ELECTROMETRISCH ONDERZOEK DER THEE-FERMENTATIE IN VERBAND MET DE KWALITEIT

PROEFSCHRIFT
TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN
DOCTOR IN DE LANDBOUWKUNDE
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
Dr J. SMIT, HOOGLERAAR IN DE MICROBIOLOGIE, TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN VAN EEN COMMISSIE UIT DE SENAAT DER LANDBOUWHOGESCHOOL TE WAGENINGEN OP WOENSDAG 3 MAART 1948
TE 15 UUR DOOR

J. E. TJIA
(TJIA BING-SIEN)

GEBR. VERWEIJ • WAGENINGEN • 1948

ERRATA

behorende bij het proefschrift van J. E. Tjia.

p 9 — Bij de formule voor ascorbinezuur aan de 2de C een OH.

p 42 — $$E = \frac{RT}{F} \ln C_0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{1}{(e)}$$

p 59 — i.p.v. regel 1 t/m 14 — De middelbare fout bij dit gemiddelde is volgens Van Uven $\sigma = \sqrt{\frac{(uu)}{n(n-1)}}$, waarbij (uu) is de som van u^2 en $u = x - X$.

Van Pecco is het gemiddelde bladgewicht 70,2 ± 11,5 mg en het gemiddelde gehalte aan ascorbinezuur is 1,25 ± 0,068 mg per gram vers blad.
Het gemiddelde gehalte aan ascorbinezuur van het eerste en tweede blad is respectievelijk 1,16 ± 0,05 en 1,15 ± 0,03 mg per gram vers blad.
Het verschil hiertussen is gering, zodat er weinig sprake is van de invloed van de ouderdom op het ascorbinezuurgehalte.

p 77 — regel 4 van onder — Sreerangachar.

p 90 — boven de tabel — activeringsstoffen i.p.v. remstoffen.

p 103

regel 3 — Het kwadraat van de middelbare fout:

regel 4 — $$\sigma^2_Q = \left(\frac{1}{(g)} + \frac{X^2}{(guu)}\right) \sigma^2$$

regel 7 — Voor deze P + 2 is M = 0,73 ± 0,104
Q = 0,016 ± 0,121

regel 13 — M = 0,407 ± 0,533
Q = 0,035 ± 0,614

regel 19 — daling van de M (i.p.v. stijging) en stijging van de Q (i.p.v. daling)

regel 3 van onder — fig. 10 i.p.v. fig. 9.

p 104 — M = 0,029 ± 0,01
Q = 2,433 ± 0,013

regel 14 van onder — Daarom menen we, dat M voldoende is, om de potentiële kwaliteit te bepalen, wat voor de praktijk van veel nut kan zijn. De middelbare fout van M is volgens het voorbeeld wel wat groot om betrouwbaar te zijn, maar door het aantal waarnemingen te vergroten kan de betrouwbaarheid van M mede worden vergroot.

STELLINGEN

I

Meer dan tot dusver moet gezocht worden naar een objectieve beoordeling van de kneuzing, die de kwaliteit van zwarte thee in hoge mate bepaalt.

Deze dissertatie.

II

De steeltjes der geplukte theeloten dienen op grond van hun veel lagere fermentatieactiviteit reeds vóór de verflenzing te worden verwijderd.

Deze dissertatie.

III

De wiskundig berekende activiteit van de electrometrisch bepaalde fermentatie is een objectieve basis voor de kwalitatieve theeselectie.

Deze dissertatie.

IV

Bij potentiometrische titraties van ascorbinezuur met 2—6 dichlorophenolindophenol worden storende invloeden van aanwezige zuurstof te weinig in aanmerking genomen.

Harris, Mapson en Wang —
Bioch. Journ. 1942—36—183
Spruijt J. P. —
Chem. Weekblad 1947-2189-756

V

Het verschil tussen organisch en anorganisch phosphaat geeft onvoldoende inzicht in phosphoryleringsreacties in de levende cel.

VI

De contrôle van het droogproces van fruit door de bepaling van de relatieve vochtigheid en van de elasticiteit moet worden vervangen door de bepaling van de plotselinge stijging van de temperatuur der uitlaatlucht.

VII

Het gebruik van mindere kwaliteit appels voor electrisch drogen komt in Nederland niet in aanmerking.

