

A 3g

# Voortgangsrapportage ATO-Champignonprogramma tweede halfjaar 1992

Dr. W.M.F. Jongen,  
programmaleider

ato-dlo



**Voortgangsrapportage**  
**ATO-Champignonprogramma**  
**tweede halfjaar 1992**

**Wageningen, maart 1993,**  
**Dr. W.M.F. Jongen, programmaleider**

<b>INHOUDSOPGAVE</b>	<b>Pagina</b>
1. Veroudering van de champignon (A. Braaksma)	3 - 9
2. Modelleren van MA-verpakkingen van champignons (H.W. Peppelenbos)	10 - 14
3. Enzymatische bruinverkleuring van champignons (H.J. Wichers)	15 - 22
4. Onderzoek naar factoren die bepalend zijn voor de verwerkingsverliezen van champignons (E.P.H.M. Schijvens)	23 - 27
5. De ontwikkeling van verwerkingstechnieken voor champignonprodukten (P.V. Bartels)	28 - 32
6. DSS Strategische Planning (R.A.C.M. Broekmeulen)	33 - 35/
7. Koelen en bewaren van champignons (J.W. Rudolphij)	36 - 38
8. CBA en champignons (B.H. van Zwol)	39 - 40

## VEROUDERING VAN DE CHAMPIGNON

A. Braaksma

### Doelstelling

Met het voortgaan van de veroudering in de afzetketen neemt de kwaliteit van de champignon af. Het onderzoek is erop gericht de eerste aanzet, of een van de eerste stappen, van het verouderingsproces te vinden. Hiermee komt dan een belangrijke parameter in handen die het in principe mogelijk maakt de daarop volgende veroudering specifiek af te remmen. Een uitgestelde veroudering, danwel een nauwelijks afnemende kwaliteit van de champignon, zou een vergroting van het afzetgebied mogelijk maken en nieuwe markten aanboren.

### Projectbeschrijving

- I. Meten en beschrijven van veranderingen in membraan-samenstelling en die voorafgaan aan macroscopische verouderingsverschijnselen. Die veranderingen markeren het begin van de veroudering.
- II. Koolhydraatmetabolisme: De hypothese is dat bij veroudering het suikermetabolisme een essentiële rol speelt. Suikers spelen enerzijds een rol als osmoticum (nodig voor steelgroei, hoedgroei) en vormen anderzijds het substraat voor de (hoge) respiratie. Door regulatie van het koolhydraatmetabolisme worden groeiprocessen gereguleerd, zoals hoedopening, welke nadelig zijn voor de kwaliteit. Inzicht in de regulatie van de koolhydraathuishouding biedt opties voor studies naar remming van deze processen.
- III. Histologische veranderingen op cellulair niveau. De centrale vraag is: Hoe wordt de bekende macroscopische groei van bepaalde onderdelen van de champignon op cellulair niveau mogelijk gemaakt?
- IV. De regulerende rol van calmoduline/calcium. Het calmoduline is een eiwit, waarvan (in andere organismen) is aangetoond dat het een rol speelt bij regulatie van processen op cellulair niveau. Daar calmoduline ook in champignons voorkomt en de structuur van dit eiwit nauwelijks afwijkt van calmodulines uit andere organismen, is een regulerende functie ook in champignon hoogst waarschijnlijk. Als eerste aanzet zal de concentratie van dit eiwit in de verschillende delen van de champignon gedurende de veroudering worden bepaald.
- V. Afzetketensimulatie. Een aantal afzetketens waarbij de veroudering van de champignon de beperkende factor wordt, zijn ge-

inventariseerd en modelmatig gesimuleerd.

### **Voortgang tweede halfjaar 1992**

- I. De werkzaamheden in het kader van dit deel-project zijn afgerond en ter publicatie aangeboden.
- II. In het kader van de rol van het koolhydraatmetabolisme is een aanzet gemaakt om de samenstelling van verschillende koolhydraten te meten onder die omstandigheden waaronder hoedopening wel en niet is geremd. Een aantal wilde champignonrassen en *A.bitorquis* zijn gescreend op snelheid van hun naogstontwikkeling en ademhalingssnelheid.
- III. Van een aantal weefsels zijn coupes gemaakt en verschillende metingen verricht. De meetresultaten worden nog doorberekend.
- IV. Uit de champignon is calmoduline volledig gezuiverd. De concentratie actief calmoduline is enzymatisch bepaald middels de fosfodiesterase test. Commercieel verkrijgbare antilichamen bleken niet geschikt voor zowel blotting- als ELISA-procedures.
- V. Van een aantal herkomsten is U1 getest onder vier afzetketencondities. Een begin is gemaakt met de verwerking van de gegevens.

### **Inleiding**

#### Deelproject IV:

Waar de deelprojecten I, II en III situaties betreffen waar de champignon al veranderingen heeft ondergaan op weg naar veroudering, het deelproject IV richt zich op de fase daarvoor; de fase waarin regulatiemechanismen enzymactiviteiten aanzetten die uiteindelijk moeten resulteren in de bekende (ongewenste) naogst processen, waaronder steelgroei en hoedopening.

Het is algemeen aanvaard dat calcium een belangrijke rol speelt in de regulatie van cellulaire biochemische processen (1-9). Alhoewel extracellulair de concentratie calcium hoog is, is intracellulair de concentratie calcium laag en wordt op een vast niveau gehandhaafd ( $10^{-8}$  tot  $10^{-6}$ M) door een actief calcium transport van Ca-ATPases (4). Vrije calcium ionen binden aan calcium bindende eiwitten waarvan calmoduline de meest voorkomende is. Het calcium-calmoduline complex reguleert een aantal enzymatische reacties (9,10). Het is aangetoond dat dit complex een rol speelt bij rijping en veroudering (1,5,11,15). Het ontbreken van calcium leidt tot fysiologische afwijkingen (2,5,9).

In schimmelcellen blijkt de intracellulaire calcium concentratie eveneens strikt gereguleerd te worden (16). Calmoduline is tijdens de evolutie goed geconserveerd. Zo wijkt calmoduline uit ratten weinig af van calmoduline

uit Pleurotus (Oesterzwam). Dit maakt aannemelijk dat calmoduline, dat ook in de champignon voorkomt (14), ook nauwelijks afwijkend zal zijn. Een regulerende rol van calcium/calmoduline in de champignon is daarom zeer aannemelijk. De eerste vragen richten zich op het feit of calmoduline inderdaad veelvuldig voorkomt in champignon, hoe de verdeling is over de verschillende weefsels en welke invloed de naooft ontwikkeling hierop heeft. Mogelijke bepalingmethoden zijn immunologische technieken (blotten, ELISA) en de enzymatische bepaling van actief calmoduline/calcium middels de phosphodiesterase test

### **Materiaal en Methoden**

De zuivering is uitgevoerd zoals beschreven door Charbonneau & Cormier (14) met enkele noodzakelijke wijzigingen. In het kort komt deze zuivering neer op:

- homogeniseren, afdraaien
- selectief verhitten van het supernatant
- fractioneren met ethanol gevolgd door een dialyse
- twee keer een filtratie over moleculaire filters
- affiniteitschromatografie (phenyl-sepharose CL-4B)

Op SDS-PAGE bleek het uiteindelijk verkregen monster zuiver te zijn. Met de verkregen eiwitfracties en commercieel verkrijgbaar calmoduline is immunoblotting uitgevoerd volgens de methode zoals beschreven door ref.13 en aangevuld/gewijzigd zoals beschreven in ref.17,18.

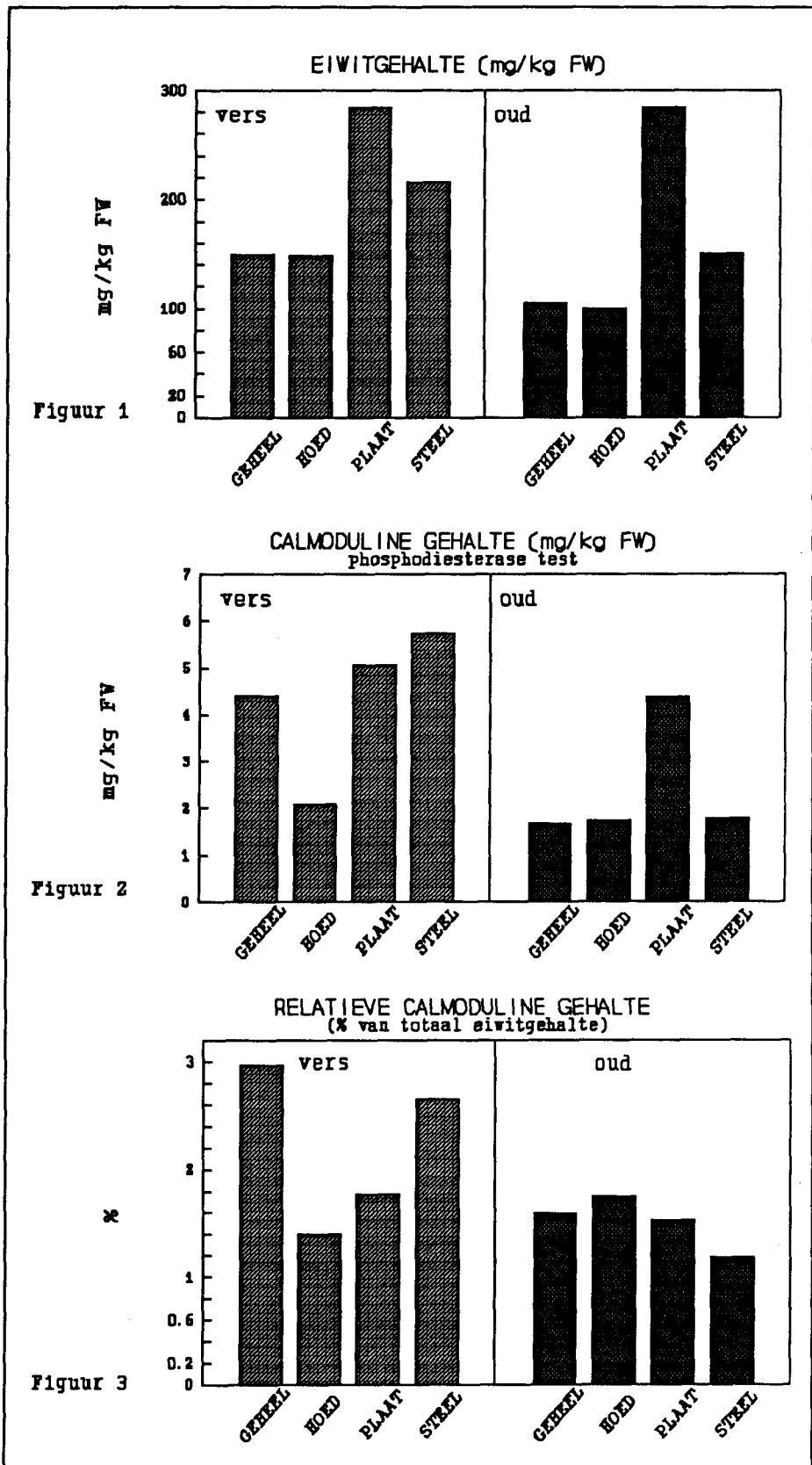
Het blotten van eiwitten naar een polyvinylidene difluoride (PVDF) membraan is geoptimaliseerd, evenals de fixatiestap met glutaaraldehyde en blokkeren van niet gereageerde sites met gelatine, alvorens de optimale condities voor de reactie met het anti-lichaam konden worden bepaald. De bepaling van het gehalte actief calmoduline is enzymatisch gemeten door de mate van stimulatie van phosphodiesterase activiteit door het calmoduline/calcium complex (19).

