

2015•2016  
FACULTEIT INDUSTRIËLE INGENIEURSWETENSCHAPPEN  
*master in de industriële wetenschappen: biochemie*

## Masterproef

Ontwikkeling en validatie van colorimetrische methoden voor de bepaling van kwaliteitsparameters van vruchtensappen en ciders met de Thermo Scientific Gallery

Promotor :  
ing. Liesbet PAULS

Promotor :  
Mevr. EMILIE VAN DE WEYER  
dr. HANNE DAMM

Pär Meijen

*Scriptie ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie*

Gezamenlijke opleiding Universiteit Hasselt en KU Leuven

## **Woord vooraf**

Ik zou graag dr. Hanne Damm en ir. Emilie Van De Weyer bedanken voor de kans om dit onderzoek uit te voeren en de tijd die ze in de begeleiding van dit onderzoek gestoken hebben. Daarnaast wil ik ook ing. Liesbet Pauls bedanken voor de steun en het advies dat ze me gedurende dit onderzoek gegeven heeft.

Verder wil ik iedereen bij Konings bedanken voor de leerrijke ervaring en de hulp die ze me tijdens de stage gegeven hebben.

Ik wil ook graag mijn ouders bedanken voor de kansen die ze me gegeven hebben om deze opleiding te volgen en Samantha Peeters voor haar steun en hulp bij het schrijven van deze thesis. Als laatste zou ik ook nog Geert Stassen willen bedanken om mij de afgelopen 5 jaar aan deadlines en andere verplichtingen te helpen herinneren.



## Inhoudstabel

Woord vooraf.....	1
Lijst van tabellen .....	5
Lijst van figuren .....	7
Abstract.....	9
Abstract in English .....	11
1 Inleiding .....	13
2 Kwaliteitsparameters.....	15
2.1 Organische zuren .....	15
2.1.1 Citroenzuur .....	15
2.1.2 Appelzuur .....	15
2.1.3 Wijnsteenzuur.....	16
2.2 Sorbitol.....	16
2.3 Pectine.....	17
2.3.1 Galacturonzuur .....	18
2.3.2 Arabinan .....	18
3 Analysemethoden voor kwaliteitsparameters.....	19
3.1 Gaschromatografie.....	19
3.1.1 Organische zuren .....	19
3.1.2 Sorbitol en galacturonzuur.....	19
3.2 HPLC .....	19
3.2.1 Bepaling van organische zuren.....	21
3.2.2 Bepaling van galacturonzuur.....	22
3.2.3 Bepaling van sorbitol.....	22
3.3 HPAEC .....	22
3.4 Colorimetrische methoden.....	23
3.4.1 Colorimetrische bepaling van galacturonzuur.....	23
3.4.2 Colorimetrische bepaling van L-appelzuur .....	24
3.4.3 Colorimetrische bepaling van sorbitol.....	24
3.4.4 Colorimetrische bepaling van citroenzuur.....	25
3.4.5 Colorimetrische bepaling van D-appelzuur.....	26
3.4.6 Colorimetrische bepaling van wijnsteenzuur .....	26
3.4.7 Colorimetrische bepaling van arabinan .....	26
3.5 Conclusie literatuurstudie .....	27
4 Instellen methoden .....	29
4.1 Galacturonzuur.....	29
4.1.1 Materiaal.....	29

4.1.2	Methode .....	29
4.1.3	Resultaten .....	32
4.1.4	Conclusie .....	34
4.2	L-appelzuur .....	35
4.2.1	Materiaal .....	35
4.2.2	Methode .....	35
4.2.3	Resultaten .....	36
4.2.4	Conclusie .....	39
4.3	Sorbitol.....	41
4.3.1	Materiaal .....	41
4.3.2	Methode .....	41
4.3.3	Validatie .....	42
4.3.4	Resultaten .....	42
4.3.5	Conclusie .....	44
4.4	Citroenzuur .....	45
4.4.1	Materiaal .....	45
4.4.2	Methode .....	45
4.4.3	Validatie .....	46
4.4.4	Resultaten .....	46
4.4.5	Conclusie .....	47
4.5	D-appelzuur .....	49
4.5.1	Materiaal .....	49
4.5.2	Methode .....	49
4.5.3	Resultaten .....	50
4.5.4	Conclusie .....	51
5	Besluit.....	53
	Bibliografie.....	55

## Lijst van tabellen

Tabel 1: Benodigde volumes voor de bereiding van reagens 1 en 2 voor de enzymatische bepaling van galacturonzuur en glucuronzuur.....	29
Tabel 2: Resultaten van herhaalbaarheidsbepaling van de glucose-, fructose- en sucrose methode van Thermo Fisher Scientific met de Gallery analyzer .....	31
Tabel 3: Resultaten van de bepaling van reproduceerbaarheid voor de galacturonzuurmethode met de gemiddelde meetwaarde en standaardafwijking in g/l en de variatiecoëfficiënt CV voor lage (troebel perensap), gemiddelde (appel ciderbasis) en hoge (appel ciderbasis) concentratie.....	32
Tabel 4: Meetresultaten en berekeningen van terugvindingsexperiment met de galacturonzuurmethode uitgevoerd op appelciderbasis .....	32
Tabel 5: Benodigde volumes voor de bereiding van reagens 1 en 2 voor de enzymatische bepaling van L-appelzuur .....	35
Tabel 6: Resultaten voor de bepaling van de reproduceerbaarheid bij lage (appelciderbasis) , gemiddelde (troebel perensap) en hoge (perenciderbasis) concentratie van de L-appelzuurmethode .....	36
Tabel 7: Resultaten van de terugvindingsexperimenten met de L-appelzuurmethode door standaardadditie op appelciderbasis .....	37
Tabel 8: Vergelijking van resultaten voor de bepaling van L-appelzuur in ciderbasis via de enzymatische methode en via titratie.....	38
Tabel 9: Bereiding van de reagentia R1 en R2 voor de bepaling van sorbitol en xylitol	41
Tabel 10: Resultaten voor de bepaling van de reproduceerbaarheid van de sorbitolmethode voor lage (appel ciderbasis) gemiddelde( peren ciderbasis) en hoge (troebel perensap) sorbitolconcentratie .....	42
Tabel 11: Resultaten van de terugvindingsexperimenten met de sorbitolmethode uitgevoerd op perenciderbasis .....	43
Tabel 12: Bereiding van de reagentia R1 en R2 voor de bepaling van citroenzuur .....	45
Tabel 13: Resultaten voor de bepaling van de reproduceerbaarheid van de citroenzuurmethode voor lage (perensap), gemiddelde (perensap) en hoge (perenciderbasis) citroenzuurconcentratie met gemiddelde en standaardafwijking in g/l en de variatiecoëfficiënt in % .....	46
Tabel 14: Resultaten van de terugvindingsexperimenten met de citroenzuurmethode uitgevoerd op perenciderbasis. ....	46
Tabel 15: Volumes voor de bereiding van reagens 1 en 2 voor de bepaling van D-appelzuur .....	49
Tabel 16: Resultaten van de bepaling van de reproduceerbaarheid van de D-appelzuurmethode voor lage (appel ciderbasis) , gemiddelde (appel ciderbasis) en hoge concentratie (peer ciderbasis) .....	50
Tabel 17: Samengevat resultaat van de verschillende bepalingen .....	53



## Lijst van figuren

Figuur 1: Structuurformule van citroenzuur.....	15
Figuur 2: Structuurformules van L- appelzuur (links) en D-appelzuur (rechts) .....	15
Figuur 3: Structuurformule van wijnsteenzuur.....	16
Figuur 4: Reacties in de vrucht van fotosynthetische planten om sorbitol als energiebron te gebruiken met de enzymen sorbitol-dehydrogenase (SDH-NAD) en sorbitol-oxydase (SOX) .....	16
Figuur 5: Schematische structuur van pectine met bovenaan de afkorting voor de verschillende substructuren homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan-I (RG I) en rhamnogalacturonan-II (RG II) .....	17
Figuur 6: Structuurformule van D-galacturonzuur.....	18
Figuur 7: Enzymatische omzetting van arabinan tot arabinose.....	18
Figuur 8: Output van HPLC analyse van enkele suikers in vruchtensap met een UPLC BEH Amide kolom, mobiele fase 0,05% triethylamine in water met een debiet van 0,25 ml/min, kolomtemperatuur 85°C en detectie met ELSD.....	21
Figuur 9: HPLC-chromatogram van scheiding van organische zuren met pieken van oxaalzuur (1) , wijnsteenzuur (2), appelzuur (3), maleïnezuur (4), barnsteenzuur (5) en fumaarzuur (6). De scheiding werd uitgevoerd met een C18 kolom en als mobiele fase wordt een perchloorzuuroplossing met pH 2 gebruikt met een debiet van 1 ml/min en constante temperatuur van 30°C. Als detectiemethode wordt UV detectie bij 210 nm gebruikt.....	21
Figuur 10: Output van een HPAEC-bepaling van rhamnose, galactose, glucose, xylose en mannose met natriumhydroxide oplossing als eluens en detectie door een PAD .....	23
Figuur 11: Enzymatische bepaling van glucuronzuur en galacturonzuur met behulp van UDH .....	24
Figuur 12: Principe van L-appelzuur bepaling met Megazyme kit.....	24
Figuur 13: Principe van enzymatische sorbitolbepaling met behulp van Megazyme kit.....	25
Figuur 14: Principe van citroenzuurbepaling met Megazyme kit .....	25
Figuur 15: Principe van D-appelzuurbepaling met Megazyme kit.....	26
Figuur 16: Structuurformule van het gekleurde complex bij de meting van wijnsteenzuur met de vanadaat-methode. ....	26
Figuur 17: Reacties gebruikt in de Megazyme kit voor de bepaling van arabinan .....	26





## **Abstract**

Het fruitverwerkend bedrijf Konings in Zonhoven ontwikkelt in haar laboratorium voortdurend nieuwe methoden om de kwaliteit van hun vruchtensappen en ciders te onderzoeken en verbeteren. Een goede kennis van de samenstelling van de producten is immers essentieel. Het doel van deze masterproef is om analysemethoden te ontwikkelen voor een aantal componenten zoals galacturonzuur, sorbitol, appelzuur en citroenzuur die momenteel niet geanalyseerd worden, of waarvan de externe analyses duur en tijdrovend zijn.

De nieuwe methoden moeten aan een aantal eisen voldoen. Ten eerste verwacht Konings een accurate bepaling van de beoogde componenten, dat wil zeggen een juistheid nabij de 100% en een standaardafwijking die zo laag mogelijk is. Ten tweede moet de kostprijs van deze nieuwe methodes lager zijn dan die van de externe analyses. Ten slotte moeten de analyses snel en eenvoudig uitvoerbaar zijn door de laboranten.

Om deze redenen werd gekozen voor een geautomatiseerde spectrofotometer, de Thermo Scientific Gallery. Enzymatische analysemethodes voor galacturonzuur, sorbitol, citroenzuur en appelzuur werden geoptimaliseerd voor gebruik met de Gallery analyzer en vervolgens gevalideerd.

Uit de validatie blijkt dat de methodes voor galacturonzuur, appelzuur, citroenzuur en sorbitol een reproduceerbaarheid en juistheid hebben die vergelijkbaar zijn met andere testen ontwikkeld voor de Gallery analyzer. Daarnaast bedraagt de kost per analyse slechts 10 tot 26 eurocent en duren de analyses slechts enkele minuten.



## **Abstract in English**

Konings in Zonhoven is constantly developing new methods to improve the quality of their fruit juices and ciders. A good knowledge of the composition of the products is essential. The purpose of this master's thesis is to develop methods of analysis for a number of components such as galacturonic acid, sorbitol, malic acid, and citric acid which are not currently being analyzed, or of which the external analyses are expensive and time consuming.

The new methods have to meet a number of requirements. Konings expect an accurate determination of the target components, that is to say an accuracy close to 100% and a standard deviation which is as low as possible. Additionally, the analyses must be quick and easy to perform and cost less than the external analyses.

An automated spectrophotometer, the Thermo Scientific Gallery, was chosen to perform the analyses. Enzymatic test kits for galacturonic acid, sorbitol, citric acid and malic acid were optimized for use with the Gallery analyzer and subsequently validated.

The validation shows that the methods for galacturonic acid, malic acid, citric acid and sorbitol have a reproducibility and accuracy which are comparable with other tests developed for the Gallery analyzer. In addition, the cost per analysis is only 10 to 26 cents and the analysis only take a few minutes



## 1 Inleiding

Konings NV is een bedrijf dat gespecialiseerd is in productie van vruchtensappen en alcoholische dranken voor verschillende merken. In Zonhoven bevinden zich twee vestigingen van het bedrijf. Op de Konings K2 site worden jaarlijks 50 000 ton appels en peren verwerkt tot versgeperst vruchtensap of concentraat. Zowel het concentraat als vers vruchtensap kan verkocht worden of dienen als basis voor de productie van cider en andere dranken. Na verwerking in K2 worden de producten in site K1 verpakt en vervolgens vervoerd naar de klant. Om de kwaliteit van het eindproduct te garanderen beschikt Konings over meerdere labo's die op verschillende stadia van het productieproces het product analyseren.

De samenstelling van het gebruikte vruchtensap heeft een invloed op de kwaliteit van het eindproduct. Om deze reden is de bepaling van een aantal belangrijke parameters van het vruchtensap gewenst. Tijdens de verwerking is het opvolgen van bepaalde parameters belangrijk om de kwaliteit van het product te garanderen.

Zo is kennis over de samenstelling van organische zuren in het vruchtensap belangrijk omdat deze voor een groot deel de smaak van het eindproduct bepalen. Daarnaast is het belangrijk om de mogelijke aanwezigheid van ongewenste stoffen aan te kunnen tonen in vruchtensap en cider. Voorbeelden hiervan zijn: sorbitol, aanwezig in peer dat wegens zijn laxerende werking in hoge concentraties ongewenst is in het eindproduct, en galacturonzuur, dat mogelijk een ongewenste bruinkleuring kan veroorzaken in heldere vruchtensappen en ciderbasissen. De te bepalen componenten en verschillende analysemethodes worden verder besproken in de literatuurstudie.

Bepaling van een aantal kwaliteitsparameters zoals suikergehalte, alcoholgehalte, tannine, melkzuur, azijnzuur, ... worden momenteel reeds uitgevoerd in het labo op site K2. Voor een aantal andere parameters zoals sorbitol en galacturonzuur wordt beroep gedaan op externe analyse.

Deze externe analyse heeft twee nadelen. Ten eerste moeten de stalen opgestuurd worden naar een extern labo, waardoor het langer duurt voordat de resultaten beschikbaar zijn. Snelle controle van bepaalde componenten is om deze reden niet mogelijk. Ten tweede heeft deze externe analyse een relatief hoge kostprijs. Indien de analyse uitgevoerd zou worden in het labo op site K2 blijft de kostprijs mogelijk beperkt.

Wegens de lange wachttijd voor resultaat en de hoge kostprijs van deze externe analyses wordt nagegaan of deze componenten ook in het labo bepaald kunnen worden met reeds aanwezige apparatuur. Als dit niet mogelijk is worden andere methodes onderzocht die wel in staat zijn de gewenste componenten volgens de gewenste specificaties te bepalen.

Het doel van deze masterproef is het ontwikkelen van accurate analysemethoden voor appelzuur, citroenzuur, sorbitol en galacturonzuur die in het labo uitgevoerd kunnen worden met een kortere analysetijd en lagere kostprijs dan de huidige externe analyse. De bepaling van de verschillende componenten zal eerst geëvalueerd worden op de reeds aanwezige Thermo Scientific Gallery automatische spectrofotometer.

Dit toestel is in staat om gelijktijdig op meerdere stalen verschillende testen uit te voeren. Verdunnen, toevoegen van reagentia en meten van de absorbantie gebeuren volledig automatisch. Na de meting berekent het toestel de concentratie aan de hand van een vooraf gemeten ijklijn en zijn de resultaten af te lezen in het bijgeleverde programma. Door gebruik van cuvetten met klein volume blijft het reagentieverbruik beperkt waardoor de kostprijs per test lager is dan bij manuele uitvoering.

Voor de bepaling van de componenten worden enzymatische kits ontworpen voor auto-analyzer of manueel gebruik aangepast voor gebruik met de Gallery analyzer.

Deze kits bevatten steeds een enzym dat de omzetting van de te bepalen component katalyseert. Het enzym van de kits voor galacturonzuur, D-appelzuur en citroenzuur verbruikt tijdens deze reactie een hoeveelheid van het co-enzym NADH of NAD<sup>+</sup> die recht evenredig is met de hoeveelheid omgezet substraat. Aangezien NADH licht absorbeert bij 340 nm kan de concentratie van het substraat berekend worden door de toename of afname van absorbantie bij 340 nm te interpoleren op een ijklijn van de te bepalen component. In de literatuurstudie worden de verschillende methodes verder besproken.

