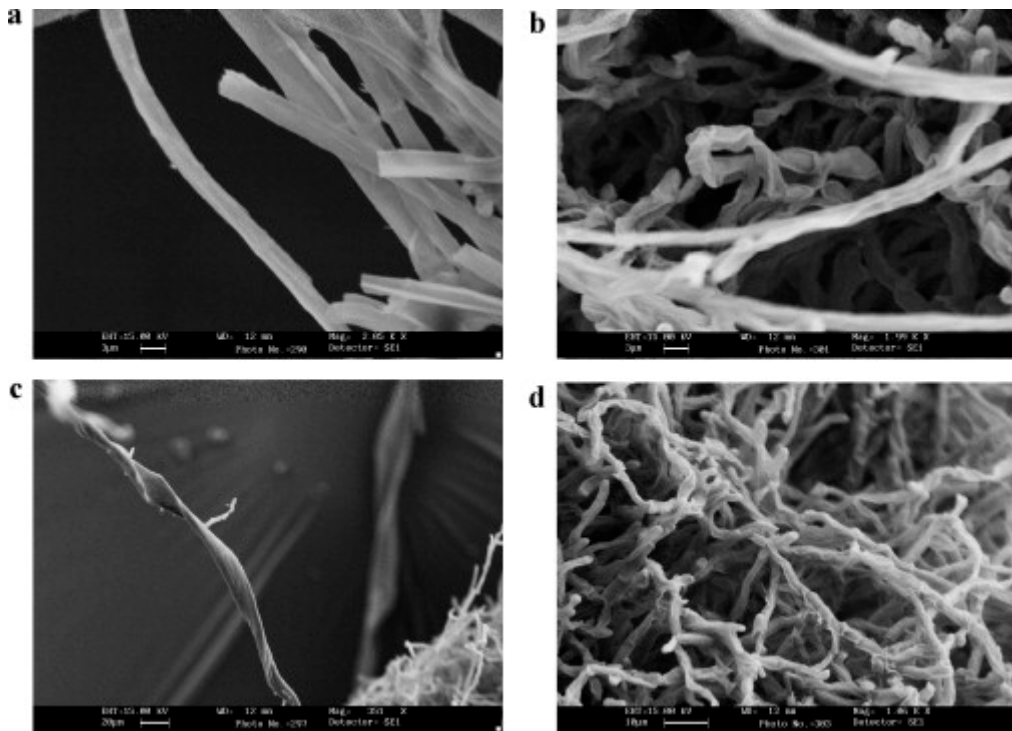
Figuur 4-3 *B. subtilis* via scanning elektronenmicroscop met A is voor behandeling met essentiële oliën, B na behandeling met essentiële oliën (Lv et al., 2011)

De werking van de EO op fungi is gelijklopend met deze van bacteriën. Het toxische effect van de olie op fungi is concentratie en tijd gebonden, dit is te zien in figuur 4-4. In afbeelding (b) wordt er een behandeling uitgevoerd met 0,02 % v/v *C. verum* olie, wat resulteert in de vorming van chlamydoconidia (2) en eveneens in de autolyse van het cytoplasma van de hyfen (1). De vorming van chlamydoconidia wordt beschouwd als een indicator voor stress. De stress wordt waargenomen in aanwezigheid van de olie. Chlamydoconidia zijn dikwandige conidia, sporen, gevormd binnen in de vegetatieve hyfen. Chlamydoconidia zijn terug te vinden als bolletjes, zoals te zien is in figuur 4-4 b, (2) (Ellis, 2013). Coagulatie van het cytoplasma (3) vindt plaats 24 uur na de behandeling met 0,04 % v/v kaneel olie. Na behandeling met *S. aromaticum* olie wordt naast autolyse van het cytoplasma (1) en chlamydoconidia vorming (2) ook necrose van de hyfen (4) waargenomen (Khan and Ahmad, 2011).



Figuur 4-4 Concentratie en tijd afhankelijke toxiciteit van essentiële olie op de morfologie van hyfen bij *T. rubrum* (40x vergroting lichtmicroscop) (a) controle na 8 uur (b) *C. verum* olie 0,02 % v/v, 20 uur (c) kaneel olie 0,04 % v/v, na 24 uur en (d) *S. aromaticum* olie 0,08 % v/v, na 24 uur

Er vindt net zoals bij de bacteriën interactie plaats tussen de olie en de celwand van schimmels. In een onderzoek naar de effecten van essentiële oliën op de celwand van schimmels, werden scanning elektronenmicroscopbeelden verkregen, weergegeven in figuur 4-5. De beelden zijn van de schimmel *A. fumigatus*. In de controle werden gezonde hyfen bekomen (a), in tegenstelling tot de behandelde hyfen waarbij allerlei ongewone patronen waar te nemen zijn. Er vinden ernstige verstoringen plaats na de behandeling met de EO, zoals de vorming van luchtbellens onder het oppervlak (b). Ook is er een gebrek aan cytoplasma waar te nemen in de hyfen, met als gevolg dat deze hyfen extreem smal ogen (c). Necrose van de hyfen is ook waar te nemen in figuur (d). Uit deze resultaten kan besloten worden dat de olie interfereert bij de synthese van de celwand. Ook andere cellen buiten de hyfen ondergaan verschillende veranderingen. Uitgetrokken cytoplasmamembranen, uitbreiding van het endoplasmatisch reticulum, lekkage van de celwand en celmembraan en abnormale verdeling van de polysacchariden waardoor vermindering van de cytoplasma kwaliteit plaatsvindt, zijn enkele waarnemingen na het behandelen met de essentiële olie (Khan and Ahmad, 2011).



Figuur 4-5 Beelden via scanning elektronenmicroscop van de morfologie van de hyfen van *A. fumigatus* behandeld met 0,04 % v/v van cinnamaldehyde (a) controle van gezonde hyfen, (b) blaarvorming in hyfen, (c) hyfen zonder cytoplasma en (d) necrose van hyfen

Er kunnen ook meerdere essentiële oliën toegediend worden om een versterking van de antimicrobiële werking te bekomen. Bij deze versterking werken verschillende inwerkingsmechanismen samen zodat organismen efficiënter gedood of geïnhibeerd worden. Deze versterking is echter niet altijd waar. Er kan interactie optreden tussen de verschillende componenten van de essentiële olie zodat er een synergetisch, antagonistisch of additief effect plaatsvindt (Burt, 2004, Hyldgaard et al., 2012). Niet enkel met andere essentiële oliën vinden deze interacties plaats, ook met conserveringsmiddelen in de voedingsmatrix kunnen deze interacties plaatsvinden. Natriumchloride en natriumnitriet kunnen zowel een synergetisch als antagonistisch effect ondervinden van de actieve componenten van essentiële oliën (Burt, 2004).

4.2. Invloeden van voedingsmatrix op werking essentiële olie

Essentiële oliën hebben een antimicrobiële werking. Bij het toevoegen van een essentiële olie aan voedsel zullen bacteriën en fungi geremd worden. Er is een hogere concentratie nodig aan essentiële olie om een zelfde werking te hebben op een voedingsmatrix, dan op een voedingsbodem (Lv et al., 2011, Gutierrez et al., 2008). Dit kan een nadeel betekenen voor het gebruik van essentiële oliën op een voedingsmatrix omdat de oliën de smaak kunnen beïnvloeden van de voedingsmatrix bij toevoegen van hoge dosissen.

Hoge gehalten aan lipiden en proteïnen in het voedsel beschermen de bacterie tegen de inwerking van de essentiële olie, waardoor de efficiëntie van de olie daalt. De interactie tussen de antimicrobiële componenten en de voedingsmatrix, waarbij deze componenten zullen interageren met het lipide van de voedingsmatrix, leidt tot een verminderde

werking. De antimicrobiële componenten reageren ook met proteïnen tot vorming van complexen (Bagamboula et al., 2004, de Oliveira et al., 2013). Koolhydraten daarentegen hebben geen invloed op de werking van de essentiële olie. Een uitzondering hierop is zetmeel. Bij hoge concentraties aan zetmeel wordt de antimicrobiële efficiëntie geremd, de lag-fase wordt korter waardoor er sneller groei zal plaatsvinden. Echter, bij lage concentraties aan zetmeel is het omgekeerde waar te nemen, met name een positief effect op de antibacteriële werking van de olie. De resultaten van zetmeel werden verkregen door *Listeria monocytogenes* als bacteriestam te gebruiken en werden enkel op een voedingsbodem uitgevoerd. De werking van een essentiële olie op een voedingsmatrix is afhankelijk van welk type voedingsmatrix er gebruikt wordt en is dus afhankelijk van de samenstelling van die matrix (Gutierrez et al., 2008).

Temperatuur en pH hebben eveneens invloed op het groeien van organismen op de voedingsmatrix. Bij verlaagde temperatuur, zoals koelkasttemperatuur, zal de groei veel trager plaatsvinden dan bij hogere temperaturen. De pH heeft ook een invloed op de groei van micro-organismen op een bepaalde voedingsmatrix. Bij *Listeria monocytogenes* wordt gezegd hoe hoger de pH, hoe meer de bacteriesoort groeit. Deze resultaten worden zowel bij aanwezigheid als bij afwezigheid van essentiële oliën bekomen (Gutierrez et al., 2008, Burt, 2004).

4.3. *Origanum compactum* en *Cymbopogon citratus*

Essentiële oliën bestaan uit een mix van verschillende actieve componenten, waardoor het verschillende inwerkingsplaatsen heeft op de micro-organismen. Door analyse van de verschillende componenten kan er een idee gegeven worden over de antimicrobiële werking van essentiële oliën. Er kunnen echter antagonistische of synergetische effecten plaatsvinden in de EO, tegenover het gebruik van de componenten afzonderlijk. Hier dient er rekening mee gehouden te worden bij analyse van de componenten afzonderlijk (Burt, 2004, Hyldgaard et al., 2012, Bouhdid et al., 2009).

In deze thesis wordt er gefocust op de werking van *Origanum compactum* en *Cymbopogon citratus*. Elk van beide EO heeft een specifieke samenstelling.

- *Origanum compactum* behoort toe tot de familie van *Lamiaceae*. Het is 1 van de 5 species die toebehoren tot de genus *Origanum* (Bouhdid et al., 2008). Uit deze kruiden kan een essentiële olie geëxtraheerd worden met de samenstelling beschreven in tabel 4-1.

Origanum compactum heeft een antimicrobiële werking op verschillende plaatsen van het organisme. De antimicrobiële werking zorgt enerzijds voor het verdwijnen of verminderen van de kalium-gradient over het cytoplasma membraan, anderzijds voor het depolariseren en permeabel maken van de membranen. Verder zal de EO een geremde celademhaling veroorzaken en de celstructuur verstoren door het stollen van het cytoplasmatisch materiaal (Hyldgaard et al., 2012, Bouhdid et al., 2009).

Tabel 4-1 Samenstelling *Origanum compactum* (BIO CEE)

Componenten	Percentage samenstelling (%)
Alfa pineen + alfa thujeen	1,80
Alfa terpineen	2,17
Alfa terpineol	0,23
Beta caryofylleen	1,89
Beta pineen	0,14
Bornéol	0,16
Carvacrol	39,70
Gamma terpineen	18,16
Linalool	1,30
Myrceen	1,84
P-cymeen	9,00
Terpinoleen	0,10
Thymol	20,50

- *Cymbopogon citratus* behoort tot de familie van *Gramineae*. Deze familie beschikt over 660 genera en 9000 species (Bassolé et al., 2011). In tabel 4-2 wordt de samenstelling beschreven. *Cymbopogon citratus* beschikt over een antimicrobiële werking die ervoor zorgt dat de membranen van het micro-organisme permeabel worden (Hyldgaard et al., 2012).

Tabel 4-2 Samenstelling *Cymbopogon citratus* (BIO CEE)

Componenten	Percentage samenstelling (%)
6-methyl-5-hepten-2-on	1,68
Alfa pineen	0,02
Beta caryophylléne	1,57
Kamfeen	0,30
Cis-Beta-ocimeen	0,76
Citronellol	1,28
Citronellal	0,21
Geranial	43,01
Geraniol	3,63
Limoneen	0,10
Linalool	1,56
Myrceen	9,56
Neral	31,47
Nerol	0,13
Trans-beta-ocimeen	0,47

De algemene antimicrobiële werking van *Origanum compactum* en *Cymbopogon citratus* is afhankelijk van de werking van alle componenten waaruit de oliën samengesteld zijn (Hyldgaard et al., 2012). Hieronder volgt een overzicht van componentgroepen van *O. compactum* en *C. citratus* die een antimicrobiële werking hebben, en waar deze werking plaatsvindt in het micro-organisme.

Terpenoïden zijn terpenen die via enzymen een biochemische transformatie hebben ondergaan. Door de enzymatische werking zijn er zuurstofmoleculen in de chemische structuur gekomen en methylgroepen verplaatst of verwijderd. Deze groep kan verder onderverdeeld worden naar de functionele groep. Fenolische terpenoïden bezitten een fenolische groep, hier horen bijvoorbeeld carvacrol en thymol bij. Ook kan er een alcoholgroep aanwezig zijn zoals linalool, nerol, geraniol.... Ook kunnen er keton-, ester-ethergroepen voorkomen (Hyldgaard et al., 2012, Liu and Yang, 2012).

Thymol (20,50%) en carvacrol (39,70%) zijn voorbeelden van fenolische terpenoïden. Het zijn de twee grootste componenten die aanwezig zijn in *Origanum compactum* (Hyldgaard et al., 2012). Hier een overzicht van de inwerkingsplaatsen op micro-organismen van deze twee fenolische terpenoïden.

- Carvacrol heeft als primaire werkingsmechanisme het vermogen om zich in het membraan te positioneren en daar de permeabiliteit te doen stijgen (Hyldgaard et al., 2012). Carvacrol is in staat om zich in het buitenmembraan van Gram-negatieve bacteriën te positioneren. In dit membraan zal het zorgen voor de vrijstelling van lipopolysaccharides. Ondanks het feit dat carvacrol aanwezig is in het buitenmembraan, zal het eveneens invloed hebben op het cytoplasmamembraan. Deze invloed zorgt voor passief transport van ionen door het membraan, wat uiteindelijk een invloed op de ATP productie zal hebben. Dit komt omdat carvacrol over een hydroxylgroep (zie figuur 2-3) beschikt die zal fungeren als een transmembrane carrier van monovalente kationen door het membraan, het zal meer bepaald H⁺ ionen in het celmembraan, en K⁺ ionen uit het membraan brengen. Hierdoor daalt de pH-gradient (Hyldgaard et al., 2012, Bouhdid et al., 2009, Burt, 2004). Het werkingsmechanisme van carvacrol in het membraan is het verhogen van de vloeibaarheid en permeabiliteit van de membranen. Cellen die onderhevig zijn aan carvacrol zullen een aanpassingsreactie ondergaan, tot wijziging van hun vetzuursamenstelling van het membraan, dit als effect op de vloeibaarheid veroorzaakt door de carvacrol. Stijgende vloeibaarheid van het membraan zorgt voor een betere permeabiliteit, zodat er een uitstroom is van K⁺, ATP...(Hyldgaard et al., 2012).

Ook tegen fungi is carvacrol werkzaam, het zorgt bijvoorbeeld voor het verstoren van de Ca²⁺ en H⁺ homeostasie. Het is ook werkzaam tegen de regulatie van gen transcriptie, bijvoorbeeld voor stress reactie, RNA metabolisme, tekort aan voedingsstoffen... (Hyldgaard et al., 2012).

- Thymol is structureel gelijklopend met carvacrol (zie figuur 2-3), maar heeft een hydroxylgroep op een andere locatie (Burt, 2004). Thymol veroorzaakt de afbraak van het buitenste en binnenste membraan van Gram-negatieve bacteriën. Blootstelling van de cel aan dit component zorgt voor een verhoogde membraan permeabiliteit, wat een verlies van potentiaal over het membraan betekent en lekkages van K⁺, ATP... veroorzaakt. Thymol veroorzaakt eveneens een vrijstelling van lipopolysaccharides van het membraan. Dit component zal integreren met de polaire kop van de lipide dubbellaag, welke wijzigingen zal veroorzaken aan het celmembraan, hierdoor zal er een aanpassingsreactie plaatsvinden om zo een stijgende vloeibaarheid van het

membraan te compenseren. Naast interactie met membraanfosfolipiden kan er ook interactie plaatsvinden met membraanproteïnen en intracellulaire componenten, waardoor de cel verhinderd wordt te herstellen na tijdelijke blootstelling aan thymol (Hyldgaard et al., 2012).

De aanwezigheid van thymol zorgt eveneens voor enkele andere wijzigingen in de cel. Zo zal er een verlaagde regulatie zijn in aanwezigheid van thymol voor de buitenste membraan proteïnen. Hierdoor zal het buitenste membraan misvormd worden. Het zorgt eveneens voor een verhoogde regulatie van heat shock proteïne 60 en heat shock proteïne 70, wat chaperonne eiwitten zijn die de cel beschermen tegen stress en misvormde proteïnen. Thymol tast ook de citraat metabolische pathway aan, en treft ook enzymen die direct of indirect te maken hebben met de synthese van ATP (Hyldgaard et al., 2012).

Thymol is ook werkzaam tegen schimmels en gisten. Net zoals bij de bacteriën zal thymol het celmembraan gaan afbreken. Eveneens zal het schade toebrengen aan het oppervlakte van de cel en cellyse veroorzaken. Activatie van specifieke pathways die instaan voor signalen zullen plaatsvinden bij gisten (Hyldgaard et al., 2012).

Geraniol (3,63%), linalool (1,56%), citronellol (1,28%), nerol (0,13%) zijn voorbeelden van alcoholische terpenoïden die aanwezig zijn in de EO van *Cymbopogon citratus*. Ook *Origanum compactum* beschikt over alcoholische terpenoïden namelijk α -terpineol (0,23%) en linalool (1,30%). Het antimicrobiële werkingsmechanisme van deze terpenoïden is het denatureren van proteïnen van het micro-organisme en eveneens het dehydrateren van de vegetatieve cellen (Liu and Yang, 2012).

- Volgens Hyldgaard et al. (2012) heeft linalool eveneens invloed op de permeabiliteit van het membraan.
- Geraniol beschikt dan weer over een antimicrobiële eigenschap tegen *Saccharomyces cerevisiae*. Geraniol heeft een inhiberende werking op dit gist. Dit omdat het component zorgt voor het ontstaan van lekken van K^+ - en Mg^{2+} -ionen. Eveneens heeft geraniol invloed op het celmembraan, waar het zorgt voor een verandering van de verhouding onverzadigde en verzadigde vetzuren (Liu and Yang, 2012).

De terpenen zijn een andere groep van componenten die voorkomen in EO. Ze worden gesynthetiseerd in het cytoplasma van de plantencel, door het volgen van de mevalonzuur pathway, startend vanaf acetyl-CoA. Terpenen beschikken op zichzelf niet over veel antimicrobiële eigenschappen. Echter in combinatie met andere componenten kan er een synergetisch effect plaatsvinden (Hyldgaard et al., 2012). In *Origanum compactum* komen er terpenen voor zoals γ -terpineen (18,16%), p-cimeen (9,00%), β -pineen (0,14%), α -terpineen (2,17%).... *Cymbopogon citratus* beschikt ook over terpenen, namelijk: myrceen (9,56%), β -caryofyleen (1,57%), Limoneen (0,10%)... (Hyldgaard et al., 2012).

- Gamma-terpineen zal bij contact met de cel zorgen voor een verlaging van de smelt temperatuur van het membraan (Hyldgaard et al., 2012). Eveneens zorgt het voor een verstoring van het membraan van de organismen. De fenolische structuur van γ -terpineen zal interageren met het buitenste membraan van het micro-organisme. Hierdoor zullen lekkages ontstaan. Dit is voornamelijk te danken aan de hydrofobe structuur van de EO componenten (Oyedemi et al., 2009, Hyldgaard et al., 2012).
- P-cymeen of para-cymeen is de precursor van carvacrol. P-cymeen is niet effectief als antimicrobieel component wanneer het alleen gebruikt wordt, maar in combinatie met bijvoorbeeld carvacrol heeft het een synergetisch effect. P-Cymeen zal zich in het membraan substitueren, waar het gedeeltelijk het membraan zal verstoren. Het heeft een hoge affiniteit voor membranen, en veroorzaakt daar zo expansie. Deze expansie zal invloed hebben op het membraanpotentiaal van de cel. Ook zal er een afname zijn van de enthalpie van de membranen, net zoals het smeltpunt dat zal dalen (Burt, 2004, Hyldgaard et al., 2012)
- Citral is het grootste component aanwezig in *Cymbopogon citratus*, het komt echter niet rechtstreeks voor. Citral is een naam die gegeven werd aan een mix van twee verschillende isomeren namelijk neral en geranial. De EO van *C. citratus* bestaat voor bijna 75% uit deze stoffen. Neral bezit de cis configuratie (cis-citral), geranial de trans configuratie (trans-citral) (Saddiq and Khayyat, 2010). Volgens Liu and Yang (2012) zou aangetoond zijn dat citral een sublethaal effect heeft op het buitenste membraan van de organismen.

5. Materiaal en methoden

Op de kruiden- en vismatrices werden respectievelijk *E. coli* en totaal coliformgetal enerzijds (natuurlijk aanwezig) en *Listeria monocytogenes* anderzijds (inoculatie) geanalyseerd. Totaal kiemgetal werd meegenomen voor beide matrices.