### **Resultaten**

Immunologische technieken hebben grote voordelen; ze zijn snel toepasbaar voor gehaltebepalingen (ELISA) en daarnaast wordt ook immunohistochemisch werk mogelijk, waardoor een heel nieuw werkterrein toegankelijk wordt. De optimale tijd voor electroforetisch blotten bleek 1 uur te zijn. Hechting vond echter niet plaats, tenzij een fixatie met glutaaraldehyde erop volgde. Verschillende blocking oplossingen, concentraties en blocking temperaturen zijn uitgetest. Gelatine (3%) gedurende 1 uur bij 37°C bleek optimaal. Tegen de verwachting in, bleken commerciële antilichamen tegen calmoduline niet of niet specifiek te reageren. Ook ELISA, met verschillende manieren om calmoduline vast te hechten,

bleken niet tot de gewenste resultaten te leiden.

De enzymatische bepaling middels de phosphodiesterase activiteitstest werd geoptimaliseerd met commercieel calmoduline, waarna een ijklijn is gemaakt met commercieel verkrijgbaar calmoduline en met het gezuiverde calmoduline uit de champignon (19). Daarna zijn bepalingen gedaan aan een ruw, celvrij extract van hoed, plaat en steel van verse en verouderde champignons. De resultaten staan in de figuren 1 t/m 3. De afname van calmoduline in de gehele champignon is vrijwel geheel toe te schrijven aan de afname in de steel. De opbrengst van calmoduline gezuiverd uit oude champignons gemeten als eiwitconcentratie is ca. de helft van de opbrengst van die uit verse champignons. De enzymatische bepaling middels de phosphodiesterase test loopt hiermee parallel (Fig.2).



Figuur 1

Figuur 2

Figuur 3



## Conclusies

De conclusies uit deze eerste testen zijn dat calmoduline in de steel versneld wordt afgebroken en in hoed- en plaatweefsel het relatieve aandeel op peil wordt gehouden, wellicht omdat in deze laatste weefsels nog een belangrijke functie door het calmoduline is te vervullen. De afbraak van calmoduline in steelweefsel is indicatief voor veroudering van het steelweefsel. Parallel hiermee loopt de (histologische) waarneming dat in deze fase van naogst-ontwikkeling middels vitaliteitskleuring geen levend weefsel in de steel meer is aan te tonen. Voor het hoedweefsel gaat dit blijkbaar niet op; het gehalte is relatief laag en blijft laag. Vitaliteitstesten gaven destijds aan dat in de hoed levend weefsel aanwezig bleef. Of naogst-processen causaal met het lot van calmoduline zijn verbonden blijft nog even de vraag. Vooralsnog zullen deze eerste resultaten nog moeten worden gereproduceerd. De commerciële antilichamen tegen calmoduline blijken niet bruikbaar voor de champignon. Zo immunologische technieken noodzakelijk worden, dan moeten antilichamen worden opgewekt met gezuiverd calmoduline uit de champignon.

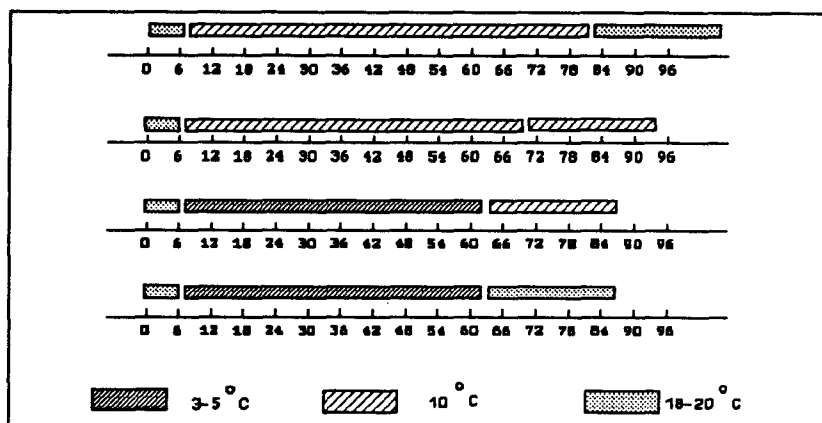
## Referenties

1. Ferguson, I.B. & Drobak, B.K. 1988 HortScience 23:262-265
2. Ferguson, I.B. 1984 Plant Cell Env. 7:477-489
3. Ferguson, I.B.; Watkins, B.W. & Harman, J.E. 1983 Plant Phys. 71:182-186
4. Poovaiah, B.W. 1985 HortScience 20:347-352
5. Paliyath, G & Poovaiah, B.W. 1985 Plant Cell Physiol. 26:977-986
6. Poovaiah, B.W. 1988 In: Senescence and aging in plants. Eds.: Nooden, L.D. & Leopold, A.C. Acad. Press
7. Trewavas, A.J. (ed) 1986. Molecular and cellular aspects of calcium in plant development-Plenum Press, New York.
8. Marmé, D. & Dieter, P. 1983 In: Calcium & Cell Function 4:263-311
9. Cheung, W.Y. 1980 Calcium and Cell Function Vol I. Acad. Press.
10. Dieter, P. 1984 Plant Cell and Env. 7:371-38011. Leshem, Y.Y.; Sridhara, S. & Thompson, J.E. 1984 Plant Phys. 75:329-335.
12. Ragotmaka, K.G.; Veluthambi, K. & Poovaiah, B.W. 1985 Plant Cell Phys. 26:1565-1572
13. Towbin, H. & Gordon, J. 1979 PNAS 76:4350
14. Charbonneau, H. & Cormier, M.J. 1979 Biochem, Biophys. Res. Comm. 90:1039-1047
15. Paliyath, G & Thompson, J.E. 1988. Plant Phys. 88:295-302.

16. Miller, A.J. & Sander, D. 1989 Plant Phys. Biochem. 27:551-556
17. Maxwell, T. 1988 Electrophoresis 9:303-306
18. Eldik, L.J.V. & Wolchok, S.R. 1984  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 124:752-759
19. Schiefer, S. 1986. In: Methods of Enzymatic Analysis.  
Vol. IX. pp. 317-331 Ed: Bergmeyer

### Deelproject V

In dit project worden champignons gevolgd gedurende afzetketensimulaties zoals weergegeven in onderstaand schema.



Bij elke temperatuurovergang zijn vier parameters gemeten:

- de kleur met een kleurmeter die L, a en b waarden oplevert.
- intern volume, dit wordt bepaald aan de hand van het onderwatergewicht hetgeen een indruk geeft van de mate van holheid van het weefsel. Deze waarde neemt naar verwachting toe bij meer holtes in het weefsel, dus bij groei/afbraak, indien er geen toevoer is van nutriënten vanuit mycelium kan zijn.
- droge stofgehalte, de afname geeft een indruk van de metabolische activiteit gedurende de tot zover gevolgde ketensimulatie.
- respiratie, welke een indruk geeft van de metabole snelheid van de champignon op dat moment.

De genomen dia's geven de mogelijkheid ook achteraf nog vergelijkingen te kunnen blijven maken.

Er zijn vijf herkomsten getest, waarnaast één herkomst drie keer herhaald. In totaal dus zeven partijen die een indruk moeten geven van de spreiding in herkomst en gedrag onder afzetketencondities.

Tevens is een kastanjechampignon drie keer in de proeven meegenomen. De eerste resultaten zullen medio maart beschikbaar komen.

## MODELLEREN VAN MA-VERPAKKINGEN VAN CHAMPIGNONS

H.W. Peppelenbos

### A. VERSLAG 1992-2

#### Probleemstelling

Bij kamertemperatuur (18°C, zoals in een supermarkt) gaat de kwaliteit van champignons snel achteruit (verkleuring van wit naar bruin en verlies van stevigheid). Bekend is dat omgevingsfactoren (temperatuur, luchtvochtigheid, zuurstof- en kooldioxideconcentraties) het kwaliteitsverloop beïnvloeden. Uit eigen onderzoek is gebleken dat zuurstof en kooldioxide een sterke invloed hebben op allerlei kwaliteitsaspecten.

Uitgaande van eigen experimenten en de literatuur lijken de optimale concentraties ongeveer 0.5-1.5% zuurstof en 6-8% kooldioxide te zijn. Lage zuurstof- en hoge kooldioxide concentraties vertragen de groei, de ontwikkeling, de groei van de vlekken op de hoed en de afname van de stevigheid.

Naar de wijze waarop zuurstof en kooldioxide de verschillende kwaliteitsfactoren (en de houdbaarheid) beïnvloeden zal nog verder onderzoek worden gedaan. Dit is ook van belang voor het kunnen aangeven van de houdbaarheid bij wisselende bewaaromstandigheden en verschillende herkomsten.

Met behulp van verpakkingen is het mogelijk de omstandigheden rond het produkt te beïnvloeden, omdat een levend produkt zuurstof gebruikt en kooldioxide afgeeft (respiratie) en een verpakking in beperkte mate doorlatend is voor zuurstof en kooldioxide (diffusie). Het is nu van belang om respiratie en diffusie zo op elkaar af te stemmen dat het bereikte evenwichtsnivo in een verpakking overeenkomt met de meest optimale luchtsamenstelling. Deze wijze van bewaren wordt MA genoemd (Modified Air). Om de optredende processen aan elkaar te kunnen koppelen is een model onontbeerlijk. Bijkomend voordeel van de ontwikkeling van een model is dat het uiteindelijk mogelijk zal zijn om het kwaliteitsverloop van een produkt bij verschillende bewaaromstandigheden te voorspellen.

#### Doel

1. Het bepalen van de invloed van een aantal omgevingsfactoren, namelijk de O<sub>2</sub>-concentratie, de CO<sub>2</sub>-concentratie en de mate van indroging (= flow \* luchtvochtigheid), op processen die de kwaliteit van verse champignons bepalen.
2. De ontwikkeling van een model dat de invloed van omstandigheden rond een produkt op het verloop van de kwaliteit

van dat produkt kan berekenen en kan aangeven welke verpakking (welk materiaal) het meest geschikt is om de kwaliteit zo lang mogelijk te handhaven.

### Fasering

#### jaar 1:

- Ontwikkeling objectieve meetmethoden kwaliteit (kleur, stevigheid, bacteriegroei, grootte)
- Het verloop van de kwaliteit bij verschillende concentraties zuurstof en kooldioxide en bij verschillende temperaturen. Het blootstellen van het produkt aan constante omstandigheden is in feite een simulatie van de mogelijk op te treden evenwichtstoestanden in verpakkingen.