Nadat de methodes geprogrammeerd zijn wordt elke methode gevalideerd om te garanderen dat de verkregen resultaten voldoen aan de gestelde kwaliteitseisen.

## Deel I: Literatuuronderzoek

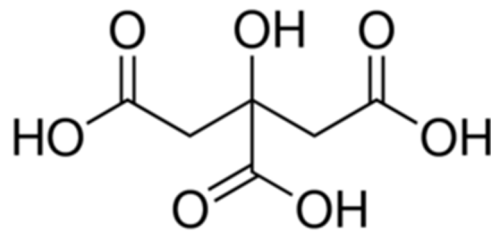
### 2 Kwaliteitsparameters

#### 2.1 Organische zuren

Organische zuren spelen een belangrijke rol in het suikermetabolisme van verschillende vruchten. De hoeveelheid en verhouding van de organische zuren in de vrucht veranderen gedurende de rijping en zijn bepalend voor de geur, kleur en smaak van het vruchtensap. Nadat de vrucht geoogst is daalt het gehalte aan organische zuren met belangrijke smaakveranderingen als gevolg. Analyse van de organische zuren in de vruchten levert informatie over de kwaliteit en versheid van de vrucht en is belangrijk om een product te leveren dat steeds voldoet aan de opgestelde eisen (Flores, Hellín, & Fenoll, 2012).

##### 2.1.1 Citroenzuur

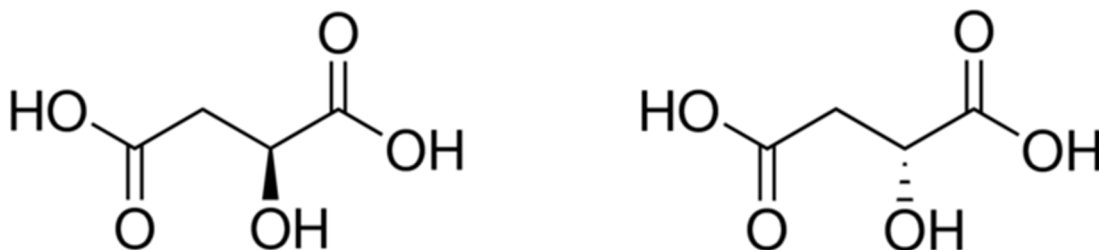
Citroenzuur is een zwak organisch zuur dat door alle aerobe organismen in kleine hoeveelheden geproduceerd wordt in de Krebscyclus. Het is een belangrijke component in heel wat vruchten en het meest voorkomende organische zuur in citrusvruchten. Daarnaast is het ook een veelgebruikt additief in de voedingsindustrie waar het gebruikt wordt om een zure smaak te geven aan dranken en voeding. Daarnaast verlaagt het ook de pH van het product zodat de kans op microbiële groei kleiner wordt (Horváth-Kerkai & Stéger-Máté, 2012; Verhoff & Bauweleers, 2012).



Figuur 1: Structuurformule van citroenzuur (Sigma-Aldrich)

##### 2.1.2 Appelzuur

Appelzuur is een organisch zuur dat net zoals citroenzuur geproduceerd wordt in de Krebscyclus. Het is het belangrijkste organische zuur in appels en komt in de natuur enkel voor als L-appelzuur. Aanwezigheid van D-appelzuur in vruchtensap wijst op toevoeging van synthetisch geproduceerd appelzuur (Kuhnert & Kuhnert, 2016).

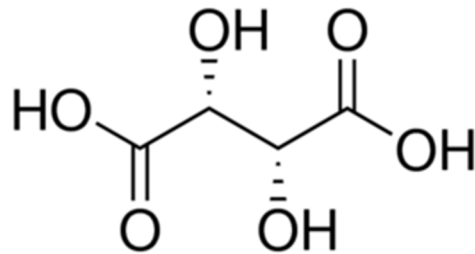


Figuur 2: Structuurformules van L- appelzuur (links) en D-appelzuur (rechts) (Sigma-Aldrich)



### 2.1.3 Wijnsteenzuur

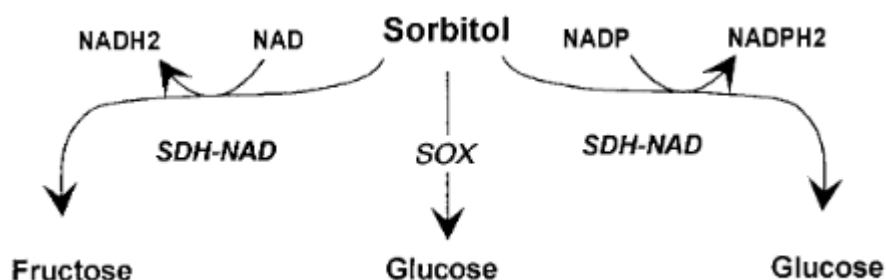
Wijnsteenzuur is een organisch zuur dat vooral voorkomt in druiven maar dat ook in andere vruchten aanwezig kan zijn. Het wordt gebruikt in de voedingsindustrie als antioxidant, bakpoeder en zuurteregelaar. De structuurformule van wijnsteenzuur wordt weergegeven in Figuur 3 (Kassaian & Kassaian, 2000).



Figuur 3: Structuurformule van wijnsteenzuur (Sigma-Aldrich, 2016b)

### 2.2 Sorbitol

Sorbitol is een suikeralcohol dat gebruikt wordt als kunstmatig zoetstof. Daarnaast komt het ook van nature voor in een aantal vruchten zoals appels, peren en kersen. Verschillende studies bevestigen dat sorbitol gevormd wordt in de bladeren van planten als product van de fotosynthese (Dietrich et al., 2007). Vervolgens wordt het sorbitol naar de vrucht getransporteerd waar het wordt omgezet tot fructose en glucose volgens de reacties die afgebeeld zijn in Figuur 4 (Escobar-Gutiérrez & Gaudillère, 1996).



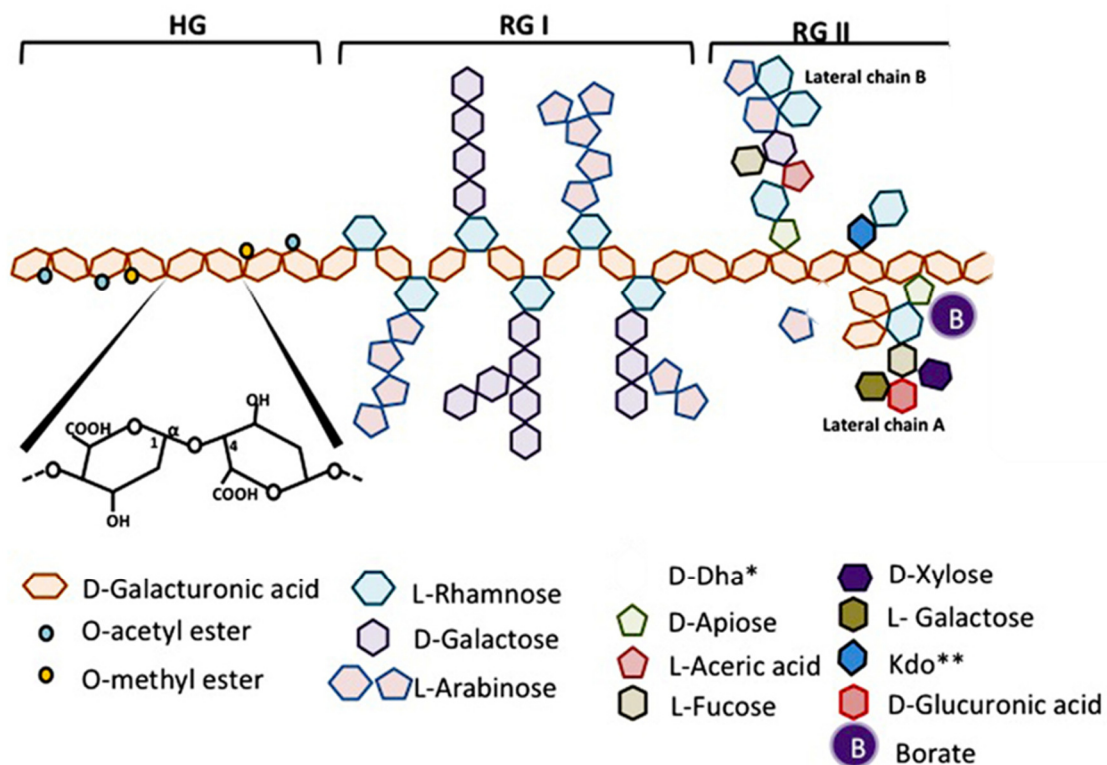
Figuur 4: Reacties in de vrucht van fotosynthetische planten om sorbitol als energiebron te gebruiken met de enzymen sorbitol-dehydrogenase (SDH-NAD) en sorbitol-oxydase (SOX) (Escobar-Gutiérrez & Gaudillère, 1996)

Voorals bij peer blijft echter een hoeveelheid sorbitol in de vrucht aanwezig die wegens haar laxerende eigenschappen ongewenst is in te hoge concentraties. In de literatuur worden voor perensap sorbitolconcentraties van 10 tot 25 g/l vermeld en voor appelsap 2,5 tot 7 g/l (Dietrich et al., 2007). Uit onderzoek naar de effecten van sorbitol blijkt dat dosissen vanaf 0,15 g sorbitol per kg lichaamsgewicht bij mannen en 0,4 g/kg bij vrouwen een laxerend effect kunnen hebben (N. Koizumi M. Fujii, R. Ninomiya, Y. Inoue, T. Tsukamoto, 1983).

## 2.3 Pectine

Pectine is een verzameling van complexe polysacchariden die in grote hoeveelheden in de primaire celwand van planten voorkomen. Pectine is verantwoordelijk voor de stevigheid van de plant, het behoud van de extracellulaire waterfase en bescherming van de cel. Figuur 5 toont dat pectine opgebouwd is uit homogalacturonan, rhamnogalacturonan-I en rhamnogalacturonan-II. Homogalacturonan is een lineaire homopolymeer van galacturonzuur met daarop enkele methyl- of acetylesters. Rhamnogalacturonan-I bestaat uit afwisselend galacturonzuur en rhamnose met daarop zijketens van arabinan of galactan. Rhamnogalacturonan-II bestaat uit een galacturonzuur keten met daarop meer complexe zijketens (Horsmans Poulsen et al., 2008).

Tijdens de productie van heldere vruchtensappen wordt pectinase toegevoegd die de pectinestructuur afbreekt zodat de extractie van het sap uit de vrucht efficiënter verloopt. Pectinase is een verzamelnaam voor verschillende enzymen die in staat zijn verschillende delen van de pectinestructuur af te breken. De arabinanstructuur (zie verder in 2.3.2) die op sommige rhamnoseresiduen aanwezig is en vrijkomt door afbraak van de pectinestructuur kan in helder perenconcentraat voor een ongewenste “haze” zorgen als de structuur niet volledig is afgebroken. Om deze reden is een bepaling van zowel galacturonzuur als arabinan gewenst (Horsmans Poulsen et al., 2008).



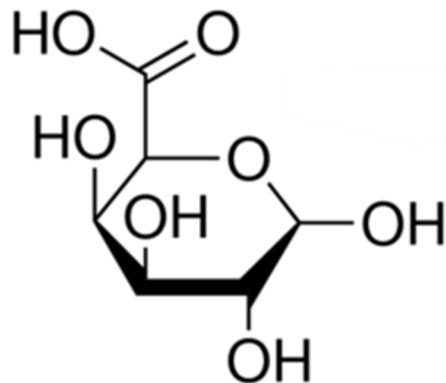
\*D-Dha = 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid

\*\*Kdo = 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid

Figuur 5: Schematische structuur van pectine met bovenaan de afkorting voor de verschillende substructuren homogalacturonan (HG), rhamnogalacturonan-I (RG I) en rhamnogalacturonan-II (RG II) (Leclere, Cutsem, & Michiels, 2013)

### 2.3.1 Galacturonzuur

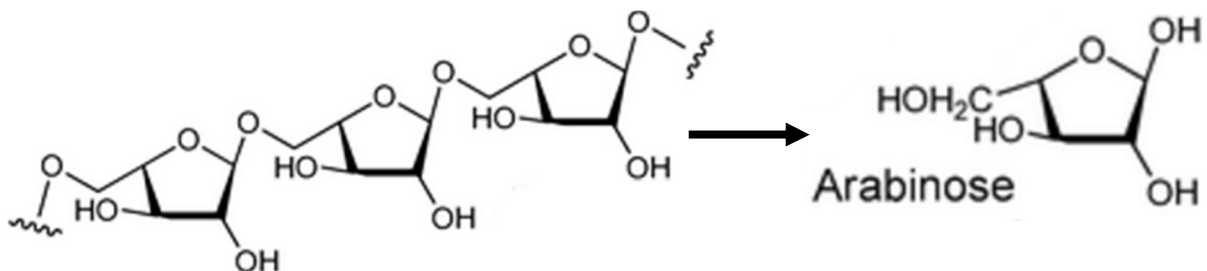
Zoals weergegeven wordt in Figuur 6 is galacturonzuur een geoxideerde vorm van D-galactose. Het is een bouwsteen van zowel homogalacturonan als rhamnogalacturonan (Mohnen, 2008). Door toevoegen van pectinase tijdens de extractie van het vruchtensap komt het galacturonzuur vrij in de oplossing. Na verloop van tijd kan door het galacturonzuur een niet-enzymatische bruinkleuring optreden in vruchtensap met een ongewenste bruine kleur als gevolg. Deze bruinkleuring is sterker als er meer galacturonzuur aanwezig is en de reactie verloopt sneller als het sap bewaard wordt op hogere temperatuur (Ibarz, Garza, & Pagán, 2008).



Figuur 6: Structuurformule van D-galacturonzuur (Sigma-Aldrich, 2016a)

### 2.3.2 Arabinan

Zoals weergegeven wordt in Figuur 7 is arabinan een polysaccharide dat bestaat uit een keten van arabinosemoleculen. Tijdens de productie van vruchtensap komt arabinan vrij door enzymatische afbraak van de pectinestructuur aanwezig in de celwand van de vruchten. Het arabinan komt als een oplosbaar suiker vrij, maar kan na verandering van temperatuur of pH aanleiding geven tot een lichte neerslag. Deze lichte neerslag geeft een troebeling of "haze" aan heldere vruchtensappen. Om deze neerslag tegen te gaan wordt pectinase toegevoegd die voldoende L-arabinofuranosidase en endo-1,5-L-arabinase bevat. Deze enzymen breken het arabinan volledig af tot het oplosbare arabinose waardoor er geen troebeling ontstaat (Horsmans Poulsen et al., 2008).



Figuur 7: Enzymatische omzetting van arabinan tot arabinose (Megazyme International Ireland, 2011)

### 3 Analysemethoden voor kwaliteitsparameters

De hierboven besproken kwaliteitsparameters zijn te bepalen met behulp van een aantal verschillende analysetechnieken. Elke techniek heeft verschillende voor- en nadelen die verder besproken worden.

#### 3.1 Gaschromatografie

Gaschromatografie (GC) maakt gebruik van een kolom waardoor het staal in gasvorm loopt om de stoffen te scheiden en vervolgens te kwantificeren met verschillende mogelijke detectiemethoden. De scheiding gebeurt op basis van de affiniteit van de component voor de gebruikte kolom. Hoe meer een bepaalde component bindt op de kolom, hoe langer het duurt voordat deze component de detector passeert. Voor de meting van het staal wordt met behulp van een standaard voor elke component de tijd die nodig is om de kolom te doorlopen bepaald. Deze tijd is een retentietijd en wordt gebruikt om de verschillende componenten te identificeren. Een nadeel van GC is dat vluchtige derivaten van de te bepalen componenten bereid moeten worden opdat scheiding op een kolom mogelijk is. Deze staalvoorbereiding wordt vaak beschouwd als een tijdrovende factor. Een voordeel is wel dat er GC-methodes zijn ontwikkeld waarbij zowel organische zuren, sorbitol, arabinose, galacturonzuur en een reeks andere componenten in één analyse bepaald worden (Katona, Sass, & Molnár-Perl, 1999).