VIII

De door onregelmatige beschaduwing der theestruiken ongewenste verhoging van de heterogeniteit van het plukmateriaal is toe te schrijven aan de formatieve invloed van licht.

IX

China zal door rationalisatie van de cultuur en van de bereiding van groene thee meer voordeel verkrijgen dan door toepassing van de gemechaniseerde fabricage van zwarte thee.

X

Met het oog op de overjarige cultures in de tropen, moeten de studenten, die de tropische landbouw bestuderen, minstens een maand bij een boomkweker werkzaam zijn.

XI

De praktijk na de candidaatstudie moet door een aparte commissie worden georganiseerd en gecontroleerd.

VOORWOORD

Bij het beëindigen van dit proefschrift, gevoel ik behoefte allen, Hoogleraren, docenten en assistenten aan de Landbouwhogeschool te Wageningen, die tot mijn academische vorming hebben bijgedragen, mijn bijzondere erkentelijkheid te betuigen.

In de eerste plaats gaat mijn dank uit naar U, Hooggeleerde Tendeloo, hooggeachte promotor, voor de leiding, die U bij mijn onderzoekingen steeds heeft willen geven en voor de moeite, die U zich getroost heeft om voor mij financiële bijstand te verkrijgen, ben ik U tevens ten zeerste dankbaar. Dat Gij nimmer twijfel hebt doen blijken in de uitslag van mijn onderzoek, is voor mij een grote steun geweest om vol te houden tot een resultaat was bereikt.

Hooggeleerde Wassink, hooggeachte promotor, ik beschouw het als een grote eer om tot de eerste te behoren, die bij U gaan promoveren. Ondanks de korte tijd, dat ik U heb mogen assisteren, heb ik Uw kritische geest leren bewonderen en ik ben U ten hoogste dankbaar, dat U Uw fiat op mijn werk heeft willen geven.

Hooggeleerde van der Stok, het feit, dat de gedachtegang, welke aan dit proefschrift ten grondslag ligt, op Uwe colleges is ontstaan, bewijst voldoende welk een beslissende invloed Gij op mijn vorming hebt gehad.

Uw bereidwilligheid voor de ter beschikkingstelling van het plantmateriaal en Uw enthousiasme bij de gesprekken over dit onderwerp, zijn niet genoeg te waarderen

Zeer Geleerde Deijs, dat U ondanks Uw drukke werkzaamheden in Uw nieuwe functie de tijd heeft gevonden om mijn werk aan Uw critiek te onderwerpen en goed te keuren, stemt mij ten hoogste dankbaar. Ik wil hierbij de hoop uitspreken, dat U spoedig in de gelegenheid zal worden gesteld, om Uw onderzoekingen betreffende de theefermentatie opnieuw ter hand te nemen.

Zeer Geleerde Swart Voorspuij, zeer veel heb ik gehad aan de talrijke gesprekken met U gevoerd. Met weemoed denk ik terug aan de plannen, welke we door de evacuatie hebben moeten opgeven.

Waarde van Wijk, ik wil U hierbij van harte danken voor al het vele en goede, dat ik van U heb ondervonden. Mijn talrijke verzoeken om hulp is U nooit teveel geweest. Uw blaaswerk en vooral Uw bereidwilligheid worden door mij dan ook ten zeerste geapprecieerd.

Tenslotte gaat mijn dank uit naar de Nederlandsche Handelmaatschappij, die voor mijn onderzoek warme belangstelling heeft getoond.

INHOUD.

Inleiding 1

Hoofdstuk I

Literatuuroverzicht van de chemie van het theeblad 5
A — De chemische samenstelling 5
B — De verschillende phasen van de bereiding 17
C — De enzymatische omzettingen in het blad tijdens de bereiding 24
D — Het mechanisme van de fermentatie 27

Hoofdstuk II

De oxydatie-reductie potentiaal 37
A — De ademhaling of het katabolisme 37
B — De oxydatie-reductie potentiaal en de afleiding der formules 40
C — De oxydatie-reductie potentiaal in biologische stelsels 45

Hoofdstuk III

De electrometrische titratie van ascorbinezuur in theeblad 48
A — De electrometrische titratie van Ferro (Mohr's zout) met twee verschillende electroden 48
B — De electrometrische titratie van synthetisch ascorbinezuur 50
C — Het ascorbinezuurgehalte van verschillende bladen van een struik 58