#### jaar 2:

- Ontwikkeling model: relatie diffusie en respiratie - concentratie O<sub>2</sub> en CO<sub>2</sub> in een verpakking
- De respiratiesnelheid bij verschillende constante concentraties zuurstof en kooldioxide en bij verschillende temperaturen. Daarnaast wordt de snelheid waarmee de ademhaling zich aan een veranderende luchtsamenstelling aanpast onderzocht. Dit is in feite een simulatie van een produkt in een verpakking.
- De invloed van verschillende luchtvochtigheden bij verschillende temperaturen (beter nog: de invloed van een verschil in dampdruktekort) op de kwaliteit.
- (Het onderzoek naar de eigenschappen van verschillende verpakkingsmaterialen zal binnen een ander projekt plaatsvinden).

#### jaar 3:

- Ontwikkeling model: relatie O<sub>2</sub>- en CO<sub>2</sub>-concentratie - kwaliteit
- Achtergrond respiratiesnelheid: wat is de invloed van veroudering/ontwikkelingsstadium op de respiratiesnelheid. Dit is van belang bij langdurige bewaring (langer dan drie dagen) van champignons in een verpakking.
- Achtergrondonderzoek kleur: op welke wijze beïnvloeden zuurstof en kooldioxide de bruinverkleuring en de activiteit van PPO (het enzym dat bruinverkleuring veroorzaakt).

#### jaar 4:

- Combinatie verpakkingsmodel en kwaliteitsmodel
- Validatie-onderzoek: de controle van het model en de bijbehorende

data door middel van een onafhankelijk experiment. Diverse verpakingsmaterialen (die vooraf op diffusie-eigenschappen zijn geselecteerd) worden samen met champignons aan verschillende omstandigheden blootgesteld.

- Aanpassing (eventueel) van het model

## B. VERSLAG VAN DE WERKZAAMHEDEN IN 1992-2

### Respiratie

In 1992 zijn er respiratiemetingen van champignons bij diverse concentraties uitgevoerd. Ditmaal is niet alleen de kooldioxide-productie maar ook de zuurstof-opname gemeten. Dit leverde een duidelijk beeld op omtrent de invloed van zuurstof, kooldioxide en hun interactie op de respiratie. De gevonden invloed van zuurstof blijkt sterk af te wijken van waarden die tot dusver bekend waren. Pas bij concentraties van minder dan 6% is er een duidelijke vermindering van de respiratiesnelheid. Ook de invloed van kooldioxide was anders dan verwacht. In combinatie met hoge zuurstofconcentraties heeft kooldioxide tot een concentratie van 10% nauwelijks invloed, maar bij lage zuurstofconcentraties (minder dan 1%) neemt de kooldioxideproductie toe. De relatie tussen de zuurstofconcentratie en respiratiesnelheid kan goed worden beschreven met een formule voor enzymkinetiek (Michaelis-Menten). De genoemde interactie is van belang om effecten van folies met verschillende verhoudingen tussen de zuurstof- en kooldioxidediffusiesnelheden te kunnen berekenen.

### Modellering

Met behulp van een model kan het verloop van de gasconcentraties in een verpakking als gevolg van respiratie en diffusie worden berekend. Het model is gebaseerd op fysische processen (diffusie) en enzymkinetiek (respiratie). De te gebruiken constanten in het model zijn nu meer betrouwbaar. De volgende stap is de modellering van het kwaliteitsverloop bij de berekende concentraties.

## Werkzaamheden 1993-1

### Aanpak

Allereerst vind er een herhaling van de respiratiemetingen van 1992 plaats, waarbij de invloed van het ontwikkelingsstadium op de respiratie en de optimale zuurstofconcentratie zal worden onderzocht. Het ontwikkelingsstadium zal m.b.v. computer beeld analyse worden gemeten.

Variabelen experiment 1 (respiratie)

temperatuur (°C)	: 18
relatieve luchtvochtigheid (%)	: 99
concentratie O <sub>2</sub> (%)	: 0, 1, 4, 21
concentratie CO <sub>2</sub> (%)	: 0.05, 2, 10
bewaarduur (dagen)	: 10
tijd tussen metingen (dagen)	: 1

Om transpiratie/uitdroging van het produkt te minimaliseren is het van belang om de luchtvochtigheid hoog te houden. In een gesloten verpakking (noodzakelijk voor MA) kan een hoge luchtvochtigheid rond het produkt worden gehandhaafd. Een te hoge luchtvochtigheid vergroot echter de kans op condensatie; op het produkt kan een laagje vocht ontstaan (vooral bij temperatuurschommelingen). Dit kan de microbiële groei stimuleren. Daarom moet naast het optimaliseren van de zuurstof- en kooldioxideconcentraties in een verpakking ook de luchtvochtigheid binnen bepaalde grenzen gehouden worden. Om te kunnen aangeven welke luchtvochtigheid (mate van indroging) optimaal of acceptabel is, zal een bewaarexperiment worden uitgevoerd. Om een eventuele interactie met de luchtsamenstelling te onderzoeken zal ook de (waarschijnlijk) optimale luchtsamenstelling worden aangeboden.

Variabelen experiment 2 (uitdroging en interactie met gascondities)

temperatuur (°C)	: 18
relatieve luchtvochtigheid (%)	: 90, 99
luchtverversingssnelheid	: 400, 800
concentratie O <sub>2</sub> (%)	: 1, 21
concentratie CO <sub>2</sub> (%)	: 0.05, 7
bewaarduur (dagen)	: 10
tijd tussen metingen (dagen)	: 3

Op grond van gevonden invloeden van zuurstof en kooldioxide op verkleuring van champignons, en de resultaten van een inleidend experiment (waarbij PPO-activiteit werd gemeten) is besloten om gericht naar de invloed van de gassamenstelling op het enzym PPO te kijken. Naast de activiteit van het enzym zal ook de hoeveelheid substraat voor het enzym worden gemeten. Inzicht in deze invloed draagt bij aan het te ontwikkelen kwaliteitsmodel en een grotere betrouwbaarheid van dat model.

Variabelen experiment 3 (invloed gascondities op activiteit van PPO)

temperatuur (°C)	: 18
relatieve luchtvochtigheid (%)	: 99
concentratie O <sub>2</sub> (%)	: 0, 1, 4, 21
concentratie CO <sub>2</sub> (%)	: 0.05, 2, 7
bewaarduur (dagen)	: 10
tijd tussen metingen (dagen)	: 3

## **Fasering**

De aangepaste fasering 1991-1995 wordt in 1993 gevolgd.

## ENZYMATISCHE BRUINVERKLEURING VAN CHAMPIGNONS

H.J. Wichers

### Doelstelling

Inzicht in de enzymologie van bruinverkleuringsreacties in de champignon en ontwikkeling van methoden om deze verkleuring te remmen of voorkomen.

Mogelijke toepassingen:

- Snelle selectiemethoden voor rassen die minder gevoelig voor bruinverkleuring zijn;
- Aanpassing van behandelings- en verwerkingsprocessen en -trajekten zodanig dat bruinverkleuring wordt tegengegaan.

### Inleiding

Bruinverkleuring in de champignon is het gevolg van de (gedeeltelijk) enzymatische vorming van bruine pigmenten, de zogenaamde melaninen. Het hierbij in de vruchtlichamen van *A. bisporus* betrokken enzym is tyrosinase (zie eerdere voortgangsrapportages).

In de onderhavige verslagperiode is aandacht besteed aan:

- A. Verdere zuivering van de tyrosinase-fractie met hoog isoelectrisch punt (IEP ~5.5) (taken 1, 1.6);
- B. Ontwikkeling methoden voor subcellulaire fractionering van myceliumcultures van *A. bisporus* (taken 1, 1.5);
- C. Vergelijking van tyrosinase-activiteit en substraatnivo's in een aantal wild-typen van *A. bisporus* (taak 1, 1.1, 2 en 2.3).

*Voor een verklaring van de gebruikte codering zie het onderzoeksprogramma d.d. februari 1992.*

### Materiaal en methoden

Standaard analysemethoden zoals de bepaling van tyrosinaseactiviteit, isoelectrische focussing, SDS-PAGE enz. zijn beschreven in het voortgangsrapport over het eerste halfjaar van 1992 [1].

#### A. Tyrosinasezuivering

Chromatografie op hydroxylapatiet is uitgevoerd zoals beschreven in het voortgangsrapport over het eerste halfjaar van 1992 [1].

Gelpermeatiechromatografie is uitgevoerd door de bij 160 mM fosfaat van hydroxylapatiet eluerende enzymfractie, welke de isoenzymen met een relatief hoog isoelectrisch punt (~5.5) bevat, te concentreren middels vriesdrogen en op te brengen op een kolom van Sephadex G-200 van 100 ml (50 x 1.6 cm, Pharmacia). De kolom is geëluëerd met 25 mM Bis-Tris buffer pH 6.5 (buffer A), bevattende 1  $\mu$ M tropolon.



Anionenwisselingschromatografie is uitgevoerd op een commerciële Mono-Q-kolom van 1 ml bedvolume (8 x 0.4 cm, Pharmacia). Na opbrengen van de activiteitspool, welke is verkregen na gelpermeatiechromatografie, is gewassen met 10 kolomvolumes buffer A. Geëluëerd is met een gradiënt van 0-0.3 M NaCl in buffer A, waarna is nagedrukt met 1M NaCl in buffer A.

#### B. *Subcellulaire fractionering*

Voor het analyseren van de subcellulaire localisatie van tyrosinase dienen in grote lijnen de volgende stappen te worden ondernomen:

1. Bereiding en isolatie van protoplasten uit myceliumcultures
2. "Gecontroleerde" lysis van de protoplasten
3. Isolatie en karakterisering van de subcellulaire fracties m.b.v. markers, tyrosinaseactiviteit en -samenstelling en substraatgehalten voor tyrosinase.

Protoplasten worden geïsoleerd volgens de methode van Sonnenberg et al. [2] uit in Fernbach-kolven gekweekt mycelium van *A. bisporus* ATCC 24663.

#### C. *Vergelijking van wildtypen*

Tyrosinaseactiviteit is bepaald met de standaardmethode [1]. Substraatgehalten zijn gekwantificeerd met het Folin-Ciocalteus-reagens en uitgedrukt als tyrosine als standaard.

### Resultaten en discussie

#### A. *Tyrosinasezuivering*

Fractionering van een homogenaat van vruchtlichamen van *A. bisporus* U1 op Hydroxylapatiet levert o.a. een scheiding naar isoelectrisch punt op (Tabel 1, Figuur 1, zie ook [1]). Van de enzymfractie die niet aan het kolommateriaal wordt gebonden blijken geglycosylerde tyrosinases aanwezig [1]. De geringe toename van de specifieke activiteit van de meest actieve fractie wordt waarschijnlijk veroorzaakt door aanzienlijke inactivering van het enzym. Voor de verdere zuivering van tyrosinase is verder gewerkt met de fractie met de hoogste activiteit, te weten HAP-pool II, eluerend bij ongeveer 160 mM fosfaat [1]. Deze pool bevat de tyrosinase-isoenzymen met een relatief hoog isoelectrisch punt (~5.5, [1]). Verdere fractionering van HAP-pool II op een gelpermeatiekolom (Sephadex G-200) resulteert in één activiteitspool eluerend na 0.65-0.70 kolomvolumes (Figuur 2A). Calibratie van deze kolom met markereiwitten duidt op een natief molekulgewicht van ~65 kD voor *A. bisporus*-tyrosinase, hetgeen niet in overeenstemming is met de literatuur. Hierin wordt een molekulgewicht van ongeveer 110 kD vermeld voor het natieve enzym. Op grond van de specifieke activiteit van deze pool lijkt een verdere zuivering bereikt te zijn (Tabel 2). Analyse van deze fracties op SDS-PAGE bevestigt deze impressie (Figuur 2B).