Het gevolgde protocol was eigendom van het labo voedingsmicrobiologie en biotechnologie van Universiteit Gent Campus Kortrijk. Hierbij werden de voedingsmatrices door middel van onderdompeling gewassen in een emulsie van essentiële olie in water. Hierbij werd de impact bekeken van de EO op de micro-organismen. Dit werd gedaan door op bepaalde tijdstippen na het wassen, 0, 1 en 6 dagen voor kruiden en 0, 1 en 7 dagen voor vis, de aantallen *E. coli* / coliformen / *Listeria monocytogenes* aanwezig op de voedingsmatrices te bekijken. Ter vergelijking werd er ook een wasbad met leidingwater (blanco) meegenomen.

5.1. Media en reagentia

5.1.1. Analyse op kruiden

- Rapid' *E. coli* 2 agar (356 4024, Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, Frankrijk)
Rapid' *E. coli* 2 agar medium werd aangemaakt door 37 gram per liter op te lossen in demi-water en dit op te koken.
- Plate Count Agar (PCA) (CM0325, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England)
Plate Count Agar werd aangemaakt door 17,5 gram per liter op te lossen in demi-water en dit op te koken.
- Peptonewater (CM0009, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England)
Het peptonewater werd aangemaakt door 15 gram op te lossen in 1 liter demi-water.
- Fysiologisch water (0,9 % NaCl)

5.1.2. Analyse op vis

- Brain Heart Infusion (BHI) broth (CM1135, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England)
BHI werd aangemaakt door 37 gram per liter op te lossen in demi-water en vervolgens per 10 ml in proefbuizen te verdelen.
- Brilliance *Listeria* Agar
Brilliance *Listeria* Agar werd aangemaakt door 33,6 gram Brilliance *Listeria* Agar Base (CM1080, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England) op te lossen in 480 ml demi-water. Na autoclaveren diende het media af te koelen tot 48 °C alvorens 1 ampule Brilliance *Listeria* Selective Supplement (SR0227, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England) en 1 ampule Brilliance *Listeria* Differential Supplement (SR0228, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England) toe te voegen.
- Plate Count Agar (PCA) (CM0325, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England)
- Gebufferd peptonewater (CM0509, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England)
Het gebufferde peptonewater werd aangemaakt door 20 gram op te lossen in 1 liter demi-water.

5.1.3. Screening van verschillende antimicrobiële middelen en hun combinaties (hurdle effect) op zalm

- Brain Heart Infusion (BHI) broth (CM1135, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England)
- Brilliance *Listeria* Agar: Brilliance *Listeria* Agar Base (CM1080, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England); Brilliance *Listeria* Selective Supplement (SR0227, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England) en Brilliance *Listeria* Differential Supplement (SR0228, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England)
- Rapid' *E. coli* 2 agar (356 4024, Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, Frankrijk)
- Gebufferd peptonewater (CM0509, Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England)
- Fysiologisch water (0,9 % NaCl)
- Zout (NaCl)
- Citroenzuur (20282.293, VWR International, Ballycoolin, Dublin, Ierland)

5.2. Micro-organismen

Er werd gebruik gemaakt van 3 stammen *Listeria monocytogenes* die werden geïsoleerd door UGent vakgroep voedselveiligheid en voedselkwaliteit. De gebruikte stammen werden geïsoleerd van krabsalade (LFMFP492), groene en rode paprika (LFMFP207) en kipsalade (LFMFP493).

5.3. Methodes

De uitgevoerde methodes zijn afkomstig van het Laboratorium Voedingsmicrobiologie en Biotechnologie.

Bij het werken met micro-organismen, is het van belang geen contaminatie met andere micro-organismen te hebben, daarom werden alle media en reagentia geautoclaveerd (Autoclaf Pb international, model: B2) gedurende 15 minuten bij 15 psi om deze steriel te maken.

5.3.1. Analyse op kruiden

Petroselinum crispum var. *Crispum* werd gekozen als kruidenmatrix. De aangeleverde stalen werden bewaard bij 4 °C tot analyse (indien mogelijk steeds de dag van aanlevering zelf). De kruiden werden aangeleverd door verschillende bedrijven, namelijk bedrijf X en Y. De kruiden afkomstig van bedrijf X hadden nog geen wasproces of bewerkingsstappen ondergaan in het bedrijf. De bewerkingen uitgevoerd bij bedrijf Y waren echter niet gekend, maar de kruiden waren heel vochtig.

5.3.1.1. Wassen van kruiden

Twee wasprocessen werden met elkaar vergeleken: (1) onderdompeling in leidingwater, (2) onderdompeling in een EO-emulsie. Deze wasprocessen werden gesimuleerd op laboschaal door onderdompeling van 20 opeenvolgende stalen van 25 gram. Elk staal werd gedurende 2 minuten ondergedompeld in het waswater. Bij het eerste wasproces werd er gebruik gemaakt van 500 ml leidingwater, bij het tweede proces een emulsie van EO in water. Er werden 2 EO gebruikt: (1) *Cymbopogon citratus* (Lot: 121838, Ex.: 09/2016, BIOVER nv, Brugge, België) , (2) *Origanum compactum* (Lot: 121846,

Ex.: 09/2016, BIOVER nv, Brugge, België). Van (1) werd er 5 ml EO aan 500 ml leidingwater toegevoegd (1% emulsie). Van (2) werd zowel 5 ml, 1 ml en 0,1 ml EO aan 500 ml leidingwater toegevoegd, zodat emulsies van 1 %, 0,2 % en 0,02 % respectievelijk verkregen werden. Als emulgator werd Tween® 20 toegevoegd, het volume was 10 keer minder dan het toegevoegde volume EO. De suspensie werd homogeen gemaakt door gebruik te maken van een mixer (IKA®T18 basic UltraTurrax®) gedurende 1 minuut bij 13.500 toeren/min.

Tijdens het wasproces werd er onderscheid gemaakt tussen analyse van waswater en analyse van plantenmateriaal. Na onderdompeling van 0, 5, 10, 15 en 20 stalen werden verschillende verdunningen van het waswaterstaal uitgeplaat (1:10 verdunnen in fysiologisch water). Parameters als pH (CONSORT C830) en temperatuur (TFA Dostmann/Wertheim model EN13485) van het waswater werden eveneens meegenomen. Kamertemperatuur was de starttemperatuur van het waswater.

Ter analyse van het plantenmateriaal werden er per reeks van 20 stalen, 6 stalen (namelijk staal 1, 2, 3, 18, 19 en 20) bewaard in een stomacherzak. Het meeste waswater werd uit het plantenmateriaal geknepen en vervolgens gedroogd door middel van een slazwierder, alvorens deze in de stomacherzak te plaatsen. Stalen 1 en 18 werden onmiddellijk geanalyseerd, stalen 2 en 19 na 1 dag bewaren bij 4 °C en stalen 3 en 20 na 6 dagen bewaren. Op deze manier werd onderscheid gemaakt tussen stalen plantenmateriaal die aan het begin en het einde van het wasproces genomen werden. Er werd eveneens een ongewassen staal geanalyseerd aan het begin van de analyse, dit fungeerde als blanco.

5.3.1.2. Staalvoorbereiding

Na bewaren van de stalen in een stomacherzak bij 4 °C gedurende 0, 1 en 6 dagen, werden de stalen geanalyseerd. Hiervoor werd aan een stomacherzak 225 gram peptonewater toegevoegd, hierdoor werd reeds een 1:10 verdunning verkregen. Met behulp van een homogenisator (IUL Instruments, model: 1000470/2289) werd het staal gedurende 1 minuut gehomogeniseerd, hierdoor werden alle op kruiden aanwezige micro-organismen verdeeld over het peptonewater en de kruidenmatrix. Van de suspensie werden gepaste verdunningen gemaakt (1:10 verdunnen in fysiologisch water).

5.3.1.3. Uitplaten stalen

Verdunningen werden aangemaakt van stalen, zowel van het waswater als van het plantenmateriaal (1:10 verdunnen in fysiologisch water). De uitgeplaatte verdunningen (telkens 1 ml) werden beslist door de voorgaande resultaten. Het uitplaten gebeurde op twee verschillende media: (1) PCA (Plate Count Agar) en (2) Rapid' *E. coli* 2 agar, respectievelijk ter bepaling van het totaal kiemgetal en *E. coli* / totaal coliformgetal. Het uitplaten gebeurde via de gietplaatmethode.

De PCA platen werden in een broedstof van 22 °C (Binder, model 9020-0242) geplaatst gedurende 5 dagen. De Rapid' *E. coli* 2 agarplaten gedurende 18-24 uur in een broedstof van 37 °C (VWR®, model: Incu-Line).

5.3.1.4. Tellen van platen

Na incubatie werden alle platen geteld. Bij de PCA platen werden alle kolonies geteld die op de plaat aanwezig waren. Rapid' *E. coli* 2 agar is een selectief medium voor *E. coli* en andere coliformen, respectievelijk te tellen als paarse en blauw-groene kolonies.

5.3.2. *Aanmaken werkcultuur van Listeria monocytogenes voor inoculatie vis*

Daar *Listeria monocytogenes* niet natuurlijk voorkwam op de gekozen vismatrices, diende een mengsel van drie verschillende stammen geïnoculeerd te worden op de vismatrix voor analyse. Hiervoor werden vanuit de diepvriesstocks, 100 µl overgeënt in 10 ml BHI en geïnoculeerd in de broedstof bij 30 °C gedurende 22 uur. Vervolgens werd nogmaals overgeënt. De stockcultuur kon een maand bewaard worden bij 4 °C.

Voor inoculatie van de vismatrices werd de dag voordien steeds een nieuw inoculum opgegroeid vanuit de stockcultuur. Het inoculeren van de vismatrix gebeurde met een cocktail van *Listeria monocytogenes* (1/3 verhouding van elke stam).

5.3.3. *Analyse op vis*

Als vismatrices werd gekozen voor Atlantische zalm (*Salmo salar*) en tong (*Solea solea*). De geleverde stalen waren reeds schoongemaakte filets (ontdaan van schubben en graten).

Kleine porties vis (25 gram) werden geïnoculeerd met *Listeria monocytogenes* en vervolgens gewassen door middel van onderdompeling, dit om het effect van het wassen deze wassing te vergelijken tussen enerzijds leidingwater en anderzijds EO. Het effect van het wassen werd vervolgens bestudeerd.

5.3.3.1. Inoculeren stalen

De geleverde visfilets werden in gelijke porties van 25 gram, met ongeveer eenzelfde contactoppervlak, gesneden. Per wasreeks waren er 40 stalen nodig (een wasreeks bestaat uit 1 wasbad met 10^3 inoculatie en een met 10^6 inoculatie). De stalen werden vervolgens geïnoculeerd met een cocktail van 3 opgekweekte stammen *Listeria monocytogenes* (1/3 verhouding van elke stam). 20 stalen per wasreeks werden geïnoculeerd met 10^6 kve/25g, 20 stalen met 10^3 kve/25g. Door middel van een drigalski spatel werd het inoculum homogeen over het visoppervlak verspreid. De stalen werden vervolgens een nacht bewaard bij 4 °C zodat de organismen zich konden vasthechten aan de vismatrix.

5.3.3.2. Wassen van visstalen

Twee wasprocessen werden met elkaar vergeleken: (1) onderdompeling in leidingwater, (2) onderdompeling in een EO-emulsie. Er werd een wasproces uitgevoerd op laboschaal door onderdompeling van 20 opeenvolgende geïnoculeerde visstalen van 25 gram. Elk staal werd gedurende 30 seconden ondergedompeld in het waswater. Bij een eerste proces werd er gebruik gemaakt van 500 ml leidingwater, bij een tweede proces van een EO-emulsie. Als EO-emulsie werd er gewerkt met 1% *Origanum compactum* (Lot: 121846, Ex.: 09/2016, BIOVER nv, Brugge, België). *O. compactum* (5 ml) werd aan

500 ml leidingwater toegevoegd, samen met Tween® 20 als emulgator (500 µl). De suspensie werd homogeen gemaakt door gebruik te maken van een mixer (IKA®T18 basic UltraTurrax®) gedurende 1 minuut bij 13.500 toeren/min.

Na onderdompeling van 0, 5, 10, 15 en 20 stalen werden verschillende verdunningen van het waswaterstaal uitgeplaat (1:10 verdunnen in fysiologisch water). Parameters als pH (CONSORT C830) en temperatuur (TFA Dostmann/Wertheim model: EN13485) van het waswater werden eveneens meegenomen. De starttemperatuur van het wasbad was $\pm 4^{\circ}\text{C}$.

Ter analyse van het vismateriaal werd er een onderscheid gemaakt tussen tong en zalm. Per reeks van 20 stalen, werden respectievelijk 8 en 6 stalen bewaard in een stomacherzak. Voor tong werden stalen 1 en 17 onmiddellijk geanalyseerd, stalen 2 en 18 na 1 dag bewaren bij 4°C , stalen 3 en 19 na 7 dagen bewaren en stalen 4 en 20 na 14 dagen bewaren. Voor zalm werden stalen 1 en 18 onmiddellijk geanalyseerd, stalen 2 en 19 na 1 dag en 3 en 20 na 7 dagen. Op deze manier werd onderscheid gemaakt tussen stalen van vismateriaal die aan het begin en het einde van het wasproces genomen werden.

Het wasproces, in zowel EO-emulsie als in leidingwater, werd uitgevoerd voor zalm en tong. Ook werden telkens 2 verschillende inoculaties per vissoort uitgevoerd namelijk 10^3 kve/25g en 10^6 kve/25g. Voor iedere vissoort en inoculum werd er telkens een blanco in een stomacherzak meegenomen voor onmiddellijke analyse.

5.3.3.3. Staalvoorbereiding

Na bewaring van de stalen in een stomacherzak bij 4°C gedurende 0, 1, 7 en 14 dagen, werden de stalen geanalyseerd. Hiervoor werd aan een stomacherzak 225 gram gebufferde peptonewater toegevoegd, hierdoor werd reeds een verdunning van 1:10 verkregen. Met behulp van een homogenisator (IUL Instruments, model: 1000470/2289) werd het staal gedurende 1 minuut gehomogeniseerd, hierdoor werden alle op vis aanwezige micro-organismen verdeeld over het gebufferde peptonewater en de vismatrix. Na homogeniseren werden de micro-organismen in de stomacherzak gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur geplaatst. Van de suspensie werden gepaste verdunningen gemaakt (1:10 verdunnen in fysiologisch water).

5.3.3.4. Uitplaten stalen

Verdunningen werden aangemaakt van stalen, zowel van het waswater als van de vismatrix (1:10 verdunnen in fysiologisch water). Het uitplaten gebeurde op twee verschillende media: 1) Brilliance *Listeria* Agar en 2) PCA, respectievelijk ter bepaling van *Listeria monocytogenes* en het totaal kiemgetal. Platen met Brilliance *Listeria* Agar waren strijkplaten, hierbij werd er 100 µl uitgeplaat. Bij PCA werd er gebruik gemaakt van gietplaten (1 ml).

Brilliance *Listeria* Agar werd geïncubeerd in de broedstoof gedurende 24 uur bij 37°C (VWR®, model: Incu-Line). Incubatie van PCA gebeurde in een broedstoof van 22°C (Binder, model 9020-0242) gedurende 5 dagen.

5.3.3.5. Tellen van platen

Na incubatie werden alle platen geteld. Voor de PCA platen werden alle kolonies geteld die op de plaat aanwezig waren. Voor Brilliance *Listeria* Agar werden alle blauwe/groene kolonies geteld, aanwezigheid van halo's rond de kolonies betekende de aanwezigheid van *Listeria monocytogenes*.

5.3.4. *Screening van verschillende antimicrobiële middelen en hun combinatie (hurdle effect) op zalm*

Als matrix werd er opnieuw gekozen voor Atlantische zalm (*Salmo salar*). Kleine porties (25 gram) werden ondergedompeld in oplossingen met verschillende samenstelling. Op deze manier werd een screening uitgevoerd om te kijken welk antimicrobieel middel of zijn combinaties de best reducerende eigenschappen bezat tegen enerzijds *E. coli* / coliformen (natuurlijk aanwezig) en anderzijds *Listeria monocytogenes* (inoculatie).

5.3.4.1. Behandelen van zalmstalen

Drie zalmblokjes van 25 gram werden telkens gelijktijdig per oplossing ondergedompeld. Acht opstellingen werden hierbij met elkaar vergeleken, deze werden opgebouwd uit: (1) leidingwater, (2) EO-emulsie, (3) zoutoplossing, (4) zuuroplossing, (5) EO-emulsie met zoutoplossing, (6) EO-emulsie en zuuroplossing, (7) Zout- en zuuroplossing en (8) EO-emulsie met een zuur- en zoutoplossing. Alles werd telkens uitgevoerd voor zowel blanco visstalen (testen op natuurlijk aanwezige organismen) als voor geïnoculeerde visstalen. De visstalen werden gedurende 3 uur ondergedompeld.

De oplossing met EO-emulsie werd verkregen door 5 ml *Origanum compactum* (Lot: 713-1867, Ex.: 09/2017; BIOVER nv, Brugge, België) toe te voegen aan de onderdompelvloeistof (zodat een 1 % emulsie verkregen werd), samen met Tween® 20 als emulgator (500 µl). De suspensie werd homogeen gemaakt door gebruik te maken van een mixer (IKA®T18 basic UltraTurrax®) gedurende 1 minuut bij 13.500 toeren/min. De zoutoplossing werd verkregen door zout aan de onderdompelvloeistof toe te voegen, tot het verzadigingspunt (= 36 %) bereikt werd. Een zuuroplossing werd verkregen door de onderdompelvloeistof aan te zuren met citroenzuur tot pH 4. Het aanzuren werd telkens als laatste stap uitgevoerd bij de voorbereiding van de onderdompelbaden. De onderdompelbaden werden telkens op een temperatuur van 4 °C gehouden. Van het onderdompelwater werd de pH bepaald aan het begin en het einde van het proces.

Na het onderdompelen, werden de stalen gedurende 15 minuten gedroogd in de laminaire flow. Na deze periode werden de visstalen die voorzien werden als blanco onmiddellijk in een stomacherzak geplaatst. De stalen voorzien voor inoculatie (3 stalen per oplossing) werden vervolgens geïnoculeerd met *Listeria monocytogenes* (10^3 kve/25g), alvorens ze in een stomacherzak te bewaren. De stalen werden bewaard gedurende 1, 5 en 8 dagen bij 4 °C.

5.3.4.2. Staalvoorbereiding en uitplaten

Na bewaring van de stalen in een stomacherzak bij 4 °C gedurende 1, 5 en 8 dagen, werden de stalen geanalyseerd. De eigenlijke analyse is overeenkomstig aan deze in paragraaf 5.3.3.3 Staalvoorbereiding.

Verdunningen werden aangemaakt van de stalen (1:10 verdunnen in fysiologisch water). Het uitplaten gebeurde op twee verschillende media: 1) Brilliance *Listeria* Agar en 2) Rapid' *E. coli* 2 agar, respectievelijk ter bepaling van *Listeria monocytogenes* en *E.coli* / totaal coliformen. Platen met Brilliance *Listeria* Agar waren strijkplaten, hierbij werd er 100 µl uitgeplaat. Bij Rapid' *E.coli* 2 agar werd er gebruik gemaakt van gietplaten (1 ml).

Zowel Brilliance *Listeria* Agar als Rapid' *E. coli* 2 agar werd geïncubeerd in de broedstoof gedurende 24 uur bij 37 °C (VWR®, model: Incu-Line).

5.3.4.3. Tellen van platen

Na incubatie werden alle platen geteld. Voor Brilliance *Listeria* Agar werden alle blauwe/groene kolonies met een halo geteld. Rapid' *E. coli* 2 agar duidde zowel *E. coli* als het totaal coliformen aan, deze werden respectievelijk geteld als paarse en blauw-groene kolonies.

5.4. Data verwerking

De getelde aantallen kolonies, aanwezig op de platen, werden verrekend volgens vergelijking 1. Via de vergelijking werden gegevens in logaritmische kolonievormende eenheden bekomen.

$$N = \log_{10} \left(\frac{S}{(n_1 + 0,1 n_2 + 0,01 n_3 + \dots) \cdot VF} \right) \quad \text{Vergelijking 1}$$

Waarin:

N = Kiemgetal, in kolonie vormende eenheden (kve) per ml

S = De som van de getelde kolonies

n_1 = Het aantal petriplaten met de laagste verdunning

n_2 = Het aantal petriplaten met de hierop volgende tienvoudige verdunning

n_3 = Het aantal petriplaten met de hierop volgende tienvoudige verdunning

VF = De verdunningsfactor: de verdunning ($10^{\text{verdunning } n_1}$)

Van de resultaten in twee- en drievoud werden gemiddelden berekend. Via SPSS Statistics 22 werd gekeken of het verschil in gemiddeldes significant waren. Dit werd gedaan door gebruik te maken van de functie Univariate. Als Post-Hoc test werd Tukey gekozen.