##### 3.1.1 Organische zuren

Organische zuren zijn te bepalen met GC gekoppeld aan een *Flame Ionisation Detector* (FID). Het nadeel van deze methode is de uitgebreide staalvoorbereiding: na centrifugatie en verdunning van het staal met NaOH wordt het staal dat de zuurresten bevat op een anionenwisselaar gebracht. Vervolgens worden de zuurresten geëluëerd met methanol en wordt methyljodide toegevoegd om er methylesters van te vormen. De gemethyleerde stalen worden uiteindelijk na toevoeging van een interne standaard gescheiden met GC. Detectie wordt uitgevoerd met FID en massaspectrometrie. (Barden, M. Croft, J. Murby, 1997)

##### 3.1.2 Sorbitol en galacturonzuur

Een GC-MS-methode om sorbitol en galacturonzuur te bepalen samen met de organische zuren werd ontwikkeld door Katona, Sass en Molnár-Perl (1999). Na derivatisatie van de componenten tot hun trimethylsilyl-oxime wordt de oplossing over een DB-5 kolom geleid waarvan de stationaire fase bestaat uit Phenyl-methylpolysiloxane. De analyse duurt 45 minuten en is in staat om meer dan 60 componenten te scheiden en identificeren. (Katona et al., 1999)

#### 3.2 HPLC

Een veelgebruikte analysemethode voor analyse van vruchtensappen is High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Met behulp van deze methode kunnen verschillende stoffen gescheiden en gedetecteerd worden in één analyse. Het staal wordt als een vloeistof, in tegenstelling met GC, door een kolom geleid die gevuld is met een stationaire fase. Deze bestaat meestal uit silicaballetjes die zijn gecoat met een stof waarvoor de te scheiden componenten een bepaalde affiniteit hebben. Hoe hoger de

affiniteit van de stof voor de kolom hoe langer het duurt vooraleer ze uit de kolom komen. De tijd tussen het injecteren van het staal en het moment dat een component de kolom verlaat is de retentietijd van die component. Bij gebruik van een apolaire C18 kolom lopen polaire verbindingen door de kolom terwijl meer apolaire verbindingen tijdelijk binden met de stationaire fase.

Na scheiding op de kolom worden de verschillende stoffen gedetecteerd als ze de kolom verlaten. Er zijn verschillende detectiemethoden mogelijk met elk hun voor- en nadelen (Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, 2012).

Een veelgebruikte detectiemethode is *UV-Vis detectie* waarbij een fotometer continu de absorptie van de oplossing meet bij een bepaalde golflengte. De absorptie is een maat voor de concentratie van de gescheiden component en de identificatie gebeurt aan de hand van de retentietijd. Om deze methode toe te passen op componenten die niet in het UV-Vis gebied absorberen moeten er eerst derivaten van bereid worden.

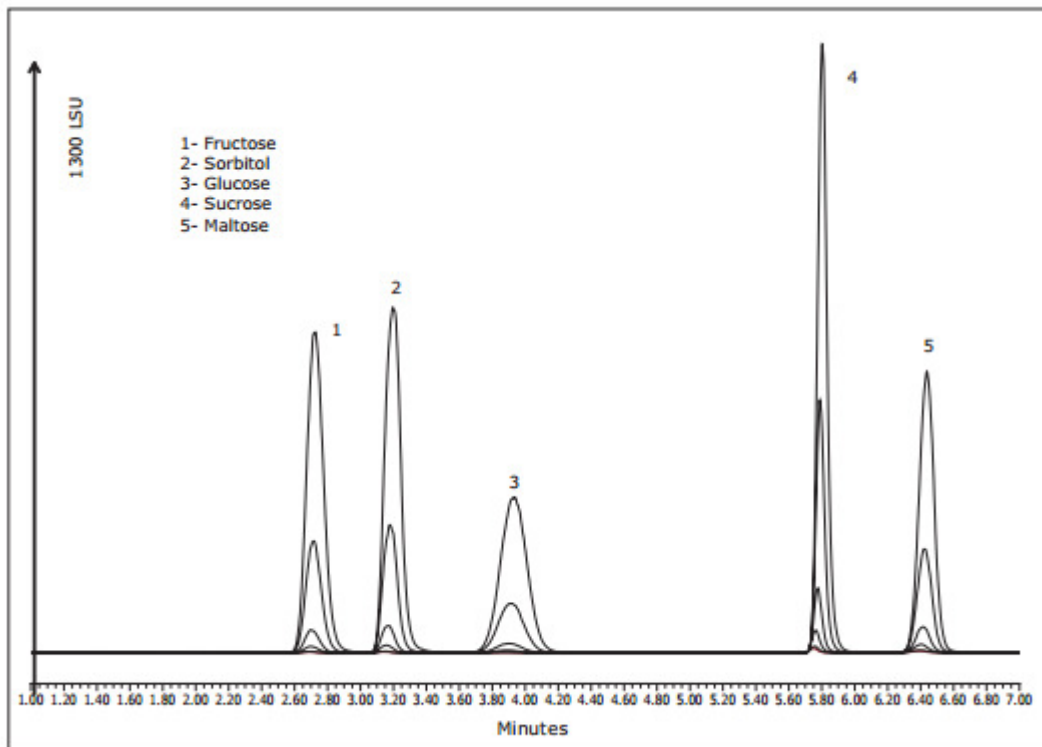
Een gelijkaardige methode is de *Diode Array Detector (DAD)*. Deze detector meet ook in het UV-Vis gebied maar heeft als voordeel tegenover normale UV-Vis detectie dat het in staat is om een volledig spectrum in één keer te meten. Hierdoor is het mogelijk de gescheiden componenten ook te identificeren aan de hand van hun spectrum (Shui & Leong, 2002).

Een andere detectiemethode is *Refractive Index (RI) detectie*. Hierbij worden veranderingen in de brekingsindex van de oplossing gebruikt om de componenten te detecteren. Deze methode kan gebruikt worden om bepaalde stoffen zoals suikers te detecteren zonder voorafgaande derivatisatie maar heeft als nadeel dat het veel minder gevoelig is dan bijvoorbeeld UV-detectie (Zielinski et al., 2014).

*Pulsed Amperometric Detector (PAD)*. Deze detector legt een werkpotentiaal aan in korte pulsen op de oplossing. De passerende koolwaterstoffen worden geoxideerd waardoor een kleine stroom volgt. Deze stroom wordt gemeten waarna de potentiaal omkeert om de op de elektrode gebonden stof terug te reduceren. De potentiaal waarbij deze stroom loopt kan gebruikt worden om de stof te identificeren en de hoeveelheid stroom is een maat voor de concentratie van de stof (Lee, 2015).

*Evaporative Light Scattering Detection (ELSD)* is de detectiemethode die door Benvenuti en Burgess (2002) gebruikt wordt om suikers te detecteren zonder derivatisatie. De detector vernevelt en verhit de mobiele fase die uit de kolom komt zodat het oplosmiddel verdampt en de opgeloste delen vrijkomen in de detector. Vervolgens worden de vrije deeltjes belicht en de hoeveelheid lichtverstrooiing wordt gemeten. De hoeveelheid lichtverstrooiing is afhankelijk van de grootte van de vrije deeltjes. Omdat de grootte van de deeltjes afhankelijk is van de concentratie van de deeltjes in de oplossing kan de lichtverstrooiing gebruikt worden om de concentratie van de deeltjes te bepalen door interpolatie van een ijklijn. Figuur 8 geeft de output van een analyse weer waarop duidelijk wordt dat een aantal suikers op korte tijd gescheiden kunnen worden (Benvenuti & Burgess, 2012).

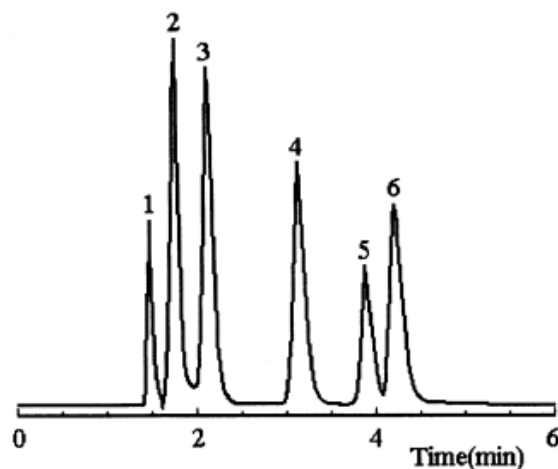
Een voordeel van HPLC is dat de staalvoorbereiding over het algemeen eenvoudiger is dan bij GC (Velterop & Vos, 2001).



**Figuur 8:** Output van HPLC analyse van enkele suikers in vruchtensap met een UPLC BEH Amide kolom, mobiele fase 0,05% triethylamine in water met een debiet van 0,25 ml/min, kolomtemperatuur 85°C en detectie met ELSD (Benvenuti & Burgess, 2012).

### 3.2.1 Bepaling van organische zuren

HPLC is een veelgebruikte methode om organische zuren te bepalen omdat alle componenten in één analyse geanalyseerd kunnen worden (Nour, Trandafir, & Ionica, 2015). Een populaire methode maakt gebruik van scheiding op een reversed phase C18 kolom gevolgd door detectie met UV-Vis (Lian, Mao, Ye, & Miao, 1999). Zoals in Figuur 9 weergegeven gebeurt scheiding en detectie van de verschillende organische zuren binnen enkele minuten.



**Figuur 9:** HPLC-chromatogram van scheiding van organische zuren met pieken van oxaalzuur (1), wijnsteenzuur (2), appelzuur (3), maleïnezuur (4), barnsteenzuur (5) en fumaarzuur (6). De scheiding werd uitgevoerd met een C18 kolom en als mobiele fase wordt een perchloorzuuroplossing met pH 2 gebruikt met een debiet van 1 ml/min en constante temperatuur van 30°C. Als detectiemethode wordt UV detectie bij 210 nm gebruikt (Lian et al., 1999).

Een gelijkaardige methode maakt gebruik van een reversed phase C18 kolom met een UV-vis *photodiode array detector* (DAD) om wijnsteenzuur, appelzuur, ascorbinezuur en citroenzuur te bepalen in vruchtensappen. De staalvoorbereiding blijft beperkt tot verdunnen en filtreren en de volledige scheiding duurt slechts 10 minuten. De mobiele fase bestaat uit een 0,01M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer waardoor de kostprijs beperkt blijft (Scherer et al., 2012).

Shui & Leong (2002) maakten gebruik van HPLC met een foto diode array detector om een volledig profiel te op te stellen van de aanwezige organische zuren en fenolen in vruchtensappen en dranken. Tijdens de 80 minuten durende analyse werden 31 verbindingen gescheiden en gedetecteerd. Detectie met fotodiode array detector maakt het mogelijk om componenten met een gelijkaardige retentietijd toch te identificeren. Ook bij deze methode kunnen de stalen zonder ingewikkelde voorbehandeling op de kolom gebracht worden. De stalen worden enkel gecentrifugeerd en gefilterd voor de analyse. Deze methode is niet zo snel als de bovenstaande methodes maar geeft een meer uitgebreid profiel van een groot aantal zuren en fenolen aanwezig in het vruchtensap.

### 3.2.2 Bepaling van galacturonzuur

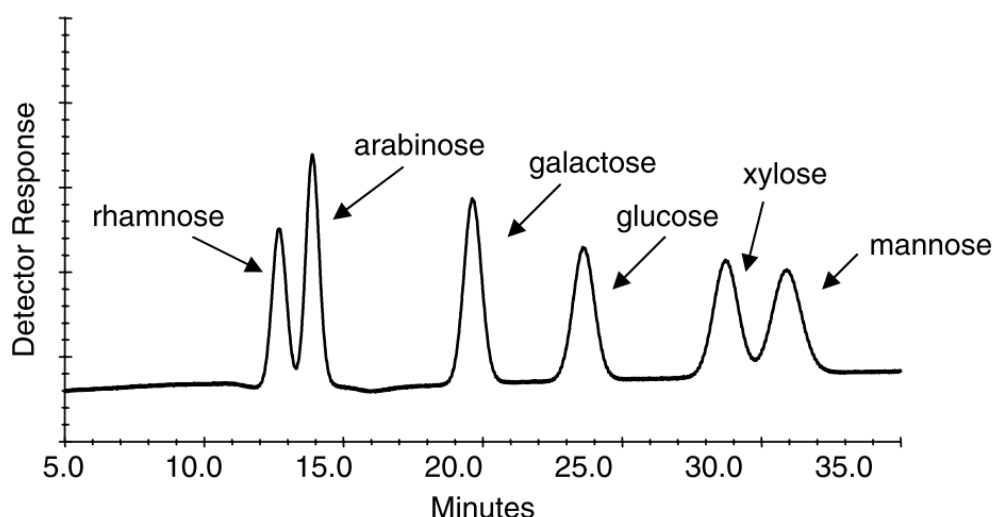
Een *reversed phase* HPLC-methode met C8 kolom slaagt erin om zowel galacturonzuur als verschillende aldosen te bepalen. Omdat refractive index (RI) detectie vaak niet de gewenste gevoeligheid bereikt wordt gebruik gemaakt van UV-detectie. Dit vereist een staalvoorbereiding waarbij UV-detecteerbare derivaten gemaakt worden met ethyl 4-aminobenzoaat. Vervolgens wordt het staal op de kolom gebracht en na 60 minuten is de analyse afgelopen. (Blanco Gomis, Muro Tamayo, & Mangas Alonso, 2001)

### 3.2.3 Bepaling van sorbitol

Sorbitol kan samen met suikers bepaald worden met behulp van een anionuitwisselingskolom. Detectie van de componenten wordt uitgevoerd met een PAD waardoor zeer lage detectielimieten bereikt worden (Dietrich et al., 2007).

## 3.3 HPAEC

*High Performance Anion Exchange Chromatography* (HPAEC) biedt een oplossing voor enkele problemen die voorkomen bij koolhydraatanalyse met HPLC. Deze methode is gebaseerd op het feit dat koolhydraten in sterk basisch midden anionen vormen waardoor ze door een ionenuitwisselingskolom gescheiden kunnen worden. Vervolgens worden de verschillende stoffen gekwantificeerd door een detector. Net als bij GC- en HPLC-methodes zijn ook hier verschillende detectiemethoden mogelijk met elk hun voor- en nadelen. Eén methode gebruikt een *Pulsed Amperometric Detector* (PAD), zie eerder in 3.2. Met deze methode worden een groot aantal componenten in vruchtensap zoals galacturonzuur, rhamnose, arabinose en sorbitol met één analyse bepaald zonder voorafgaande derivatisatie, zie Figuur 10 (Brummer & Cui, 2005; Burana-osot et al., 2010).



Figuur 10: Output van een HPAEC-bepaling van rhamnose, arabinose, galactose, glucose, xylose en mannose met natriumhydroxide oplossing als eluens en detectie door een PAD (Brummer & Cui, 2005).

### 3.4 Colorimetrische methoden

Colorimetrische methoden hebben vaak een eenvoudigere staalvoorbereiding dan HPLC of GC en vereisen minder dure apparatuur. Door een (bio)chemische reactie treedt een kleurverandering op die vervolgens spectrofotometrisch gedetecteerd wordt. Dit maakt het mogelijk om de kwantitatieve hoeveelheid van de onderzochte component te bepalen. In tegenstelling tot HPLC en GC is het met deze methode niet mogelijk meerdere componenten gelijktijdig te kwantificeren (Goeij, 2013).

#### 3.4.1 Colorimetrische bepaling van galacturonzuur

Er worden in de literatuur verschillende methoden beschreven voor kwantitatieve analyse van galacturonzuur.

Een eerste colorimetrische methode om galacturonzuur te bepalen maakt gebruik van zwavelzuur en carbazoolreagens om een gekleurde component te bereiden van het galacturonzuur.

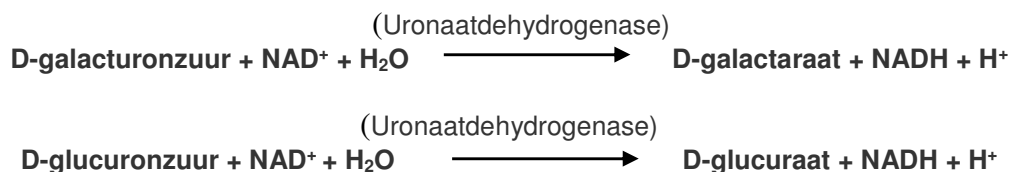
De kleur met absorptiemaximum bij 530 nm ontstaat na 1h incubatie bij 60°C. Door reactie in sterk zuur midden worden eerst derivaten van het galacturonzuur bereid die vervolgens met het carbazool reageren. Deze methode is een snelle en eenvoudige manier om galacturonzuur te bepalen maar de aanwezigheid van hexosen en pentosen in de oplossing heeft een negatieve invloed op de nauwkeurigheid. (Brummer & Cui, 2005; Taylor & Buchanan-smith, 1992).