Verdere fractionering van deze enzymfractie m.b.v. anionenwisselingschromatografie is uitgevoerd op een Mono-Q-kolom (Tabel 3,

Figuur 3). Ten opzichte van de meest actieve fractie na gelpermeatie-chromatografie lijkt ionenwisseling een verdere zuivering van ongeveer 4 à 5 x op te leveren. Ten opzichte van het homogenaat is de specifieke activiteit 20 à 30 x toegenomen. Analyse van een aantal van de fracties met de hoogste specifieke activiteiten op SDS-PAGE toont een aanzienlijke, maar nog geen volledige, zuivering aan (Figuur 4). In de meest zuivere fracties komen nadrukkelijk eiwitbanden van 43, 39 en 24 kD voor. Op grond van de literatuur worden zware eiwitketens van 43 kD en lichte eiwitketens van 13 kD verwacht; wellicht kan de band van 24 kD worden verklaard als een dimeer van de lichte keten. De band van 39 kD is wellicht een verontreiniging.

#### Geplande activiteiten in het komende halfjaar

- Toepassing van affiniteitschromatografie m.b.v. anti-lichamen tegen een commercieel (niet volledig zuiver) tyrosinase van de firma Sigma.

#### B. *Protoplastbereiding*

Protoplasten zijn bereid uit mycelium van *A. bisporus* ATCC 24663, een adenine-mutant. Kortstondige protoplastbereiding (gedurende ongeveer 4 uur) bleek een hogere opbrengst ( $10^7 \cdot \text{ml}^{-1}$ ) op te leveren dan langdurige (overnacht,  $10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Vermoedelijk lyseren veel protoplasten spontaan tijdens de langdurige procedure. Voor U1 verloopt de protoplastering tot dusver met aanzienlijk lagere opbrengsten ( $10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$  na 4 uur).

#### Geplande activiteiten in het komende halfjaar

- Ontwikkelen van assays voor markers voor subcellulaire fracties
- Toepassen differentiële centrifugatie c.q. gradiëntcentrifugatie voor isolatie van subcellulaire fracties.

#### C. *Vergelijking tyrosinaseactiviteit en substraatpools van wildtypes*

In tabel 4 en 5 zijn gegevens met betrekking tot de tyrosinaseactiviteit van een aantal commercieel in gebruik zijnde (reeds eerder gerapporteerd) en een aantal wild-type champignonrassen (alle verkregen via het Proefstation voor de Champignoncultuur) samengevat.

Alle commercieel in gebruik zijnde rassen zijn geanalyseerd in fase 3 à 4 (nog niet zichtbare lamellen tot breken van het velum).

Bij de wildtypes varieerde de hoed-diameter van 24 tot 38 mm. De lamellen waren nog niet zichtbaar, behalve voor B155/9. Volgens Burton heeft de fase waarin de champignon verkeert bij oogst overigens een relatief gering effect op de totale tyrosinaseactiviteit in de hoed (spreiding van ~30 % in gemeten activiteiten) [3].

De metingen van enzymen en substraat zullen in het vervolg worden gekoppeld aan kleurbepalingen met behulp van Minolta-meetapparatuur

en/of computer beeld analyse. Met deze meerdere gegevens kan wellicht worden gezocht naar relaties tussen deze parameters.

### **Geplande activiteiten in het komende halfjaar**

- Afhankelijk van de beschikbaarheid van materiaal wordt dit onderdeel voortgezet. De enzym- en substraatmetingen zullen worden gekoppeld aan kleurmetingen m.b.v. Minolta en/of CBA.

### **Referenties**

1. Voortgangsrapportage ATO-champignonprogramma eerste halfjaar 1992, p. 13-20
2. A.S. Sonnenberg, J.G. Wessels, L.J. van Griensven (1988) *Curr. Microbiol.* 17: 285-291
3. K.S. Burton (1988) *J. Hort. Sci.* 63: 255-260

Tabel 1. Fractionering van *A. bisporus* U1-homogenaat op Hydroxylapatite Bio-Gel HT. De vermelde waarden zijn gemiddelden van vier experimenten.

	Eiwit mg	Activiteit μkatal	Specifieke activiteit μkatal.mg <sup>-1</sup>	pI	mM
Homogenaat	1.6x10 <sup>3</sup>	3.6x10 <sup>2</sup>	0.22		
Ongebonden	0.2x10 <sup>3</sup>	1.5x10 <sup>1</sup>	0.07	4.5	5
Pool I	4.4x10 <sup>1</sup>	5	0.11	4.5	80
Pool II	6x10 <sup>2</sup>	1.7x10 <sup>2</sup>	0.29	5-5.6	160

Tabel 2. Fractionering van Hydroxylapatite Bio-Gel HT-pool II op Sephadex G-200 (bedvolume 100 ml). De vermelde waarden zijn gemiddelden van vijf experimenten.

	Eiwit mg	Activiteit μkatal	Specifieke activiteit μkatal.mg <sup>-1</sup>
HAP-pool II	2.8	0.75	0.28
G-200 pool I	0.6	0.03	0.04
G-200 pool II	0.7	0.52	0.79

Tabel 3. Fractionering van Sephadex G-200-pool II op Mono-Q (bedvolume 1 ml). De vermelde waarden zijn afkomstig uit twee experimenten waarbij verschillende hoeveelheden zijn opgebracht.

	Eiwit mg	Activiteit μkatal	Specifieke activiteit μkatal.mg <sup>-1</sup>
Exp. 1:			
Seph-G200-pool II:	0.49	0.36	0.74
Aktiefste fracties:	0.02 0.02	0.05 0.09	2.1 3.9
Exp. 2:			
	5	9.1	1.8
Aktiefste fracties:	0.96	7.01	7.3

Tabel 4. Kwantitatieve samenstelling van het PPO in mycelia en vruchtlichamen van *Agaricus* spp.

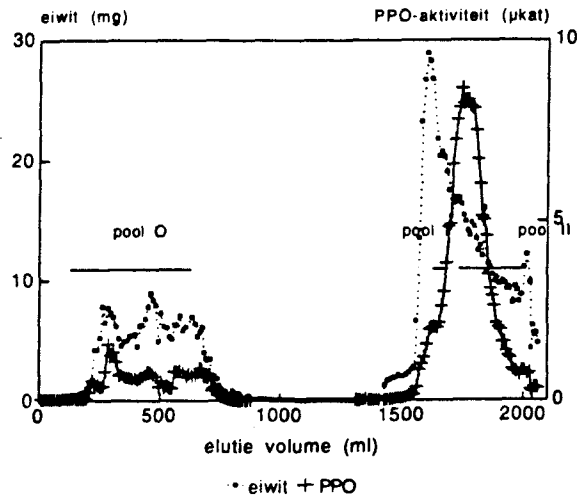
	stam/ras	PPO-activiteit ( $\mu$ kat/gDW, +SDS)		Fenolen ( $\mu$ mol/gDW)
		mycelium	vruchtlichaam	
<i>A. bisporus</i>	U1	19.4	4.2	--
	LLC9 <sup>*)</sup>	23.9	18.0	251
	CC4 <sup>*)</sup>	23.5	23.0	248
	LLC33 <sup>*)</sup>		21.6	267
	R101 <sup>*)</sup>		9.9	252
	S456 <sup>*)</sup>		13.9	257
	T850 <sup>*)</sup>		21.2	272
<i>A. bitorquis</i>	K26	13.2		
<i>A. arvensis</i>	R20(myc)	6.7		
	R20(diff)	9.0		

<sup>\*)</sup> commerciële "kastanje"rassen

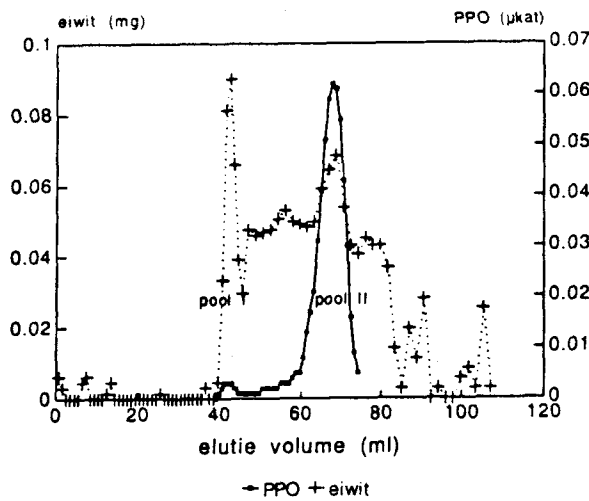
Tabel 5. Kwantitatieve samenstelling van het PPO en substraten in de vruchtlichamen van enkele wild-type *Agaricus* spp.

	stam/ras	PPO-activiteit ( $\mu$ kat/gDW)		Fenolen ( $\mu$ mol/gDW)	Kleur homogenaat
		-SDS	+SDS		
<i>A. bisporus</i>	B162/5	1.1	31.8	51	donker bruin
	B155/9	1.0	16.1	43	zeer donker bruin
	B162/10	0.6	15.2	38	midden bruin
	B65	1.3	14.3	41	donker bruin
	B92	1.2	13.0	37	midden bruin
	B80	0.9	13.0	35	licht bruin
	B98	0.5	10.7	40	midden bruin
	B83	0.8	8.0	33	licht bruin
<i>A. bitorquis</i>	K26	0.7	24.8	50	midden bruin

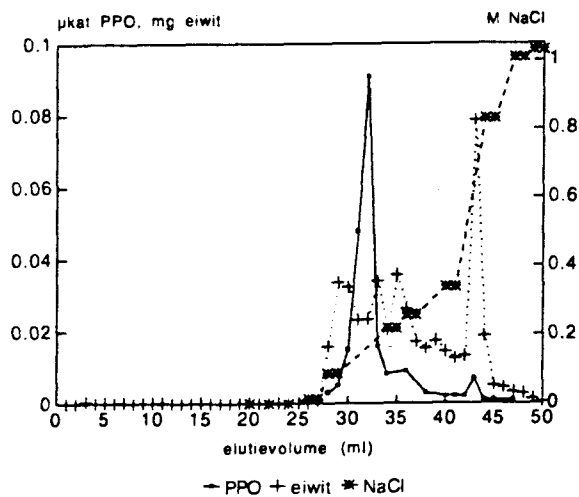
Figuur 1: Fractionering van *A. bisporus* U1-homogenaat op Hydroxylapatite Bio-Gel HT.



Figuur 2: Fractionering van Hydroxylapatite Bio-Gel HT-pool II op Sephadex G-200.

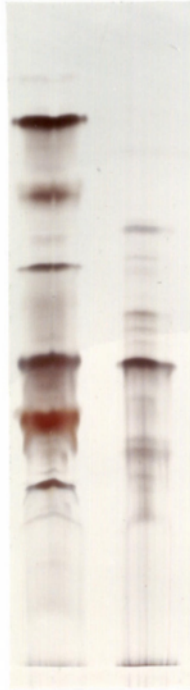


Figuur 3: Fractionering van Sephadex G-200-pool II op Mono-Q.