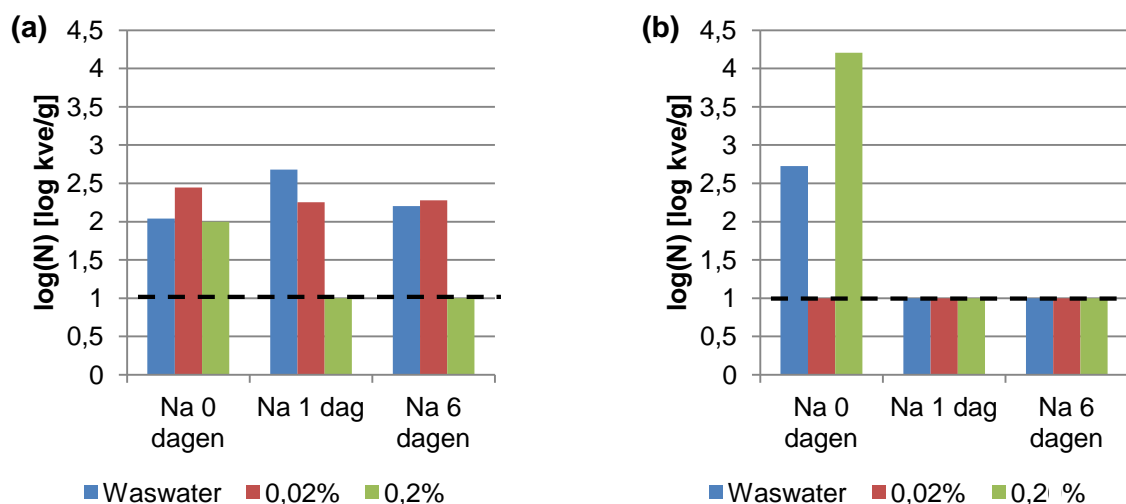
6. Resultaten

6.1. Kruidenmatrix

De verse kruiden werden ondergedompeld in een emulsie van essentiële olie (*O. compactum* en *Cymbopogon citratus*) om een reductie te verkrijgen van het aantal micro-organismen aanwezig in enerzijds het waswater en eventueel op de kruidenmatrix zelf.

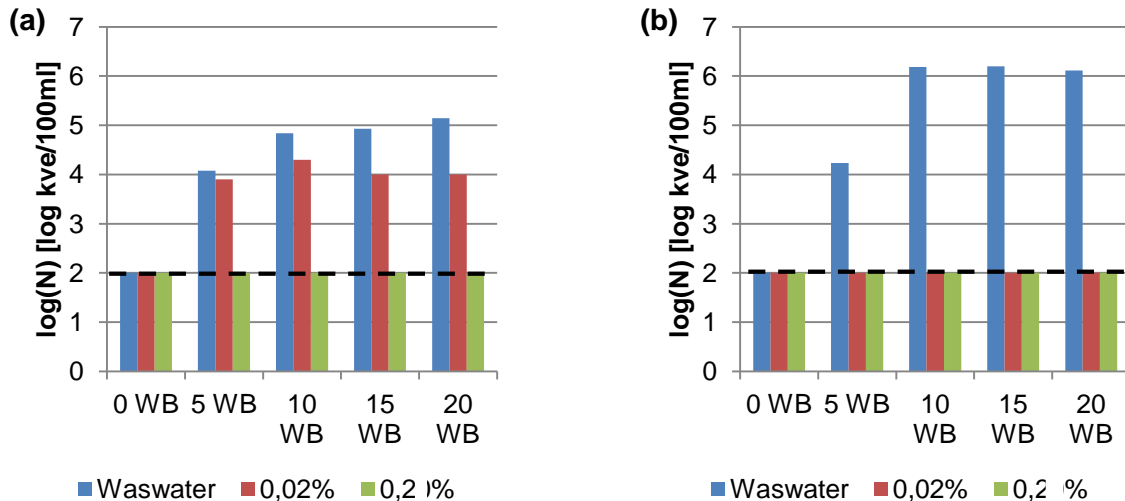
Op de kruidenmatrix en in het wasbad werd er gecontroleerd op *E. coli*, totale coliformen en totaal kiemgetal. Het werken met natuurlijke aanwezigheid van *E. coli* vormde enigszins een probleem in deze thesis. Het aantal *E. coli* aanwezig op de kruidenstalen was sterk leveringsafhankelijk. Zo kon er maar op 1 ongewassen blanco staal het aantal *E. coli* bepaald worden, namelijk 1,60 kve/g (staal afkomstig van bedrijf X, de gewassen reeks van dit staal is terug te vinden in figuur 6-1-a). De andere ongewassen blanco stalen hadden telkens een aantal onder het detectielimiet van 1 log kve/g.

Figuur 6-1 toont twee resultaten van *E. coli*, verkregen na onderdompelen van de kruidenmatrix. De resultaten van (a) vertoonden geen onmiddellijke impact op het *E. coli* gehalte op de kruidenmatrix. Echter na 1 dag bewaren werd er wel een reductie van meer dan 1,68 log kve/g teruggevonden bij een concentratie van 0,2%. Na 6 dagen bewaren van deze stalen, lag het aantal *E. coli* nog steeds onder het detectielimiet. Een concentratie van 0,02% had geen reductie tegenover waswater. Een ander resultaat werd verkregen in (b), waarbij alle waarden na 1 en 6 dagen bewaren onder het detectielimiet van 1 log kve/g lagen. Ook werd er op stalen, ondergedompeld in 0,2% EO, meer *E. coli* gedetecteerd dan op lagere concentraties wanneer deze onmiddellijk geanalyseerd werden. Een derde reeks resultaten gaven voor zowel dag 0, dag 1 als dag 6 waarden onder het detectielimiet en dit voor alle wasbaden. Aan de hand van deze resultaten kon er dus niet met zekerheid gezegd worden dat de verkregen reducties het gevolg waren van het onderdompelen in een emulsie van EO.



Figuur 6-1 Aantal *E. coli* aanwezig op verse kruiden, na onderdompeling in *O. compactum* Kruiden waren afkomstig van (a) bedrijf X en (b) bedrijf Y, staalname aan begin van wasbad. ---, LOQ.

Figuur 6-2 geeft het aantal *E. coli* weer in het wasbad, na onderdompeling van verschillende stalen. In (a) is te zien dat er geen opstapeling te vinden is van het aantal *E. coli* in een wasbad met een concentratie aan *O. compactum* van 0,2%. Hetzelfde resultaat werd verkregen voor stalen afkomstig van bedrijf Y (b). Hierbij werd eveneens geen opstapeling verkregen aan *E. coli*. Echter verschillen de resultaten bij een concentratie aan 0,02%. Een tweede meting met stalen afkomstig van bedrijf Y gaf voor alle wasbaden een waarde onder het detectielimiet.

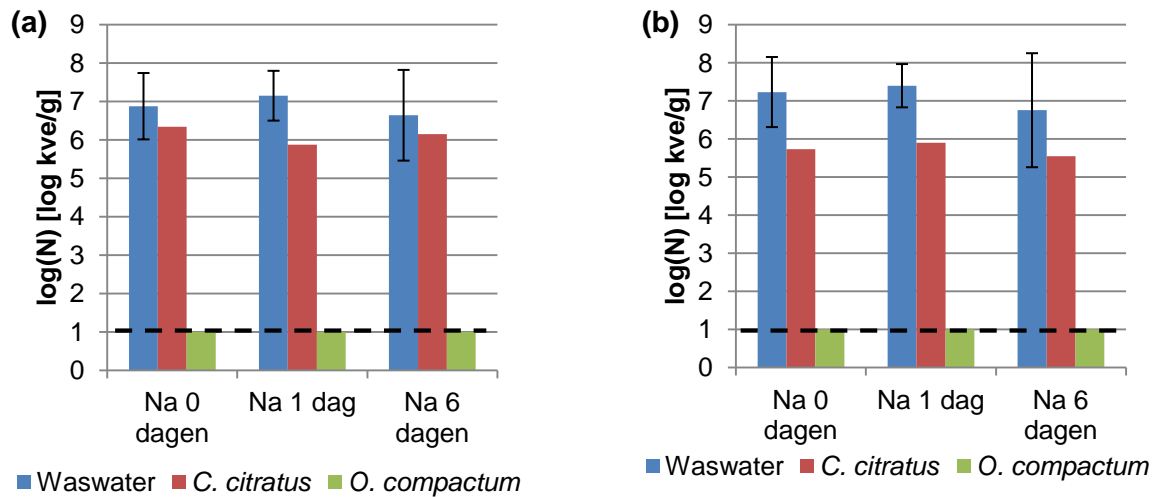


Figuur 6-2 Opstapeling van *E. coli* in het wasbad van *O. compactum*, na onderdompeling van een kruidenmatrix
Kruiden waren afkomstig van (a) bedrijf X en (b) bedrijf Y. - - -, LOQ. WB = wasbeurten

6.1.1. Analyse van de kruidenmatrix

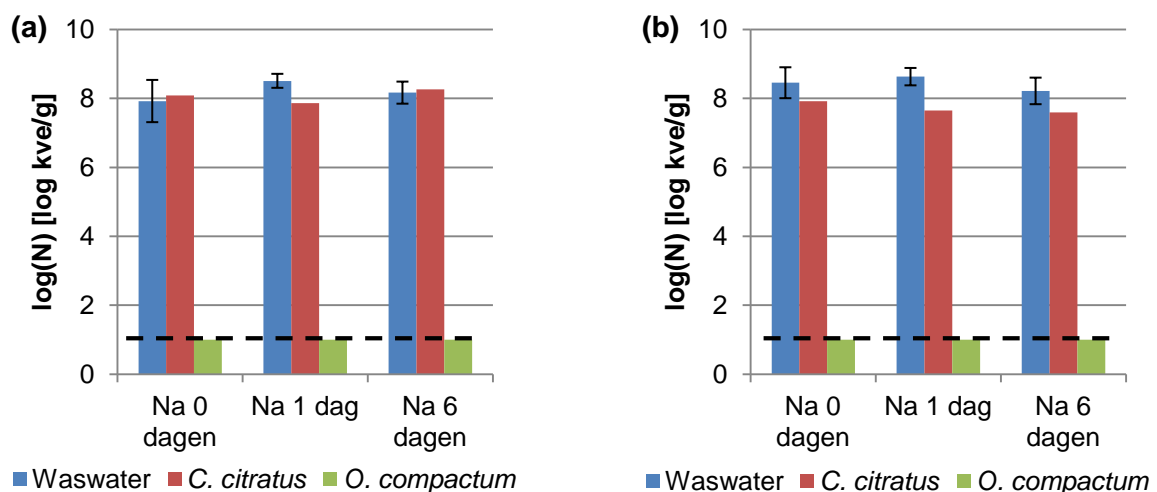
6.1.1.1. Vergelijken van verschillende essentiële oliën

Kruidenstalen, afkomstig uit bedrijf X, werden ondergedompeld in verschillende essentiële oliën met eenzelfde concentratie, namelijk 1%. Het totaal coliformen aanwezig op de kruidenmatrix, verkregen na onderdompeling in *Origanum compactum* of *Cymbopogon citratus*, wordt weergegeven in figuur 6-3. *Origanum compactum* beschikte over een zeer goede antimicrobiële werking tegen coliformen. Tegenover waswater gaf *O. compactum* een reductie weer van meer dan 6,0 log kve/g op de kruidenmatrix. Het aantal lag telkens onder het detectielimiet van 1 log kve/g. In functie van de tijd kon ook geen coliformen worden gedetecteerd. *C. citratus* (citroengras; n = 1) zorgde voor een kleine reductie van het aantal coliformen aanwezig op de kruidenmatrix, tegenover onderdompelen in waswater. Er werd een reductie van 0,5 tot 1,5 log kve/g waargenomen. *O. compactum* bezat betere antimicrobiële eigenschappen tegen coliformen dan *C. citratus*. Er werd een reductieverschil van meer dan 4,5 – 5,5 log kve/g terug gevonden, in het voordeel van *O. compactum*.



Figuur 6-3 Totaal coliformen aanwezig op verse kruiden, afkomstig van bedrijf X, na onderdompeling in een 1% emulsie
Staalname aan begin (a) en einde (b) van wasreeks. - - -, LOD.

Figuur 6-4 geeft het totale kiemgetal weer, aanwezig op de kruidenmatrix, na onderdompelen in EO. Op deze figuur is te zien dat er zo goed als geen reductie waar te nemen was wat betreft het totale kiemgetal bij onderdompeling in een emulsie van *C. citratus*, tegenover onderdompeling in waswater. Het aantal kiemen bleef echter constant na bewaring van de stalen gedurende 6 dagen. Daarentegen was er dan weer een zeer goede werking terug te vinden bij onderdompeling in *O. compactum*. Tegenover waswater leverde *O. compactum* een reductie van meer dan 7,3 log kve/g op, dit tot onder de detectiegrens van 1 log kve/g. Eveneens bleef het aantal kiemen onder de detectielimiet, na bewaren van de stalen tot 6 dagen na onderdompeling. Net zoals bij de totaal coliformen was *O. compactum* beter werkzaam tegen kiemen dan *C. citratus*.

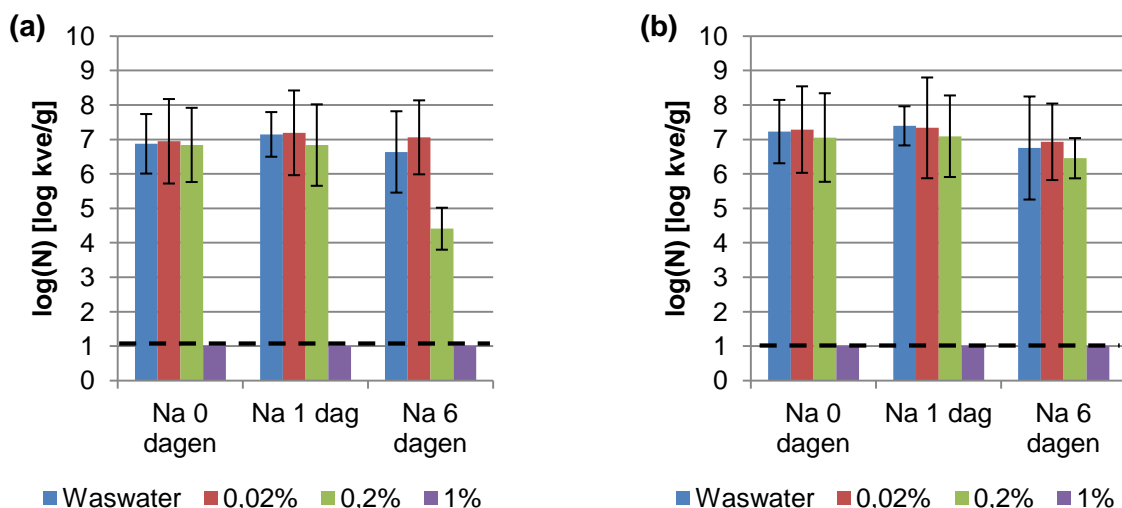


Figuur 6-4 Totaal kiemgetal aanwezig op verse kruiden, afkomstig van bedrijf X, na onderdompeling in een 1% emulsie
Staalname aan begin (a) en einde (b) van wasreeks. - - -, LOD.

6.1.1.2. Vergelijken van verschillende concentraties

Kruidenstalen werden ondergedompeld in een emulsie van verschillende concentraties aan *O. compactum*. De totaal coliformen aanwezig op de matrix na onderdompeling in verschillende concentraties, namelijk 1%; 0,2%; 0,02% en 0% (waswater), wordt weergegeven in figuur 6-5. Zoals vermeld in subparagraaf 6.1.1.1 beschikte 1% *O. compactum* over zeer goede antimicrobiële eigenschappen tegen coliformen. Hierbij werd een reductie van 6,0 log kve/g verkregen tegenover waswater. Deze sterke reductie betekende een significant verschil tussen deze concentratie en waswater (zowel voor (a) als (b) is $P < 0,05$). Ook betekende een concentratie aan 1 %, een significant verschil tegenover lagere concentraties *O. compactum*, namelijk 0,2 en 0,02 % (voor beide $P < 0,05$). Aangezien 1 % *O. compactum* zeer goede antimicrobiële eigenschappen tegen coliformen bezat, kon gekeken worden of lagere concentraties even effectief waren. Echter had een concentratie aan 0,2 % zeer weinig tot geen reductie tegenover waswater. Een concentratie van 0,2 % *O. compactum* was niet significant verschillend tegenover waswater (voor zowel (a) als (b) is $P > 0,05$). Het toepassen van een concentratie van 0,02 % *O. compactum* bood geen meerwaarde tegenover de totaal coliformen, dan toepassen van waswater. Er was dan ook geen significant verschil terug te vinden tussen deze concentratie en waswater, dit zowel voor stalname aan het begin (a) en het einde (b) van de wasreeks ($P > 0,05$).

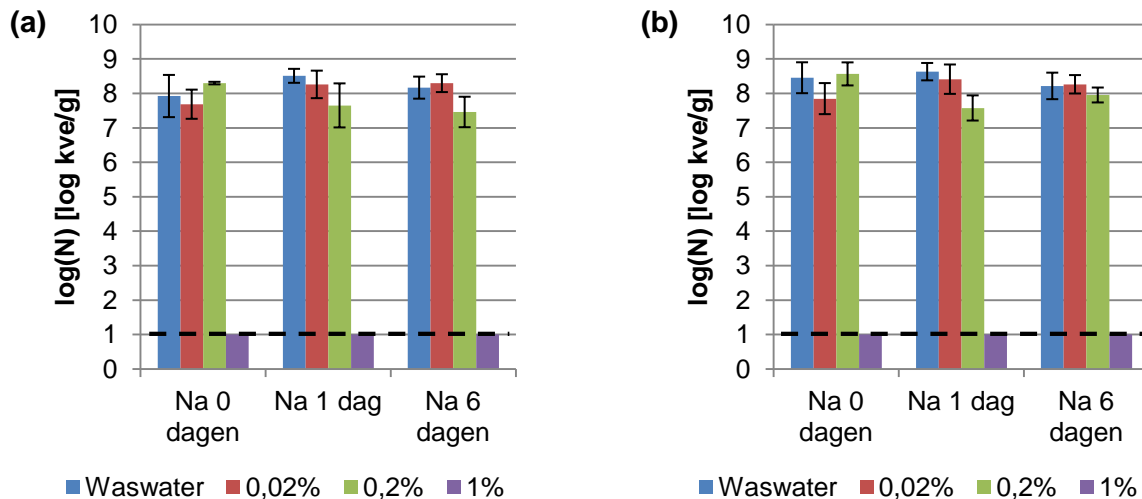
Op figuur 6-5 kan ook gezien worden dat het aantal coliformen aanwezig na onderdompeling constant bleef tot minimaal 6 dagen na bewaren. Zowel bij de stalen genomen aan het begin (a) en het einde (b) van de wasreeks, was er geen significant verschil terug te vinden in de aantallen aanwezig op de kruidenmatrix (voor beide $P > 0,05$). Wanneer de wasreeks van 0,2 % (stalname aan het begin van de wasreeks) afzonderlijk werd gecontroleerd, omdat bij dag 6 een daling van het aantal coliformen opgemerkt werd, was er geen significant verschil terug te vinden tussen de dagen ($P > 0,05$).



Figuur 6-5 Totaal coliformen aanwezig op verse kruiden, afkomstig van bedrijf X, na onderdompeling in verschillende concentratie *O. compactum* Stalname aan begin (a) en einde (b) van wasreeks. - - -, LOD.

Tussen stalen die aan het begin (a) en het einde (b) van een wasreeks genomen werden is geen significant verschil terug te vinden in aantal coliformen, zowel bij waswater, *O. compactum* 0,02 % als bij *O. compactum* 0,2 % (Voor alle drie $P > 0,05$). De werking van de olie op de kruidenmatrix, is dus onafhankelijk van het aantal stalen dat reeds in het wasbad ondergedompeld werden.

Figuur 6-6 geeft het totale kiemgetal weer, aanwezig op de kruidenmatrix, na onderdompeling in een emulsie van *O. compactum* met concentraties 0,02 %; 0,2 % en 1 %. Net zoals besproken in subparagraaf 6.1.1.1 zorgde een 1 % emulsie van *O. compactum* voor een reductie van 7,3 log kve/g voor het totale kiemgetal. Deze hoogste concentratie zorgde dan ook voor de grootste reductie, zoals te zien is in de figuur. Net zoals bij de totaal coliformen zorgde 1% *O. compactum* voor een significante reductie tegenover waswater (voor (a) en (b) is $P < 0,05$). Voor lagere concentraties, namelijk 0,2 en 0,02 %, werd er geen significant verschil gevonden bij het totale kiemgetal, tegenover waswater (respectievelijk $P > 0,05$ en $P > 0,05$ voor (a)).

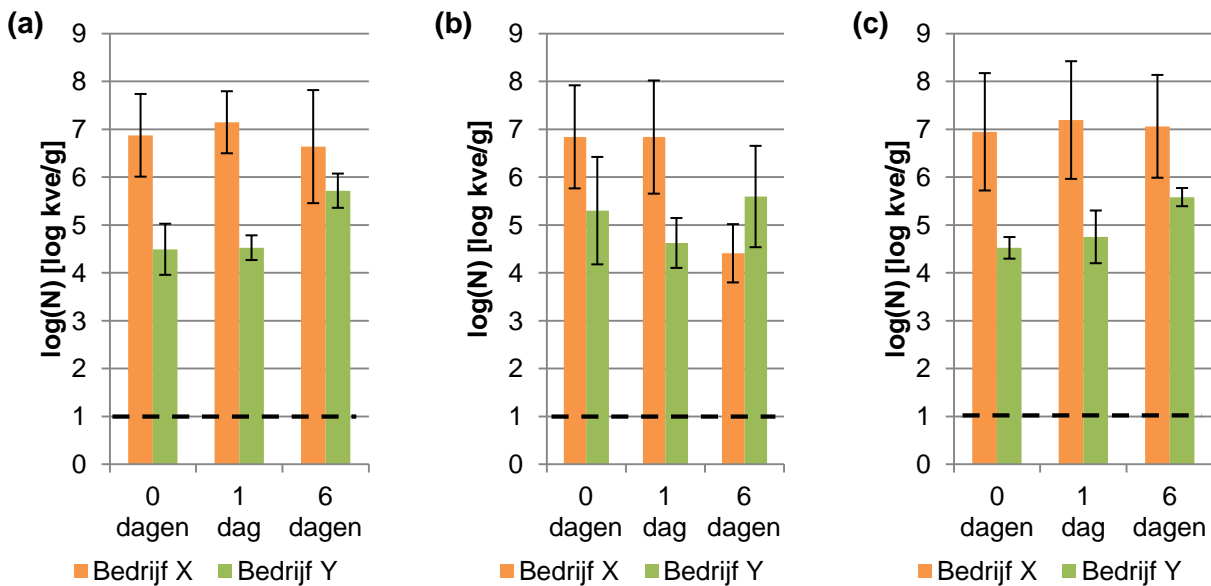


Figuur 6-6 Totaal kiemgetal aanwezig op verse kruiden, afkomstig van bedrijf X, na onderdompeling in verschillende concentratie *O. compactum*
Staalname aan begin (a) en einde (b) van wasreeks. - - -, LOD.