Hoofdstuk IV

De bepaling van de oxydatie-reductie potentiaal in fermenterende thee en de invloed van verschillende factoren op de fermentatie 60
A — Vooronderzoek ter verkrijging van een methode, welke geschikt is voor fermenterende thee 60
B — Invloed van de verflenzing op de fermentatie 68
C — De electrometrische fermentatiecurves van de opvolgende bladen van een theeloot 71
D — De invloed van de temperatuur op de fermentatie .. 75
E — De invloed van de aeratie op de fermentatie 78
F — Nabeschouwing 79

Hoofdstuk V

Onderzoek van het vermogen van theeblad om ascorbinezuur te oxyderen 84
A — Inleiding 84
B — Het onderzoek naar de katalysatoren van de oxydatie van ascorbinezuur in het theeblad 90
G — Invloed van zware metalen als Cu en Fe op de oxydatie van ascorbinezuur 95
D — Nabeschouwing 97

Hoofdstuk VI

Wiskundige berekening van de fermentatieactiviteit en van het vermogen van het theeblad om ascorbinezuur te oxyderen ten behoeve van de kwalitatieve selectie .. 100
A — Inleiding 100
B — De toepassing van de rechtlijnige vereffening op het vermogen van het blad om ascorbinezuur te oxyderen 102
C — De toepassing van de rechtlijnige vereffening op de electrometrische fermentatiecurve 103

Slotbeschouwing 105

Samenvatting 114

Summary 118

Literatuurlijst 122

INLEIDING

De moderne theefabricage, zoals die o.a. op Java wordt toegepast en welke in wezen vrijwel geheel afwijkt van de Chinese bereidingsmethode, is vrij sterk gemechaniseerd. Het feit, dat men te veel aandacht heeft besteed aan de mechanisering van de bereiding en te weinig aan chemische onderzoekingen, heeft er toe geleid, dat over verschillende problemen, welke betrekking hebben op de bereiding, uiteenlopende meningen worden gehuldigd.

In de laatste decennia echter zijn door talrijke chemische onderzoekingen en enquêtes verschillende van die problemen opgehelderd, maar niettemin zijn er nog tal van vraagstukken, die een nader onderzoek verdienen.

In het begin dezer eeuw hechtte men zeer veel aandacht aan de kwaliteit van het bereide product. Men probeerde o.a. een verband te zoeken tussen de kwaliteit enerzijds, welke abusievelijk door de prijs werd voorgesteld en anderzijds de asanalyses van de grond en van verse en bereide theebladen. Zeer waarschijnlijk heeft men gehoopt om door bemestingen de kwaliteit te kunnen opvoeren. Dat deze onderzoekingen op niets zijn uitgelopen, was eigenlijk wel te verwachten, daar zowel de opzet der proeven als de voorstelling van de kwaliteit door de prijs onjuist was. Men hield nl. geen rekening met de invloed van de grond, de bereiding, klimaat en type en tenslotte is in de prijs ook vraag en aanbod, dus de invloed van de markt, opgenomen. Ook het zoeken naar een verband tussen de kwaliteit enerzijds en enkele organische bestanddelen, als looistoffen en caffeïne anderzijds, hebben om de zelfde redenen geen resultaten gebracht. Sindsdien werd het kwaliteitsprobleem meer met rust gelaten en ging men zich toeleggen op de bestudering van de chemie van het theeblad. Men onderzocht o.m. het gedrag der peroxydase, daar men in de mening verkeerde, dat dit enzym tot de voornaamste enzymen in het theeblad behoorde en in de laatste tien jaren nam men ook het mechanisme van de fermentatie onder de loupe. Dergelijke onderzoekingen hebben ons inziens meer zin, daar we daaromtrent nog volkomen in het duister tasten en ook doordat de bestudering van de fermentatie ons dichter tot de oplossing van tal van problemen zal brengen.

Kozai heeft reeds in 1890 te berde gebracht, dat de fermentatie een grote invloed heeft op de kwaliteit, wat sedertdien door iedere theeonderzoeker werd aangenomen.