Figuur 4: SDS-PAA-gelelectroforese van een aantal fracties, verkregen bij de zuivering van *Agaricus*-tyrosinase. Links: markeereiwitten (van boven naar beneden resp. 14.3, 20.1, 30, 43, 68 en 94 KD); Rechts: hoogste activiteitspool van Mono-Q-chromatografie (zie fig. 3).

---



## ONDERZOEK NAAR FAKTOREN DIE BEPALEND ZIJN VOOR DE VERWERKINGSVERLIEZEN VAN CHAMPIGNONS

E.P.H.M. Schijvens

### Inleiding

In de tweede helft van 1992 is het onderzoek voortgezet ter verklaring van het effect dat een aantal processtappen in de verwerking van champignons, heeft op het gewichtsrendement.

1. *Nader onderzoek naar het effect dat de blancheertijd heeft op het gewichtsverlies*

Uit het onderzoek naar de voor het gewichtsverlies relevante procesfactoren (zie voortgangsrapportage van januari 1992) is onder andere gebleken dat er een significant effect is van de blancheertijd van 5 minuten ten opzichte van 15 minuten blancheren. Dit effect is bij herhaling gebleken (4 maal). Om een duidelijker beeld te krijgen van het effect van de blancheertijd op het gewichtsrendement is het gewichtsrendement in functie van meerdere blancheertijden onderzocht.

2. *Herhaling van de experimenten over het effect van de samenstelling van de opgieter*

Uit het onderzoek naar de relevante procesfactoren bleek ook dat de samenstelling van de opgieter effect heeft op het gewichtsrendement. In de voortgangsrapportage van augustus '92 is verslag gedaan van een experiment dat een duidelijke aanwijzing geeft dat de lading en niet de osmotische waarde van de zouten dit negatieve effect veroorzaakt. Om zeker te zijn van deze conclusie is dit experiment met verschillende zout- en suikeroplossingen herhaald.

3. *Voorspellende waarde van produkteigenschappen voor het gewichtsverlies*

In de voortgangsrapportage van augustus '92 wordt verslag gedaan van experimenten waaruit blijkt dat de dichtheid van het weefsel, het gewichtsverlies dat optreedt bij verwerking, gedeeltelijk kan verklaren. Het vervolgonderzoek richt zich op produkteigenschappen die aanvulling op deze verklaring van het gewichtsrendement kunnen geven.

4. *De textuur eigenschappen van champignons*

Het onderzoek naar de textuureigenschappen van champignons wordt uitgevoerd om het slinken en daarmee het gewichtsverlies beter begrijpbaar te maken. Het is echter ook van belang voor het onderzoek naar de ontwikkeling van champignonproducten. Bij dit onderzoek blijkt dat door bepaalde bewerkingen, zoals diepvriezen, de champignon taai wordt. De eerste experimenten moeten een



meetmethode selecteren die de taatheid van champignons kan meten. Dit onderzoek is uitgevoerd in samenwerking met de groep die het onderzoek naar de ontwikkeling van champignonprodukten uitvoert (Bartels).

## **Materiaal en Methoden**

1. *Nader onderzoek naar het effect dat de blancheeertijd heeft op het gewichtsverlies*  
Champignons zijn geblancheerd variërend van 2 minuten tot 30 minuten. Dit onderzoek is alleen uitgevoerd met hele champignons en bestaat uit 8 afzonderlijke experimenten. Na het blancheren zijn de champignons verwerkt tot gesteriliseerde champignons. Het rendement is berekend uit het uitlekgewicht en het gewicht van de verse champignon waarvan is uitgegaan.
2. *Herhaling van de experimenten over het effect van de samenstelling van de opgiel*  
Bij de normale verwerking van champignons is de opgietsamenstelling gevarieerd. De opgiel bestaan uit oplossingen van NaCl, NaSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>3</sub>Citraat en D-Glucose. Het rendement is berekend uit het uitlekgewicht en het gewicht van de verse champignon waarvan is uitgegaan.
3. *Voorspellende waarde van produkteigenschappen voor het gewichtsverlies*  
Per champignon worden de produkteigenschappen gemeten. Dezelfde champignon wordt vervolgens verwerkt, waarna het gewichtsverlies wordt gemeten. Aan de eerste experimenten is naast de dichtheid van het weefsel, het drogestofgehalte, de refractometerwaarde en de osmotische waarde gemeten. Er zijn momenteel echter onvoldoende resultaten om er betrouwbaar over te kunnen rapporteren.
4. *De textuur eigenschappen van champignons*  
Een partij champignons is een dag na de oogst in twee delen gesplitst. Eén deel is meteen verwerkt. Het andere deel is 2 dagen bewaard bij 20 °C voordat deze champignons werden verwerkt. De verwerkingsbehandelingen bestonden uit steriliseren en diepvrozen. Bij het steriliseren is de evacuatievloei stof gevarieerd (water vs alginaat oplossing), al of niet geblancheerd. Bij het diepvrozen is ook geëvacueerd met water en alginaat oplossing. Bovendien is er naast het diepvrozen zonder blancheer voorbehandeling, ook diepgevrozen zonder dat er geblancheerd is. Op deze wijze zijn in totaal 16 monsters gemaakt. De textuur is gemeten doormiddel van:  
- shear cell - plunjer van 2,5 mm diameter - wig met een hoek van 30°.

De sensorische metingen om de sensorische mate van taatheid van deze champignons vast te stellen moeten nog uitgevoerd worden. De resultaten, bestaande uit de mate van overeenkomst tussen de instrumentele meting en de sensorische meting, kunnen hier dan ook nog niet gepresenteerd worden.

## Resultaat en discussie

### 1. Nader onderzoek naar het effect dat de blancheertijd heeft op het gewichtsverlies

De resultaten van het rendement in relatie tot de blancheertijd is samengevat in Fig. 1.

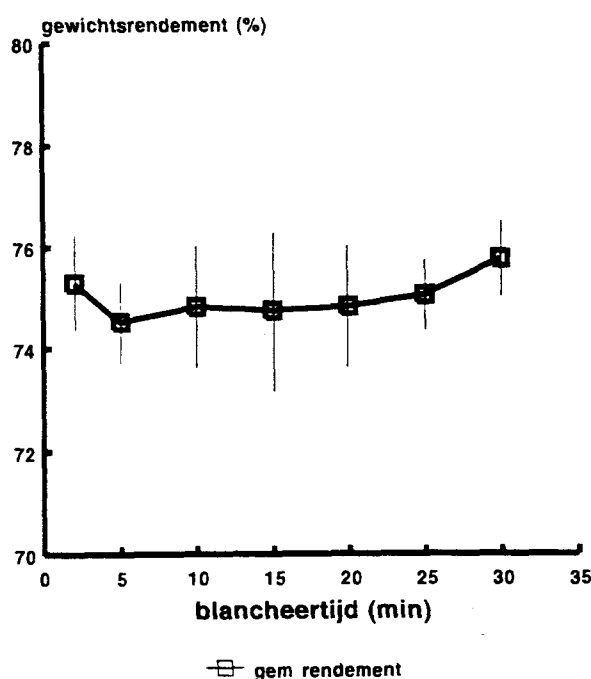


Fig. 1: Gewichtsrendement bij de verwerking van champignons, afhankelijk van de blancheertijd

Op basis van regressie analyse blijkt er geen significant verband te bestaan tussen de blancheertijd en het gewichtsrendement. Dit is in tegenspraak met de resultaten van eerder onderzoek waarbij een significant verschil in gewichtsverlies is vastgesteld tussen 5 en 15 minuten blancheren, ook al was dat verschil maar 1 %. De enige mogelijke verklaring van dit verschil in resultaat is dat het verschil in gewichtsverlies tussen 5 en 15 minuten blancheren te klein is om in de experimentele opzet, zoals deze hier is uitgevoerd, tot uiting te kunnen komen. In het vervolgonderzoek zal dan ook getracht worden met een andere proefopzet alsnog het verschil van 5 en 15 minuten zichtbaar te maken voor meerdere blancheertijden, om zo de functie van blancheertijd en rendement te leren kennen.

## 2. Herhaling van de experimenten over het effect van de samenstelling van de opgieter

De resultaten van het effect van de samenstelling van de opgieter is samengevat in Fig. 2.

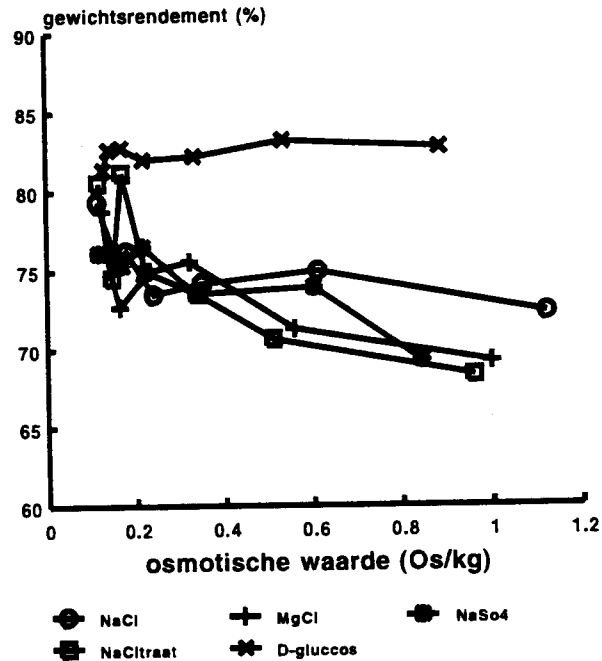


Fig. 2: Het gewichtrendement bij verwerking van champignons met in de opgieter opgelost, D-glucose, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, NaSO<sub>4</sub> en NaCltraat

Deze resultaten zijn een bevestiging van de resultaten van het eerste experiment (voortgangsrapportage, augustus 1992). Ook hier blijkt dat suiker, dat een osmotische waarde heeft en geen lading, geen effect heeft op het gewichtsverlies, terwijl zouten dat wel hebben. Bovendien blijkt uit deze experimenten dat de lading van de ionen een duidelijk effect heeft op het gewichtsverlies dat optreedt bij verwerking. Deze resultaten zijn een bevestiging van wat in voorgaande experimenten was vastgesteld, nl dat het effect dat zouten hebben op het gewichtsverlies, gebaseerd is op de ionogene eigenschappen van het zout en niet op de osmotische eigenschappen ervan.

## 3. Voorspellende waarde van produkteigenschappen voor het gewichtsverlies

De voorspellende waarde kan pas goed getoetst worden, indien er een redelijk groot aantal monsters zijn onderzocht. Momenteel zijn er onvoldoende resultaten om er betrouwbaar over te kunnen rapporteren.

4. De textuureigenschappen van champignons

De instrumentele metingen zijn uitgevoerd, maar de sensorische metingen moeten nog plaatsvinden. Resultaten bestaande uit de mate van overeenkomst tussen de instrumentele meting en de sensorische meting kunnen hierdoor ook nog niet gepresenteerd worden.