Tijdens het bewaren van de stalen, na onderdompeling, was in figuur 6-6 geen significant verschil te vinden tussen de verschillende dagen wat betreft het totale kiemgetal, dit zowel voor stalen genomen aan het begin (a) als op het einde (b) van de wasreeks (respectievelijk $P > 0,05$ en $P > 0,05$). Tevens is er bij het totale kiemgetal geen significant verschil te merken tussen stalen die aan het begin en het einde van de wasreeks genomen werden, dit zowel voor waswater, 0,2 en 0,02 % *O. compactum* (voor alle drie is $P > 0,05$).

6.1.1.3. Vergelijken van verschillende batches

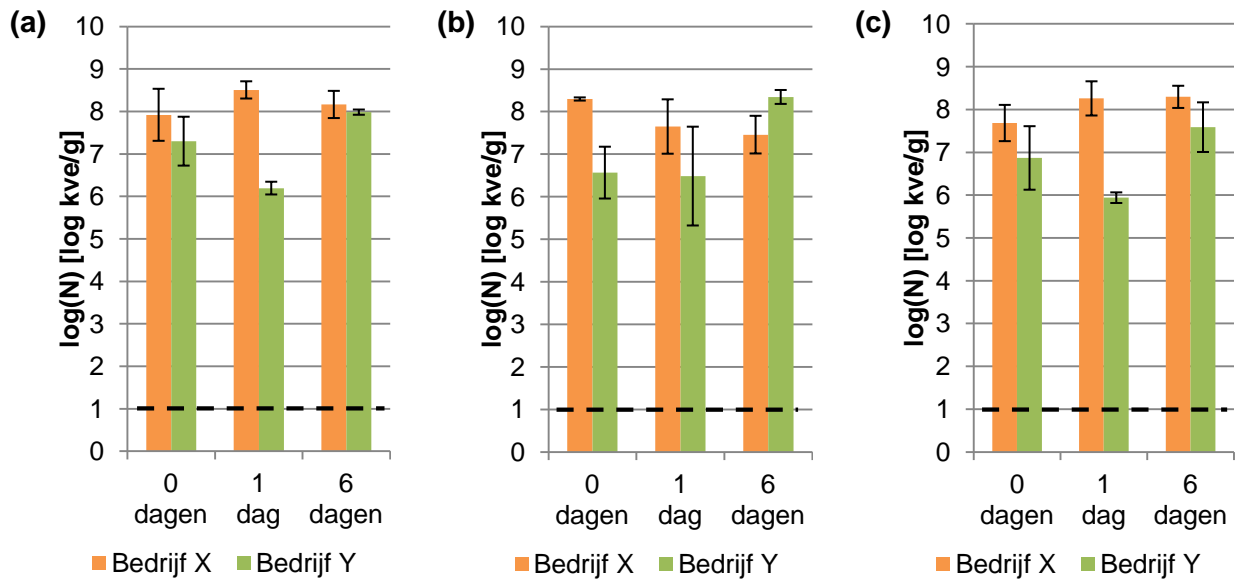
In figuur 6-7 wordt een vergelijking gemaakt tussen de coliformen aanwezig op de kruidenmatrix, afkomstig van twee verschillende bedrijven. Hierbij werden de resultaten van eenzelfde essentiële olie, namelijk *Origanum compactum*, en zelfde concentraties aan EO in het wasbad, namelijk 0% (a); 0,2% (b) en 0,02% (c), met elkaar vergeleken. Het aantal coliformen aanwezig op de kruidenmatrix, afkomstig van bedrijf Y, was significant lager dan deze afkomstig van bedrijf X ($P < 0,05$; voor staalname aan het begin van de wasreeks).



Figuur 6-7 Vergelijken van de coliformen aanwezig op de kruidenmatrix afkomstig van verschillende bedrijven, staalname aan het begin van de wasreeks
Onderdompeling in (a) waswater, (b) 0,2% *O. compactum* en (c) 0,02% *O. compactum*. - - -, LOD.

Desondanks de twee bedrijven een verschillend aantal coliformen hadden na onderdompelen in een emulsie van EO, blijven dezelfde conclusies wel geldig. Bij bedrijf Y werd geen significante reductie aan coliformen terug gevonden tussen de verschillende concentraties, dit zowel voor staalname aan begin (zie figuur 6-7) en einde (figuur niet weergegeven) van de wasreeks ($P > 0,05$ voor beide). Nog in overeenstemming met de resultaten van bedrijf X, werd er tussen stalen van bedrijf Y met een verschillende bewaringstijd geen significant verschil in coliformen gevonden. Het aantal coliformen zal dus statistisch niet wijzigen in functie van de bewaringstijd en dit tot minimaal 6 dagen na onderdompeling. Dit was te merken op de kruidenmatrix ondergedompeld in zowel waswater (Figuur 6-7 a), 0,2% (b) als 0,02% *O. compactum* (c) (voor alle drie is $P > 0,05$).

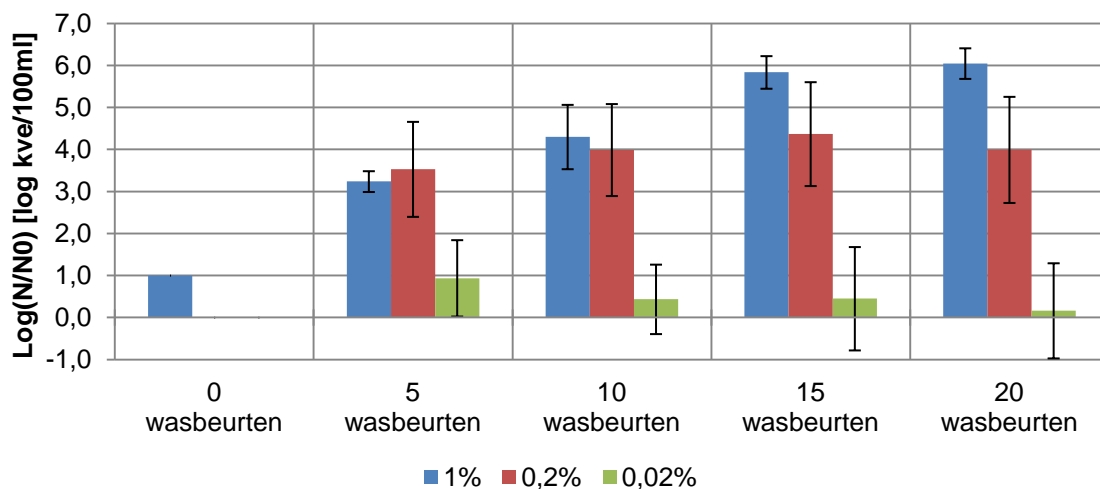
Ook wat betreft het totale kiemgetal, afgebeeld in figuur 6-8, was er een significant verschil te merken tussen de twee bedrijven ($P < 0,05$ voor staalname aan begin van de wasreeks). Het totale kiemgetal van bedrijf Y was dus lager dan deze van bedrijf X. Het onderdompelen van kruiden van bedrijf Y in verschillende concentraties aan *O. compactum*, zal geen significant verschil opleveren in totale kiemgetal ($P > 0,05$ voor zowel staalname aan begin en einde van wasreeks). Het zelfde resultaat werd voorgaand al verkregen bij bedrijf X, bij toepassen van dezelfde concentraties aan EO. Ook wat betreft aangroei of reductie van de kiemcellen in functie van de bewaringstijd is er voor 0,02 (Figuur 6-8 c) en 0,2% (b) *O. compactum*, geen significant verschil te vinden ($P > 0,05$ voor beide concentraties, staalname aan begin van wasreeks). Voor waswater werd hier echter wel een significant verschil aangetroffen tussen 1 dag bewaren en 6 dagen bewaren ($P < 0,05$). Stalen die ondergedompeld werden in waswater, op het einde van de wasreeks, hebben dan weer net geen significant verschil ($P = 0,052$).



Figuur 6-8 Vergelijken van het totale kiemgetal aanwezig op de kruidenmatrix afkomstig van verschillende bedrijven, staalname aan het begin van de wasreeks
Onderdompeling in (a) waswater, (b) 0,2% *O. compactum* en (c) 0,02% *O. compactum*. - - -, LOD.

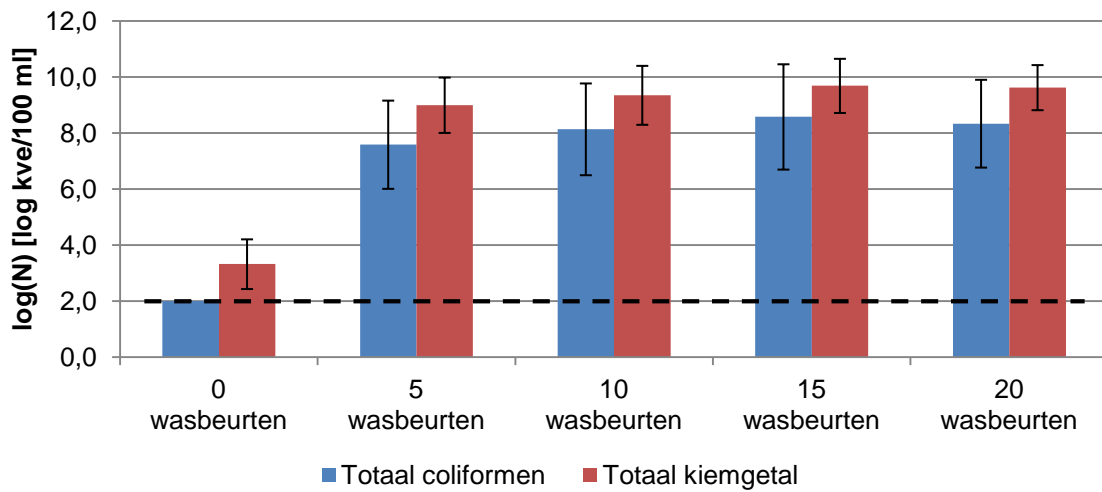
6.1.2. Analyse van het waswater

Figuur 6-9 toont de reductie verkregen bij de totaal coliformen, na onderdompeling in een wasbad van *O. compactum* met verschillende concentraties. In deze figuur is te zien dat de beste reductie aan coliformen werd verkregen in het wasbad waar 1 % *O. compactum* aan toegevoegd was. Na 20 stalen te hebben ondergedompeld, is er een reductie in het wasbad waar te nemen van $6,0 \pm 0,4$ log kve/100ml. Een concentratie aan 0,2 % *O. compactum* vertoonde in het begin eenzelfde reductie als 1 %, maar zal vanaf 15 wasbeurten beginnen verschillen. Na 20 stalen te hebben ondergedompeld, was er een reductie tegenover waswater waar te nemen van $4,0 \pm 1,3$ log kve/100ml. De kleinste concentratie, namelijk 0,02 % aan *O. compactum*, zal eenzelfde opstapeling aan



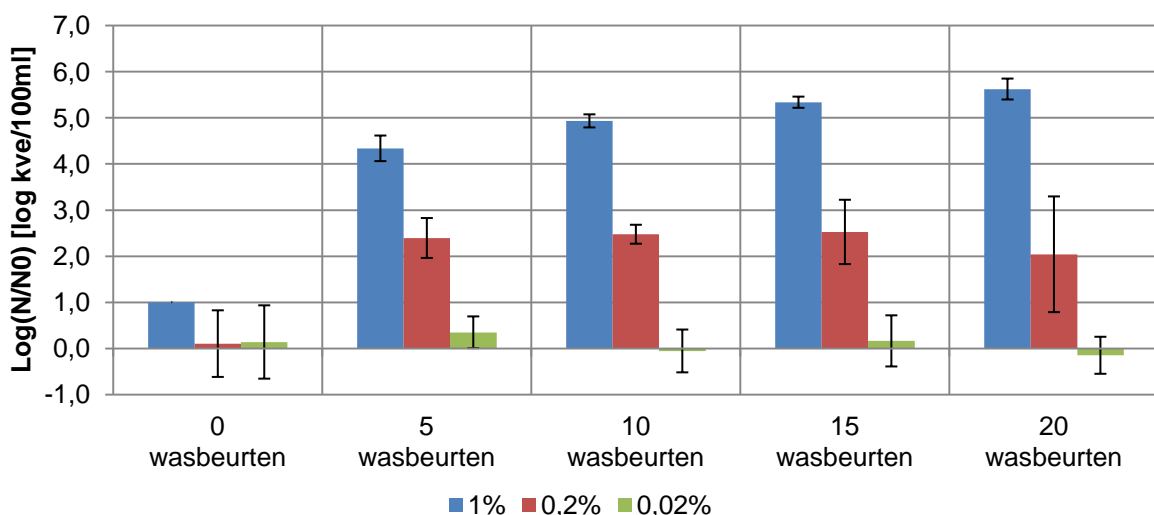
Figuur 6-9 Reductie verkregen van de totaal coliformen door *O. compactum* na onderdompeling van een kruidenmatrix in het wasbad

coliformen hebben in het wasbad als waswater. Deze opstapeling van de micro-organismen in waswater wordt weergegeven in figuur 6-10. Het toevoegen van *O. compactum* in deze concentratie (0,02 %) is dus niet nuttig.



Figuur 6-10 Opstapeling van micro-organismen in waswater, na onderdompeling van een kruidenmatrix, - - -, LOD.

De reductie verkregen van het totale kiemgetal aanwezig in het wasbad van *O. compactum*, na onderdompelen van kruidenstalen, wordt weergegeven in figuur 6-11. Bij het totale kiemgetal was de grootste reductie terug te vinden bij de hoogste concentratie, namelijk 1 % aan *O. compactum*. De reductie tegenover waswater, na 20 stalen te hebben ondergedompeld, is $5,6 \pm 0,2$ log kve/100ml. Bij een concentratie aan 0,2 % werd er een kleinere reductie verkregen dan bij een concentratie van 1 %. De reductie bedroeg hier $2,0 \pm 1,3$ log kve/100ml. De verkregen reductie was eveneens lager dan bij de totale coliformen, bij een concentratie aan 0,2 % ($4,0 \pm 1,3$ log kve/100ml). Opnieuw was geen reductie waar te nemen tegenover waswater, bij een concentratie aan 0,02 %.



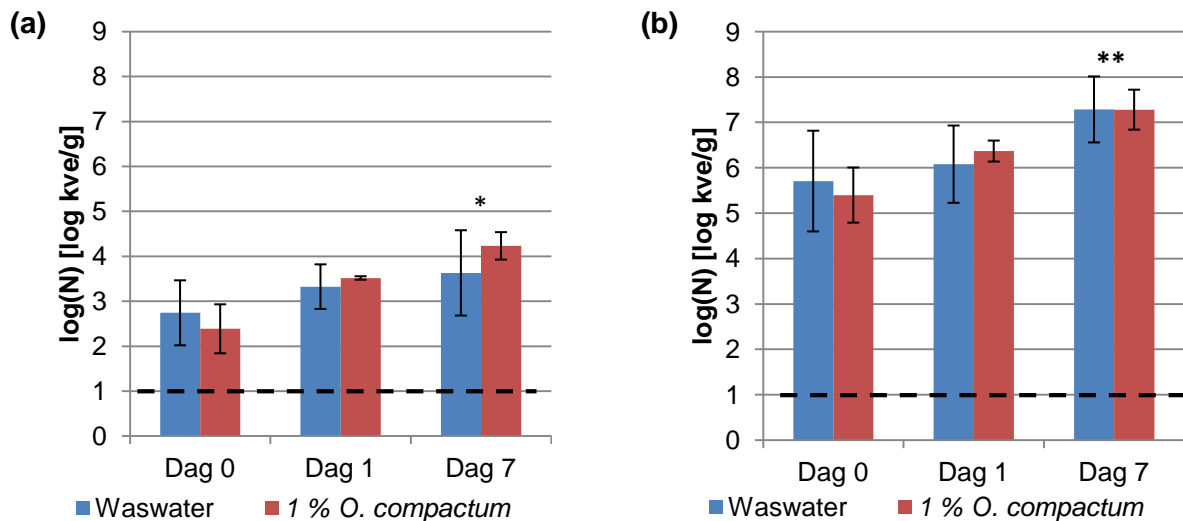
Figuur 6-11 Reductie verkregen van het totale kiemgetal door *O. compactum* na onderdompeling van een kruidenmatrix in het wasbad

6.2. Analyse op vis

Verse vis, namelijk tong- en zalmfilet, werd ondergedompeld in een emulsie van *O. compactum*. De bedoeling hiervan was om een reductie te verkrijgen van het aantal micro-organismen in enerzijds het waswater en eventueel op de vismatrix zelf.

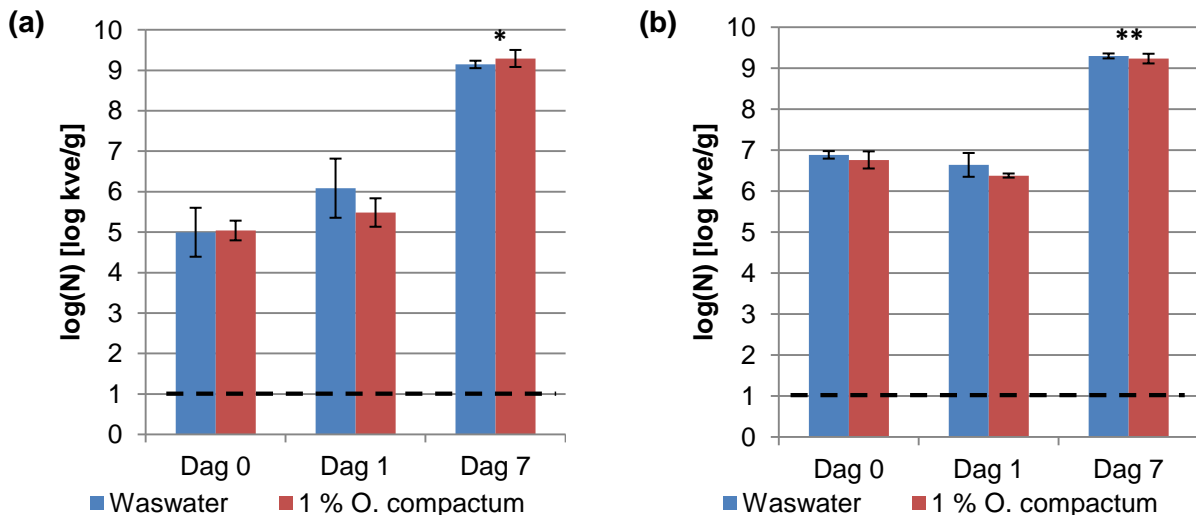
6.2.1. Analyse van zalm- en tongmatrix

De hoeveelheid *Listeria monocytogenes* aanwezig op verse zalm, na onderdompelen in een wasbad (staalname aan begin van wasreeks) wordt weergegeven in figuur 6-12. Bij zowel 3 log inoculatie (a) als 6 log inoculatie (b), was er geen significant verschil waargenomen tussen enerzijds wassen in waswater en anderzijds wassen in een emulsie van water met 1% *Origanum compactum* (voor beide $P > 0,05$). Hetzelfde kan gezegd worden over de resultaten, genomen aan het einde van de wasreeks (figuur niet weergegeven, eveneens voor beide $P > 0,05$). Ook was er geen significant verschil waar te nemen op de zalmstalen, ondergedompeld in een verschillend wasbad, wanneer deze per dag vergeleken werden ($P > 0,05$).



Figuur 6-12 *L. monocytogenes* op zalmfilet, staalname aan begin van wasreeks Inoculatie met (a) 3 log kve/25g en (b) 6 log kve/25g. - - -, LOD. *, Aantallen significant verschillend met dag 0 ($P < 0,05$). **, Aantallen significant verschillend met dag 0 ($P < 0,05$).