Deijs, Roberts, Lamb e.a. hebben enige belangrijke bijdragen geleverd tot analyse van deze invloed. Desondanks werden over de invloed van de aard der bladen en die van de verflenzing, flensgraad, temperatuur enz. op de fermentatie nog weinig onderzoekingen verricht. Men weet er nog weinig van en vaak zijn de meningen nog met elkaar in strijd, daar er nog zoveel onbekende factoren zijn.

We zijn van mening, dat een nader onderzoek hierover van veel nut zal zijn voor de theebereiding.

Om te beginnen moeten we ter fundering van ons onderzoek een basis vinden, welke niet alleen objectief is, maar ook door ieder moet worden aanvaard. Gelukkig zijn we in het bezit van een dergelijke basis in het feit, dat Peccoblad (d.i. het nog opgerolde blad) van betere potentiële kwaliteit is dan de daaropvolgende oudere bladen. Het is een algemeen bekend feit, dat de fijnheid van pluk de kwaliteit van het eindproduct kan beinvloeden, zodat er dus een verband moet bestaan tussen de potentiële kwaliteit en de aard der bladen. We kunnen echter niet voortgaan met steeds fijn te plukken, want ten eerste gaat dit ten koste van de hoeveelheid en ten tweede gaat de struik door de kortere plukronde aan krachten achteruit, waardoor ze gevoeliger wordt voor allerlei ziekten en plagen. Het is dus van belang te weten in hoeverre de aard van het blad de fermentatie, als zijnde een kwaliteitsfactor, beinvloedt.

Om te kunnen nagaan, waaraan het verschil in kwaliteit te wijten is, moet de fermentatie van het Peccoblad vergeleken worden met die van de oudere, daaropvolgende bladen. We moeten echter er voor zorgen, dat allerlei fouten door verschil in type van de struik, van de grond en ook van de plaats t.o.v. de zon, zoveel mogelijk worden uitgeschakeld.

Dit kunnen we verkrijgen, indien we steeds elk blad apart onderzoeken. Daar de bladen verschillend van gewicht zijn, moeten we òf steeds een bladplaatje nemen van 20 mg (d.i. het kleinste bladgewicht, dat we zijn tegengekomen), dat in 10 ml water wordt gesuspendeerd, òf steeds dezelfde concentratie nemen.

Wat de methodiek betreft, hebben we de electrometrische methode toegepast, niet zozeer omdat deze bijv. beslist beter zou zijn dan de manometrische methode met de Warburg aparaat, doch doordat zij veel prettiger is in het gebruik en ook doordat de waarden snel kunnen worden afgelezen. De colorimetrische methode met de Hellige tintometer, welke door Deijs werd gebruikt, zegt ons te weinig van de reacties, want ze geeft alleen de kleurvorming aan, terwijl de manometrische methode, die door Roberts bij het onderzoek van de theefermentatie werd toegepast, niet specifiek genoeg is, daar zuurstof behalve bij de oxydatie der tanninen o.a. ook bij die van vetten in koolhydraten wordt opgenomen.

De electrometrische methode is gebaseerd op het overdragen der electronen bij de oxydatie-reductie reacties. Sommige onderzoekers hechten echter weinig waarde aan een biologische toepassing ervan, doordat bij de kleine potentiaalverschillen in een organisch milieu allerlei factoren, die anders weinig te betekenen hebben, zoals de vorm en grootte der electrode enz. een grote invloed kunnen uitoefenen op het gemeten potentiaalverschil. We dienen dus na te gaan, hoe we dergelijke invloeden kunnen tegengaan.

Terwijl men in de praktijk de gerolde bladen fermenteert door ze in een vochtige en koele ruimte aan de lucht bloot te stellen, kan de electrometrische methode slechts worden toegepast, wanneer we water aan de bladmassa toevoegen. Door lucht door de suspensie te leiden kan de fermentatie regelmatig plaats vinden. Men moet echter niet vergeten, dat door het verdunnen de bestanddelen, dus ook de coenzymen, meer gedispergeerd zijn, zodat we kunnen verwachten, dat er enig verschil is in de mate van fermentatie in ons laboratorium en in de fabriek.