## **DE ONTWIKKELING VAN VERWERKINGSTECHNIEKEN VOOR CHAMPIGNONPRODUKTEN**

P.V. Bartels

### **A. VERSLAG OVER DE TWEEDE HELFT VAN 1992**

#### **Doelstelling**

Doel van dit project is het ontwikkelen van technieken voor het vervaardigen van champignonprodukten die de consument thuis of in de horeca kan nuttigen. Hiervoor moet het produkt langere tijd houdbaar zijn, meestal door invriezen, alvorens bijvoorbeeld gebakken te worden. Hoewel het produkt aan wisselende temperaturen wordt bloot gesteld, moet het wel vorm houden, dus niet significant slinken, en niet taai worden.

Het onderzoek heeft zich vooral geconcentreerd op de invloed van de blancheer- of evacueervloeistof op de produktkwaliteit en de invloed van het invriezen op deze kwaliteit. Gelet is op de textuur met name de taaiheid en verder de kleur, krimp van de hoed en de gewichtsverandering.

De ontwikkeling van methoden om de taaiheid van de diepvrieschampignon te beperken, indien geblancheerd, heeft het onderzoek in deze periode in belangrijke mate bepaald.

#### **Uitgevoerde experimenten zijn**

- A. Het effect van blancheren in zout water op de kwaliteit na diepvriezen en ontdooien.
- B. De invloed van het koelen na evacuatie op de kwaliteit van diepvrieschampignons.
- C. De vorming van samengestelde produkten met champignons en onder andere uien en paprika.
- D. De invloed van de concentratie citroenzuur bij de evacuatie of het blancheren van champignons met alginaat op de kwaliteit.
- E. Het effect van de invriessnelheid op het taai worden van champignons.

De instronbepalingen in het vervolg van dit onderzoek zijn in samenwerking met Eugène Schijvens uitgevoerd, en worden in zijn projectverslag beschreven.

Door een wijziging in de projectuitvoering worden de meeste droogproeven niet in het kader van het project voor verwerkingstechnieken van champignons uitgevoerd.

**Van de onderzoeken kunnen de volgende samenvattingen en conclusies gegeven worden:**

*Blancheren in zout water*

Champignons zijn geblancheerd in zout water tot 10 % NaCl en daarna ingevroren. Beoordeling vond plaats na ontdooien.

Onderzocht is of deze oplossingen gebruikt kunnen worden om een verbetering te krijgen op de textuur wat betreft taatheid, en verder zijn het rendement, de krimp, smaak en uiterlijk beoordeeld.

Geconcludeerd kan worden dat de taatheid toeneemt tot een toevoeging van 2% zout om daarna bij hogere concentraties NaCl weer af te nemen. Boven een concentratie van 4% zijn de champignons minder taaai dan het blanco produkt. Het rendement en de krimp worden over het algemeen negatief beïnvloed door een toevoeging van zout zoals aangegeven in figuur 1 en 2. Bij een toevoeging van 5% is een gering positief effect waarneembaar.

Het slinken van de champignons bij hogere concentraties zout is te verwachten door de osmotische werking van de zoutoplossing (osmotisch drogen).

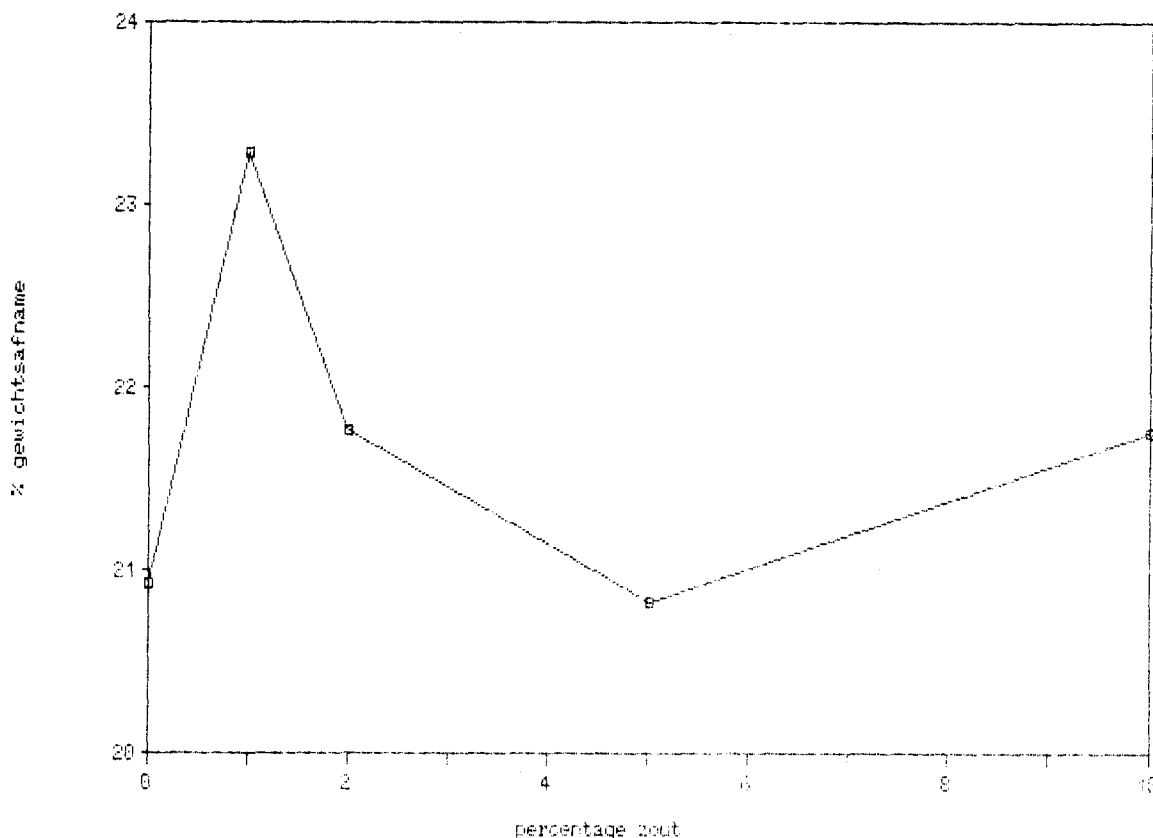


Fig. 1: Afname van het gewicht als functie van de zoutconcentratie bij blancheren

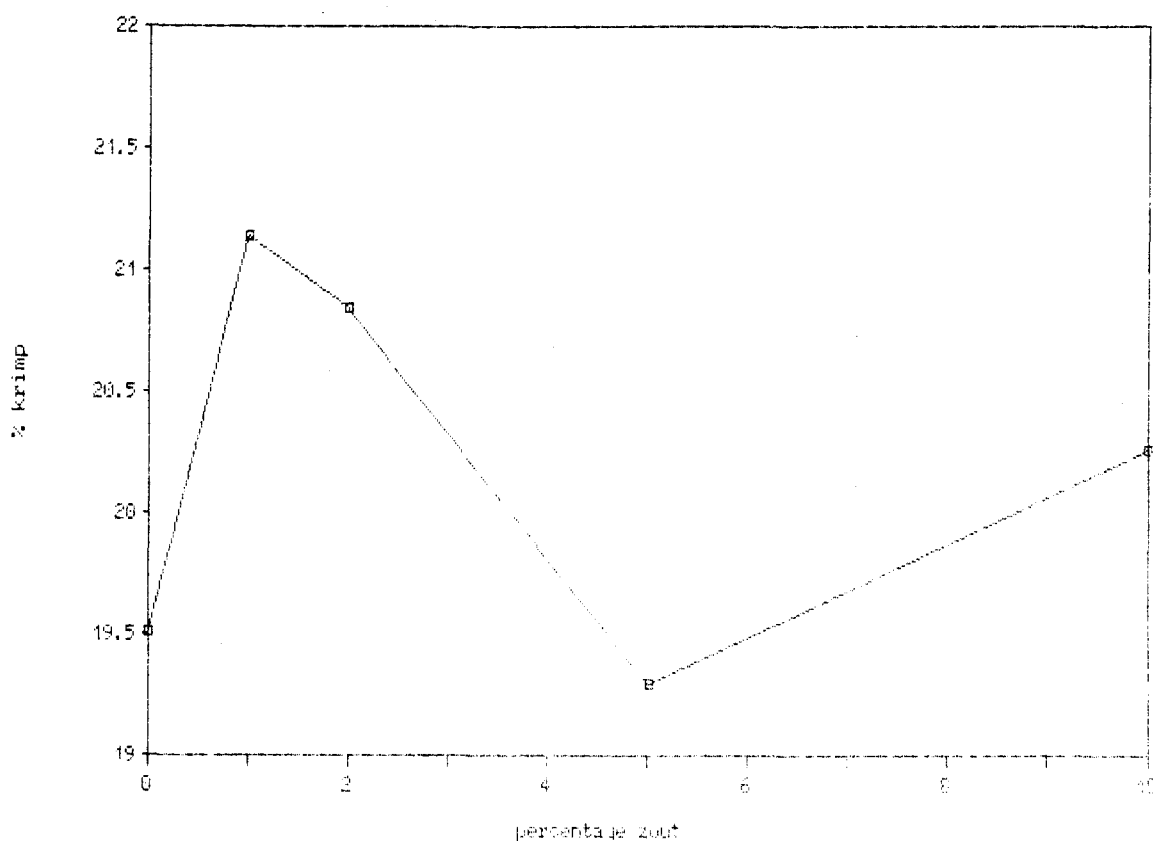


Fig. 2: Percentage krimp van de hoed ten gevolge van de zoutconcentratie bij blancheren

#### *Koelen na het evacueren van diepvrieschampignons*

Er zijn champignons onderzocht, die in water of in een 0.5% Alginaatoplossing met of zonder toevoeging van Calciumsulfaat zijn geëvacueerd. Beoordeling heeft plaatsgevonden na 48 uur koeling tot 2 - 4 graden Celsius en bij directe verwerking.

Het blijkt dat er geen significant effect is van het koelen op de taaiheid. Het gebruik van Calciumalginaat heeft een positief effect. De gekoelde produkten gaven een duidelijk grauwer uiterlijk. Een beter rendement en minder krimp worden bereikt met gebruik van koeling, in het bijzonder voor de champignons met de Calciumalginaatoplossingen. De rendementverbeteringen liggen tussen 16% voor een behandeling in water tot 7.5% bij een gekoelde Calciumalginaat oplossing. Een sensorisch panel beoordeelde over het algemeen de vers bewerkte champignons positiever, ook wat betreft de textuur. In het bijzonder de champignons die in de Calciumalginaat oplossing zijn geëvacueerd werden als beter beoordeeld.

#### *Vorming van samengestelde produkten*

Diepvries champignonburgers en worst zijn gevormd uit gesneden champignons met als extra ingrediënten snippers paprika, ui en verder Calciumalginaat. Het resultaat van de gefrituurde burgers lijkt aantrekkelijk, hoewel de samenhang van het gebakken produkt nog verder verbeterd wordt. Ook geroosterd zijn de burgers appetijtelijk.