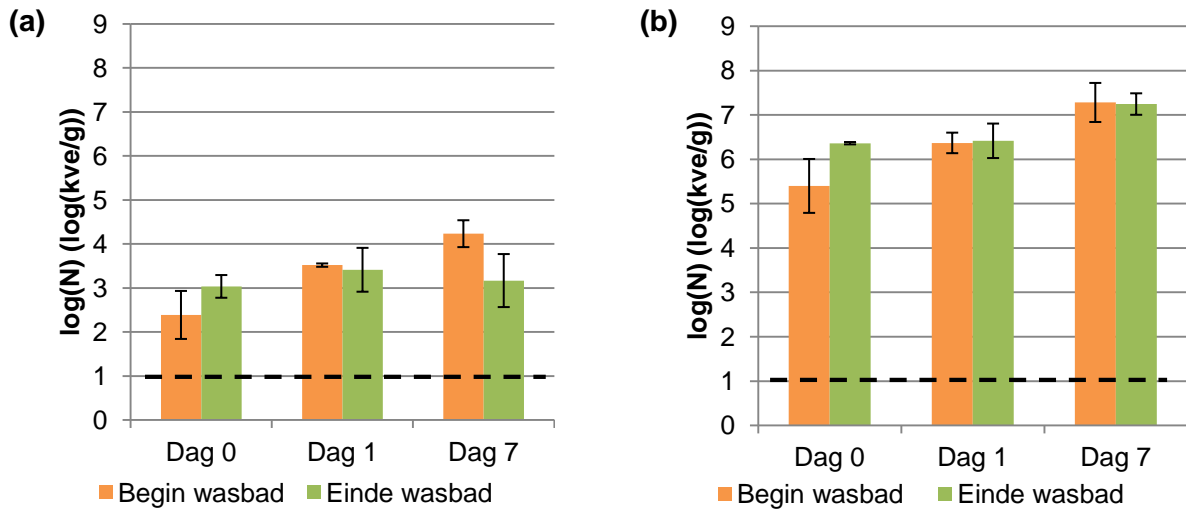
Het totale kiemgetal aanwezig op verse zalm, na onderdompeling in een wasbad (staalname aan het einde van een wasreeks), wordt weergegeven in figuur 6-13. Bij zowel 3 log inoculatie (a) als 6 log inoculatie (b) aan *L. monocytogenes*, was er geen significant verschil waar te nemen in het totale kiemgetal aanwezig op de zalmfilet, dit na onderdompeling in waswater of *O. compactum* (voor zowel (a) als (b) is $P > 0,05$). Ook op de zalmstalen die aan het begin van de wasreeks genomen werden (figuur niet weergegeven), was er geen significant verschil te vinden in het totale kiemgetal, ondergedompeld in een verschillend wasbad (voor inoculatie van zowel 3 log kve/25g als 6 log kve/25g is $P > 0,05$). Ook was er geen significant verschil waar te nemen bij zalmstalen, ondergedompeld in de verschillende wasbaden, wanneer deze per dag vergeleken werden.



Figuur 6-13 Totaal kiemgetal aanwezig op zalmfilet, staalname aan einde van wasreeks Inoculatie met (a) 3 log kve/25g en (b) 6 log kve/25g aan *L. monocytogenes*. - - -, LOD. *, Aantallen significant verschillend met dag 0 en dag 1 ($P < 0,05$ en $P < 0,05$, respectievelijk). **, Aantallen significant verschillend met dag 0 en dag 1 ($P < 0,05$ en $P < 0,05$, respectievelijk).

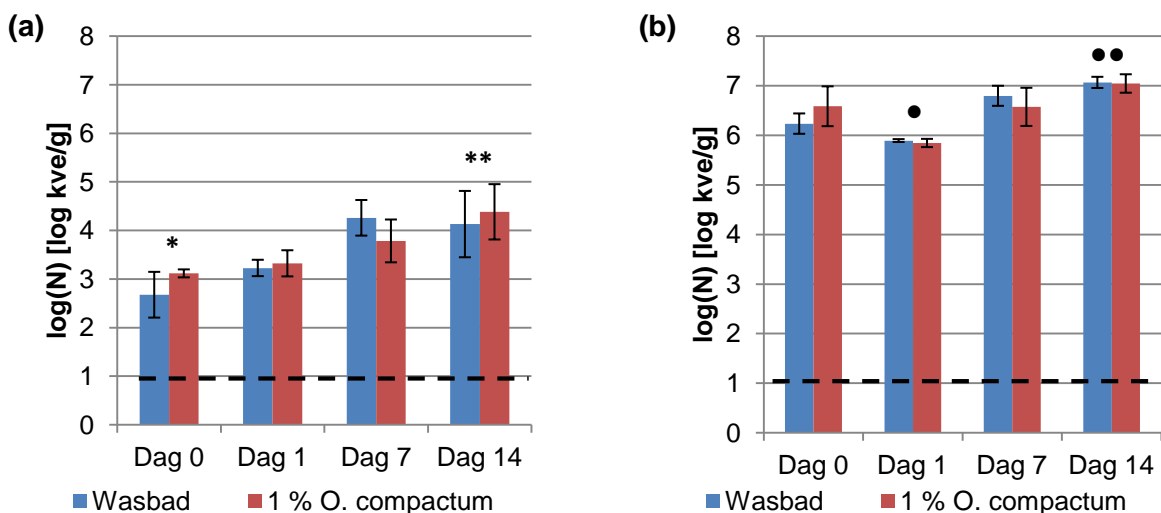
De groei van de cellen kon eveneens nagegaan worden, onafhankelijk van de samenstelling van de verschillende wasbaden. Op figuur 6-12 is te zien dat *Listeria monocytogenes* bleef doorgroeien op de zalmmatrix in functie van de bewaringstijd. Voor een inoculatie van 3 log kve/25g (a) werd er een significant verschil gevonden tussen het aantal *L. monocytogenes* aanwezig op dag 0 en dag 7 ($P < 0,05$). Ook bij een inoculatie van 6 log kve/25g (b) werd er een significant verschil gevonden tussen dag 0 en dag 7 van de bewaringstermijn ($P < 0,05$). Gelijkaardige bevindingen werden verkregen voor het totale kiemgetal, aanwezig op de zalmmatrix (figuur 6-13). Zalmstalen die geïnoculeerd werden met 3 log kve/25g (a) hadden wat betreft het aanwezige totale kiemgetal, na bewaren van 7 dagen, een significant verschil met dag 0 en dag 1 (voor beide $P < 0,05$). Bij een inoculatie aan 6 log kve/25g *L. monocytogenes* werd er na 7 dagen bewaren een significant verschil gevonden tegenover dag 0 en dag 1 (voor beide $P < 0,05$).

Figuur 6-14 vergelijkt de aanwezigheid van *L. monocytogenes* bij stalen genomen aan het begin en het einde van een wasreeks, na onderdompeling in 1% *Origanum compactum*. Voor een inoculatie met 3 log kve/25g (a) werd er geen significant verschil teruggevonden tussen stalen genomen aan het begin en het einde van een wasreeks, dit zowel na bewaren van de stalen gedurende 0, 1 en 7 dagen (Voor alle drie $P > 0,05$). Ook bij de stalen met inoculatie van 6 log kve/25g (b) werd er geen significant verschil waargenomen ($P > 0,05$ voor de drie dagen). Hetzelfde werd waargenomen bij het totale kiemgetal aanwezig op de zalmmatrix, namelijk geen verschil tussen staalname aan begin en einde van de wasreeks (figuren niet weergegeven).



Figuur 6-14 Vergelijking van het aantal *L. monocytogenes* op zalmfilet bij stalen genomen aan enerzijds het begin van de wasreeks met 1% *Origanum compactum* en anderzijds het einde van de wasreeks Inoculatie van 3 log kve/25g (a) en 6 log kve/25g (b). - - -, LOD.

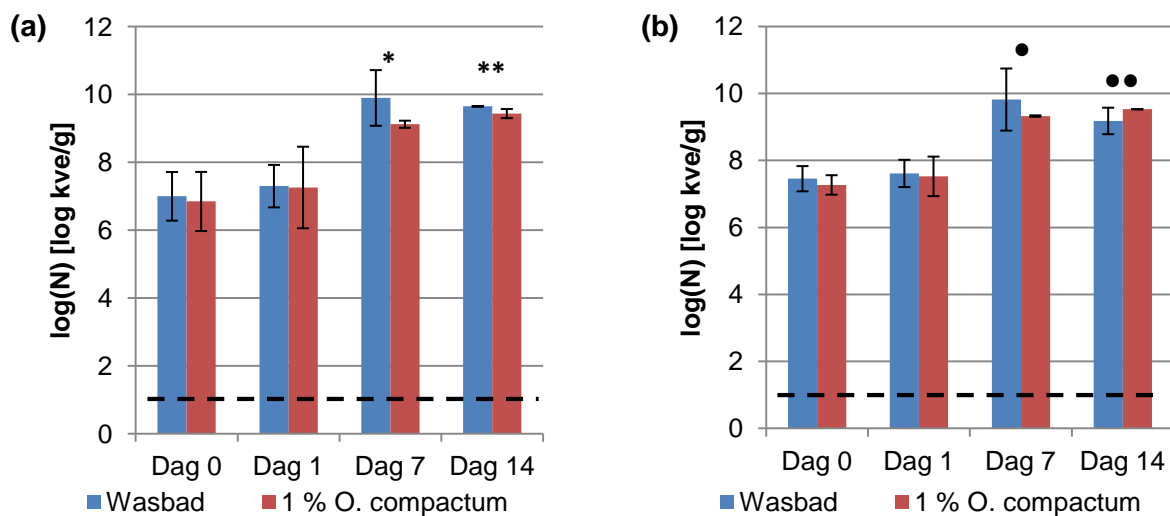
De hoeveelheid *Listeria monocytogenes* aanwezig op tongfilet, na onderdompelen in een wasbad (staalname aan einde van wasreeks) wordt weergegeven in figuur 6-15. Bij zowel 3 log inoculatie (a) als 6 log inoculatie (b), werd er geen significant verschil waargenomen tussen enerzijds wassen in waswater en anderzijds wassen in een emulsie van water met 1% *O. compactum* ($P > 0,05$ voor beide). Hetzelfde werd gedetecteerd bij de resultaten, genomen aan het begin van de wasreeks (figuur niet weergegeven, voor zowel 3 log kve/25g als 6 log kve/25g inoculatie is $P > 0,05$). Ook was er geen significant verschil waar te nemen tussen de wasbaden (waswater en EO emulsie), wanneer deze per dag



Figuur 6-15 *L. monocytogenes* aanwezig op tongfilet, staalname aan einde van de wasreeks Inoculatie met (a) 3 log kve/25g en (b) 6 log kve/25g. - - -, LOD. *, Significant verschillend met dag 7 en 14 ($P < 0,05$ voor beide). **, Significant verschillend met dag 0 en dag 1 ($P < 0,05$ voor beide). •, Significant verschillend met dag 0, 7 en 14 ($P < 0,05$ voor de drie). ••, Significant verschillend met dag 0 en 1 ($P < 0,05$ voor beide).

vergeleken werden. Het bewaren van stalen gedurende 14 dagen leverde eveneens geen significant verschil op met betrekking tot de aanwezigheid van *L. monocytogenes*. Dit werd zowel waargenomen voor een inoculatie van 3 log kve/25g (Figuur 6-15-a) als 6 log kve/25g (Figuur 6-15-b) ($P > 0,05$ voor beide gevallen).

Het totale kiemgetal aanwezig op tongfilet, na onderdompeling, is terug te vinden in figuur 6-16 (staalname aan begin van de wasreeks). Bij een inoculatie van zowel 3 log kve/25g (a) als 6 log kve/25g (b) aan *L. monocytogenes*, werd er geen significant verschil teruggevonden bij het totale kiemgetal op de tongmatrix, na onderdompeling in de verschillende wasbaden ($P > 0,05$ voor beide). Ook op stalen tongfilet, die aan het einde van de wasreeks genomen werden (figuur niet weergegeven) was er geen significant verschil waar te nemen wat betreft het totale kiemgetal (eveneens $P > 0,05$ voor beide).



Figuur 6-16 Totaal kiemgetal aanwezig op tongfilet, staalname aan begin van de wasreeks. Inoculatie met (a) 3 log kve/25g en (b) 6 log kve/25g *L. monocytogenes*. - - -, LOD. *, Significant verschillend met dag 0 en dag 1 ($P < 0,05$ voor beide). **, Significant verschillend met dag 0 en dag 1 ($P < 0,05$ voor beide). •, Significant verschillend met dag 0 en dag 1 ($P < 0,05$ voor beide). ••, Significant verschillend met dag 0 en dag 1 ($P < 0,05$ voor beide).

De groei van de cellen kon eveneens nagegaan worden, onafhankelijk van de samenstelling van de verschillende wasbaden. In figuur 6-15 is te zien dat *L. monocytogenes* zal blijven doorgroeien in functie van de bewaringstijd. Voor inoculatie met 3 log kve/25g (a) werd er een significant verschil gevonden tussen enerzijds het aantal *L. monocytogenes* aanwezig op dag 0 en het aantal aanwezig op dag 7 ($P < 0,05$) en dag 14 ($P < 0,05$), anderzijds was dag 14 ook significant verschillend met dag 0 ($P < 0,05$) en dag 1 ($P < 0,05$). Bij een inoculatie van 6 log kve/25g (b) op dag 1 was er echter een zwakke significante daling terug te vinden in het aantal *L. monocytogenes* tegenover dag 0 ($P < 0,05$), het aantal groeide echter terug aan in functie van de tijd. Nog bij 6 log kve/25g inoculatie, maar staalname aan begin van de wasreeks (figuur niet weergegeven), was er dan weer geen significant verschil waar te nemen tussen de verschillende dagen, wat betreft *L. monocytogenes* ($P > 0,05$). Bij het totale kiemgetal, afgebeeld in figuur 6-16, werd een doorgroei van de kiemen vastgesteld in functie van de tijd, dit zowel bij 3 als 6 log kve/25g inoculatie van *L. monocytogenes*. Voor een inoculatie met 3 log kve/25g (a) was dag 7 significant verschillend met dag 0 en 1 ($P < 0,05$ voor

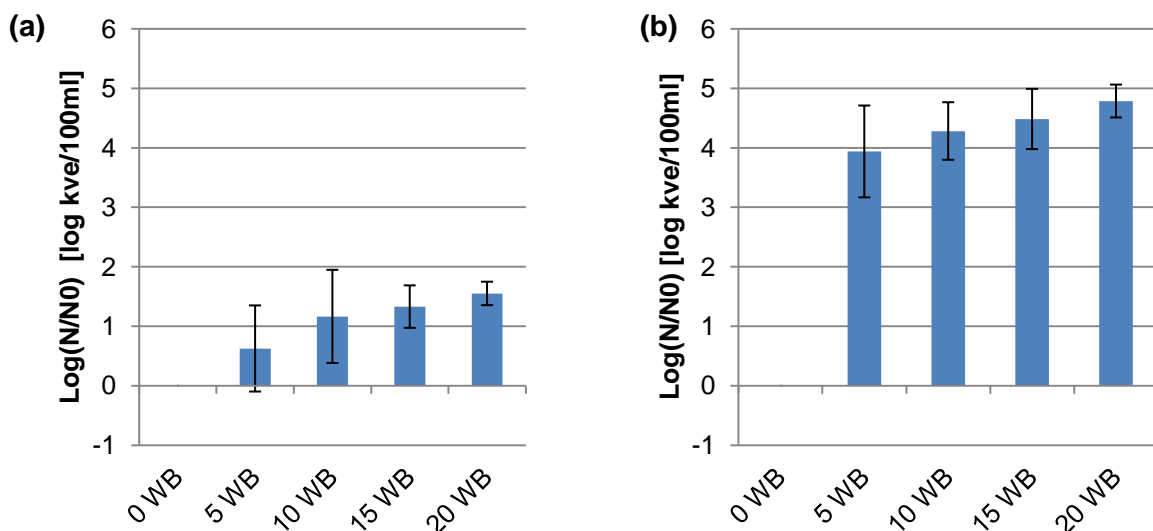
beide), en dag 14 ook significant verschillend met dag 0 en 1 (Eveneens $P < 0,05$). Gelijkaardige waarnemingen werden verkregen bij 6 log inoculatie (b). In overeenstemming met zalmfilet (Fig. 6-14), werd er op tongfilet geen verschil teruggevonden tussen stalen die aan het begin en het einde van de wasreeks van *O. compactum* genomen werden.

6.2.1.1. Conclusie

Zoals eerder aangehaald werd er geen reductie verkregen op zowel zalm- als tongfilet, door onderdompeling in 1% *O. compactum*. De aangroei van de cellen, het verschil tussen dag 7 en dag 0, was voor beide vismatrices verschillend. Op tongfilet (2 log kve/g aangroei) was er een significante kleinere aangroei waar te nemen tegenover zalmfilet (2,5 – 4 log kve/g) wat betreft het totale kiemgetal, dit zowel bij 3 als 6 log kve/25g inoculatie aan *L. monocytogenes* ($P < 0,05$ voor beide). Ook wat betreft *L. monocytogenes*, bij 6 log kve/25g inoculatie, was er een significante kleinere aangroei waar te nemen bij tongfilet (0,2 log kve/g) dan bij zalmfilet (1,4 log kve/g; $P < 0,05$). De aangroei aan *L. monocytogenes* bij 3 log kve/25g inoculatie was echter niet significant verschillend tussen tongfilet (0,7 log kve/g) en zalmfilet (1 log kve/g; $P > 0,05$).

6.2.2. *Analyse van wasbaden*

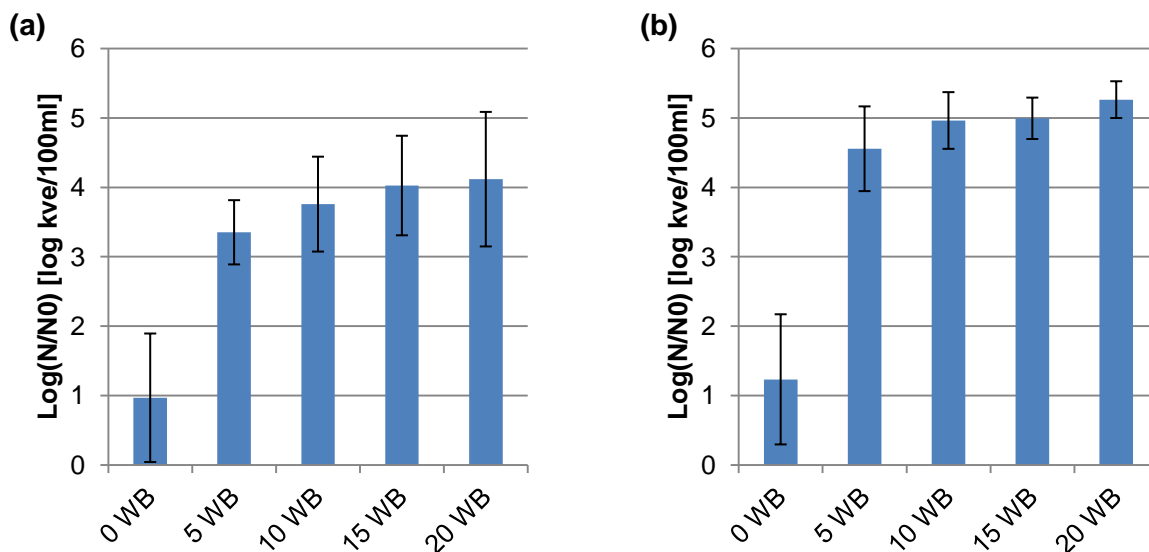
De reductie verkregen aan *L. monocytogenes* in een 1% wasbad van *O. compactum*, na onderdompeling van visstalen, wordt weergegeven in figuur 6-17. De reductie verkregen aan het totale kiemgetal wordt weergegeven in figuur 6-18. In het begin werd een snelle stijging van de reductie waargenomen in het wasbad, wanneer slechts enkele visstalen werden ondergedompeld. Deze snelle reductiestijging zwakte echter snel af, tot een meer constantere reductie, dit in functie van het aantal cellen aanwezig in het wasbad (verschil tussen 3 log kve/25g en 6 log kve/25g inoculatie). Een concentratie aan 1% *O. compactum* veroorzaakte steeds een reductie aan *L. monocytogenes* en het totale kiemgetal in het wasbad tot onder het detectielimiet van 2 log kve/100ml. Hierdoor is de reductie uitgezet in de figuren niet exact bepaald, en is deze mogelijks groter.



Figuur 6-17 Reducties van *L. monocytogenes* verkregen in het wasbad van *O. compactum*, na onderdompeling van visstalen
Inoculatie met (a) 3 log kve/25g en (b) 6 log kve/25g. WB = wasbeurten.

De reductie verkregen aan *L. monocytogenes* (Figuur 6-17) bij het onderdompelen van vis, geïnoculeerd met 3 log kve/25g (a), bedroeg na 20 wasstalen $1,5 \pm 0,2$ log kve/100ml. Bij een inoculatie van 6 log kve/25g (b), was deze reductie na 20 wasstalen een stuk hoger namelijk $4,8 \pm 0,3$ kve/100ml.

Ook bij het totale kiemgetal was er een reductie waar te nemen (Figuur 6-18). Bij een inoculatie aan 3 log kve/25g *L. monocytogenes*, bovenop het natuurlijk aantal kiemen, vond er een reductie plaats. Na 20 wasstalen te hebben ondergedompeld in het wasbad was de reductie $4,1 \pm 1$ log kve/100ml. Een inoculatie aan 6 log kve/25g aan *L. monocytogenes* bovenop het natuurlijke kiemgetal veroorzaakte een reductie van $5,3 \pm 0,3$ log kve/100ml.



Figuur 6-18 Reductie van het totale kiemgetal verkregen in het wasbad van *O. compactum* na onderdompeling van visstalen
Inoculatie met (a) 3 log kve/25g en (b) 6 log kve/25g. WB = wasbeurten.