Een verbeterde methode maakt gebruik van 3-fenylfenol dat met het staal in sterk zuur midden verwarmd wordt tot 80°C en een felroze gekleurd product geeft. Een nadeel van deze methode is dat de kleurintensiteit niet stabiel is. Een manier om dit probleem te omzeilen is door de absorptantie op te volgen doorheen de tijd. Berekeningen worden dan uitgevoerd met de hoogste gemeten absorptantie. Deze methode is hierdoor niet geschikt om meerdere analyses tegelijk uit te voeren tenzij gebruik gemaakt wordt van een multiwell plate reader die de absorptanties van meerdere stalen continu meet (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973; Brummer & Cui, 2005; Ibarz et al., 2006).



Een enzymatische kit ter bepaling van galacturonzuur wordt ter beschikking gesteld door Megazyme. De methode waarop deze kit baseert is echter niet specifiek voor galacturonzuur omdat het gebruikte enzym ook reageert met glucuronzuur. De reacties die optreden staan in Figuur 11.

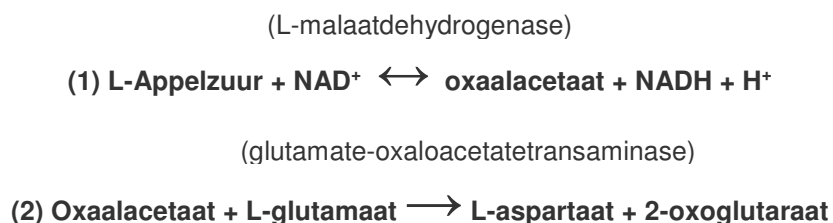
Zowel D-glucuronzuur alsook D-galacturonzuur worden door het uronaatdehydrogenase (UDH) omgezet naar respectievelijk D-glucuraat en D-galactaraat en een equivalente hoeveelheid NADH. De hoeveelheid NADH die gevormd wordt is recht evenredig met de som van de concentraties glucuronzuur en galacturonzuur en wordt gemeten bij 340 nm (Megazyme International Ireland, 2014b).



**Figuur 11: Enzymatische bepaling van glucuronzuur en galacturonzuur met behulp van UDH (Megazyme International Ireland, 2011)**

### 3.4.2 Colorimetrische bepaling van L-appelzuur

De Megazyme kit die beschikbaar is voor de analyse van L-appelzuur maakt gebruik van malaatdehydrogenase. Figuur 12 toont dat deze reactie een evenwichtsreactie is, om een aflopende reactie te induceren wordt het oxaalacetaat dat in reactie 1 gevormd werd door een tweede reactie verwijderd uit de oplossing. Ook bij deze reactie wordt het gevormde NADH gemeten bij 340 nm (Megazyme International Ireland, 2014d).



**Figuur 12: Principe van L-appelzuur bepaling met Megazyme kit (Megazyme International Ireland, 2014d)**

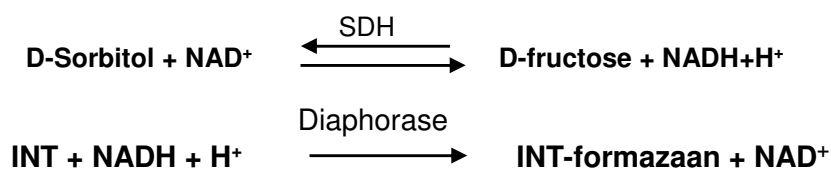
### 3.4.3 Colorimetrische bepaling van sorbitol

De colorimetrische bepaling van sorbitol is mogelijk met een enzymatische kit van Sigma Aldrich waarbij sorbitol omgezet wordt naar fructose en in een daaropvolgende reactie een gekleurde component gevormd wordt. Het principe van de reactie wordt door de fabrikant niet ter beschikking gesteld. Gedurende de reactie moet het mengsel afgeschermd worden van licht. Na incubatie volgt de fotometrische meting bij 560 nm (Sigma-Aldrich, 2016b).

Een andere kit ontwikkeld door *Megazyme* maakt gebruik van sorbitoldehydrogenase en diaphorase om sorbitol en xylitol te bepalen. Na 15 minuten ontstaat een kleur die bij een golflengte van 492 nm gemeten wordt. Zoals weergegeven wordt in

Figuur 13 wordt sorbitol omgezet naar fructose gekatalyseerd door het sorbitoldehydrogenase (SDH) met  $\text{NAD}^+$  als co-enzym. Het gevormde NADH wordt in een tweede reactie gebruikt door diaphorase (NADH dehydrogenase) om INT om te zetten in de roodgekleurde INT-formazaan verbinding (Megazyme International Ireland, 2015).

L-ascorbinezuur heeft een storende werking op deze reactie omdat het in staat is INT te reduceren tot INT-formazaan in een niet-enzymatische redoxreactie. Bij ascorbinezuurconcentraties hoger dan  $5 \mu\text{g/ml}$  heeft deze reactie een invloed op de bepaling van sorbitol omdat een te groot deel van de ontwikkelde kleur veroorzaakt wordt door het gereduceerde INT en niet door enzymatische reactie met verbruik van NADH. (Megazyme International Ireland, 2015)

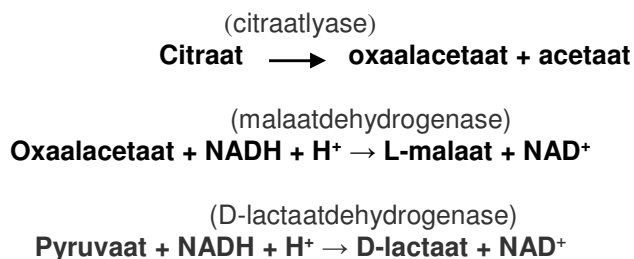


**Figuur 13: Principe van enzymatische sorbitolbepaling met behulp van Megazyme kit (Megazyme International Ireland, 2015)**

Ook R-Biopharm heeft een kit beschikbaar gesteld die werkt volgens het principe dat weergegeven wordt in Figuur 13 (R-Biopharm, n.d.). De kit werd ontworpen zodat het uiteindelijk reactievolume 3 ml bedraagt, maar kan aangepast worden zodat slechts 200  $\mu\text{l}$  reactievolume volstaat voor een meting. Hierdoor daalt de kostprijs per meting aanzienlijk zonder dat de kwaliteit van de bepaling daalt (Vermeir, Nicolaï, Jans, Maes, & Lammertyn, 2007).

### 3.4.4 Colorimetrische bepaling van citroenzuur

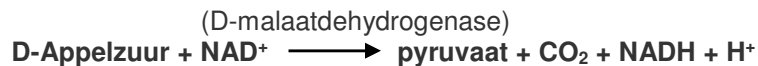
De methode gebruikt in de kit van Megazyme vormt eerst het citroenzuur om tot oxaalacetaat in een reactie die gekatalyseerd wordt door citraatlyase (Figuur 14). In een volgende reactie reageert het gevormde oxaalacetaat tot malaat gekatalyseerd door malaatdehydrogenase met NADH als co-enzym. Als het staal echter het enzym oxaalacetaatdecarboxylase bevat, wordt een deel van het gevormde oxaalacetaat omgezet in pyruvaat. Er wordt daarom D-lactaatdehydrogenase toegevoegd aan het enzymmengsel zodat ook het gevormde pyruvaat gekwantificeerd wordt. Als de reactie afgelopen is wordt de NADH-afname fotometrisch bepaald bij een golflengte van 340 nm (Megazyme International Ireland, 2014a).



**Figuur 14: Principe van citroenzuurbepaling met Megazyme kit (Megazyme International Ireland, 2014a)**

### 3.4.5 Colorimetrische bepaling van D-appelzuur

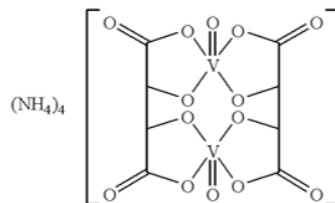
Een kit die beschikbaar gesteld wordt door “Megazyme” maakt gebruik van het enzym D-malaatdehydrogenase waardoor appelzuur omgezet wordt naar pyruvaat. Tijdens deze reactie wordt een hoeveelheid NADH gevormd die recht evenredig is met het oorspronkelijk aanwezige D-appelzuur, zie Figuur 15. Het gevormde NADH wordt na incubatie fotometrisch bepaald door meting bij 340 nm (Megazyme International Ireland, 2014c).



Figuur 15: Principe van D-appelzuurbepaling met Megazyme kit (Megazyme International Ireland, 2014c)

### 3.4.6 Colorimetrische bepaling van wijnsteenzuur

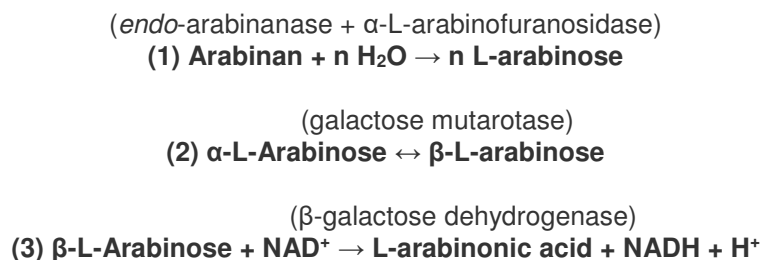
De methode om wijnsteenzuur te bepalen is in tegenstelling tot de vorige methodes geen enzymatische methode. De bepaling maakt gebruik van de reactie tussen vanadaat en wijnsteenzuur. Door vanadaat toe te voegen aan het staal wordt een gekleurd complex gevormd (Figuur 16) met het aanwezige wijnsteenzuur dat vervolgens fotometrisch gemeten wordt bij 505 nm. In de literatuur worden de metingen ook uitgevoerd bij golflengtes van 520 en 510 nm (Bastos, Tafulo, Queirós, Matos, & Sales, 2009).



Figuur 16: Structuurformule van het gekleurde complex bij de meting van wijnsteenzuur met de vanadaat-methode.

### 3.4.7 Colorimetrische bepaling van arabinan

Een kit om arabinan te bepalen wordt ter beschikking gesteld door Megazyme. Hierbij wordt arabinose eerst verwijderd door gelfiltratie op een bijgeleverde kolom alvorens het arabinan gehydrolyseerd wordt tot arabinose. Zoals weergegeven in Figuur 17 wordt het gevormde arabinose door het enzym galactosedehydrogenase geoxideerd tot arabinonic acid waarna de oplossing spectrofotometrisch gemeten wordt door NADH bepaling bij 340 nm (Megazyme International Ireland, 2011).



Figuur 17: Reacties gebruikt in de Megazyme kit voor de bepaling van arabinan (Megazyme International Ireland, 2011)

### 3.5 Conclusie literatuurstudie

Uit de literatuur blijkt dat HPLC zeer geschikt is voor analyse van organische zuren. De staalvoorbereiding blijft vaak beperkt tot filtratie en de analyse van belangrijke componenten kan worden uitgevoerd in enkele minuten. Indien gewenst kan HPLC echter ook gebruikt worden om een uitgebreid profiel van het product op te stellen. De analyse duurt in dit geval beduidend langer.

Een andere zeer geschikte methode voor de uitgebreide bepaling van verschillende componenten in één analyse is gaschromatografie. Een GC-MS-methode is in staat om vrijwel alle belangrijke componenten in een staal te bepalen. Het grootste nadeel van deze methode is de vereiste staalvoorbereiding die meestal veel tijd in beslag neemt. Dit in combinatie met de lange analysetijd en hoge aankooprijks van het toestel en kolom maakt GC minder geschikt voor toepassingen waarbij meerdere stalen per dag geanalyseerd worden.

Bij gebruik van colorimetrische methoden moet voor elke te bepalen component een andere reactie gebruikt worden. De staalvoorbereiding blijft beperkt tot een eenvoudige vacuümfiltratie indien het staal te troebel is. De verschillende reacties kunnen gelijktijdig uitgevoerd worden op een klein volume van een staal en op meerdere stalen tegelijk. Hierdoor wordt de duur van de analyse van meerdere componenten in meerdere stalen bepaald door de traagste reactie. Deze methode is bijgevolg beter geschikt om meerdere stalen per dag te analyseren dan de chromatografische methoden waarbij elk staal na elkaar geanalyseerd wordt.



## Deel II: Praktisch

### 4 Instellen methoden

#### 4.1 Galacturonzuur

##### 4.1.1 Materiaal

- Thermo Fisher Scientific Gallery Plus analyzer
- Megazyme D-glucuronic & D-galacturonic acid assay kit
  - Flesje 1: Buffer pH 8
  - Flesje 2: NAD<sup>+</sup>
  - Flesje 3: UDH
  - Flesje 4: Glucuronzuurstandaard 0,5 g/l
- Beker 150 ml
- Analytische balans Mettler Toledo PR503
- Pipet 100 – 1000 µl
- Pipet 1 - 5 ml
- Sigma-Aldrich D-(+)-Galacturonic acid monohydrate 97%
- Pall Metrigard Glass Fiber Filter 0,45 µm

##### 4.1.2 Methode

###### 4.1.2.1 Ontwikkeling van test

###### Bereiding van reagentia

Flesje 2: NAD<sup>+</sup> wordt geleverd als gevriesdroogd poeder en werd opgelost in 22 ml gedestilleerd water voor gebruik. Reagens 1 (R1) en reagens 2 (R2) werden bereid door de oplossingen te mengen volgens de volumes die weergegeven worden in Tabel 1.

Tabel 1: Benodigde volumes voor de bereiding van reagens 1 en 2 voor de enzymatische bepaling van galacturonzuur en glucuronzuur (Megazyme International Ireland, 2014b)

	Oplossing	Volume
<b>Reagens 1</b>	Gedestilleerd water	48,00 ml
	Oplossing 1: Buffer	5,50 ml
	Oplossing 2: NAD <sup>+</sup>	5,50 ml
<b>Reagens 2</b>	Gedestilleerd water	6,90 ml
	Oplossing 3: UDH	0,55 ml

Na bereiding werden de oplossingen in buisjes, die in de analyzer passen, gepipetteerd. Vervolgens werden beide reagentia in de analyzer geplaatst en toegevoegd aan het reagentiaoverzicht van het bijbehorende programma.

### **Instellingen analyzer**

De nieuwe methode werd geprogrammeerd in de analyzer door het definiëren van de volgende stappen in het onderdeel test flow van het analyzer programma:

- toevoegen 200 µl R1 met extra 10 µl<sup>1</sup>;
- toevoegen 10 µl staal met extra 10 µl;
- blancometing bij 340 nm;
- toevoegen 25 µl R2 met extra 5 µl;
- 600 seconden incubatie bij 37°C;
- meting eindpunt bij 340 nm.

Het staal en R1 worden eerst toegevoegd en vervolgens wordt een blancometing uitgevoerd. Vervolgens wordt R2, dat het enzym bevat, toegevoegd. Hierdoor start de reactie waarbij galacturonzuur en NAD<sup>+</sup> omgezet worden in galactaraat en NADH + H<sup>+</sup>. Na 10 minuten werd al het galacturonzuur omgezet en werd de eindabsorbantie gemeten bij 340 nm. De totale analysetijd bedraagt 10 minuten.

### **Kalibratie**

Nadat de nieuwe methode geprogrammeerd werd moest deze gekalibreerd worden. Deze kalibratie werd uitgevoerd met de bijgeleverde 0,5 g/l glucuronzuurstandaard in flesje 4. Vanuit deze standaard werden door het toestel automatisch verdunningen tot 0,25; 0,10 en 0,05 g/l bereid om een ijklijn op te stellen. Door interpolatie op deze ijklijn berekent het toestel bij het uitvoeren van de test automatisch de concentratie van het staal.

### **Staalvoorbereiding**

Om te vermijden dat troebele stalen de leidingen van de analyzer verstoppert werd elk troebel staal gezuiverd door vacuümfiltratie met Pall Metrigard 0,45 µm filtreerpapier. Er werd tweemaal gefiltreerd om te vermijden dat water in de afzuigkolf het filtraat verdunt. Het eerste filtraat werd gebruikt om de kolf te spoelen en werd vervolgens verwijderd. Hierna volgt een tweede filtratie van het staal waarvan het filtraat gebruikt werd om de meting uit te voeren.

#### **4.1.2.2 Validatie**

Zowel reproduceerbaarheid als juistheid van deze methode werden gevalideerd volgens de methode beschreven door OVAM/VITO en Klaessens, 2013.

### **Reproduceerbaarheid**

De reproduceerbaarheid van deze methode werd gevalideerd door herhaalde analyse van een aantal stalen met verschillende concentratie. De parameter tijd werd gevarieerd door de metingen op verschillende dagen uit te voeren. De invloed van de analist op de meting is beperkt door de eenvoudige staalvoorbereiding en alle analyses worden met hetzelfde apparaat uitgevoerd.

Na herhaalde analyse van een staal werd de standaardafwijking berekend met behulp van volgende formule (Klaessens, 2013).