*Invloed van citroenzuur op de kwaliteit van diepvrieschampignons*

Champignons zijn geëvacueerd in een Alginaat- met opvolgend een Calciumoplossing. Hierdoor ontstaat een Calciumalginaatcomplex in de gehele champignon. Toegevoegd is verder 0.1% citroenzuur in achtereenvolgens:

- 1) de Alginaatoplossing bij evacuatie
- 2) beide oplossingen bij de evacuatie
- 3) in het blancheerwater
- 4) bij de evacuatie- en blancheeroplossing

Tevens is een vergelijk gemaakt met oplossingen zonder citroenzuur.

Geconcludeerd kan worden, dat de toevoeging aan het blancheerwater (oplossing 3) een betere textuur met een geringere taaigheid geeft dan de andere oplossingen. Uiterlijk en smaak worden door het expertpanel beter beoordeeld dan de andere varianten. De krimp is voor deze variant echter het sterkst vergeleken met de blanco (1.5%) en het rendement is ook minder (3% absoluut).

*Invloed van de invriessnelheid op het taai worden van champignonschijfjes*

Onderzocht is of door een juiste invriessnelheid het taai worden van ontdooide champignons kan worden beperkt.

Champignonschijfjes met een dikte van 5, 10 en 15 mm zijn direct ingevroren of na geëvacueerd te zijn of na evacuatie en blanchering ingevroren. Invriezen heeft plaatsgevonden in stilstaande lucht van ongeveer -20 °C of in constant bewegende lucht van -35 °C.

Het blijkt dat de invriessnelheid voor verse en geblancheerde champignonschijfjes het hoogst is. Met bewegende en koudere lucht is de snelheid nog eens 4 tot 5 maal hoger. Het duurt ongeveer 2 s om een schijfje van 10 mm in te vriezen tot een temperatuur van -5 °C. Een schijfdikte van 15 mm betekent een invriestijd van ongeveer 50 s in stilstaande lucht en 10 s in een convectiestroom. De geëvacueerde schijfjes benodigen door hun grotere dikte na evacuatie ongeveer tweemaal zoveel tijd.

De taaigheid van de geblancheerde schijven na ontdooien ligt duidelijk hoger dan van de verse of alleen geëvacueerde champignons. De snelheid van invriezen blijkt hierop geen significante invloed gehad te hebben.

**B) PUBLICATIES**

Geen.



### C) PLANNING EERSTE HELFT VAN 1993

Voor 1993 zijn de volgende proeven gepland:

- \* Osmotisch drogen van dunne plakjes met daarna vacuümfrituren. Dit vormt de basis voor een interessante snack. Voor het osmotisch drogen zullen verschillende oplossingen gebruikt worden.
- \* Ontwikkeling van batters en coatings in aansluiting op het droogonderzoek o.a. voor het vasthouden van smaak en geur.
- \* Extrusie van champignonafval, zoals voetjes, samen met andere produkten zoals aardappel, paprika, ui of erwten.
- \* Onderzoek naar het effect van de soort champignon, zoals ras en ouderdom, op de smaak en textuur na bewerking.
- \* Vervolg op het effect van blancheren en invriezen op de textuur met toepassing van electronenmicroscopie in samenwerking met Eugène Schijvens.

## DSS STRATEGISCHE PLANNING

R.A.C.M. Broekmeulen

### A. VOORTGANG TWEEDE HALFJAAR 1992

Doel van dit project is het bestuderen van de bestaande en alternatieve afzetketens voor champignons in het kader van het thema integrale goederenstroombesturing. Integrale goederenstroombesturing is een logistiek vraagstuk en houdt in dat op de juiste momenten de juiste beslissingen over opslag, transport, bewerking en verwerking dienen te worden genomen. Hiervoor zijn modellen nodig voor het kwaliteitsverloop, het koelen en het verpakken van een bederfelijk produkt zoals champignons.

Voor het ontwikkelen van nieuwe markten voor champignons en het consolideren of uitbreiden op bestaande is het noodzakelijk om de condities in de afzetketens te kennen en te (gaan) beheersen. Hierbij moet gelet worden op verlengen van de houdbaarheid aan de ene kant en op het verkorten van de doorlooptijd aan de andere kant. Een ketenbeschrijving waarin alle acties en condities van teler tot consument zijn vastgelegd worden conditie-scenario's genoemd (CS). Het sectormodel wat met deze conditie-scenario's werkt is op dit moment opgebouwd uit drie lagen:

- 1 Aanmaak van potentieel aantrekkelijke conditie-scenario's.
- 2 Selectie van een set van relevante CS die voldoen aan de gewenste criteria (kwaliteit, kosten, exportactieradius, flexibiliteit, etc.) en die de sector volledig kunnen beschrijven (integraal).
- 3 Een doelprogrammeringsmodel dat bij de inrichting en besturing van de sector met behulp van de geselecteerde CS rekening houdt met de aanwezige en/of gewenste capaciteiten (koelen, verpakken en handling).

De hierbij gehanteerde invoerparameters zijn:

- de locatie van de betrokken bedrijven
- de investeringskosten
- de capaciteit
- de gehanteerde schaalgrootte
- de variabele kosten
- de doeltemperatuur
- het vermogen om de temperatuur te wijzigen uitgedrukt in een halfwaarde tijd
- de minimaal benodigde doorlooptijd

Verder zijn er voor sommige schakels nog specifieke invoerparameters beschikbaar, bijvoorbeeld voor de telers de oogstmethode, de produktkwaliteit en de wijze met het produkt. Ook voor de andere schakels, transport, gekoelde opslag, veilingen, distributiecentra, industrie en

markten zijn dergelijke specifieke invoerparameters beschikbaar. Met name voor de industrie en de markt zijn de invoerparameters surplus boete, boete bij niet leveren en gewenste kwaliteitsindex beschikbaar, waarmee de gebruiker de marktsituatie kan representeren.

Op basis van deze invoerparameters, de mogelijke CS's en het eerder genoemde sectormodel wordt een optimale organisatie met de bijbehorende fysieke stromen bepaald voor de sector. Per stroom wordt dan tevens vastgelegd wat de benodigde capaciteit zou moeten zijn, de invloed op de produktkwaliteit, de kosten, de doorlooptijd en nog een aantal relevante logistieke indicatoren.

Dit half jaar is een eerste prototype opgeleverd: AiDA for Mushrooms. AiDA is een acronym voor ATO Intelligent Decision Assistant. In AiDA zijn de volgende modules opgenomen:

- \* Een expertsysteem met regels over het afkoelgedrag van champignons in diverse koelinstallaties en over het houdbaarheidsverloop in relatie tot de temperatuur. Deze regels zijn op eenvoudige wijze uit te breiden en/of aan te passen. De huidige set kennisregels is voornamelijk van kwantitatieve aard.
- \* Een grafisch hulpmiddel voor het bouwen van conditie-scenario's. De informatie over telersgroepen, veilingen, groothandelaren en markten is gegroepeerd in "blokken" en kan zeer gebruikersvriendelijk worden ingevuld en onderhouden volgens de "point & click" methode. Elk blok wordt gepresenteerd in de vorm van een icoon op een elektronisch werkblad. Met de muis kan men deze iconen manipuleren. Op een inzichtelijke wijze wordt zo een conditie-scenario opgebouwd.
- \* Berekening van kengetallen zoals resterende houdbaarheid, doorlooptijd, exploitatie- en investeringskosten en het nut voor de markt. M.b.v. grafieken worden de afstemmingsproblemen en het kwaliteitsverloop in de keten zichtbaar gemaakt.
- \* Op basis van de berekende kengetallen kunnen handmatig de interessante CS worden geselecteerd.
- \* M.b.v. een doelprogrammeringsmodel wordt de benodigde koelcapaciteit toegewezen aan de diverse schakels in de sector. Economische schaalvoordelen spelen een rol bij deze beslissingen op strategisch niveau.

De uitkomsten van het systeem gevalideerd met een compleet sectormodel. In dit model zijn ruim 200 CS opgenomen. Het merendeel van de gebruikte gegevens zijn gebaseerd op het verslagjaar 1989.

Het gebruik van een DSS dat helpt bij het inzichtelijk maken van effecten op kwaliteit, kosten e.d. als gevolg van alternatieve ketenscenario's dient goed ondersteund te worden. Het is uit de literatuur bekend dat het op peil houden van "kennis" in een expertsysteem/DSS een kritische factor is. Dit kwam ook naar voren bij de validatie van het "kleine" sectormodel en bij de confrontatie met potentiële gebruikers. De nadruk zal in dit onderzoek liggen op de analyse van de

champignonketenproblematiek en de generatie van oplossingen. Door gerichte inzet van OR/AI technieken zal dit probleem waar mogelijk worden ondervangen.

Voorlopige conclusies:

- Met het huidige prototype is het mogelijk om zowel de logistieke organisatie als de logistieke prestatie adequaat te beschrijven;
- Tevens verschaft het de sector een instrument om een toekomstvisie ten aanzien van IKB te ontwikkelen en deze op effecten te laten doorrekenen;
- Door verdere verbreding, verdieping en confrontatie met de praktijk kan het prototype uitgroeien tot een volwaardig beslissingsondersteunend systeem met een grote toegevoegde waarde voor met name de strategische sectorplanning.

## B. PUBLIKATIES

Geen

## C. PIANNING EERSTE HALFJAAR 1993

Op dit moment moet de gebruiker alle conditie-scenario's met de hand aanmaken. Deze taak wordt ondoenlijk bij het genereren van alle mogelijke alternatieve afzetketens. Een nog te implementeren automatische CS-generator kan deze taak aanzienlijk versnellen en zorgt er tevens voor dat het hele scala van potentiële afzetketens wordt meegenomen. De huidige 222 handmatig gegenereerde CS worden met een CS-generator eenvoudig uitgebreid tot tienduizenden CS. Omdat het LP-model dat de capaciteitstoeewijzing berekent slechts met enkele honderden CS kan werken, moet er een goede selectie worden gemaakt. Voor het ondersteunen van dit selectieproces zijn er een aantal AI-technieken beschikbaar die zullen worden getest op hun bruikbaarheid. In de zomer van 1993 zal een prototype worden opgeleverd dat voorzien is van modules voor de automatische generatie en selectie van CS.

In de loop van het voorjaar zal regelmatig contact worden gezocht met de praktijk om het huidige prototype te presenteren. Uit deze gesprekken dienen aanbevelingen en suggesties om het uiteindelijke systeem te kunnen verbeteren te worden gedaan.

Voorlopig zal het systeem niet worden uitgebreid met de effecten van verpakken. Hiervoor ontbreken op dit moment de benodigde modellen. Deze modellen worden niet binnen de duur van dit project verwacht.

## KOELEN EN BEWAREN VAN CHAMPIGNONS

J.W. Rudolphij

### A. VOORTGANG TWEEDE HALFJAAR 1992

#### Doelstelling

Onderzoek van de invloed van het toegepaste koelsysteem (factoren: luchtsnelheid, luchtvochtigheid en de sturing van het systeem nl. continu of aan/uit in enkele variaties) op de koelsnelheid, het vochtverlies en de bruinverkleuring van champignons.