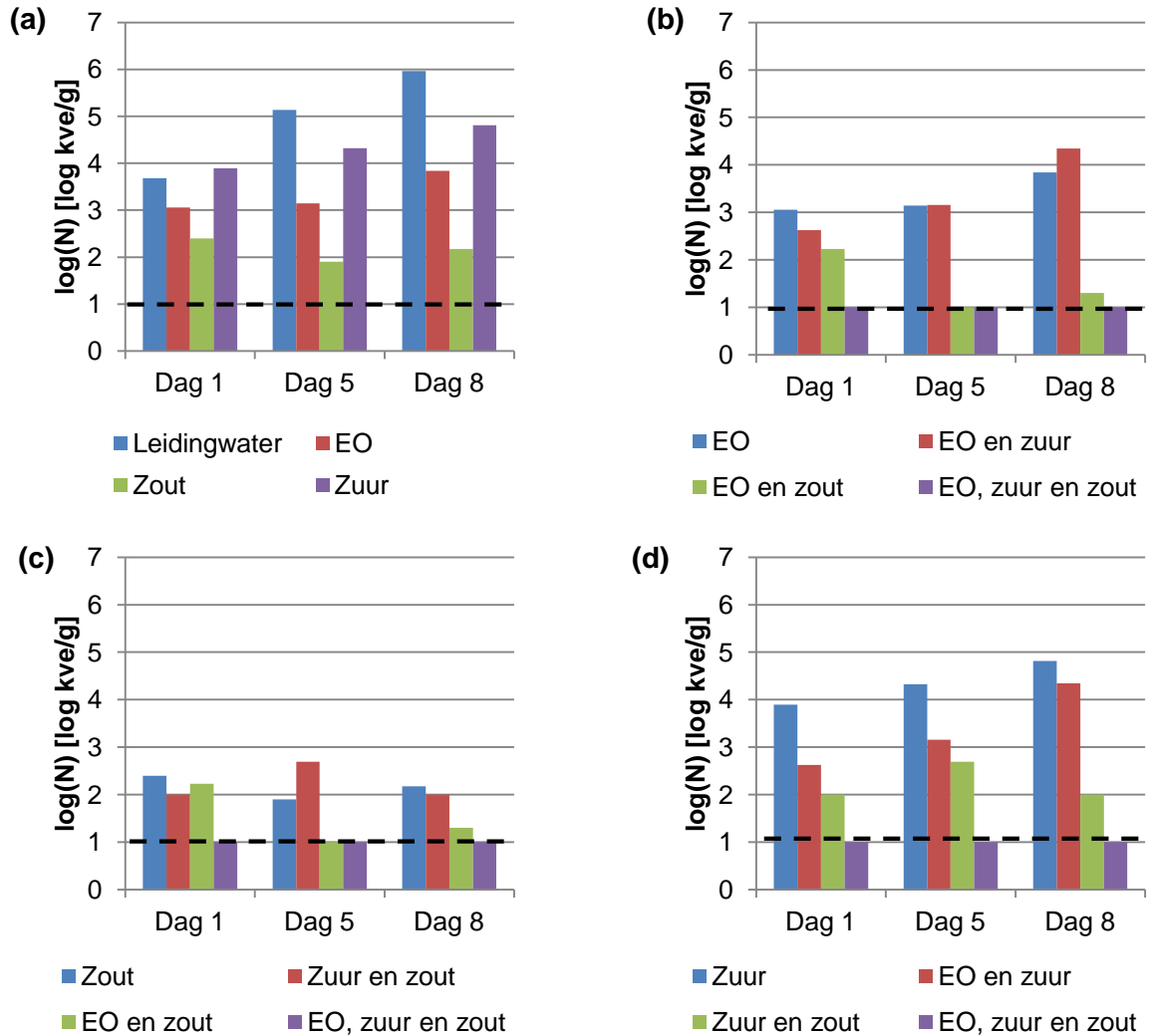
6.2.2.1. Algemeen conclusie

De microbiële opstapeling in het wasbad, na onderdompeling van visstalen, was in een emulsie van 1% *O. compactum* veel lager dan voor waswater. Dit was zowel te concluderen voor *L. monocytogenes* als het totale kiemgetal. Reducties van meer dan $4,8 \pm 0,3$ kve/100ml voor *L. monocytogenes* en $5,3 \pm 0,3$ log kve/100ml voor het totale kiemgetal werden verkregen. Een emulsie aan EO in water was zeer effectief in het wasbad zelf. Het voorkwam microbiële opstapeling en verkleint zo het risico op kruiscontaminatie. Op de vismatrix zelf is een emulsie van EO in water niet effectief in deze concentratie.

6.3. Screening van verschillende antimicrobiële middelen en hun combinaties (hurdle effect) op zalm

De totale coliformen aanwezig op zalmfilet (natuurlijke contaminatie), na onderdompeling in verschillende oplossingen is terug te vinden in figuur 6-19. Figuur 6-20 toont het verloop van de postcontaminatie van *Listeria monocytogenes* op zalmfilet. Zowel bij figuur 6-19 als 6-20 beschrijft afbeelding (a) verschillende onderdompelbaden, waarvan elk onderdompelbad opgebouwd is uit een oplossing/emulsie met slechts 1

conserveringscomponent. Afbeelding (b) geeft allerlei combinaties weer van EO (1% *O. compactum*) met de andere conserveringsproducten gebruikt in afbeelding (a). Afbeeldingen (c) en (d) beschrijven hetzelfde, maar dan voor zout (verzadigde oplossing) en zijn combinaties, en zuur (aangezuurd met citroenzuur tot pH 4) met zijn combinaties.



Figuur 6-19 Totaal coliformen aanwezig op de zalmmatrix na onderdompeling in verschillende wasbaden

In het waswater was (a) slechts 1 product toegevoegd, (b) combinatie van EO en andere producten, (c) combinatie van zout en andere producten, (d) combinatie van zuur en andere producten. - - -, LOD

Het aantal coliformen oorspronkelijk aanwezig op de zalmmatrix was 2,8 log kve/g. Na onderdompeling in leidingwater, werden er 3,7 log kve/g coliformen gedetecteerd. Alle oplossingen beschreven in (a) van figuur 6-19 vertoonden een reductie van het aantal coliformen, aanwezig op zalmfilet, tegenover leidingwater. De beste techniek hierbij was onderdompeling in een verzadigde zoutoplossing. In deze zoute oplossing werd, na 8 dagen de stalen bewaard te hebben, een reductie van 3,8 log kve/g verkregen. Ook EO (2,1 log kve/g) en zuur (1,1 log kve/g) zorgden voor een reductie na 8 dagen bewaren. Het nadeel hierbij is dat het aantal coliformen terug stijgt tijdens het bewaren van de stalen.

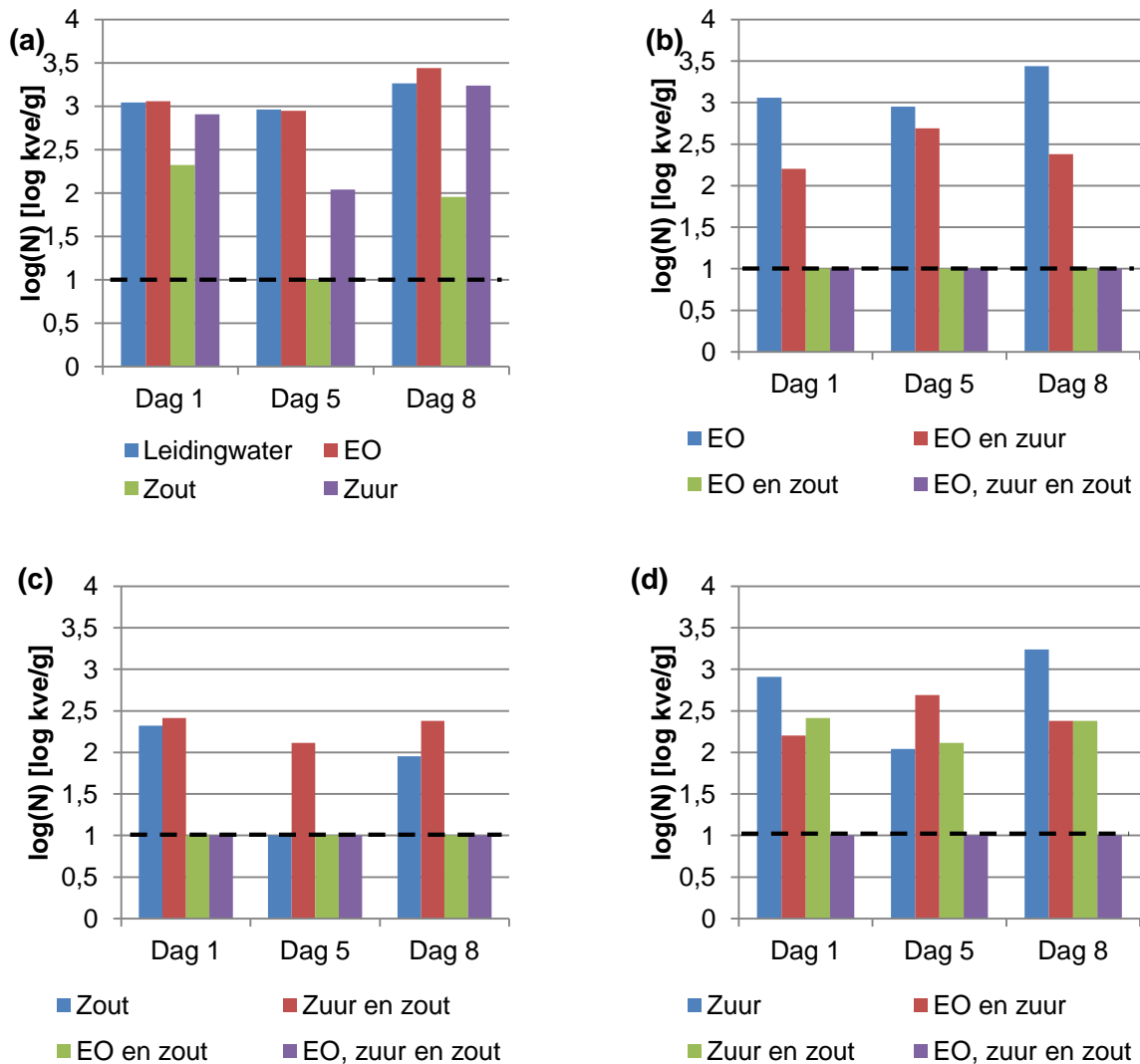
Essentiële olie (afbeelding (b), figuur 6-19) in combinatie met zout zorgde voor een synergetisch effect, tegenover de werking van EO alleen. Het aantal coliformen aanwezig na 5 dagen bewaren, na onderdompeling in een oplossing van EO en zout, zal dalen onder het detectielimiet. Echter zijn niet alle coliformen afgedood, aangezien deze terug aangroeiden na 8 dagen bewaren. Onderdompeling in een combinatie van zuur en EO zorgde dan weer voor een additief (zelfs licht antagonistisch) effect tegenover de werking van enkel EO. De beste werking werd verkregen bij onderdompeling in een oplossing met zowel EO, zuur als zout. Hierbij daalde het aantal coliformen onmiddellijk tot onder het detectielimiet, na 8 dagen bewaren was dit nog altijd zo. Verder onderzoek, waarbij het staal aangereikt wordt, zal moeten uitwijzen of alle coliformen hierbij afgedood zijn, of er nog coliformen aanwezig zijn.

Een verzadigde oplossing van zout als onderdompeloplossing gaf de beste reductie voor coliformen wanneer slechts 1 conserveringscomponent als oplossing werd gebruikt. Ook in afbeelding (c) van figuur 6-19 zal er bij een combinatie van EO en zout een synergetisch effect plaatsvinden, tegenover zout alleen. Een combinatie van zuur en zout gaf dan weer weinig of geen extra effect dan wanneer enkel een verzadigde zoutoplossing toegepast werd.

De werkzaamheid van enkel zuur als oplossing, verbeterde wel in combinatie met andere conserveringsproducten (afbeelding (d), figuur 6-19). Een combinatie van EO en zuur veroorzaakte wel een reductie, maar de coliformen groeiden onmiddellijk verder. Hiertegenover zorgde een combinatie van zuur en zout dat de coliformen veel minder snel uitgroeiden.

Ook bij de postcontaminatie aan *Listeria monocytogenes* (figuur 6-20) vond de grootste reductie plaats wanneer de zalmatrix ondergedompeld werd in een verzadigde zoutoplossing (a). Het aantal *L. monocytogenes* aanwezig op dag 5 zakte onder het detectielimiet, maar groeide vervolgens terug aan. EO had tegen *L. monocytogenes* geen werking, er viel geen reductie te merken tegenover waswater. Bij zuur werd wel een reductie veroorzaakt na 5 dagen bewaren van de stalen (0,92 log kve/g), maar dit groeide vervolgens terug aan tot hetzelfde niveau als waswater, na 8 dagen bewaren.

Enkel EO toepassen als oplossing, betekende geen reductie van *L. monocytogenes* tegenover leidingwater. Een combinatie van EO met zuur (afbeelding (b), figuur 6-20) leverde een synergetisch effect op. Een reductie van 1,1 log kve/g werd verkregen na 8 dagen bewaren van de stalen. Bij een oplossing met als combinatie EO en zout en een andere oplossing met een combinatie EO, zuur en zout, zakte het aantal *L. monocytogenes*, na 1 dag, onder het detectielimiet. Ook hier zal verder onderzoek nodig zijn, waarbij de stalen worden aangereikt om te weten of er nog levende cellen aanwezig zijn.



Figuur 6-20 *Listeria monocytogenes* aanwezig op de zalmmatrix na onderdompeling in verschillende wasbaden

In het waswater was (a) slechts 1 product toegevoegd, (b) combinatie van EO en andere producten, (c) combinatie van zout en andere producten, (d) combinatie van zuur en andere producten. - - -, LOD

Een combinatie van zuur en zout had een antagonistische werking tegenover zout alleen (c). Combinatie van EO en zout, al dan niet met zuur, hadden tegenover zout alleen een sterke reductie. De exacte reductie kon echter niet bepaald worden omdat de waarden onder het detectielimiet liggen. De werking van zuur en zout en van EO en zuur hadden een gelijkaardige werking als zuur alleen (d). Echter was er wel een verschil in de aangroei van *L. monocytogenes*. Op de zalmfilet die ondergedompeld werd in zuur alleen, zal de aangroei groter zijn.

7. Discussie

Voor de discussie wordt een onderscheid gemaakt tussen de kruidenmatrix en de vismatrix.

7.1. Kruidenmatrix

De kruidenmatrix werd ondergedompeld in een emulsie van EO in water. Er werd gebruik gemaakt van twee verschillende essentiële oliën, namelijk *O. compactum* en *C. citratus*. Bij toepassing van eenzelfde concentratie (1%), bezat *O. compactum* betere antimicrobiële eigenschappen dan *C. citratus* en dit zowel tegen de totale coliformen als het totale kiemgetal. Een reductie van de coliformen van meer dan 6 log kve/g werd verkregen voor *O. compactum* en 0,5-1,5 log kve/g voor *C. citratus*. Een reductie van meer dan 7 log kve/g en 0-1 log kve/g, respectievelijk, werd verkregen voor het totale kiemgetal. Het verschil in antimicrobiële werking tussen de EO is afhankelijk van de samenstelling, de natuurlijke componenten, de functionele groepen, een mogelijk synergetisch effect... (Azizkhani et al., 2013). Een component als carvacrol, aanwezig in *O. compactum*, wordt gerelateerd met de beste antimicrobiële eigenschappen in essentiële oliën. Ook thymol, eveneens aanwezig in *O. compactum*, beschikt over zeer goede antimicrobiële eigenschappen (de Azeredo et al., 2011, Scollard et al., 2013, Azizkhani et al., 2013). Componenten als neral, geranial en myrceen, de hoofdcomponenten van *C. citratus*, beschikken over een lagere antimicrobiële werking. Iets gelijkaardigs werd verkregen bij de Azeredo et al. (2011), hierbij werd een betere antimicrobiële werking teruggevonden bij *Origanum vulgare* dan bij *Rosmarinus officinalis*.

Verschillende concentraties aan *O. compactum* werden toegepast, namelijk 1%, 0,2% en 0,02%. Een concentratie van 0,2% betekent voor *E. coli* een 6 log reductie op voedingsbodems (resultaten uit eerder onderzoek). Toepassen van deze concentratie op een kruidenmatrix had echter geen effect, dit zowel op het totaal kiemgetal als op de totaal coliformen. Dit was eveneens de bevinding bij een lagere concentratie, namelijk 0,02%. Een concentratie aan 1% had wel een antimicrobiële werking, zowel het aantal kiemen als de coliformen konden niet gedetecteerd (detectielimiet: 1 log kve/g) worden na onderdompeling in een emulsie van *O. compactum*. Een hogere concentratie aan EO moet toegediend worden om eenzelfde werking te verkrijgen op een voedingsmatrix dan op voedingsbodems (Burt, 2004, Hyldgaard et al., 2012, de Azeredo et al., 2011). Een oorzaak hiervan is de hoge initiële microbiële lading op voedingsstalen. Contaminatie voor de oogst zal de bacteriën eveneens de tijd geven om zich aan de matrix te hechten. Ook zullen de cellen filtreren in beschadigingen van de plant waardoor het contactoppervlak van de bacterie met de EO verkleint, een hogere concentratie zal hierdoor noodzakelijk zijn. Ook daalt de efficiëntie van de EO doordat ander organisch materiaal, anders dan bacteriën bijvoorbeeld aarde, zal aanwezig zijn op de kruidenmatrix (de Azeredo et al., 2011, Gil et al., 2009).

Tabel 7-1 beschrijft een overzicht van de reeds gepubliceerde studies naar de werking van EO op kruiden en bladgroenten. Deze gepubliceerde resultaten zijn echter moeilijk te vergelijken aangezien er vaak in andere studies gebruik gemaakt werd van andere kruiden/bladgroente, EO, methode tot aanbrengen van EO... (Azizkhani et al., 2013).

Tabel 7-1 Overzicht onderzoek naar de werking van EO op kruiden en bladgroenten

Voedingsmatrix	EO	Organisme	Concentratie EO	Inhibitie*	Conditie bewaring	Stap productieproces	Ref.
Ijsbergsla	Tijm	<i>Listeria innocua</i>	0,5 g EO per 25 g staal (= 20 m%)	+++	Vers gesneden sla, bewaard gedurende 9 d bij 8 °C	Na inoculeren EO sprayen over staal door vernevelen van EO	(Scollard et al., 2013)
	Rosemarijn	<i>Listeria innocua</i>		+			
	Oregano	<i>Listeria innocua</i>		++ (na 2d.), +			
Gesneden ijsbergsla	<i>Myrtus communis</i> L. (Mirte)	<i>Salmonella enteric</i> subsp. <i>enteric</i> serovar Typhimurium	0,05 %	+ (5'), + (10'), + (15'), + (20')	Onmiddellijk analyse na wassing	Wassen onder stromend leidingwater, versnijden, inoculeren en behandelen door wassing voor 5, 10, 15 en 20 minuten	(Gündüz et al., 2009)
			0,075 %	+ (5'), + (10'), + (15'), + (20')			
			0,1 %	+ (5'), + (10'), + (15'), + (20')			
			0,05 %	+ (5'), + (10'), + (15'), + (20')			
			0,075 %	+ (5'), + (10'), + (15'), + (20')			
			0,1 %	+ (5'), + (10'), + (15'), + (20')			

Vervolg tabel 7-1 Overzicht onderzoek naar de werking van EO op kruiden en bladgroenten

Voedingsmatrix	EO	Organisme	Concentratie EO	Inhibitie*	Conditie bewaring	Stap productieproces	Ref.
<i>Lactuca sativa</i> spp. (IJsbergsla)	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Totaal kiemgetal</i>	0,025 %	-	Bewaren gedurende 7 dagen bij 4°C	Wassen onder stromend water gedurende 1 minuut, vervolgens in EO ondergedompeld gedurende 2 minuten, onder continu schudden	(Gutierrez et al., 2009)
		<i>Enterobacteria</i>	0,025 %	-			
		<i>Pseudomonas</i>	0,025 %	-			
<i>Lactuca sativa</i> var. <i>Capitata</i> (IJsbergsla)	<i>Origanum onites</i>	<i>Salmonella enteric</i> subsp. <i>enteric</i> serovar Typhimurium	0,0025 %	+ (5'), + (10'), + (15'), + (20')	Onmiddellijke analyse na wassen	Gewassen onder stromend water, versneden inoculatie en behandelen door wassing voor 5, 10, 15 en 20 minuten	(Gündüz et al., 2010)
			0,004 %	+ (5'), + (10'), + (15'), + (20')			
			0,0075 %	+ (5'), + (10'), + (15'), ++ (20')			
			0,0025 %	+ (5'), + (10'), + (15'), + (20')			
			0,004 %	+ (5'), + (10'), + (15'), + (20')			
			0,0075 %	+ (5'), + (10'), + (15'), + (20')			

Vervolg tabel 7-1 Overzicht onderzoek naar de werking van EO op kruiden en bladgroenten

Voedingsmatrix	EO	Organisme	Concentratie EO	Inhibitie*	Conditie bewaring	Stap productieproces	Ref.
Salade (gesneden)	Basilicum	<i>E. coli</i> O157:H7	0,001 % 0,0032 % 0,008 %	- (K), - (L) - (K), - (L) + (K, 5 d), + (L)	In PE verpakking onder atmosferische condities gedurende 7 dagen bij 4°C	Gewassen onder stromend water, versneden en na inoculatie onderdempeling in een EO-oplossing gedurende 10' (kort (K)) of 15' (lang (L))	(Karagözü et al., 2011)
		<i>S. typhimurium</i>	0,001 % 0,0032 % 0,008 %	- (K), - (L) + (K), + (L) + (K), + (L)			
	Munt	<i>E. coli</i> O157:H7	0,001 % 0,0032 % 0,008 %	- (K), + (L) ++ (K, 5d.), ++ (L, na 0d.) ++ (K en L, 0d.)			
		<i>S. typhimurium</i>	0,001 % 0,0032 % 0,008 %	- (K), - (L) ++ (K en L, 5d.) ++ (K en L, 0d.)			
<i>Letuca sativa</i> L. (IJsberg sla), <i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>cicla</i> L. (biet), <i>Eruca sativa</i> L. (Rucola)	<i>Origanum vulgare</i> L.	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,125 %	+++		Na inoculatie, onderdempelen in EO (MIC waarde als concentratie) gedurende 5' bij 28 °C	(de Azeredo et al., 2011)
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,25 %	+++			
Mix verhouding 1:1:1	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,5 %	+++	Onmiddellijke analyse na wassen		
		<i>Listeria monocytogenes</i>	2 %	++			
		<i>Yersinia enterocolitica</i>	2 %	+			
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2 %	+			

Vervolg tabel 7-1 Overzicht onderzoek naar de werking van EO op kruiden en bladgroenten

Voedingsmatrix	EO	Organisme	Concentratie EO	Inhibitie*	Conditie bewaring	Stap productieproces	Ref.
Groene en rode batavia, Lollo Rosso sla, Spinazie, Rucola	<i>Origanum compactum</i>	<i>E. coli</i> O157:H7	5 %	- (15'); + (5d.)	Bewaren in polypropyleen zak, gedurende 5 dagen bij 7 °C	Stalen reeds ondergedompeld in NaOCl (100 mg/ml), vervolgens gereinigd onder stromend leidingwater, gedroogd Na 15' bij koelkasttemp. inoculeren en sprayen van EO (dosis van 0,8 ml emulsie/ 25 gram staal)	(Azizkhani et al., 2013)
			10 %	+ (15'); ++ (5d.) + (15'); ++ (5d.)			
	<i>Eugenia caryophyllus</i>	5 % 10 %	- (15'); + (5d.) - (15'); ++ (5d.) - (15') ++ (5d.)				
Mix in verhouding: 1:1:1:0,3	<i>Zataria multiflora</i> boiss	<i>E. coli</i> O157:H7	3 %	+ (K), + (L)	In PE verpakking onder atmosferische condities voor 7 dagen bij 4°C	Gewassen onder stromend water, versneden en na inoculatie onderdompeling in een EO-oplossing gedurende 10' (kort (K)) of 15' (lang (L))	(Karagözü et al., 2011)
			5 % 10 %	+ (K), + (L) ++ (K en L, 5d.)			
Postelein (gesneden)	Basilicum	<i>S. typhimurium</i>	0,001 %	+ (K), + (L)			
			0,0032 %	+ (K), + (L)			
	0,008 %	++ (K en L, 5d.)					
	0,001 %	+ (K), + (L)					
	0,0032 %	+ (K), + (L)					
Munt	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. typhimurium</i>	0,008 %	++ (K en L, 3d.)			
			0,001 %	+ (K), + (L)			
			0,0032 %	++ (K), ++ (L)			
	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhimurium</i>	0,008 %	++ (K en L, 0d.)			
			0,001 %	+ (K), + (L)			
			0,0032 %	+ (K), ++ (L)			
			0,008 %	++ (K en L, 0d.)			