---

<sup>1</sup> Het extra volume wordt opgezogen door het apparaat maar wordt niet in de reactieoplossing gebracht. Hierdoor wordt vermeden dat er diffusie optreedt van het reagens naar het water dat zich in de naald van het toestel bevindt.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

S: standaardafwijking in g/l

N: aantal analyses  $\geq 5$

$X_i$ : i-de analyseresultaat

$\bar{x}$ : gemiddelde van n analyseresultaten

De standaardafwijking werd bepaald bij een lage, een gemiddelde en een hoge concentratie die vergelijkbaar is met waarden die in praktijkstalen te verwachten zijn. Om de gevonden standaardafwijking eenvoudiger te vergelijken met gewenste waarden werd de variatiecoëfficiënt berekend volgens volgende formule.

$$CV = 100 \times \frac{S}{\bar{x}}$$

De resultaten van deze validatie werden vergeleken met de resultaten die Thermo Fisher Scientific opgeeft voor hun ontwikkelde methodes. De resultaten van Thermo Fisher van de herhaalbaarheid voor de glucose-, fructose- en sucrose methode zijn weergegeven in Tabel 2.

Tabel 2: Resultaten van herhaalbaarheidsbepaling van de glucose-, fructose- en sucrose methode van Thermo Fisher Scientific met de Gallery analyzer (Thermo Fisher Scientific, 2011)

	Lage concentratie	Gemiddelde concentratie	Hoge concentratie
<b>Gemiddelde (g/l)</b>	5,61	44,65	88,12
<b>Standaardafwijking (g/l)</b>	<b>0,067</b>	<b>0,473</b>	<b>2,287</b>
<b>Variatiecoëfficiënt (%)</b>	<b>1,2</b>	<b>1,1</b>	<b>2,6</b>

### Juistheid

De juistheid van de methode werd bepaald door uitvoering van terugvindingsexperimenten op stalen waar een bekende hoeveelheid galacturonzuur aan toegevoegd is. De juistheid werd vervolgens berekend volgens onderstaande formule (Klaessens, 2013).

$$TV\% = \frac{X_{c+\Delta c,i} - X_{c,i}}{\Delta c} \times 100$$

TV%: procentuele terugvinding bij experiment

$X_{c+\Delta c,i}$ : analyseresultaat voor waarde c met additie van  $\Delta c$  van de bepalen component

$X_{c,i}$ : analyseresultaat voor waarde c van de te bepalen component

$\Delta c$ : toegevoegde hoeveelheid van de component



### 4.1.3 Resultaten

#### 4.1.3.1 Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid werd bepaald door analyse van een staal met een lage, een gemiddelde en een hoge concentratie. Alle stalen zijn productiestalen die op 5 verschillende dagen geanalyseerd werden. De resultaten van de analyses zijn weergegeven in Tabel 3.

	Laag	Gemiddelde	Hoog
Gemiddelde (g/l)	0,056	0,997	2,534
Standaardafwijking (g/l)	<b>0,002</b>	<b>0,025</b>	<b>0,056</b>
Variatiecoëfficiënt (%)	<b>4,25</b>	<b>2,51</b>	<b>2,20</b>

Tabel 3: Resultaten van de bepaling van reproduceerbaarheid voor de galacturonzuurmethode met de gemiddelde meetwaarde en standaardafwijking in g/l en de variatiecoëfficiënt CV voor lage (troebel perensap), gemiddelde (appel ciderbasis) en hoge (appel ciderbasis) concentratie.

In Tabel 3 is te zien dat de metingen van een gemiddelde en hoge concentratie variatiecoëfficiënten hebben die zich tussen de referentiewaarden 1,1% en 2,6 % bevinden, zie Tabel 2. De variatiecoëfficiënt van de meting bij lage concentratie is hoger dan bij gemiddelde en hoge concentratie. Dit is te wijten aan de lage galacturonzuurconcentratie van het troebele perensap waardoor zelfs een zeer kleine standaardafwijking een grotere variatiecoëfficiënt als gevolg heeft.

#### 4.1.3.2 Juistheid

Voor de bepaling van de juistheid werd gebruik gemaakt van 97% galacturonzuur dat werd toegevoegd aan appelciderbasis. De resultaten van de bepaling van de terugvinding (TV%) worden weergegeven in Tabel 4.

Tabel 4: Meetresultaten en berekeningen van terugvindingsexperiment met de galacturonzuurmethode uitgevoerd op appelciderbasis .

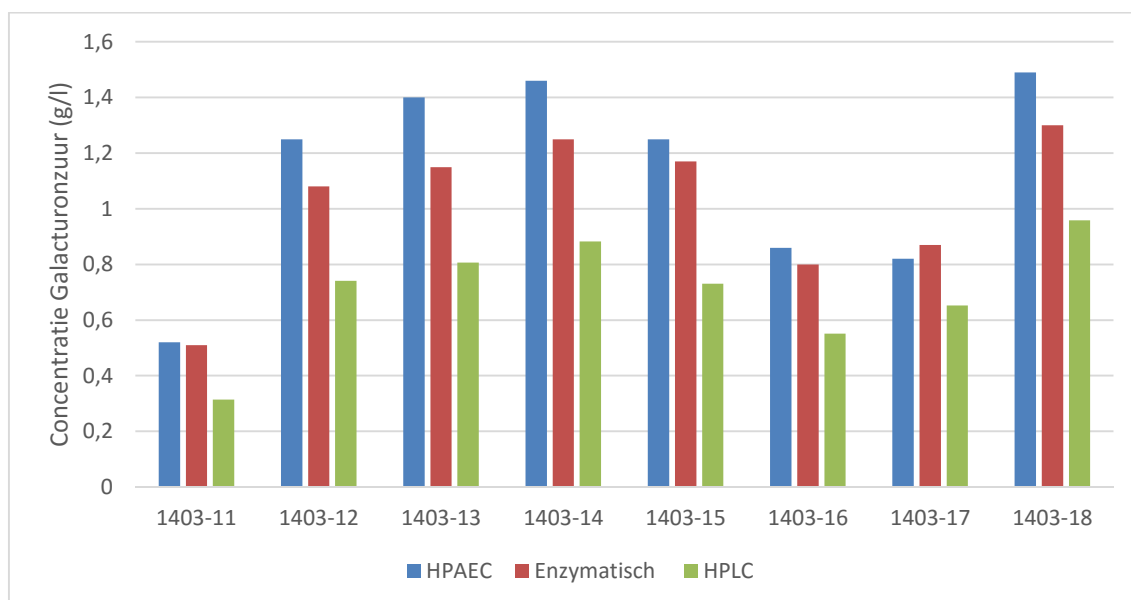
Meting	Concentratie met additie (g/l)	Concentratie zonder additie (g/l)	Toegevoegd galacturonzuur (g)	Volume staal (l)	$\Delta C$ (g/l)	TV%
1	5,95	2,48	0,191	0,05	3,8171	90,9
2	9,20	2,48	0,383	0,05	7,6697	87,6
3	5,29	2,48	0,152	0,05	3,0359	92,4
4	5,78	2,48	0,177	0,05	3,5330	93,3
5	7,31	2,85	0,249	0,05	4,9889	89,5
<b>Gemiddelde</b>						<b>91,0</b>

Uit de metingen blijkt dat slechts 91% van het toegevoegde galacturonzuur teruggevonden wordt. Blijkbaar is het galacturonzuur dat toegevoegd werd niet zuiver genoeg om als standaard te gebruiken. Dit blijkt ook uit eerdere experimenten waarbij het galacturonzuur werd opgelost in water.

Hiervoor werd 502 mg galacturonzuur opgelost in 50 ml gedemineraliseerd water. De verwachte galacturonzuurconcentratie van deze oplossing bedraagt 10,04 g/l. De analyse van deze oplossing met de galacturonzuurmethode gaf 9,1 g/l als gemiddeld resultaat. Daarnaast werden ook analyses uitgevoerd met additie van de 0,5 g/l standaard die door *Megazyme* geleverd werd bij de enzymatische kit. Toevoeging van deze standaard aan een aantal stalen leidde wel tot een terugvinding van 100%. Dit wijst erop dat het gebruikte galacturonzuur niet de aangegeven zuiverheid heeft. Om de test te valideren wordt dus best gebruik gemaakt van een andere galacturonzuurstandaard zodat de juistheid met zekerheid bepaald kan worden.

#### 4.1.3.3 Vergelijking met andere methodes

Een aantal stalen heldere appelsap werden extern geanalyseerd met behulp van HPLC en HPAEC. De resultaten van deze analyses worden vergeleken met de enzymatische methode in Grafiek 1.



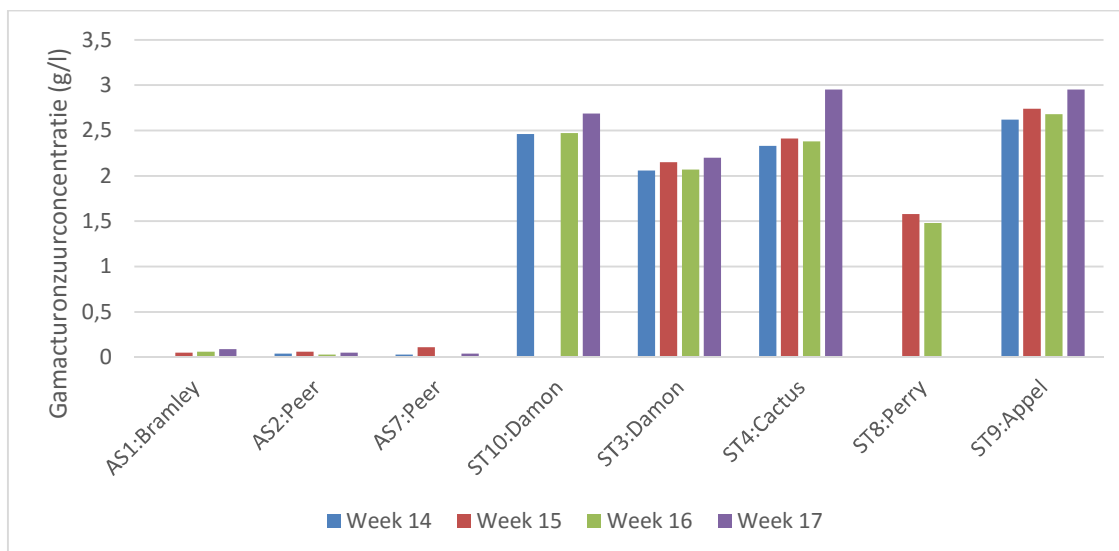
**Grafiek 1: Meetresultaten van HPAEC, HPLC en enzymatische methodes voor de bepaling van galacturonzuur op helder appelsap**

De resultaten van de enzymatische methode liggen steeds tussen de metingen bekomen met behulp van beide twee andere methoden. Het verschil tussen de verschillende metingen kan te wijten zijn aan de bewaring van de stalen. De galacturonzuurconcentratie kan dalen in de tijd als gevolg van een bruinkleuringsreactie. Verschillen in omstandigheden tijdens de bewaring of vervoer van de stalen kunnen dus leiden tot verschillende galacturonzuurconcentraties. De bruinkleuringsreactie treedt sterker op bij hogere galacturonzuurconcentraties. Dit zou mogelijk ook verklaren waarom de verschillen tussen de HPAEC-methode en de enzymatische methode bij stalen met een lage galacturonzuurconcentratie kleiner zijn (Ibarz et al., 2008).

Een andere verklaring is het verschil in staalvoorbereiding tussen de 3 methodes. De HPLC-methode maakt gebruik van een voorafgaande derivatisatie. Het is mogelijk dat deze niet 100% efficiënt is waardoor er minder galacturonzuur gemeten wordt dan bij de twee alternatieve methodes.

#### 4.1.3.4 Metingen tanks

Gedurende enkele weken werd de galacturonzuurconcentratie bepaald van een aantal tanks waarin sappen en ciderbasissen gestockeerd worden. De resultaten van deze metingen worden weergegeven in Grafiek 2.



**Grafiek 2: Resultaten van de wekelijkse galacturonzuurbepalingen van de tanks waarbij AS1, AS2, AS3 en AS7 troebel sap bevatten en ST3, ST4, ST8, ST9 en ST10 heldere ciderbasis bevatten**

In Grafiek 2 is er een duidelijk verschil zichtbaar tussen het galacturonzuurgehalte van troebel sap en heldere ciderbasis. Zoals vermeld in de literatuurstudie wordt het hogere galacturonzuurgehalte bij de heldere ciderbasis veroorzaakt door het pectinase dat tijdens de productie van helder sap wordt toegevoegd. Deze enzymen worden toegevoegd om de sapopbrengst te verhogen en breken het pectine in de celwand af tot monomeren zoals galacturonzuur (Mohnen, 2008).

#### 4.1.4 Conclusie

De galacturonzuur methode heeft zoals gewenst een lage standaardafwijking wat wijst op een grote reproduceerbaarheid. De juistheid van deze methode is door mogelijk onzuiver galacturonzuur niet correct bepaald kunnen worden. Er is dus in de toekomst verder onderzoek nodig om de validatie van deze methode af te ronden.

De analyse duurt slechts 10 minuten en de prijs per test bedraagt €0,20. Hierdoor is de galacturonzuurbepaling, mits verdere validatie van de juistheid, geschikt is voor gebruik.

## 4.2 L-appelzuur

### 4.2.1 Materiaal

- Sigma-Aldrich L-(-)-Malic Acid >99%
- Thermo Fisher Scientific Gallery Plus analyzer
- Megazyme L-Malic acid assay kit Analyzer Format
  - Flesje 1: buffer pH10
  - Flesje 2: NAD<sup>+</sup>/PVP
  - Flesje 3: GOT
  - Flesje 4: L-Malaatdehydrogenase
  - Flesje 5: L-appelzuurstandaard 6 g/l
- Beker 150 ml
- Analytische balans Mettler Toledo PR503
- Pipet 100 – 1000 µl
- Pipet 1 - 5 ml
- Pall Metrigard Glass Fiber Filter 0,45 µm

### 4.2.2 Methode

#### 4.2.2.1 Ontwikkeling van test

##### Bereiding van reagentia

Reagens 2: NAD<sup>+</sup> werd geleverd als gevriesdroogd poeder en werd opgelost in 22 ml gedestilleerd water voor gebruik. Vervolgens werden reagens 1 en 2 bereid door het mengen van de oplossingen volgens de volumes die weergegeven worden in Tabel 5.

Tabel 5: Benodigde volumes voor de bereiding van reagens 1 en 2 voor de enzymatische bepaling van L-appelzuur (Megazyme International Ireland, 2014b)

	Oplossing	Volume
<b>Reagens 1</b>	Gedestilleerd water	12,40 ml
	Oplossing 1: Buffer	4,00 ml
	Oplossing 2: NAD <sup>+</sup> /PVP	2,00 ml
	Oplossing 3: GOT	0,20 ml
<b>Reagens 2</b>	Gedestilleerd water	2,10 ml
	Oplossing 4: L-MDH	0,20 ml

Na bereiding werden de oplossingen overgebracht in buisjes die vervolgens in de analyzer geplaatst werden.

##### Instellingen analyzer

De nieuwe methode werd in het toestel geprogrammeerd door een nieuwe test aan te maken en bij test flow de volgende stappen in de juiste volgorde te definiëren:

- toevoegen 200 µl R1 met extra 10 µl;
- toevoegen 5 µl staal met extra 10 µl;
- 180 seconden incubatie bij 37°C;
- blancometing bij 340 nm;
- toevoegen 20 µl R2 met extra 5 µl;
- 180 seconden incubatie bij 37°C;
- meting eindpunt bij 340 nm.

Eerst worden reagens 1 en staal toegevoegd. Vervolgens wordt dit mengsel 3 minuten geïncubeerd bij 37°C zodat het PVP mogelijke storende polyfenolen kan absorberen uit het reactiemiddel. Na incubatie wordt reagens 2 toegevoegd dat het enzym bevat om de reactie te starten. Na 3 minuten is de reactie afgelopen en heeft al het aanwezige L-appelzuur gereageerd en is een equivalente hoeveelheid NADH gevormd. Het NADH wordt gemeten bij 340 nm en door interpolatie op een vooraf opgestelde ijklijn wordt de L-appelzuurconcentratie berekend.

### **Kalibratie**

De kalibratie van de L-appelzuurmethode werd uitgevoerd met de bijgeleverde L-appelzuurstandaard met een concentratie van 6 g/l. Het opstellen van de ijklijn werd automatisch uitgevoerd door het toestel. Automatische verdunningen vanuit deze standaard van 3; 2; 1,5 en 1 g/l werden gebruikt om de ijklijn op te stellen. De resultaten van deze kalibratie werden gecontroleerd door bepaling van de R<sup>2</sup> en vergelijking met eerdere ijkingsen.