#### Werkplan 1992

Met betrekking tot de fasering van het project (looptijd 3 jaar) zijn de werkzaamheden in het 2e jaar hoofdzakelijk gericht op het verzamelen van experimentele gegevens als grondslag voor het vaststellen van kentallen toe te passen in het koelcelmodel KOBAC en voor het vaststellen van de invloed van koelprocessen op de kwaliteit van het produkt. Omdat verdamping van water uit een produkt een belangrijk deel van het koeleffect uitmaakt, staan koeltijd en vochtverlies in relatie tot elkaar. Met de in 1992 uit te voeren proefserie van 10 proeven wordt beoogd een vergelijkend afkoelproces en opslagproces te realiseren tussen een droog en een vochtig koelregime. Voor dit doel worden twee gelijkwaardige koelruimtes benut; de eerste uitgerust met een verdamper-koelinstallatie (droog koelregime), de ander met een koelinstallatie met water-lucht-warmtewisselaar (vochtig koelregime). In beide ruimtes kan het lucht-circulatie-debiet worden ingesteld d.m.v. een toerenregeling van de ventilatoren. Criteria voor een vergelijking van de resultaten zijn: koeltijd, optredend vochtverlies, mate van bruinverkleuring van de champignons.

#### Voorgenomen proeven 1992

- afkoelproef (circ. 1500 m<sup>3</sup>/h) + aansluitende opslag (circ. 500 m<sup>3</sup>/h; 2 dagen)
- afkoelproef (circ. 1000 m<sup>3</sup>/h) + aansluitende opslag (circ. 500 m<sup>3</sup>/h; 2 dagen)
- afkoelproef (circ. 500 m<sup>3</sup>/h) + aansluitende opslag (circ. 500 m<sup>3</sup>/h; 2 dagen)
- 2 \* afkoelproef (circ. 1500 m<sup>3</sup>/h)
- 2 \* afkoelproef (circ. 1000 m<sup>3</sup>/h)
- 2 \* afkoelproef (circ. 500 m<sup>3</sup>/h)
- inlooppoef

Totaal 10 proeven

## Werkzaamheden 2e helft 1992

Van de proefserie van 10 zijn in de eerste helft van 1992 3 proeven gerealiseerd en in de tweede helft van 1992 nog eens 3. Het programma ligt dan ook achter op schema. Eén en ander is het gevolg van vertraging en aanloopproblemen in de eerste helft van het jaar (zie verslag 1e halfjaar 1992) en onvoldoende beschikbare tijd in de warme maanden van de tweede helft van het jaar om de achterstand op de planning in te halen.

Met betrekking tot de invloed van de koelmethode op de bruinverkleuring en het vochtverlies zijn in de figuren 1 en 2 enkele resultaten opgenomen. In figuur 1 is uitgezet de gemiddelde L-waarde van de Minolta L-a-b - meting van een monster van champignons uit een koelcel als maat voor de bruinverkleuring.

De bruinverkleuring neemt toe (L-waarde neemt af) met de tijd doorgebracht in de koelruimte, 0 h, 18h, 60 h.

De verschillen tussen effecten bij natte of droge koeling zijn uitermate klein. De tendens van de meetresultaten is, dat in de eerste fase (afkoeling) een nat koelsysteem een marginaal positieve invloed heeft op de bruinverkleuring. Bij langere opslag (halvering van de luchtcirculatie) blijft in de natte koelcel het klimaat te vochtig en zet de bruinverkleuring daar meer door dan in een droge koelcel.

In figuur 2 is het vochtverlies uitgezet van 2 proeven met verschillend uitgangsmateriaal direct na afkoeling, gedurende de opslagperiode en totaal over het gehele proces. De vochtverliezen van het natte proces zijn uiteraard geringer.

Voorlopige conclusies: - Het effect op de bruinverkleuring van champignons tussen het gebruik van natte koeling tegenover droge koeling is uitermate gering. Tijdens de geforceerde afkoeling geeft een natte koeling een iets beter resultaat. Opslagkoeling kan beter onder wat drogere omstandigheden plaatsvinden. De bepaling van de bruinverkleuring van champignons op basis van de L-waarde van een Minolta L-a-b-meting is onvoldoende gevoelig voor het aantonen van kleurverschillen in de beginfase van de bruinverkleuring. Om een uitspraak te doen over het effect van de luchtsnelheid rond de champignons op de bruinverkleuring zijn de aanwezige proefgegevens nog te incompleet.

## B. PUBLICATIES

Geen

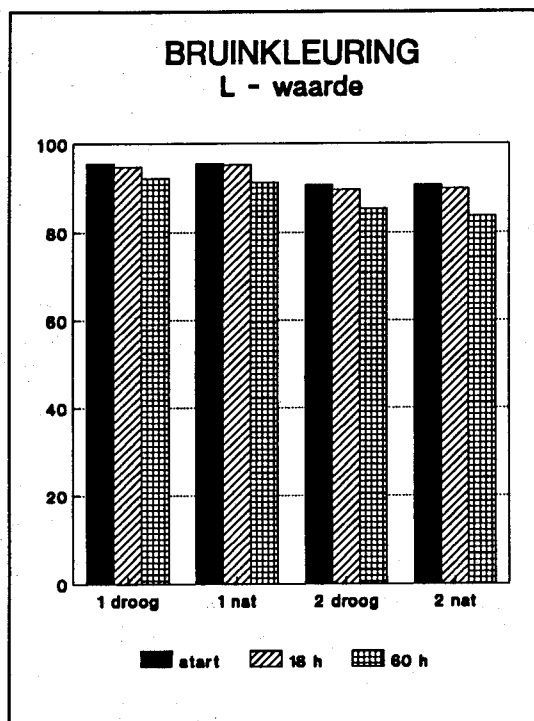


Fig.1 Bruinverkleuring

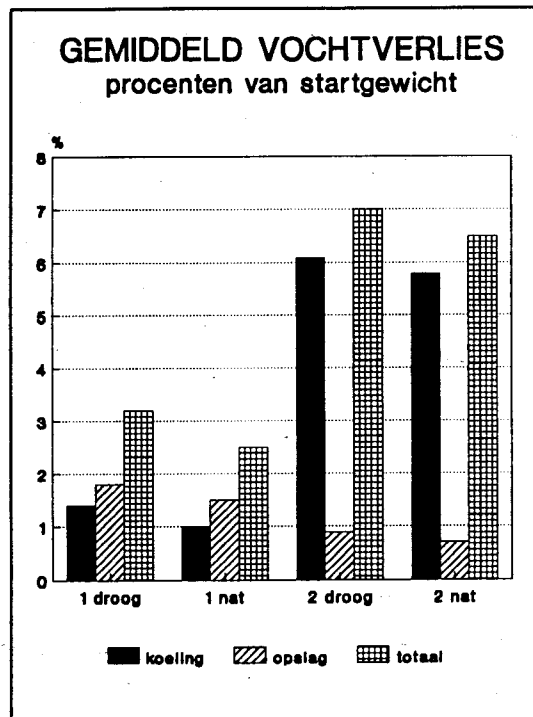


Fig.2 Vochtverlies

### C. PLANNING 1e HALFJAAR 1993

1. Nagaan de mogelijkheid van schaalverkleining voor de nog af te werken proeven
2. Afwerking proefserie

## **CBA EN CHAMPIGNONS**

B.H. van Zwol

### **A. VOORTGANG TWEDE HALFJAAR 1992**

#### **Doelstelling**

Het meten van de kwaliteits bepalende aspecten van champignons op een objectieve manier met behulp van computer beeld analyse. Uiteindelijk zullen de met CBA ontwikkelde meetroutines worden gebruikt voor het bouwen van een prototype kwaliteitscontrole apparaat waarmee deze metingen ook onder praktische omstandigheden kunnen worden uitgevoerd.

#### **Geplande activiteiten**

- Beoordeling van opname aspecten voor kleur en verkleuring, lengte en dikte metingen en mate van hoedopening op een tray.
- Ontwikkeling van meetroutines voor de keuze van champignons voor het bepalen van kleur en verkleuringen of voor het meten van steellengte, hoeddiameter en mate van hoedopening.
- Metingen van steellengte en hoeddiameter, bij ligging van de champignon op hoed, steel of zijkant.
- Metingen aan champignon"mengels" op een tray.
- Herhalingsmetingen en beoordeling van de meetresultaten.

#### **Verslag werkzaamheden**

Uitvoerige metingen aan de lichtomstandigheden in de belichtingskast tonen aan dat de lichtverdeling in de kast mede afhankelijk is van het object wat gemeten wordt. Met de regeling van de belichting, het instellen van de reflectoren en de diffusoren werd een zo gelijkmatig mogelijke belichting nagestreefd. Met behulp van een calibratieplaat met daarop 25 witte schijfjes en een correctie-algoritme worden verschillen in de lichtverdeling verder gecorrigeerd. Door deze correctie toe te passen kunnen grijswaardeverschillen in het beeld worden teruggebracht van 20 grijswaarden tot minder dan 5 grijswaarden. De camera-instellingen en de licht-sterkte in de kast worden geijkt met een grijs en een wit plaatje voorafgaand aan de metingen. De tray's met champignons waaraan wordt gemeten zijn ook voorzien van een ijkplaatje om afzonderlijke metingen te kunnen corrigeren.

Verschillen in gemiddelde grijswaarde tussen champignons van eenzelfde partij blijken gerelateerd te zijn aan de grootte van de champignons (aantal pixels).

Meetroutines zijn ontwikkeld voor het meten aan tray's met champignons met de hoed naar de camera gekeerd en met de steel naar de camera gekeerd en met de op de zijkant liggende champignons.



Voor de hoedmeting zijn de kenmerkende aspecten: gemiddelde grijswaarde, grijswaarde bij 70 % van de pixels, grootste en kleinste feretmeting en de mate van verkleuringen op de hoed.

Bij de steelmeting wordt gekeken naar verkleuringen aan de steel, hoogte en breedte van de hoed en de aanwezigheid van "open hoeden". Uit de opnamen waarbij de champignon op de zijkant ligt, worden de hoeddiameter en de dikte van de hoed gemeten als ook de lengte van de steel en de steeldiameter.

Voor het uitvoeren van metingen aan partijen champignons is gekozen voor champignons van de grootte "middel". Vergelijkende metingen zijn uitgevoerd tussen de klassen I-1-60, I-2-60, II-2-60 en II-2-60industrie.

Uit de uitgevoerde metingen lijken naast natuurlijk hoeddiameter en steellengte, de diameterverhouding hoed/steel, de gemiddelde grijswaarde van de hoed, het percentage verkleuringen op de hoed en de kleur en verkleuringen aan de steel, goede kenmerken voor de classificering van de partijen.

De ontwikkelde methode voor het calibreren van de camera-instellingen en het gebouwde correctie-algoritme zijn van essentieel belang voor het onderling vergelijkbaar uitvoeren van praktische metingen.

De metingen aan meerdere partijen champignons hebben tot doel de in CBA-opzicht kenmerkende verschillen op te sporen.

## B. PUBLICATIES

Artikel aangeboden aan: "Champignoncultuur"

## C. PLANNING EERSTE HALFJAAR 1993

De geplande werkzaamheden moeten inzicht geven in het onderscheidingsvermogen van CBA voor het indelen in klassen op basis van praktische metingen.

- Metingen t.b.v. classificatie van partijen champignons
- Ontwikkeling van een classificatie-systeem voor het indelen van partijen champignons.
- Ontwikkeling van opname opstelling voor het meten in bulk