* De inhibitie is genoteerd in log kve/ml bij een vloeibare voedingsmatrix. De onderverdeling -, +, ++ en +++ staan respectievelijk voor geen inhibitie, > 0-2 log inhibitie, > 2-4 log inhibitie en > 4 log inhibitie.

Gebruikte afkortingen:
Minuten
d. dagen

Gutierrez et al. (2009) bekwam geen reductie van het totale kiemgetal bij onderdompeling van ijsbergsla in 250 ppm (0,025%) *Origanum vulgare*. Dit is in overeenstemming met deze thesis, waarbij er ook geen reductie verkregen werd bij de lage concentraties. In tegenstelling van Gutierrez et al. (2009) beschrijven Karagözlü et al. (2011) en de Azeredo et al (2011) wel een goede werking van onderdompeling in een emulsie van EO. Een andere concentratie aan EO, een andere EO en een langere contacttijd van de EO met de bacteriën zijn mogelijk de oorzaak voor de verkregen grotere reductie. Ook zal de efficiëntie van de essentiële olie afhankelijk zijn van de gebruikte bacteriële stammen en de toestand van de cellen (Gil et al., 2009). Al deze zaken zorgen voor een andere efficiëntie van essentiële oliën.

Er kon in deze thesis niet afgeleid worden of de verkregen reducties op de kruidenmatrix voor *E. coli*, het gevolg waren van de essentiële olie of dit de oorzaak was van een niet homogene staalname. Wel werd een reductie verkregen, wanneer *E. coli* behandeld werd met essentiële olie, op voedingsbodems. De MIC-waarde voor *E. coli* na behandeling met *O. compactum* lag tussen 0,060 en 0,080% (v/v), dit afhankelijk van de gebruikte stammen (resultaten verkregen uit eerder onderzoek). Azizkhani et al. (2013) beschrijft een reductie aan *E. coli* O157:H7 van 0,5 log kve/g, na sprayen van een emulsie van *O. compactum*. Ook Karagözlü et al. (2011) beschrijft een reductie aan *E. coli* O157:H7, dit zowel na onderdompeling van een EO-oplossing van munt en basilicum (tabel 7-1).

In deze thesis werden kruidenstalen ondergedompeld in een emulsie van EO. Een andere methode tot aanbrengen van de EO is sprayen. Sprayen is volgens Scollard et al. (2013) het vernevelen van een bepaald volume aan EO op de bladmatrix, Azizkhani et al. (2013) vernevelt een emulsie van EO in water. De sensorische houdbaarheid van de kruidenstalen worden verschillend beïnvloed bij de verschillende technieken (Ponce et al., 2011). Volgens Ponce et al. (2011) zal de sensorische houdbaarheid bij onderdompeling kleiner zijn dan deze bij sprayen. De sensorische houdbaarheid werd bepaald door rekening te houden met de kleur (fris groen, weinig bruin), smaak, textuur.... Achteruitgang van de sensorische houdbaarheid is de oorzaak van het EO. Deze zorgt voor vochtverlies en het aantasten van de weefsels. Ook zal de bladstructuur vaak een onaantrekkelijke geur hebben, afkomstig van de olie (Scollard et al., 2013). Op microbiologisch vlak is er volgens Ponce et al. (2011) geen verschil te merken tussen beide technieken, zowel sprayen als onderdompelen vertonen geen reductie. Een andere conclusie werd beschreven door Gil et al. (2009), zij melden dat onderdompeling de grootste reductie van micro-organismen veroorzaakt. Beide technieken veroorzaken een reductie aan micro-organismen. Scollard et al. (2013) en Azizkhani et al. (2013), voor sprayen, en Karagözlü (2011) en de Azeredo et al. (2011), voor onderdompelen, beschrijven reducties op microbiologisch vlak (tabel 7-1).

Het wassen van producten is noodzakelijk om vuil, weefselvloeistoffen van snijvlakken en micro-organismen te verwijderen. Het onderdompelen van de kruidenmatrices in een wasbad heeft echter kruiscontaminatie als risico. In de klassieke industrie wordt chloor gebruikt als desinfectiemiddel van pathogenen, zowel op de kruidenmatrix, maar voornamelijk in het wasbad (Van Haute et al., 2013, Gil et al., 2009). In deze thesis werd

hier een alternatief voor getest, namelijk EO. De werkzaamheid van chloor op ijsbergsla, eveneens een bladstructuur zoals kruiden, is beperkt tot een reductie van 1- tot 2-log (Van Haute et al., 2013, Goodburn and Wallace, 2013). De werkzaamheid van 1% *O. compactum* op een kruidenmatrix is hierbij beter, concentraties van 0,2 en 0,02% niet.

Chloor is meer effectief voor het inactiveren van pathogene bacteriën in het waswater, dan voor het verwijderen van pathogenen op de kruidenmatrix zelf (Van Haute et al., 2013). Van Haute et al. (2013) nam bij ijsbergsla, die gewassen wordt in een wasbad zonder enige toevoeging, waar na 1 uur er een microbiële opbouw van $5,4 \pm 0,4$ log kve/100ml plaatsvond in het wasbad. Bij een wasbad, met toevoeging van 1 mg/l vrij chloor, is deze microbiële opbouw beperkt tot 2,7 log kve/100ml. De microbiële opbouw, in een emulsie van 1% *O. compactum*, is in deze thesis zowel voor het totale kiemgetal als de totaal coliformen kleiner dan 2 log kve/100ml, dit betekent een reductie tegenover waswater van $6,0 \pm 0,4$ log kve/100ml en $5,6 \pm 0,2$ log kve/100ml, respectievelijk. De reductie vermindert bij lagere concentraties aan EO, waardoor de microbiële opstapeling groter wordt.

Enkele belangrijke zaken dienen verder onderzocht te worden voor de wasbaden. Een verfijning van de concentratie aan EO in de emulsie, dit tussen een concentratie van 0,2 en 1%, is nodig om toch ervoor te zorgen dat kruiscontaminatie uitgesloten wordt maar eveneens de sensorische eigenschappen van de kruiden niet (in grote mate) worden veranderd. Verder dient er ook nog aandacht geschonken te worden aan de evolutie en concentratie aan EO in het wasbad in functie van de tijd. Hierbij is eveneens een techniek noodzakelijk tot online opvolging van de concentratie. Voor de kruidenmatrix zelf dient er nog onderzoek gedaan te worden naar de evolutie van de sensorische eigenschappen van de kruiden. Eveneens dient de groei van de organismen en de kwaliteit van de kruiden bekeken te worden, bij toepassen van een combinatie van EO en moderne verpakkingstechnieken.

7.2. Vismatrix

De vismatrix, meerbepaald zalm- en tongfilet, werden ondergedompeld in een emulsie van essentiële olie in water. De MIC-waarde van *O. compactum* tegen *Listeria monocytogenes*, verkregen op voedingsbodems, bedraagt 0,028% (verkregen uit voorgaande proeven). De visstalen, geïnoculeerd met *L. monocytogenes*, werden ondergedompeld in een hogere concentratie aan *O. compactum*, namelijk 1%. Desondanks de concentratie van het wasbad aan EO, toegepast op de voedingsmatrix, 35x hoger is dan op een voedingsbodem, is er geen significante reductie te merken van *L. monocytogenes* tegenover waswater. Ook is er geen verschil te merken in het totale kiemgetal. Een mogelijke oorzaak waarom een concentratie van 1% onvoldoende is voor een reductie te verkrijgen van *L. monocytogenes* en het totale kiemgetal, is de samenstelling van de vismatrix (Hyldgaard et al., 2012, Burt, 2004). Hoge gehalten aan lipiden en proteïnen beschermen namelijk de bacterie tegen de inwerking van de EO (Bagamboula et al., 2004, de Oliveira et al., 2013, Miladi et al., 2010). Zalm is namelijk een vette vis, die over een vetpercentage van 6,34% beschikt. Ook beschikt deze Atlantische zalm over een hoog proteïnegehalte, namelijk 19,84% (USDA, 2013d). Tongfilet is een magere vis wat betreft vetgehalte, namelijk 1,93%, en het bezit een lager

proteïnegehalte, namelijk 12,41% (USDA, 2013c). Deze componenten vormen een beschermende structuur voor de bacterie. Veel hogere concentraties aan *O. compactum* zullen moeten gebruikt worden op voedingsmatrices (> 1%), dan op voedingsbodems (0,028%) (Bagamboula et al., 2004, Burt, 2004, Hyldgaard et al., 2012, Miladi et al., 2010).

Zowel op tongfilet als zalmfilet is er geen reductie te merken van de microbiële lading, na onderdompeling in een emulsie van 1% *O. compactum*. De aangroei van de bacteriën, na het onderdompelen, is echter voor tongfilet kleiner dan voor zalmfilet. De verklaring hiervan is ook te vinden bij de samenstelling van de vismatrices. De EO zal minder gestoord worden op tongfilet dan op zalmfilet, waardoor de aangroei aan *L. monocytogenes* en het totale kiemgetal meer geremd zal worden bij tongfilet, dit omdat het een magere vis is (Burt, 2004).

Tabel 7-2 geeft een overzicht van onderzoek verricht naar de behandeling van vis met EO om zo een antimicrobiële werking te verkrijgen. Door het onderzoek van Miladi et al. (2010) werd in deze thesis de methode aangepast, waarbij de stalen tot 14 dagen na onderdompeling bewaard werden. Als EO maakte Miladi et al. (2010) gebruik van *Eugenia caryophyllata*, welke als antimicrobieel component eugenol bezit. Het onderzoek van Miladi et al. (2010) leidde wel tot een positieve werking van EO op een vismatrix tegen *L. monocytogenes*. Na 7 tot 15 dagen bewaren, werd een reductie van 1 – 2 log kve/g verkregen bij een concentratie van 1% v/w *Eugenia caryophyllata* bij 4 °C. Voor een concentratie van 2% v/w werd een reductie van 1,76-2,4 log kve/g beschreven na 15 dagen. Een bijkomstige vergelijking met deze thesis is dat er bijna geen reductie verkregen werd bij stalen na 0 en 3 dagen bewaren (Miladi et al., 2010). Door deze reden werd een extra staal genomen van tongfilet, na onderdompeling in een wasbad. Echter werd er in deze thesis geen reductie waargenomen bij deze extra staalname.

Mexis et al. (2009) onderzocht het effect van *Origanum vulgare* (0,4 % v/w) op het totale kiemgetal bij regenboogforel. Hierbij werd een reductie van 0,8 – 1 log kve/g verkregen. Ook Kostaki et al. (2009) en Kykkidou et al. (2009) onderzochten de werking van EO (tijd) op het totale kiemgetal. Dit werd getest op Europese zeebaars (0,2% v/w) en zwaardvis (0,1% v/w). Hierbij werd een reductie bekomen van 1 log kve/g na 10 dagen en 18 dagen, respectievelijk. Deze resultaten zijn in tegenstelling met de verkregen resultaten in deze thesis. In deze thesis werd er gebruik gemaakt van een andere EO, namelijk *O. compactum*. Een andere essentiële olie kan inwerken op andere plaatsen bij een micro-organisme, waardoor het een betere, gelijke of mindere werking zal hebben tegen een bepaald micro-organisme (Hyldgaard et al., 2012). Een ander verschil met deze thesis is dat er steeds als wasbad een emulsie van essentiële olie in water aangemaakt werd, waarin de vis werd ondergedompeld. Dit in tegenstelling tot de gepubliceerde studies, waarbij telkens (onverdunde) EO over het oppervlakte werd verspreid. Een andere methode tot aanbrengen van de EO en eveneens de concentratie van de EO hebben een invloed op de werking van de EO (Gil et al., 2009). Dit verklaart mogelijk de betere werking van EO in de literatuur dan in deze thesis. Ook werd meestal gebruik gemaakt van andere vismatrices, wat ook een verschil in werkzaamheid kan opleveren.

Tabel 7-2 Overzicht van onderzoek verricht naar de werking van EO op vis

Voedingsmatrix	EO	Organisme	Concentratie EO	Inhibitie	Conditie bewaring	Stap productieproces	Ref.
<i>H. molitrix</i> (Zilveren karper)	<i>Zataria multiflora</i> <i>boiss.</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<u>Bij 4°C</u> 0,045 % 0,135 % 0,405 % 0,81 % <u>Bij 8°C</u> 0,045 % 0,135 % 0,405 % 0,81 %	+ (0d.); + (15d.) + (0d.); + (15d.) + (0d.); + (15d.) + (0d.); ++ (1d.)	Bewaard in stomacherzakken bij 4 of 8°C voor 21 dagen	Dippen in pekelwater (4 % NaCl) met toegevoegde EO, dit na inoculatie	(Ekhtiarzadeh et al., 2012)
				- (0d.); + (6d.) - (0d.); + (6d.) - (0d.); ++ (6d.) + (0d.); ++ (6d.)			
Atlantische zalm (vers gesneden)	<i>Eugenia caryophyllata</i>	<i>Vibro paraahaemolyticus</i>	0,045 % 0,135 % 0,405 % 0,81 %	+ (0d.); ++ (9d.) + (0d.); ++ (6d.) + (0d.); ++ (3d.) + (0d.); ++ (1d.)	Bewaard in stomacherzakken bij 8°C voor 21 dagen	Behandeld met EO na inoculatie	(Miladi et al., 2010)
				+ (3d.) + (15d.) + (3d.) ++ (15d.)			
<i>Onchorynchus mykiss</i> (regenboogforel filet)	<i>Origanum vulgare</i>	Totaal kiemgetal	0,4 % v/w	+ (na 3d.)	Aerobe verpakking, bewaard bij 4 °C gedurende 21 dagen	EO gepipetteerd op oppervlak en homogeen verdeeld.	(Mexis et al., 2009)
		<i>Pseudomonas</i> spp.		+ (na 3d.)			
		H ₂ S prod. bact.**		+ (na 3d.)			
		Enterobacteriaceae		+ (na 3d.)			
		Melkzuurbacteriën		+ (na 3d.)			

Vervolg tabel 7-2 Overzicht van onderzoek verricht naar de werking van EO op vis

Voedingsmatrix	EO	Organisme	Concentratie EO	Inhibitie	Conditie bewaring	Stap productieproces	Ref.
<i>Dicentrarchus labrax</i> (Europese zeebaars)	Tijm	Totaal kiemgetal	0,2 % v/w	+	Gedurende 20 dagen bewaren bij temperatuur van 4 ± 0,5 °C	EO pipetteren op oppervlakte, homogeen verdelen over 2 zijden en vervolgens aeroob verpakken	(Kostaki et al., 2009)
		<i>Pseudomonas</i>		+			
		H ₂ S prod. bact.**		++			
		Melkzuurbacteriën		+			
		Enterobacteriaceae		-			
<i>Xiphias gladius</i> (Zwaardvis)	Tijm	Totaal kiemgetal	0,1 % v/w	+	Bewaren gedurende 18 dagen, bij een temperatuur van 4 ± 0,5 °C	EO pipetteren op oppervlakte, en homogeen verdelen over 2 zijden en aeroob verpakken	(Kykkidou et al., 2009)
		<i>Pseudomonas</i> spp.		+			
		H ₂ S prod. bact.**		+			

* De inhibitie is genoteerd in log kve/g bij een vaste voedingsmatrix of in log kve/ml bij een vloeibare voedingsmatrix. De onderverdeling -, +, ++ en +++ staan respectievelijk voor geen inhibitie, > 0-2 log inhibitie, > 2-4 log inhibitie en > 4 log inhibitie.

** Inclusief *Shewanella putrefaciens*

Gebruikte afkortingen: d. dagen
H₂S prod. bact. H₂S producerende bacteriën

Een emulsie van EO in water is meer werkzaam in het wasbad, om kruiscontaminatie te voorkomen, dan op de vismatrix zelf (analoog met bevindingen van Van Haute et al. (2013) voor chloor op ijsbergsla). In deze thesis is geen reductie terug te vinden op de vismatrix, dit zowel wat betreft het totale kiemgetal als het aantal *L. monocytogenes*. In het wasbad met de EO in water emulsie is geen microbiële opstapeling terug te vinden, dit zowel voor het totale kiemgetal als het aantal *L. monocytogenes* (de aantallen lagen onder de detectiegrens van 2 log kve/100 ml). Hiertegenover is er wel een microbiële opstapeling in het wasbad na onderdompeling in waswater. De betere werking in het wasbad komt er doordat er geen/minder EO remmende componenten aanwezig zijn zoals proteïnen, vet... Deze componenten komen enkel via de vismatrix in het wasbad terecht (Burt, 2004, Hyldgaard et al., 2012). Op deze wijze komt de antimicrobiële eigenschap van de EO het best tot zijn recht. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of de opstapeling van deze componenten geen invloed heeft op de werkzaamheid van de EO.

7.3. Hurdle effect

Het onderdompelen van zalmfilet in EO via een wasbad (korte contacttijd) had in deze thesis geen effect. Ook is er in de gepubliceerde literatuur slechts wisselend succes waar te nemen (Miladi et al., 2010, Mexis et al., 2009, Kostaki et al., 2009, Kykkidou et al., 2009). Om toch een antimicrobiële stof of combinatie ervan te vinden die werkzaam is op de zalmmatrix, werd er voor langere tijd ondergedompeld in verschillende oplossingen met antimicrobiële middelen.

De antimicrobiële werking van zowel EO (1% *Origanum compactum*), zout (verzadigde oplossing) als citroenzuur (verlagen waswater tot pH 4) werden op verse zalmfilet getest. In tegenstelling tot het wassen in EO, is hier wel een reductie terug te vinden bij onderdompeling van zalmfilet in een emulsie van EO. De betere werking van de emulsie is de oorzaak van een langere onderdompeltijd (Gil et al., 2009). Onderdompeling van de zalmmatrix in een verzadigde oplossing van zout betekent in de eerste plaats een verlaging van de wateractiviteit. Dit is echter niet het enige effect van zout, het zorgt eveneens voor een toxisch effect tegen micro-organismen (Berk, 2013). Toevoegen van zuur aan het waswater tot pH 4 zorgt voor het verlagen van de pH van de voedingsmatrix. Het zwakke zuur zal slechts gedeeltelijk dissociëren waardoor er een opstapeling is van geprotoneerde zuren. Diffusie zal hierdoor plaatsvinden door het membraan, waardoor de zuurtegraad van het cytoplasma daalt. Dit zorgt later voor een verstoring van de productie en regeling van de energie (Mani-López et al., 2012).

De werkzaamheid van de verschillende oplossingen is anders voor de natuurlijk aanwezige coliformen (aanwezig voor behandeling) als voor geïnoculeerde *L. monocytogenes* (geïnoculeerd na behandeling). Tegen coliformen wordt de beste werkzaamheid verkregen bij een combinatie van EO, zuur en zout > EO en zout > zout > zuur en zout > EO > EO en zuur > zuur > leidingwater. Voor *L. monocytogenes* wordt eveneens de beste werking verkregen bij een combinatie van EO, zuur en zout. Echter wordt een zelfde reductie verkregen bij een combinatie van EO en zout. Deze worden gevolgd door zout > zuur en zout > EO en zuur > zuur > EO = leidingwater.