#### **4.2.2.2 Validatie**

De validatie van juistheid en reproduceerbaarheid worden uitgevoerd zoals beschreven in hoofdstuk 4.1.2.2 Validatie. Om de kostprijs van de validatie laag te houden werd voor de bepaling van de juistheid gebruik gemaakt van >99% zuiver L-appelzuur geleverd door Sigma Aldrich.

#### **4.2.3 Resultaten**

##### **4.2.3.1 Reproduceerbaarheid**

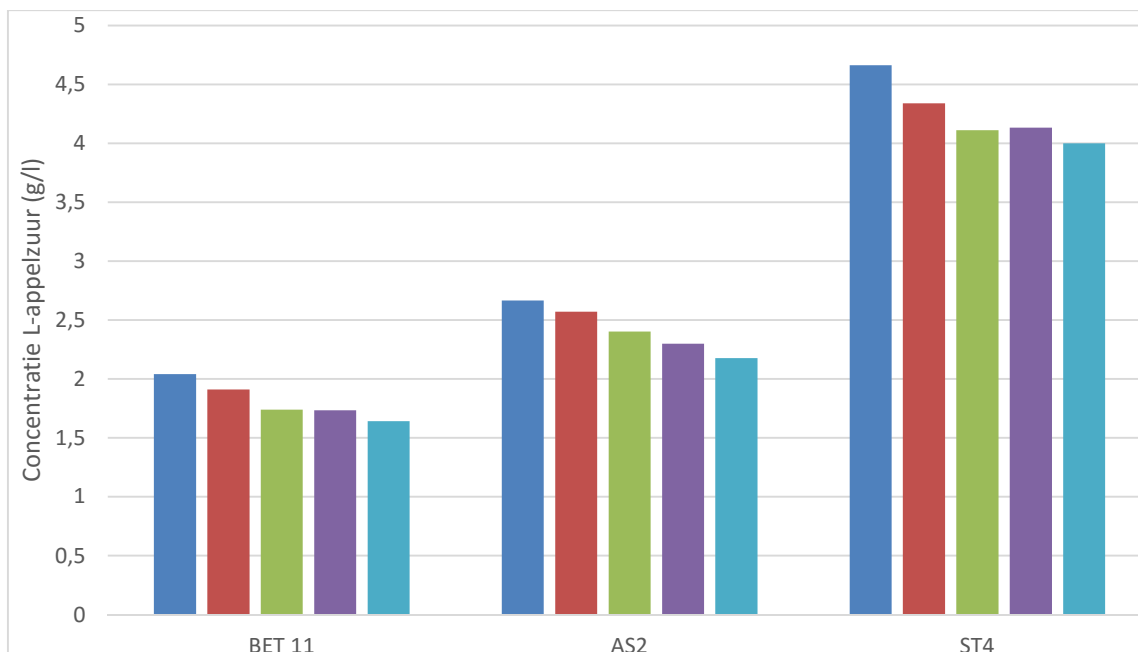
De resultaten voor de reproduceerbaarheid van de L-appelzuurbepaling worden weergegeven in Tabel 6.

**Tabel 6: Resultaten voor de bepaling van de reproduceerbaarheid bij lage (appelciderbasis) , gemiddelde (troebel perensap) en hoge (perenciderbasis) concentratie van de L-appelzuurmethode**

	<b>Laag</b>	<b>Gemiddeld</b>	<b>Hoog</b>
<b>Gemiddelde (g/l)</b>	1,967	3,405	4,207
<b>Standaardafwijking (g/l)</b>	<b>0,090</b>	<b>0,098</b>	<b>0,228</b>
<b>Variatiecoëfficiënt (%)</b>	<b>4,59</b>	<b>2,87</b>	<b>5,43</b>

Zoals te zien is in Tabel 6 zijn de standaardafwijkingen voor deze methode groter dan de gewenste waarde van 2,6 %. Dit wil zeggen dat er een te grote variatie is tussen de verschillende metingen. Een mogelijke verklaring voor deze afwijking is dat de reagentia beperkt houdbaar zijn in de analyzer waardoor het enzym minder actief wordt en de methode na een aantal dagen steeds lagere meetresultaten geeft voor hetzelfde staal. Het is ook mogelijk dat het appelzuurgehalte tijdens de bewaring gedaald is.

Beide hypothesen worden ondersteund door de resultaten weergegeven in Grafiek 3. Hier wordt duidelijk dat de verschillen tussen de metingen niet willekeurig zijn. De meetresultaten van 3 stalen die op 5 opeenvolgende dagen gemeten werden vertonen een dalende trend.



Grafiek 3: Resultaten van de meting met de L-appelzuurmethode gedurende 5 opeenvolgende dagen van BET11 die appel ciderbasis bevat en AS2 en ST4 die troebel perensap bevatten.

#### 4.2.3.2 Juistheid

De resultaten voor de bepaling van de juistheid van deze methode worden weergegeven in Tabel 7.

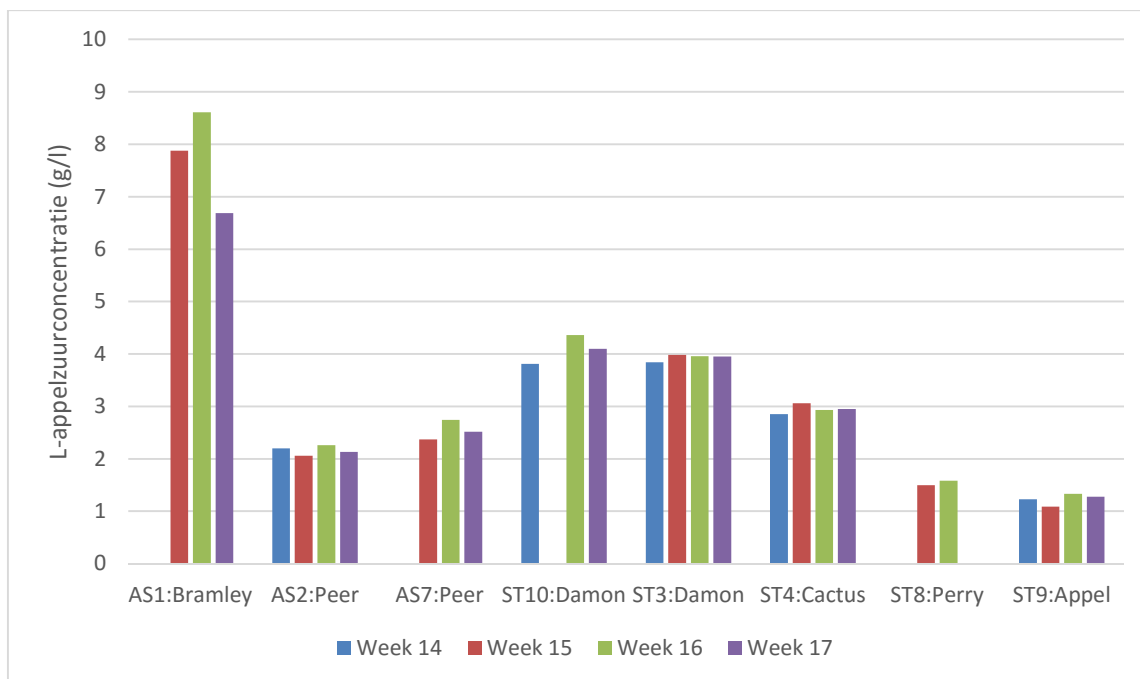
Tabel 7: Resultaten van de terugvindingsexperimenten met de L-appelzuurmethode door standaardadditie op appelciderbasis

Meting	Concentratie met additie (g/l)	Concentratie zonder additie (g/l)	Toegevoegd Galacturonzuur (g)	Volume staal (l)	$\Delta C$ (g/l)	TV%
1	12,42	1,83	0,514	0,05	10,28	103,02
2	12,41	1,83	0,514	0,05	10,28	102,92
3	5,77	1,91	0,203	0,05	4,06	95,07
4	5,84	1,88	0,207	0,05	4,14	95,65
5	12,43	1,74	0,514	0,05	10,28	103,99
6	9,665	5,57	0,206	0,05	4,12	99,39
7	10,275	5,57	0,239	0,05	4,78	98,43
<b>Gemiddelde</b>						<b>100,13</b>

Uit deze resultaten blijkt dat de gemiddelde terugvinding zoals gewenst zeer dicht bij de gewenste 100% ligt. Deze methode blijkt dus in staat om L-appelzuurconcentraties exact te bepalen. Toch blijkt uit de resultaten dat deze methode niet helemaal op punt staat. Zoals blijkt uit de kolom TV% van Tabel 7 verschilt de terugvinding tussen de verschillende metingen door de hoge standaardafwijking van de methode.

#### 4.2.3.3 Metingen tanks

Gedurende enkele weken werd de L-appelzuurconcentratie bepaald van een aantal tanks waarin sappen en ciderbasissen gestockeerd worden. De resultaten van deze metingen worden weergegeven in Grafiek 4.



**Grafiek 4: Resultaten van de wekelijkse metingen van de tanks met behulp van de L-appelzuurmethode waarbij AS1, AS2, en AS7 troebel sap bevatten en ST3, ST4, ST8, ST9 en ST10 heldere ciderbasis bevatten.**

Uit Grafiek 4 blijkt dat de resultaten van de metingen gedurende 4 weken dicht bij elkaar liggen. Uit de resultaten blijkt ook dat er grote verschillen zijn tussen de verschillende ciderbasisen die verwerkt worden. Bramley staat bekend als een zeer zure appelsoort en bevat ook duidelijk meer L-appelzuur dan de andere sappen en ciderbasisen. In de literatuur worden appelzuurconcentraties vermeld van 1,93 g/l tot 17,38 g/l (Eisele & Drake, 2005). De L-appelzuurconcentratie van de meeste sappen en ciderbasisen bleef gedurende 4 weken constant.

#### 4.2.3.4 Vergelijkingen met zuurtitratie op laboschaal

De L-appelzuurconcentratie werd in het labo bepaald door titratie met NaOH waarna met behulp van een factor de hoeveelheid appelzuur berekend werd. Om na te gaan hoe juist deze methode is werd de L-appelzuurconcentratie van een aantal heldere ciderbasisen bepaald met de enzymatische methode en de titratie. De resultaten van deze analyses worden weergegeven in Tabel 8.

**Tabel 8: Vergelijking van resultaten voor de bepaling van L-appelzuur in ciderbasis via de enzymatische methode en via titratie.**

	Bet 1	AS1	Bet 7	Bet 5	Bet 2
<b>Titratie (g/l)</b>	4,0	11,8	6,8	5,8	9,6
<b>Enzymatisch (g/l)</b>	1,2	6,7	2,5	1,4	1,6

Uit Tabel 8 blijkt dat de titratiemethode steeds een hogere L-appelzuurconcentratie meet dan de enzymatische methode. Hoewel de resultaten van de zuurtitratie uitgedrukt worden in appelzuur-equivalenten is deze methode geen goede indicator voor de werkelijke L-appelzuurconcentratie. Omdat verschillende appelvariëteiten verschillende verhoudingen van organische zuren hebben, wordt mogelijk een beter resultaat bekomen met de titratiemethode indien voor elke variëteit een andere factor gebruikt wordt. Maar om vrij eenvoudig te kunnen vergelijken met metingen die op andere sites worden uitgevoerd en omdat er vaak verschillende variëteiten gemengd worden, kiest Konings ervoor om slechts één factor te gebruiken voor alle variëteiten.

#### **4.2.4 Conclusie**

De L-appelzuurbepaling bereikt niet de gewenste reproduceerbaarheid. De juistheid van deze methode ligt dicht genoeg bij 100% om de concentratie L-appelzuur in een staal te bepalen. De analyse duurt slechts 6 minuten en de prijs per test bedraagt €0,16. Deze methode zou geschikt zijn voor de L-appelzuurbepaling als de reproduceerbaarheid na verdere ontwikkeling verhoogd kan worden.





### 4.3 Sorbitol

#### 4.3.1 Materiaal

- Thermo Fisher Scientific Gallery analyzer
- Megazyme D-Sorbitol/Xylitol assay kit
  - Flesje 1: Buffer pH 8,6
  - Flesje 2: NAD<sup>+</sup> + INT
  - Flesje 3: Diaphorase oplossing
  - Flesje 4: Sorbitoldehydrogenase
  - Flesje 5: Sorbitol standaardoplossing 0,1 g/l
- Beker 150 ml
- Analytische balans Mettler Toledo PR503
- Pipet 100 – 1000 µl
- Pipet 1 - 5 ml
- Merck D-(-)-sorbitol 99%
- Pall Metrigard Glass Fiber Filter 0,45 µm
- KOH (2M)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% v/v)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Katalase
- Maatkolf 50 ml

#### 4.3.2 Methode

##### 4.3.2.1 Ontwikkelen van test

##### Bereiding reagentia

De inhoud van flesje 2 werd opgelost in 6 ml gedestilleerd water. Aan flesje 4 werd 6,1 ml gedestilleerd water toegevoegd voor gebruik. Vervolgens werden de reagentia bereid door de oplossingen te mengen volgens de volumes vermeld in Tabel 9.

Tabel 9: Bereiding van de reagentia R1 en R2 voor de bepaling van sorbitol en xylitol

	Oplossing	Volume
<b>Reagens 1</b>	Gedestilleerd water	34,5 ml
	Oplossing 1: Buffer	10 ml
	Oplossing 2: NAD <sup>+</sup> /INT	4,0 ml
	Oplossing 3: Diaphorase	0,4 ml
<b>Reagens 2</b>	Oplossing 4: SDH	6,1 ml

##### Instellingen analyzer

De nieuwe methode werd in het toestel geprogrammeerd door een nieuwe test aan te maken en bij test flow de volgende stappen in de juiste volgorde te definiëren:

- toevoegen 200 µl R1 met extra 10 µl;
- toevoegen 10 µl staal met extra 10 µl;
- blancometing bij 492 nm;
- toevoegen 25 µl R2 met extra 5 µl;
- 15 minuten incuberen bij 37°C;
- eindpuntmeting bij 492 nm.

Eerst worden reagens 1 en staal samengevoegd en vervolgens werd de absorbantie van het mengsel bepaald door de blanco meting bij 492 nm. Na bepaling van de blanco absorbantie werd reagens 2 toegevoegd dat het enzym bevat en start de reactie waarbij sorbitol en  $\text{NAD}^+$  omgezet worden tot D-fructose en  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Het gevormde NADH reageert vervolgens met INT tot het gekleurde INT-formazaan. Na 15 minuten was de reactie afgelopen en werd het gevormde INT-formazaan gemeten bij 492 nm en door interpolatie op een vooraf opgestelde ijklijn wordt de sorbitolconcentratie berekend.

#### 4.3.2.2 Effect van staalvoorbereiding

Zoals vermeld in 3.4.3 heeft de aanwezigheid van ascorbinezuur een invloed op de sorbitolmeting. Twee verschillende oplossingen voor dit probleem werden onderzocht. Een eerste methode wordt voorgesteld door Megazyme en omvat een staalvoorbereiding die het ascorbinezuur verwijdert uit de oplossing door het te oxideren tot dehydroascorbinezuur. Als alternatief wordt nagegaan of de stalen verdund kunnen worden zodat de uiteindelijke ascorbinezuurconcentratie lager ligt dan  $5 \mu\text{g/ml}$ .

De staalvoorbereiding werd uitgevoerd door 1 ml gefilterd sap of ciderbasis in een maatkolf van 50 ml te pipetteren. Vervolgens werd 30 ml gedestilleerd water, 1 ml KOH (2M) en 0,05 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v) toegevoegd waarna 15 minuten geïncubeerd bij  $25^\circ\text{C}$ . Na incubatie werd aangezuurd met  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1M) tot pH 8. Daarna werd 0,01 ml katalase toegevoegd en na goed mengen werd 20 minuten geïncubeerd bij  $25^\circ\text{C}$ . Tot slot werd tot aan de maatstreep aangelengd met gedemineraliseerd water en werd de oplossing gefilterd. Op het filtraat werden de metingen uitgevoerd.

#### 4.3.3 Validatie

De validatie van juistheid en reproduceerbaarheid worden uitgevoerd zoals beschreven in hoofdstuk 4.1.2.2. Voor de bepaling van de juistheid werd 99% zuiver sorbitol gebruikt.

#### 4.3.4 Resultaten

##### 4.3.4.1 Reproduceerbaarheid

De resultaten voor de reproduceerbaarheid van de sorbitolbepaling worden weergegeven in Tabel 10.

