

Afdeling Microscopie
VERSLAG 80.70

1980-12-22
Pr.Nr. 12.469

Projekt: Onderzoek monsters land- en tuin-
bouwprodukten t.b.v. "Sprenger".

Onderwerp: Microscopisch onderzoek van
enkele op verschillende wijzen
behandelde sperciebonen.

Projekt: Onderzoek monsters land- en tuinbouwprodukten t.b.v.
"Sprenger".

Onderwerp: Microscopisch onderzoek van enkele op verschillende wijzen behandelde sperciebonen.

Doel

Door middel van microscopisch onderzoek nagaan of er structurele verschillen waar te nemen zijn tussen de op verschillende wijze voorbehandelde diepvries sperciebonen en verse sperciebonen.

Samenvatting

Aan de hand van coupes werd nagegaan of door het blancheerproces bij diepvriesgroenten verschillen in structuur ontstaan die microscopisch waarneembaar zijn. Tevens werd aan de hand van preparaten en met behulp van een katalasebepaling nagegaan of door dit blancheerproces de enzymactiviteit wordt beïnvloed.

Conclusie

Microscopisch konden geen structuurverschillen tussen het verse materiaal en de op verschillende wijze geblancheerde sperciebonen worden waargenomen.

Aan de hand van coupes en de TT-kleuring kon worden vastgesteld dat bij blancheren de enzymactiviteit van de dehydrogenasen wordt vernietigd. Bij een thermische schok gebeurde dit slechts gedeeltelijk. Ook met behulp van een katalasetest kon dit worden vastgesteld.

Verantwoordelijk: drs W.J.H.J. de Jong
Medewerkers/samenstellers: V. Pinckaers, W. de Jong.

1. Inleiding

Diepvries sperciebonen dienen voor het invriezen te worden geblancheerd (2 à 3 minuten in water van 95°C).

Bonen die niet geblancheerd zijn voor het invriezen vormen onder commerciële opslagcondities vrij snel een afwijkende geur.

Deze afwijkende geur ontwikkelt zich door de activiteiten van katalase en peroxydase.

De veranderingen worden waarschijnlijk niet veroorzaakt door lipidoxydatie. Gedurende het blancheren verandert het chlorophyl in pheophytine en de textuur neigt elastisch te worden op voorwaarde dat het water niet te hard is (1).

Het is logisch dat de blancheertijd zo kort mogelijk wordt gehouden, omdat een excessief contact met water leidt tot verlies van nutriënten door uitlogen en verlies van smaak en geur (1).

Bij het hier beschreven onderzoek door het RIKILT is op de eerste plaats nagegaan of er microscopisch structuurverschillen waar zijn te nemen bij de op verschillende wijze geblancheerde boontjes.

Hierbij is speciaal gekeken naar veranderingen in het chlorophyl, die ontstaan kunnen zijn bij het blancheren en diepvriezen.

Op de tweede plaats is aan de hand van coupes nagegaan of er verschil in enzymactiviteit in de verschillend behandelde boontjes is waar te nemen. Voor microscopisch onderzoek op enzymactiviteit leent zich bijzonder goed de enzymgroep van de dehydrogenasen (DH). DH-reacties laten zich zoals bekend met behulp van 2,3,5 tetrazoliumchloride (TT) zichtbaar maken. Omdat bij reductie van het oplosbare reagens het helder rode, onoplosbare formazan ontstaan, is een exacte histologische lokalisering mogelijk (2).

Een andere mogelijkheid om enzymactiviteit aan te tonen is een katalasetest. Katalase behoort tot de groep van de peroxydasen (POD). Het katalase maakt uit een verdunde oplossing van waterstofperoxyde zuurstof vrij. Door gebruik te maken van een gecalibreerde stijgbuis gevuld met een hoeveelheid monster-materiaal en verdund H₂O₂ kan men de in b.v. 24 uur gevormde hoeveelheid zuurstof meten (4).

2. Uitvoering

2.1 Monsters

Monsters waren afkomstig van het "Sprenger Instituut" te Wageningen. Ze waren als volgt voorbehandeld:

I Normaal geblancheerde sperciebonen (3 à 4 minuten in kokend water) en ingevroren.

II Niet geblancheerde sperciebonen, ingevroren.

IV Sperciebonen geblancheerd door een korte warmtebehandeling (thermische schok), ingevroren.

5 Niet geblancheerde en niet ingevroren sperciebonen.

Monsters I, II en IV behoren tot dezelfde soort sperciebonen.

Monster 5 kwam rechtstreeks uit de detailhandel en was vers.

2.2 Uitvoering

2.2 a. Het microscopisch onderzoek op structurele verschillen aan de hand van coupes.

Van bovenstaande monsters werden m.b.v. een vriesmicrotoom coupes gemaakt van ± 60 μm . Ter verbetering van het contrast werden kleuringen uitgevoerd met methyleenblauw en methyloord volgens de gebruikelijke methoden.

2.2 b. Het microscopisch onderzoek op enzymactiviteitsverschil m.b.v. een TT-kleuring van de coupes.

Van de monsters werden coupes gemaakt (± 60 μm dik) en deze werden gedurende 24 uur gebracht in een 1% waterige oplossing van tetrazoliumchloride (TT) en bij 30°C geïncubeerd in het donker i.v.m. de lichtgevoeligheid van TT.