Zuur, zout en EO is de best geteste combinatie tegen micro-organismen. Toch is het toevoegen van zuur niet essentieel, daar de combinatie zout en EO een gelijkaardige werking heeft voor *L. monocytogenes*. Ekhtiarzadeh et al. (2012) bewaam eveneens een reductie bij toepassen van EO (0,81%) en zout (4%). De toegepaste concentraties zijn zelfs lager dan toegepast in deze thesis. Verder onderzoek zal nodig zijn om deze proef te herhalen en vervolgens te kijken of lagere concentraties aan producten kunnen toegepast worden, om eenzelfde werking te verkrijgen.

8. Referenties

- A. HASSAN, A., A. HASSAN, M., M. EL SHAFEI, H., S. EL AHL, R. & ABDEL-DAYEM, R. H. (2011). Detection of Aflatoxigenic Moulds Isolated From Fish and their Products and its Public Health Significance. *Nature and Science*, 9, 106-114.
- ALFARO, B., HERNÁNDEZ, I., LE MARC, Y. & PIN, C. (2013). Modelling the effect of the temperature and carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria in packed fish products. *Food Control*, 29, 429-437.
- ALLÉGROW. (2013). *Platte peterselie of bladpeterselie*. Allégrow. [Online] <http://www.allegrow.be/nl/platte-peterselie-of-bladpeterselie-376.htm> (datum van opzoeken 15/04/2014).
- AZIZKHANI, M., ELIZAKUÍVEL, P., SÁNCHEZ, G., SELMA, M. V. & AZNAR, R. (2013). Comparative efficacy of Zataria multiflora Boiss., Origanum compactum and Eugenia caryophyllus essential oils against E. coli O157:H7, feline calicivirus and endogenous microbiota in commercial baby-leaf salads. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 249-255.
- BAGAMBOULA, C. F., UYTENDAELE, M. & DEBEVERE, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards Shigella sonnei and S. flexneri. *Food Microbiology*, 21, 33-42.
- BARTH, M., HANKINSON, T., ZHUANG, H. & BREIDT, F. (2010). Microbiological Spoilage of Fruits and Vegetables. In: SPERBER, W. H. & DOYLE, M. P. (eds.) *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*. Springer New York.
- BASSOLÉ, I. H. N., LAMIEN-MEDA, A., BAYALA, B., OBAME, L. C., ILBOUDO, A. J., FRANZ, C., NOVAK, J., NEBIÉ, R. C. & DICKO, M. H. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of Cymbopogon citratus and Cymbopogon giganteus essential oils alone and in combination. *Phytomedicine*, 18, 1070-1074.
- BIOPIX 2013. Atlantische zalm (Salmo salar) Biopix foto 41985. Biopix.
- BOER, E., SPIEGELENBERG, W. M. & JANSSEN, F. W. (1985). Microbiology of spices and herbs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 51, 435-438.
- BOUHDID, S., ABRINI, J., ZHIRI, A., ESPUNY, M. J. & MANRESA, A. (2009). Investigation of functional and morphological changes in Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus cells induced by Origanum compactum essential oil. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1558-1568.
- BOUHDID, S., SKALI, S. N., IDAOMAR, M., ZHIRI, A., BAUDOUX, D., AMENSOUR, M. & ABRINI, J. (2008). Antibacterial and antioxidant activities of Origanum compactum essential oil. *African Journal of Biotechnology*, 7, 1563-1570.
- BREED, R., MURRAY, E. G. D. & SMITH, N. R. (1957). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Baltimore, The Williams & Wilkins company.
- BRUCE, J. & MORRIS, E. O. (1973). Psychrophilic yeasts isolated from marine fish. *Antonie van Leeuwenhoek*, 39, 331-339.

- BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- COMMISSION, E. (2013). Sole and plaice (*Solea solea* and *Pleuronectes platessa*) - Fisheries - European Commission. EU: European Commission.
- DE AZEREDO, G. A., STAMFORD, T. L. M., NUNES, P. C., GOMES NETO, N. J., DE OLIVEIRA, M. E. G. & DE SOUZA, E. L. (2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International*, 44, 1541-1548.
- DE OLIVEIRA, T. L. C., SOARES, R. D. A. & PICCOLI, R. H. (2013). A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 93, 645-651.
- DIOPERE, E., HELLEMANS, B., VOLCKAERT, F. A. M. & MAES, G. E. (2013). Identification and validation of single nucleotide polymorphisms in growth- and maturation-related candidate genes in sole (*Solea solea* L.). *Marine Genomics*, 9, 33-38.
- DOYLE, M. E. (2007). Microbial Food Spoilage — Losses and Control Strategies. *Fri-briefings*, 16.
- EKHTIARZADEH, H., AKHONDZADEH BASTI, A., MISAGHI, A. L. I., SARI, A., KHANJARI, A. L. I., ROKNI, N., ABBASZADEH, S. & PARTOVI, R. (2012). GROWTH RESPONSE OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AND *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN SALTED FISH FILLETS AS AFFECTED BY *ZATARIA MULTIFLORA* BOISS. ESSENTIAL OIL, NISIN, AND THEIR COMBINATION. *Journal of Food Safety*, 32, 263-269.
- EL SAID SAID, D. (2012). Detection of parasites in commonly consumed raw vegetables. *Alexandria Journal of Medicine*, 48, 345-352.
- ELLIS, D. 2013. *Mycology Online*. Australia: The University of Adelaide. [Online] <http://www.mycology.adelaide.edu.au/virtual/glossary/> (datum van opzoeking: 3/04/2013).
- ELVISS, N. C., LITTLE, C. L., HUCKLESBY, L., SAGOO, S., SURMAN-LEE, S., DE PINNA, E. & THRELFALL, E. J. (2009). Microbiological study of fresh herbs from retail premises uncovers an international outbreak of salmonellosis. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 83-88.
- FAO. 1998. *Fermented and vegetables. A global perspective. Chapter 5. Agriculture and consumer protection*. (Online) <http://www.fao.org/docrep/x0560e/x0560e10.htm> (datum van opzoeking 07/05/2013).
- FOODSAFETY.GOV. (2013). *E. coli*. U.S. Department of Health and Human Services. (Online) <http://www.foodsafety.gov/poisoning/causes/bacteriaviruses/ecoli/> (datum van opzoeking: 30/03/2013).

- GLOBINMED. (2013). *Petroselinum crispum* (Miller) Nyman ex A.W. Hill . Globinmed. (Online)
http://www.globinmed.com/index.php?option=com_content&view=article&id=79453:petroselinu (datum van opzoeking: 3/05/2013).
- GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C. & BOURKE, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 91-97.
- GUTIERREZ, J., BOURKE, P., LONCHAMP, J. & BARRY-RYAN, C. (2009). Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10, 195-202.
- GÜNDÜZ, G. T., GÖNÜL, Ş. A. & KARAPINAR, M. (2009). Efficacy of myrtle oil against *Salmonella Typhimurium* on fresh produce. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 147-150.
- GÜNDÜZ, G. T., GÖNÜL, Ş. A. & KARAPINAR, M. (2010). Efficacy of oregano oil in the inactivation of *Salmonella typhimurium* on lettuce. *Food Control*, 21, 513-517.
- HSOUNA, A. B., TRIGUI, M., MANSOUR, R. B., JARRAYA, R. M., DAMAK, M. & JAOUA, S. (2011). Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 66-72.
- HUIS IN'T VELD, J. H. J. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 1-18.
- HUSS, H. H., ABABOUC, L. & GRAM, L. (2003). Assessment and management of seafood safety and quality. *Food and agriculture organization of the United Nations*, 444, 230.
- HUSSAIN, A. I., ANWAR, F., HUSSAIN SHERAZI, S. T. & PRZYBYLSKI, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108, 986-995.
- HYLDGAARD, M., MYGIND, T. & MEYER, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3.
- IWAMOTO, M., AYERS, T., MAHON, B. E. & SWERDLOW, D. L. (2010). Epidemiology of Seafood-Associated Infections in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 399-411.
- KAISER, A., CARLE, R. & KAMMERER, D. R. (2013). Effects of blanching on polyphenol stability of innovative paste-like parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym ex A. W. Hill) and marjoram (*Origanum majorana* L.) products. *Food Chemistry*, 138, 1648-1656.
- KARAGÖZLÜ, N., ERGÖNÜL, B. & ÖZCAN, D. (2011). Determination of antimicrobial effect of mint and basil essential oils on survival of *E. coli* O157:H7 and *S. typhimurium* in fresh-cut lettuce and purslane. *Food Control*, 22, 1851-1855.

- KHAN, M. S. A. & AHMAD, I. (2011). In vitro antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of Cinnamomum-, Syzygium- and Cymbopogon-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Phytomedicine*, 19, 48-55.
- KOSTAKI, M., GIATRAKOU, V., SAVVAIDIS, I. N. & KONTOMINAS, M. G. (2009). Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology*, 26, 475-482.
- KYKKIDOU, S., GIATRAKOU, V., PAPAVERGOU, A., KONTOMINAS, M. G. & SAVVAIDIS, I. N. (2009). Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4°C. *Food Chemistry*, 115, 169-175.
- LAPIDOT, A., ROMLING, U. & YARON, S. (2006). Biofilm formation and the survival of *Salmonella Typhimurium* on parsley. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 229-233.
- LIU, T.-T. & YANG, T.-S. (2012). Antimicrobial impact of the components of essential oil of *Litsea cubeba* from Taiwan and antimicrobial activity of the oil in food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 68-75.
- LUND, B. M., BAIRD-PARKER, T. C. & GOULD, G. W. (2000). *Microbiological Safety and Quality of Food*, Amerika, Aspen Publishers.
- LV, F., LIANG, H., YUAN, Q. & LI, C. (2011). In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44, 3057-3064.
- MACÉ, S., JOFFRAUD, J.-J., CARDINAL, M., MALCHEVA, M., CORNET, J., LALANNE, V., CHEVALIER, F., SÉROT, T., PILET, M.-F. & DOUSSET, X. (2013). Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled raw salmon (*Salmo salar*) fillets stored under modified atmosphere packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 160, 227-238.
- MADIGAN, M. T., MATINKO, J. M. & DUNLAP, P. V. (2009). *Brock biology of microorganisms*, San Francisco, Pearson.
- MAHMOUD, B. S. M., YAMAZAKI, K., MIYASHITA, K., IL-SHIK, S., DONG-SUK, C. & SUZUKI, T. (2004). Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oil compounds. *Food Microbiology*, 21, 657-666.
- MCKEE, L. H. (1995). Microbial contamination of spices and herbs: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 1-11.
- MEXIS, S. F., CHOULIARA, E. & KONTOMINAS, M. G. (2009). Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4 °C. *Food Microbiology*, 26, 598-605.
- MILADI, H., CHAIEB, K., AMMAR, E. & BAKHROUF, A. (2010). INHIBITORY EFFECT OF CLOVE OIL (*SYZIUM AROMATICUM*) AGAINST *LISTERIA MONOCYTOGENES* CELLS INCUBATED IN FRESH-CUT SALMON. *Journal of Food Safety*, 30, 432-442.

- MINISTRY OF HEALTH BY ESR LTD. (2001). *Escherichia coli* O157:O7. New Zealand: Ministry of primary industries. (Online) <http://www.foodsafety.govt.nz/> (datum van opzoeking: 9/05/2013).
- MIRCEA, C., POIATA, A., TUCHILUS, C., AGOROA EI, L., BUTNARU, E. & STANESCU, U. (2008). Aflatoxigenic fungi isolated from medicinal herbs. *Toxicology Letters*, 180, Supplement, S154.
- NCBI. (2013). *Enterobacteriaceae*. USA: National Center for Biotechnology Information. (Online) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (datum van opzoeking: 31/03/2013).
- NEGI, P. S. (2012). Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 7-17.
- OYEDEMI, S. O., OKOH, A. I., MABINYA, L. V., PIROCHENVA, G. & AFOLAYAN, A. J. (2009). *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*, 8, 1280-1286.
- PATON, A. (2013). *Plants & Fungi: Ocimum basilicum (basil) - Species profile from Kew. Sustainable Uses Group*. (Online) <http://www.kew.org/plants-fungi/Ocimum-basilicum.htm> (datum van opzoeking 23/05/13).
- ROBERTS, T. A., CORDIER, J. L., GRAM, L., TOMPKIN, R. B., PITT, J. I., GORRIS, L. G. M. & SWANSON, K. M. J. (2005a). Fruits and fruit products. In: ROBERTS, T. A., CORDIER, J. L., GRAM, L., TOMPKIN, R. B., PITT, J. I., GORRIS, L. G. M. & SWANSON, K. M. J. (eds.) *Micro-Organisms in Foods 6*. Springer US.
- ROBERTS, T. A., CORDIER, J. L., GRAM, L., TOMPKIN, R. B., PITT, J. I., GORRIS, L. G. M. & SWANSON, K. M. J. (2005b). Vegetables and vegetable products. In: ROBERTS, T. A., CORDIER, J. L., GRAM, L., TOMPKIN, R. B., PITT, J. I., GORRIS, L. G. M. & SWANSON, K. M. J. (eds.) *Micro-Organisms in Foods 6*. Springer US.
- SADDIQ, A. A. & KHAYYAT, S. A. (2010). Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98, 89-93.
- SCOLLARD, J., FRANCIS, G. A. & O'BEIRNE, D. (2013). Some conventional and latent anti-listerial effects of essential oils, herbs, carrot and cabbage in fresh-cut vegetable systems. *Postharvest Biology and Technology*, 77, 87-93.
- STALS, A., BAERT, L., VAN COILLIE, E. & UYTENDAELE, M. (2012). Extraction of food-borne viruses from food samples: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 1-9.
- TAJKARIMI, M. (2007). *Salmonella* spp. *PHR*, 250, 8.
- USDA. (2013a). *Nutrient data for 02044, Basil, fresh*. Verenigde staten: Nutrient Data Laboratory. (Online) <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/263?fg=&man=&lfacet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Full&new> (datum van opzoeking: 21/02/'13).
- USDA. (2013b). *Nutrient data for 11297, Parsley, fresh*. Verenigde staten: Nutrient Data Laboratory. (Online) <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3030?fg=&man=&lfacet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Full&new> (datum van opzoeking 21/02/'13).

- USDA. (2013c). *Nutrient data for 15028, Fish, flatfish (flounder and sole species), raw*. Verenigde staten: Nutrient Data Laboratory. (Online)<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/4491?fg=Finfish+and+Shellfish+Products&man=&facet=&format=&count=&max=25&offset=&sort=&qlookup=sole> (datum van opzoeking: 27/10/2013).
- USDA. (2013d). *Nutrient data for 15076, Fish, salmon, Atlantic, wild, raw*. Verenigde staten: Nutrient Data Laboratory. (Online) <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/4539> (datum van opzoeking: 27/10/2013).
- USDA. 2013e. *PLANTS Profile for Ocimum basilicum (sweet basil) | USDA PLANTS*. US: USDA. (Online)http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=OCBA&photoID=ocba_001_ah_p.tif (datum van opzoeking: 3/05/2013).
- UYTTENDAELE, M., JACXSENS, L., DE LOY-HENDRICKX, A., DEVLIEGHIERE, F. & DEBEVERE, J. (2010). *Microbiologische richtwaarden en wettelijke microbiologische criteria*.
- VOEDSEL EN WARENAUTORITEIT. (2008). *Clostridium botulinum*. Nederland: Kennisbank voedselveiligheid VWA. (Online) <http://www.vwa.nl/onderwerpen/bacterien-ziekteverwekkers/dossier/clostridium-botulinum/clostridium-botulinum-voor-deskundigen> (datum van opzoeking: 8/05/2013).
- VOKK, R., LOUGAS, T., METS, K. & KRAVETS, M. (2011). Dill (*Anethum graveolens* L.) and Parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss) from Estonia: Seasonal Differences in Essential Oil Composition. *Agronomy Research*, 9, 515-520.
- YANG, J., CAO, Y., CAI, Y. & TERADA, F. (2010). Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *Journal of Dairy Science*, 93, 3136-3145.
- ZWEIFEL, C. & STEPHAN, R. (2012). Spices and herbs as source of Salmonella-related foodborne diseases. *Food Research International*, 45, 765-769.

9. Bijlages

Bijlage A: Mineralen aanwezig in *O. basilicum* en *P. crispum* (USDA, 2013a, USDA, 2013b)

Nutriënt	<i>Ocimum basilicum</i>			<i>Petroselinum crispum</i>		
	Waarde per 100 g (mg)	Std. deviatie	Aantal metingen	Waarde per 100 g (mg)	Std. deviatie	Aantal metingen
Calcium	177	23,050	3	138	6,838	4
IJzer	3,17	-	-	6,20	-	1
Magnesium	64	17,150	3	50	10,578	4
Fosfor	56	12,800	3	58	8,035	4
Kalium	295	166,750	3	554	77,704	7
Natrium	4	-	2	56	19,862	7
Zink	0,81	0,039	3	1,07	0,391	3
Koper	0,385	0,095	3	0,149	0,013	3
Mangaan	1,148	0,298	3	0,160	-	1
Selenium	0,0003	-	1	0,0001	-	-

Bijlage B: Vitamines aanwezig in *O. basilicum* en *P. crispum* (USDA, 2013a, USDA, 2013b)

Nutriënt	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Petroselinum crispum</i>
	Waarde per 100 g (mg)	Waarde per 100 g (mg)
Vitamine A, uitgedrukt in retinol	0,264	0,421
Vitamine B1 (thiamine)	0,034	0,086
Vitamine B2 (riboflavine)	0,076	0,098
Vitamine B3 (niacine)	0,902	1,313
Vitamine B5 (Panthotheenzuur)	0,209	0,400
Vitamine B6 (pyridoxine)	0,155	0,090
Vitamine B11 (foliumzuur)	0,068	0,152
Vitamine C	18,0	133,0
Vitamine E (alpha tocoferol)	0,80	0,75
Vitamine K (fylloquinone)	0,4148	1,6400

Bijlage C: Amino-zuren aanwezig in *O. basilicum* en *P. crispum* (USDA, 2013a, USDA, 2013b)

	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Petroselinum crispum</i>
Nutriënt	Waarde per 100 g (g)	Waarde per 100 g (g)
Alanine	0,132	0,195
Arginine	0,117	0,122
Asparaginezuur	0,301	0,294
Cystine	0,028	0,014
Fenylalanine	0,130	0,145
Glutaminezuur	0,277	0,249
Glycine	0,122	0,145
Histidine	0,051	0,061
Isoleucine	0,104	0,118
Leucine	0,191	0,204
Lysine	0,110	0,181
Methionine	0,036	0,042
Proline	0,104	0,213
Serine	0,099	0,136
Threonine	0,104	0,122
Tryptofaan	0,039	0,045
Tyrosine	0,077	0,082
Valine	0,127	0,172

Bijlage D: Lipiden aanwezig in *O. basilicum* en *P. crispum* (USDA, 2013a, USDA, 2013b)

	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Petroselinum crispum</i>
Nutriënt	Waarde per 100 g (g)	Waarde per 100 g (g)
<i>Verzadigde vetzuren:</i>		
Myristinezuur (14:0)	0	0,008
Palmitinezuur (16:0)	0,036	0,084
Stearinezuur (18:0)	0,005	0,039
<i>Enkelvoudig onverzadigde vetzuren:</i>		
Palmitoleïnezuur (16:1)	0	0,008
Oliezuur (18:1)	0,088	0,287
<i>Meervoudig onverzadigde vetzuren:</i>		
Linolzuur (18:2)	0,073	0,115
Alfa-linoleenzuur (18:3)	0,316	0,008
Fytosterolen	0	0,005

Bijlage E: Mineralen aanwezig in tong en Atlantische zalm (USDA, 2013c, USDA, 2013d)

	Tong	Atlantische zalm
Nutriënt	Waarde per 100 g (mg)	Waarde per 100 g (mg)
Calcium	21	12
IJzer	0,18	0,80
Magnesium	18	29
Fosfor	252	200
Kalium	160	490
Natrium	296	44
Zink	0,32	0,64

Bijlage F: Vitaminen aanwezig in tong en Atlantische zalm (USDA, 2013c, USDA, 2013d)

	Tong	Atlantische zalm
Nutriënt	Waarde per 100 g (mg)	Waarde per 100 g (mg)
Vitamine A, uitgedrukt in retinol	0,010	0,012
Vitamine B1 (thiamine)	0,022	0,226
Vitamine B2 (Riboflavine)	0,020	0,380
Vitamine B3 (niacine)	1,04	7,860
Vitamine B6 (pyridoxine)	0,098	0,818
Vitamine B11 (foliumzuur)	0,005	-
Vitamine B12	0,00113	0,00318
Vitamine C	0,0	-
Vitamine D (D2 + D3)	0,0028	-
Vitamine E (alpha tocoferol)	0,63	-
Vitamine K (fylloquinone)	0,0001	-

Bijlage G: Lipiden aanwezig in tong en Atlantische zalm (USDA, 2013c, USDA, 2013d)

	Tong	Atlantische zalm
Nutriënt	Waarde per 100 g (g)	Waarde per 100 g (g)
Verzadigde vetzuren	0,441	0,981
Enkelvoudige onverzadigde vetzuren	0,535	2,103
Meervoudige onverzadigde vetzuren	0,374	2,539
Cholesterol	0,045	0,055