Tabel 10: Resultaten voor de bepaling van de reproduceerbaarheid van de sorbitolmethode voor lage (appel ciderbasis) gemiddelde( peren ciderbasis) en hoge (troebel perensap) sorbitolconcentratie

	Laag	Gemiddeld	Hoog
<b>Gemiddelde (g/l)</b>	1,99	9,52	31,57
<b>Standaardafwijking (g/l)</b>	0,062	0,262	0,477
<b>Variatiecoëfficiënt (%)</b>	3,13	2,75	1,51

Zoals Tabel 10 weergeeft, zijn de standaardafwijkingen voor deze methodevergelijkbaar met de waarden die vermeld worden in Tabel 2 (1,1% tot 2,6%). Verschillende metingen van eenzelfde staal wijken dus niet veel af van elkaar.

#### 4.3.4.2 Juistheid

De resultaten van de terugvindingsexperimenten worden weergegeven in Tabel 11. Voor de bepaling van de juistheid werd gebruik gemaakt van de staalvoorbereiding waarbij het staal verdund werd om de storende invloed van ascorbinezuur te vermijden.

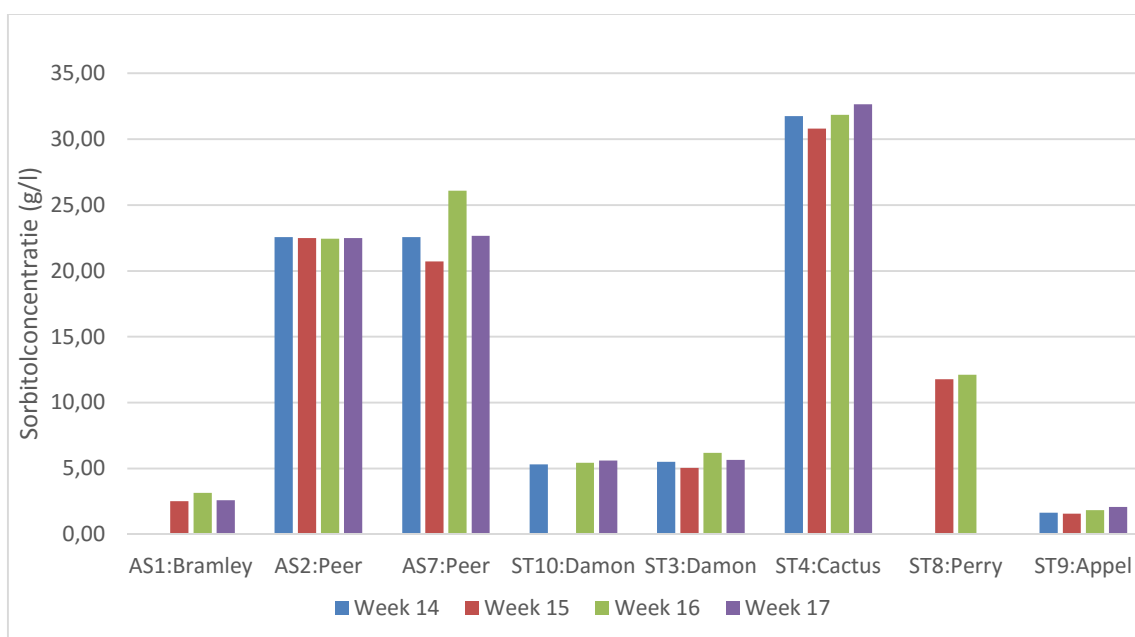
Tabel 11: Resultaten van de terugvindingsexperimenten met de sorbitolmethode uitgevoerd op perenciderbasis

Meting	Concentratie met additie (g/l)	Concentratie zonder additie (g/l)	Toegevoegd Galacturonzuur (g)	Volume staal (l)	$\Delta C$ (g/l)	TV%
1	20,315	9,14	1,101	0,1	11,01	101,50
2	19,34	9,14	0,991	0,1	9,91	102,93
3	19,67	9,14	1,016	0,1	10,16	103,64
4	19,325	9,14	1,036	0,1	10,36	98,31
5	19,60	9,14	1,092	0,1	10,92	95,79
Gemiddelde						<b>100,40</b>

Uit deze resultaten blijkt dat ook de sorbitolmethode in staat is om het opgeloste sorbitol in een staal te bepalen.

#### 4.3.4.3 Metingen tanks

Gedurende enkele weken werd de sorbitolconcentratie bepaald van een aantal tanks waarin sappen en ciderbasissen gestockeerd worden. De resultaten van deze metingen zijn te zien in Grafiek 5.



Grafiek 5: Resultaten van de wekelijkse sorbitolbepaling van de tanks waarbij AS1, AS2, en AS7 troebel sap bevatten en ST3, ST4, ST8, ST9 en ST10 heldere ciderbasis bevatten

Grafiek 5 toont dat de sorbitolconcentraties van AS2, AS7 en ST4 beduidend hoger liggen dan de andere tanks. Deze tanks bevatten perensap of ciderbasis op basis van peer dat, zoals vermeld in hoofdstuk 2.2, een veel hogere sorbitolconcentratie heeft dan appelsap. De resultaten komen overeen met de waarden die in de literatuur vermeld worden. Voor perensap wordt 10 tot 25 g/l vermeld en voor appelsap 2,5 tot 7 g/l (Dietrich et al., 2007).

#### **4.3.5 Conclusie**

De methode voor de bepaling van sorbitol bereikt zowel voor de juistheid als de reproduceerbaarheid de gewenste waarden. De analyse duurt 15 minuten en de prijs per test bedraagt €0,26. Deze methode is dus geschikt om het sorbitolgehalte van vruchtensappen en ciderbassisen te bepalen. De methode kan vooral nuttig zijn om het sorbitolgehalte in dranken op basis van peer te meten omdat uit de resultaten van de tanks blijkt dat deze soms meer dan de maximum toegelaten sorbitolconcentratie bevatten.

## 4.4 Citroenzuur

### 4.4.1 Materiaal

- Thermo Fisher Scientific Gallery Plus analyzer
- Sigma Aldrich Citric acid monohydrate >99,9998
- Megazyme citric acid kit
  - Flesje 1: Buffer pH 7,5
  - Flesje 2: NADH + PVP
  - Flesje 3: L-Malaatdehydrogenase + D-lactase
  - Flesje 4: Citraatlyase
  - Flesje 5: Citroenzuur standaardoplossing 0,2 g/l
- Beker 150 ml
- Analytische balans Mettler Toledo PR503
- Pipet 100 – 1000 µl
- Pipet 1 - 5 ml
- Pall Metrigard Glass Fiber Filter

### 4.4.2 Methode

#### Bereiding reagentia

De inhoud van flesje 2 werd opgelost in 6 ml gedestilleerd water. Aan flesje 4 werd 0,55 ml gedestilleerd water toegevoegd. Vanuit deze oplossing werd vervolgens wekelijks 0,125 µl opgelost in 1,625 µl gedemineraliseerd water voor gebruik. Vervolgens werden de reagentia bereid door de oplossingen te mengen volgens de volumes vermeld in Tabel 12.

Tabel 12: Bereiding van de reagentia R1 en R2 voor de bepaling van citroenzuur

	Oplossing	Volume
<b>Reagens 1</b>	Gedestilleerd water	51,50 ml
	Oplossing 1: Buffer	13,00 ml
	Oplossing 2: NADH/PVP	5,00 ml
	Oplossing 3: L-MDH/D-LDH	0,50 ml
<b>Reagens 2</b>	Oplossing 4: Citraat Lyase	1,75 ml

#### Instellingen analyzer

De nieuwe methode werd in het toestel geprogrammeerd door een nieuwe test aan te maken en bij test flow de volgende stappen in de juiste volgorde te definiëren:

- toevoegen 125 µl R1 met extra 5 µl;
- toevoegen 125 µl R1 met extra 5 µl;
- toevoegen 10 µl staal met extra 10 µl;
- blancometing bij 340 nm;
- toevoegen 25 µl R2 met extra 5 µl;
- 5 minuten incuberen bij 37°C;
- eindpunt meting bij 340 nm.

Eerst werden reagens 1 en staal toegevoegd en vervolgens werd de absorbantie van het mengsel bepaald bij 340 nm, dit is de blanco. Vervolgens werd reagens 2 toegevoegd dat het enzym bevat. Het citraatlyase zet citroenzuur om tot oxaalacetaat dat vervolgens door L-MDH wordt omgezet tot malaat in een reactie waarbij NADH wordt omgezet tot

NAD<sup>+</sup>. Ten slotte wordt de eindabsorbantie gemeten bij 340 nm en door interpolatie op een vooraf opgestelde ijklijn wordt de citroenzuurconcentratie berekend.

#### 4.4.3 Validatie

De validatie van juistheid en reproduceerbaarheid worden uitgevoerd zoals beschreven in hoofdstuk 4.1.2.2.

#### 4.4.4 Resultaten

##### 4.4.4.1 Reproduceerbaarheid

De resultaten voor de reproduceerbaarheid van de citroenzuurbepaling worden weergegeven in Tabel 13.

Tabel 13: Resultaten voor de bepaling van de reproduceerbaarheid van de citroenzuurmethode voor lage (perensap), gemiddelde (perensap) en hoge (perenciderbasis) citroenzuurconcentratie met gemiddelde en standaardafwijking in g/l en de variatiecoëfficiënt in %

	Laag	Gemiddeld	Hoog
<b>Gemiddelde (g/l)</b>	0,150	0,247	0,368
<b>Standaardafwijking (g/l)</b>	<b>0,0029</b>	<b>0,0055</b>	<b>0,0062</b>
<b>Variatiecoëfficiënt (%)</b>	<b>1,97</b>	<b>2,23</b>	<b>1,69</b>

Zoals te zien is in Tabel 13 zijn de standaardafwijkingen voor deze methode vergelijkbaar met de waarden die vermeld werden in Tabel 2 (1,1% tot 2,6%).

##### 4.4.4.2 Juistheid

De resultaten van de terugvindingsexperimenten worden weergegeven in Tabel 14.

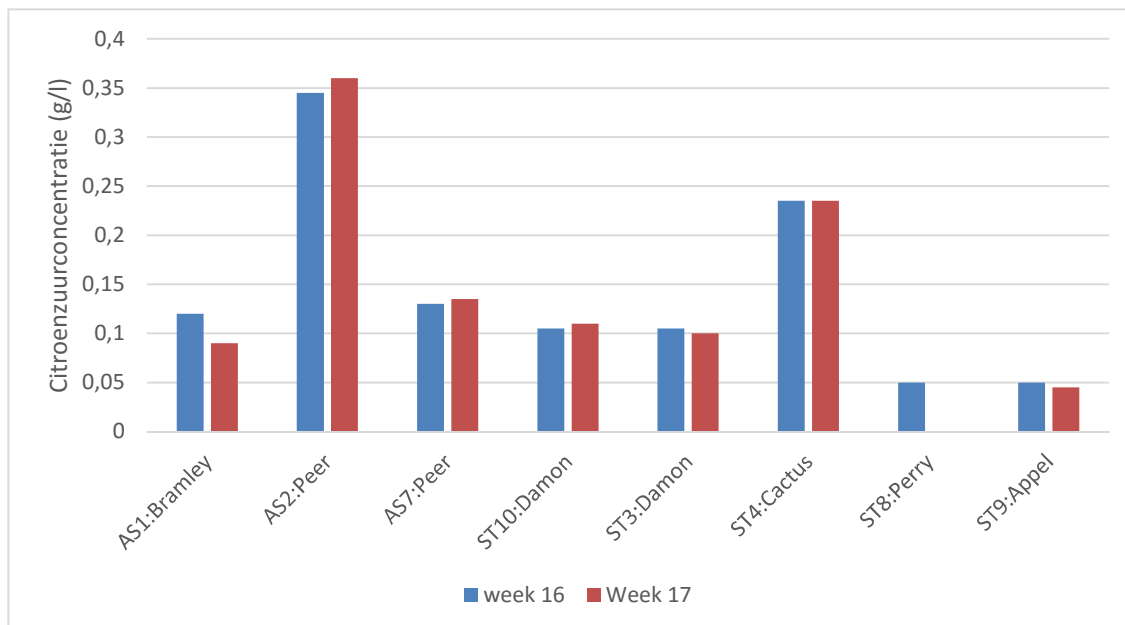
Tabel 14: Resultaten van de terugvindingsexperimenten met de citroenzuurmethode uitgevoerd op perenciderbasis.

Meting	Concentratie met additie (g/l)	Concentratie zonder additie (g/l)	Toegevoegd Galacturonzuur (g)	Volume staal (l)	$\Delta C$ (g/l)	TV%
1	4,98	0,26	0,243	0,05	4,864	97,04
2	4,99	0,26	0,240	0,05	4,791	98,73
3	5,22	0,26	0,252	0,05	5,047	98,28
4	5,39	0,26	0,269	0,05	5,376	95,43
5	4,96	0,26	0,243	0,05	4,864	96,63
6	4,82	0,26	0,240	0,05	4,791	95,19
7	5,13	0,26	0,252	0,05	5,047	96,50
8	5,43	0,26	0,269	0,05	5,376	96,17
<b>Gemiddelde</b>						<b>96,75</b>

Uit deze resultaten blijkt dat de citroenzuurmethode in staat is 96,75% van het toegevoegde citroenzuur te bepalen. Dit is nog steeds dicht genoeg bij de gewenste 100% terugvinding om bruikbaar te zijn voor de bepaling van citroenzuur.

#### 4.4.4.3 Metingen tanks

Gedurende enkele weken werd de citroenzuurconcentratie bepaald van een aantal tanks waarin sappen en ciderbasissen gestockeerd worden. De resultaten van deze metingen worden weergegeven in Grafiek 6.



**Grafiek 6: Resultaten van de wekelijkse citroenzuurbepaling van de tanks waarbij AS1, AS2, en AS7 troebel sap bevatten en ST3, ST4, ST8, ST9 en ST10 heldere ciderbasis bevatten**

Uit de metingen van de tanks blijkt dat het citroenzuurgehalte van de ciderbasissen en sappen veel lager is dan de L-appelzuurconcentraties die te zien zijn in Grafiek 4. In de literatuur worden voor appelsap bij een onderzoek op 175 appelvariëteiten waarden vermeld van 0,08 g/l tot 0,270 g/l (Eisele & Drake, 2005).

#### 4.4.5 Conclusie

De methode voor de bepaling van citroenzuur heeft een lage standaardafwijking en bereikt de gewenste reproduceerbaarheid. De terugvinding van deze methode bedraagt 96,7%. Dit is nog dicht genoeg bij de gewenste 100% om bruikbaar te zijn voor de bepaling van citroenzuur in stalen. De analyse duurt slechts 5 minuten en de prijs per test bedraagt €0,18. Deze methode is bijgevolg geschikt voor de snelle bepaling van citroenzuur in vruchtensappen en ciders.





## 4.5 D-appelzuur

### 4.5.1 Materiaal

- Thermo Fisher Scientific Gallery Plus analyzer
- Megazyme D-Malic acid assay kit
  - Flesje 1: Buffer pH 8,0
  - Flesje 2: NAD<sup>+</sup>
  - Flesje 3: D-Malaat dehydrogenase suspensie
  - Flesje 4: D-appelzuur standaardoplossing 0,2 g/l
- Beker 150 ml
- Analytische balans Mettler Toledo PR503
- Pipet 100 – 1000 µl
- Pipet 1 - 5 ml
- Pall Metrigard Glass Fiber Filter 0,45 µm

### 4.5.2 Methode

#### 4.5.2.1 Ontwikkeling van test

##### Bereiding van reagentia

Oplossing 2: NAD<sup>+</sup> werd geleverd als gevriesdroogd poeder en werd opgelost in 11 ml gedestilleerd water voor gebruik. De reagentia werden bereid door de oplossingen te mengen volgens de volumes die weergegeven worden in Tabel 15.

Tabel 15: Volumes voor de bereiding van reagens 1 en 2 voor de bepaling van D-appelzuur

	Oplossing	Volume
<b>Reagens 1</b>	Gedestilleerd water	45,6 ml
	Oplossing 1: Buffer	5,5 ml
	Oplossing 2: NAD <sup>+</sup>	5,5 ml
<b>Reagens 2</b>	Gedestilleerd water	6,53 ml
	Oplossing 3: D-MDH	0,55 ml

Na bereiding werden de oplossingen overgebracht naar buisjes en in de analyzer geplaatst.

##### Instellingen analyzer

De nieuwe methode werd vervolgens geprogrammeerd in de Gallery analyzer door bij test flow de volgende stappen in te stellen:

- toevoegen 200 µl R1 met extra 10 µl;
- toevoegen 20 µl staal met extra 10 µl;
- blancometing bij 340 nm;
- toevoegen 25 µl R2 met extra 5 µl;
- 360 seconden incubatie bij 37°C;
- meting eindpunt bij 340 nm.