Vervolgens werd met water afgespoeld (3).

2.2 c. De bepaling van de katalaseactiviteit

Van ieder monster werd 0,5 g in een gecalibreerde buis gebracht. Vervolgens werd H_2O_2 0,5% toegevoegd. Een stop met capillair werd aangebracht en de buis werd omgekeerd in een rekje geplaatst in een broedstoof bij 37°C . Na 24 uur werd de hoeveelheid gevormde O_2 afgelezen (4).

3. Resultaten en discussie

3.1 a. Het onderzoek op waarneembare structurele verschillen.

Het microscopisch onderzoek van de coupes van de verschillende monsters leverde weinig structurele verschillen op, die zouden kunnen worden toegeschreven aan de voorbehandeling van de spercieboontjes.

Speciale aandacht werd geschonken aan de vergelijking van het chlorophyl in de cellen van het mesocarp. Chlorophylkorrels bestaan uit ronde lichaampjes variërend van grootte tot 12 µm. In gedroogde toestand zouden de korrels min of meer bruin worden. Dit verschijnsel werd in de diverse sperciebonen niet waargenomen. Wel bleken een aantal chlorophylkorrels te zijn gedeformeerd en enigszins uiteengetrokken te zijn.

Verder onderzoek is hier noodzakelijk. Ook zou een onderzoek met fluorescentie-microscopie hierbij mogelijk tot resultaten leiden. Dit zal in een volgend onderzoek worden uitgewerkt.

3.1 b. Het onderzoek van de enzymactiviteit van m.b.v. TT-gekleurde coupes.

Bij het microscopisch onderzoek van de met TT-gekleurde coupes bleken duidelijke verschillen bij de verschillende monsters op te treden. De dehydrogenaseactiviteit in monster I bleek afwezig. Door het blancheerproces was vermoedelijk de enzymactiviteit vernietigd.

Het monster II (de niet geblancheerde boontjes) vertoonde een lichte paarskleuring door het formazan. Het is bekend dat het dehydrogenase vooral in de kiem voorkomt.

Monster IV (de met een thermische schok behandelde boontjes) vertoonde ook enige paarskleuring, zij het zeer gering. Waarschijnlijk waren door de thermische schok niet alle enzymen vernietigd.

Monster 5 (verse boontjes) gaf een zeer duidelijke paarskleuring te zien. Naast amorf formazan werden ook anisotrope formazankristallen gevormd.

3.1 c. Het resultaat van het onderzoek op katalaseactiviteit.

In de stijgbuizen werden de volgende hoeveelheden zuurstof vastgesteld:

Monster I (geblancheerd en ingevroren)	0,2 ml
Monster II (niet geblancheerd, ingevroren)	2,6 ml
Monster IV (behandeld met thermische schok en ingevroren)	1,0 ml
Monster 5 (vers materiaal)	2,4 ml

Het bleek dat de katalaseactiviteit door blancheren nagenoeg verdwenen was (0,2 ml). Veel verschil in activiteit tussen monster II en 5 was er kennelijk niet (2,6 ml en 2,4 ml).

Ondanks de thermische schok bleek de enzymactiviteit in monster IV niet geheel vernietigd te zijn (1,0 ml). Er werd echter niet zoveel O₂ gevormd als in de onbehandelde monsters.

4. Conclusies

Het onderzoek naar structurele verschillen, die zouden ontstaan door het blancheerproces (resp. de thermische schok) van spercieboontjes door middel van microscopisch onderzoek, heeft in eerste instantie niet tot resultaten geleid. Verder onderzoek zal noodzakelijk zijn.

Wel werd vastgesteld aan de hand van de TT-test in microscopische preparaten dat de enzymactiviteit van het dehydrogenase door het blancheren wordt vernietigd. Bij een thermische schok werd deze activiteit sterk gereduceerd, evenals bij het diepgevroren ongeblancheerde materiaal. Een grote activiteit - vooral in het zaad - van de spercieboon werd waargenomen in het verse materiaal.

Wat betreft de katalaseactiviteit werd vastgesteld dat deze vernietigd wordt door het blancheren en sterk gereduceerd wordt door de thermische schok. Niet van invloed op de enzymactiviteit lijkt het diepvriezen van vers materiaal.

Literatuur

1. Materials and Technology (Volume VII), Longman Group Ltd. London 1975. Hoofdstuk 11, p.758.
2. Huss W.; Mikroskopische Untersuchungen über Enzym-Aktivitäten bei verschiedenen konservierten Maiskörnern. Protokoll IAG-Arbeitstagung te Graz (1979) p.80-87.

3. Onderzoek van Zaaizaden, Het Rijksproefstation voor Zaad-
controle, Methodiek en achtergrond. (1964), 10.1. 10.2.
4. Het microscopisch veevoeder-, meststoffen- en voedingsmiddelen-
onderzoek, De Jong, W.J.H.J. (1980) p.93.

c.c.: Van Doesburgh,
adj. directeur,
sektorhoofd (3x),
directie VKA (dhr. Top),
afd. Microscopie,
leesportefeuille (5x),
Normalisatie,
projectbeheer,
Sprenger Instituut (dhr. Steinbuch).

dJ/W



12.469.5