Reagens 1 en staal werden samengevoegd en een blancometing werd uitgevoerd bij 340 nm. Na bepaling van de blanco absorptie werd reagens 2 toegevoegd dat het enzym bevat om de reactie te starten. Tijdens de 6 minuten durende incubatie reageert het D-appelzuur waarbij een equivalente hoeveelheid NADH + H<sup>+</sup> gevormd worden. Het gevormde NADH wordt vervolgens bepaald bij 340 nm en door interpolatie op een vooraf opgestelde ijklijn wordt de D-appelzuurconcentratie berekend.

#### 4.5.2.2 Validatie

De validatie van reproduceerbaarheid wordt uitgevoerd zoals beschreven in hoofdstuk 4.1.2.2 Validatie.

#### 4.5.3 Resultaten

##### 4.5.3.1 Reproduceerbaarheid

De resultaten voor de reproduceerbaarheid van de D-appelzuurmethode worden weergegeven in Tabel 16.

**Tabel 16: Resultaten van de bepaling van de reproduceerbaarheid van de D-appelzuurmethode voor lage (appel ciderbasis) , gemiddelde (appel ciderbasis) en hoge concentratie (peer ciderbasis)**

	<b>Laag</b>	<b>Gemiddeld</b>	<b>Hoog</b>
<b>Gemiddelde (g/l)</b>	1,03	1,29	1,35
<b>Standaardafwijking (g/l)</b>	0,0346	0,0625	0,0337
<b>Variatiecoëfficiënt (%)</b>	3,36	4,83	2,49

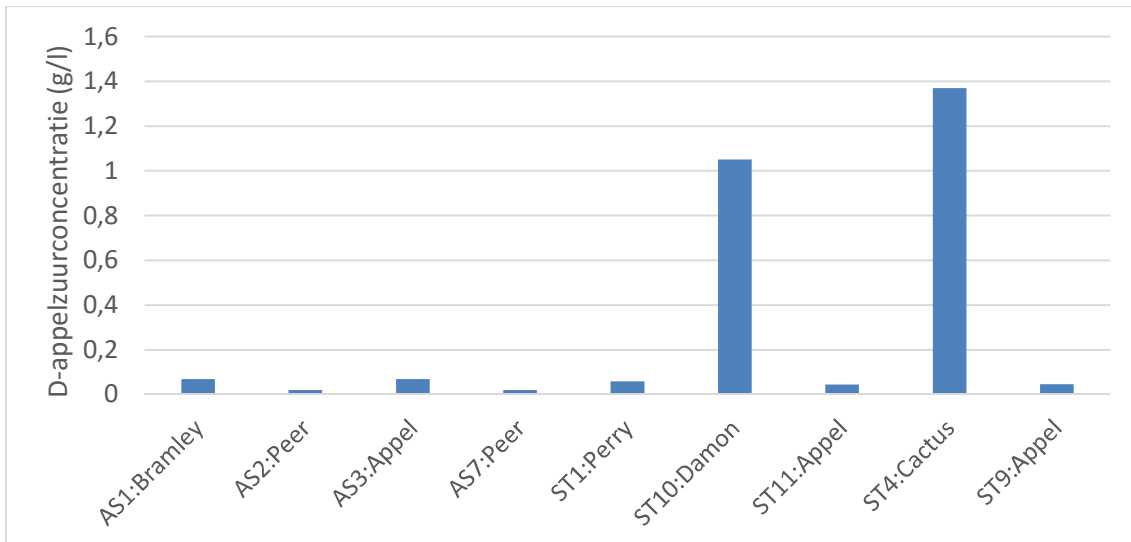
Uit Tabel 16 blijkt dat de resultaten voor de reproduceerbaarheid bij lage en gemiddelde concentraties iets hoger liggen dan de waarden vermeld in Tabel 2 (1,1 tot 2,6%). Dit kan te wijten zijn aan de relatief hoge blancowaarden die gemeten werden tijdens het uitvoeren van de test. Verder onderzoek zou de reproduceerbaarheid van deze methode mogelijk kunnen verlagen. De hoge blancowaarde kan mogelijk vermeden worden door een kleiner volume staal toe te voegen.

##### 4.5.3.2 Juistheid

Wegens gebrek aan een geschikte standaard was er voor de D-appelzuurmethode geen bepaling van de juistheid mogelijk.

##### 4.5.3.3 Metingen tanks

De D-appelzuurconcentratie werd bepaald van een aantal tanks waarin sappen en ciderbasissen gestockeerd worden. De resultaten van deze metingen worden weergegeven in Grafiek 7.



**Grafiek 7: Resultaten voor de metingen van een aantal tanks met de D-appelzuurmethode waarbij AS1, AS2, en AS7 troebel sap bevatten en AS3, ST3, ST4, ST8, ST9 en ST10 heldere ciderbasis bevatten**

Uit Grafiek 7 blijkt dat de D-appelzuurconcentratie in de meeste sappen en ciderbasisen zeer laag is. Dit is te verklaren doordat D-appelzuur niet natuurlijk voorkomt en enkel aanwezig kan zijn door toevoeging van kunstmatig geproduceerd appelzuur. Dit appelzuur is een mengeling van D en L-appelzuur en wordt toegevoegd om de smaak en zuurtegraad van de ciderbasis aan te passen (Kuhnert & Kuhnert, 2016).

#### 4.5.4 Conclusie

De methode voor de bepaling van D-appelzuur heeft een standaardafwijking die overeenkomt met de andere methodes die ontwikkeld zijn voor de Gallery analyzer. De analyse duurt 6 minuten en de prijs per test bedraagt €0,17. Indien uit verdere validatie blijkt dat de methode ook de gewenste juistheid behaalt, kan de test gebruikt worden voor de bepaling van D-appelzuur. Dit kan nuttig zijn om de toevoeging van appelzuur te controleren.



## 5 Besluit

De doelstelling van deze masterproef was het optimaliseren en valideren van methodes voor de accurate bepaling van galacturonzuur, sorbitol, L- en D-appelzuur en citroenzuur. Deze methodes moeten tevens een lagere kostprijs hebben dan de externe analyses en moeten snel en eenvoudig uitvoerbaar zijn door de laboranten.

Analyses op de Thermo Scientific Gallery via enzymatische methodes blijken bijna allemaal aan deze doelstellingen te voldoen. Uit de behaalde resultaten geldt dit namelijk voor de bepaling van sorbitol en citroenzuur. De bepaling van galacturonzuur en D-appelzuur hebben een voldoende lage standaardafwijking maar er is verder onderzoek nodig om de juistheid met voldoende zekerheid te bepalen. De methode voor de bepaling van L-appelzuur heeft een te hoge standaardafwijking en naar de oorzaak hiervan moet in een verder onderzoek gezocht worden.

De kostprijs van deze methodes zijn beduidend lager dan de kostprijs van een externe analyse. De automatische spectrofotometer, de Thermo Scientific Gallery, heeft een zeer laag reagentiaverbruik waardoor de kostprijs per test beperkt blijft tot maximaal €0,26 voor de duurste bepaling.

Andere voordelen van het gebruik van een automatische spectrofotometer is de snelle analysetijd, de eenvoudige uitvoering eens de methoden geprogrammeerd zijn en de beperkte staalvoorbereiding. Hierdoor zijn resultaten van de analyses beschikbaar na 5 tot 15 minuten en kunnen de methodes gebruikt worden in een productieomgeving waarbij niet altijd tijd is om externe analyses af te wachten. De resultaten worden samengevat weergegeven in Tabel 17

Tabel 17: Samengevat resultaat van de verschillende bepalingen

Bepaling	Juistheid (%)	Variatiecoëfficiënt bij gemiddelde concentratie (%)	Kostprijs per test (€)	Analysetijd (minuten)
Galacturonzuur	91,0	2,51	0,20	10
Sorbitol	100,4	2,75	0,26	15
L-Appelzuur	100,1	2,87	0,16	6
Citroenzuur	96,7	2,23	0,18	5



## Bibliografie

- Barden, M. Croft, J. Murby, R. W. (1997). Gas chromatographic determination of organic acids from fruit juices by combined resin mediated methylation and extraction in supercritical carbon dioxide. *Journal of Chromatography*, 785, 251–261.
- Bastos, S. S. T., Tafulo, P. A. R., Queirós, R. B., Matos, C. D., & Sales, M. G. F. (2009). Rapid determination of tartaric acid in wines. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 12(7), 712–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19531018>
- Benvenuti, M. E., & Burgess, J. a. (2012). Monitoring Sugar Content of Fruit Juice Using ACQUITY UPLC H-Class and BEH Amide Column Chemistry with Evaporative Light Scattering Detection ( ELSD ), 1–6.
- Blanco Gomis, D., Muro Tamayo, D., & Mangas Alonso, J. (2001). Determination of monosaccharides in cider by reversed-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 436(1), 173–180. [http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)00889-3](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)00889-3)
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54(2), 484–489. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90377-1](http://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90377-1)
- Brummer, Y., & Cui, S. W. (2005). Understanding Carbohydrate Analysis. *Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties, and Applications*, (July), 68–104. <http://doi.org/doi:10.1201/9780203485286.ch2>
- Burana-osot, J., Soonthornchareonnon, N., Chaidedgumjorn, A., Hosoyama, S., & Toida, T. (2010). Determination of galacturonic acid from pomelo pectin in term of galactose by HPAEC with fluorescence detection. *Carbohydrate Polymers*, 81(2), 461–465. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.001>
- Dietrich, P. D. H., Krüger-Steden, D. E., Patz, D. C.-D., Will, D. F., Rheinberger, A., & Hopf, I. (2007). INCREASE OF SORBITOL IN PEAR AND APPLE JUICE BY WATER STRESS , A CONSEQUENCE OF CLIMATIC CHANGE ?, (December), 348–355.
- Eisele, T. A., & Drake, S. R. (2005). The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(2-3), 213–221. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.01.002>
- Escobar-Gutiérrez, A., & Gaudillère, J. (1996). Distribution , metabolism and role of sorbitol in higher plants . A review. *Agronomie*, 16(JANUARY 1996), 281–298.
- Flores, P., Hellín, P., & Fenoll, J. (2012). Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 132(2), 1049–1054. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.064>
- Goeij, S. De. (2013). Quantitative analysis methods for sugars, 43.
- Horsmans Poulsen, C., Kragh, K. M., Frisbak Sorensen, J., Grassin, C., Herweijer, M., Wilms, J., ... Borch Soe, J. (2008). Enzymes, 3. Food Application. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. [http://doi.org/10.1002/14356007.m09\\_m02](http://doi.org/10.1002/14356007.m09_m02)
- Horváth-Kerkai, E., & Stéger-Máté, M. (2012). Manufacturing Fruit Beverages and Concentrates. In *Handbook of Fruits and Fruit Processing* (pp. 213–228). Oxford, UK: Wiley-Blackwell. <http://doi.org/10.1002/9781118352533.ch13>
- Ibarz, A., Garza, S., & Pagán, J. (2008). Nonenzymatic browning of selected fruit juices affected by D-galacturonic acid. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(5), 908–914. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01541.x>
- Ibarz, A., Pagán, A., Tribaldo, F., & Pagán, J. (2006). Improvement in the measurement of spectrophotometric data in the m-hydroxydiphenyl pectin determination methods.



- Food Control*, 17(11), 890–893. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.06.007>
- Kassaian, J.-M., & Kassaian, J. (2000). Tartaric Acid. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. [http://doi.org/10.1002/14356007.a26\\_163](http://doi.org/10.1002/14356007.a26_163)
- Katona, Z. ., Sass, P., & Molnár-Perl, I. (1999). Simultaneous determination of sugars, sugar alcohols, acids and amino acids in apricots by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 847(1-2), 91–102. [http://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00333-7](http://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00333-7)
- Klaessens, J. W. . (2013). *Statistiek, validatie en meetonzekerheid voor het laboratorium* (3rd ed.). Utrecht: Syntax Media.
- Kuhnert, P., & Kuhnert, P. (2016). Foods, 3. Food Additives. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (pp. 1–52). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. [http://doi.org/10.1002/14356007.a11\\_561.pub2](http://doi.org/10.1002/14356007.a11_561.pub2)
- Leclere, L., Cutsem, P. Van, & Michiels, C. (2013). Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin, 4(October), 1–8. <http://doi.org/10.3389/fphar.2013.00128>
- Lee, J. (2015). Sorbitol, Rubus fruit, and misconception. *Food Chemistry*, 166, 616–622. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.073>
- Lian, H. Z., Mao, L., Ye, X. L., & Miao, J. (1999). Simultaneous determination of oxalic, fumaric, maleic and succinic acids in tartaric and malic acids for pharmaceutical use by ion-suppression reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 19(3-4), 621–625. [http://doi.org/10.1016/S0731-7085\(98\)00101-0](http://doi.org/10.1016/S0731-7085(98)00101-0)
- Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, J. L. G. (2012). *Practical HPLC Method Development* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
- Megazyme International Ireland. (2011). Arabinan Assay procedure.
- Megazyme International Ireland. (2014a). Citric acid (citrate) (extended stability) assay procedure, 14(K-CITR 11/14).
- Megazyme International Ireland. (2014b). D-GLUCURONIC ACID & D-GALACTURONIC ACID. Retrieved from [https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-URONIC\\_DATA.pdf](https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-URONIC_DATA.pdf)
- Megazyme International Ireland. (2014c). D-MALIC ACID assay. Megazyme. Retrieved from <https://secure.megazyme.com/D-Malic-Acid-Assay-Kit>
- Megazyme International Ireland. (2014d). L-MALIC ACID (Analyser Format) ASSAY PROCEDURE FOR AUTO-ANALYSER, 1–4.
- Megazyme International Ireland. (2015). D-sorbitol/xylitol ASSAY PROCEDURE. Megazyme. Retrieved from [www.megazyme.com](http://www.megazyme.com)
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 266–277. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.03.006>
- N. Koizumi M. Fujii, R. Ninomiya, Y. Inoue, T. Tsukamoto, T. K. (1983). STUDIES ON TRANSITORY LAXATIVE EFFECTS OF SORBITOL AND MALTITOL. *Chemosphere*, 12(1), 45–53.
- Nour, V., Trandafir, I., & Ionica, M. E. (2015). HPLC Organic Acid Analysis in Different Citrus Juices under Reversed Phase Conditions HPLC Organic Acid Analysis in Different Citrus Juices under Reversed Phase Conditions, (JANUARY 2010).
- R-Biopharm. (n.d.). D-Sorbitol / Xylitol Colorimetric method.
- Scherer, R., Rybka, A. C. P., Ballus, C. A., Meinhart, A. D., Filho, J. T., & Godoy, H. T. (2012). Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Chemistry*, 135(1), 150–154. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.111>
- Shui, G., & Leong, L. (2002). Separation and determination of organic acids and phenolic

- compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 977, 89–96. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967302013456>
- Sigma-Aldrich. (2016a). D-(+)-Galacturonic acid monohydrate. Retrieved from <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/48280?lang=en&region=BE>
- Sigma-Aldrich. (2016b). Enzymatic Method for Determining D-Sorbitol (D-Sorbitol Assay). Retrieved from <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/d-sorbitol-assay-kit-mak010.html>
- Taylor, K. a, & Buchanan-smith, J. G. (1992). A Colorimetric Method for the Quantitation Acids and a Specific Assay for Galacturonic of Uranic Acid, *196*, 190–196.
- Thermo Fisher Scientific. (2011). D-glucose+D-fructose+sucrose insert. Vantaa: Thermo Scientific.
- Velterop, J. S., & Vos, F. (2001). A rapid and inexpensive microplate assay for the enzymatic determination of glucose, fructose, sucrose, L-malate and citrate in tomato (*Lycopersicon esculentum*) extracts and in orange juice. *Phytochemical Analysis*, 12(5), 299–304. <http://doi.org/10.1002/pca.598>
- Verhoff, F. H., & Bauweleers, H. (2012). Citric acid. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Vol. 57 Suppl, pp. 657–659).
- Vermeir, S., Nicolai, B. M., Jans, K., Maes, G., & Lammertyn, J. (2007). High-throughput microplate enzymatic assays for fast sugar and acid quantification in apple and tomato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9), 3240–3248. <http://doi.org/10.1021/jf0637022>
- Zielinski, A. A. F., Braga, C. M., Demiate, I. M., Beltrame, F. L., Nogueira, A., & Wosiacki, G. (2014). Development and optimization of a HPLC-RI method for the determination of major sugars in apple juice and evaluation of the effect of the ripening stage. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34(1), 38–43. <http://doi.org/10.1590/S0101-20612014005000003>

# Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

**Ontwikkeling en validatie van colorimetrische methoden voor de bepaling van kwaliteitsparameters van vruchtensappen en ciders met de Thermo Scientific Gallery**

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**

Jaar: **2016**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

**Meijen, Pär**

Datum: **13/06/2016**