Kunnen we langs deze weg te weten komen, hoe de invloed van de aard der bladen op de fermentatie is en waaraan dit te wijten is, dan zouden we ook kunnen nagaan in hoeverre de verflenzing enz. invloed heeft op de fermentatie, dus indirect op de kwaliteit van het bereide product. Bij het verkrijgen van positieve resultaten zouden we aan de praktijk belangrijke wenken kunnen verschaffen omtrent de onderzochte factoren.

Het tweede probleem betreft meer het mechanisme van de fermentatie. Het gaat nl. om de vraag welk systeem of systemen de luchtzuurstof opnemen, daar er hierover drie verschillende meningen bestaan nl. de luchtzuurstof wordt opgenomen door het systeem ascorbinezuur-ascorbinezuuroxydase, cytochroom-cytochroomoxydase en polyphenol-polyphenolase.

Het lijkt ons van belang te proberen hierop een antwoord te geven door met gebruikmaking van de methode van W a c h o l d e r na te gaan, welke enzymen bij de oxydatie van het ascorbinezuur een rol spelen, daar dit zuur door verschillende enzymen direct en indirect katalytisch kan worden geoxydeerd.

Tenslotte willen we nagaan, of we langs wiskundige weg de resultaten kunnen vastleggen en of we langs deze weg een objectief criterium voor de fermentatie kunnen vaststellen, dit met het oog op de kwalitatieve selectie. Tegenwoordig kent men een soort microbereiding, volgens welke de bladen van een struik kunnen worden bereid en beoordeeld. De bladen moeten dus eerst bereid worden, wat minstens een dag duurt en vervolgens wordt de kwaliteit beoordeeld door de thee-expert. Deze beoordeling geschiedt dus geheel subjectief. Grote en tamelijk grote verschillen zouden op deze wijze kunnen worden opgespoord, maar voor de kwalitatieve selectie moeten kleine ver-

schillen ook worden gevonden en daarvoor is de bovenomschreven methode onvoldoende.

Het is ons inziens niet juist, dat de kwalitatieve selectie gebaseerd moet zijn op het oordeel dat men krijgt, nadat het blad bereid is. Zij moet ons inziens gebaseerd worden op de kwaliteit, die de bladen van de tuin meekrijgen. We moeten dus een onderscheid maken tussen twee verschillende begrippen nl. de potentiële kwaliteit, welke door de tuin wordt meegegeven en de kwaliteit, welke door de bereiding wordt verkregen.

Wanneer het ons lukken zou om een positief verband te leggen tussen de fermentatie en de potentiële kwaliteit, dan zal het vastleggen van de fermentatie door een wiskundige grootheid van groot nut zijn voor de kwalitatieve selectie.

We willen hierbij nog opmerken, dat ons bladmateriaal afkomstig is van een Thea Assamica, die in een der kassen van het Laboratorium van Tropische Landbouwplantenteelt te Wageningen groeit en die door Prof. van der Stok zo welwillend werd afgestaan.

Deze opmerking is als een beperking bedoeld op de eventueel door ons gevonden resultaten. We moeten steeds voor ogen houden, dat onze struik een kasplant is, die op verschillende uitwendige omstandigheden waarschijnlijk geheel anders zal reageren. Zo vonden wij bijv. dat de bladen van onze kasplant veel sneller verflenzen dan in de praktijk normaal het geval is.

Er zijn echter ook andere verschillen. Immers in de theeproducerende landen zijn de struiken van verschillende typen. Deze zijn doorgaans niet allemaal Assamica, maar slechts selecties van toevallige hybriden. Ook klimatologische verschillen zijn zó groot, dat deze uiteraard hun invloed moeten hebben op de bereiding en de kwaliteit (zowel de potentiële als die door de bereiding verkregen).

HOOFDSTUK I

LITERATUUROVERZICHT VAN DE CHEMIE VAN DE THEE.

A — De chemische samenstelling.

Vers theeblad bevat 75—82 % water of 18—25 % droge stof. De belangrijkste organische stoffen, die tijdens de fermentatie een voorname rol spelen, zijn o.a. tanninen, ascorbinezuur, caffeïne, koolhydraten, enzymen en waarschijnlijk ook de eiwitten.

Theetanninen.

De literatuur over het theetannine bevatte aanvankelijk veel tegenstrijdigheden. Later is gebleken, dat deze materie veel gecompliceerder is dan men eerst heeft gedacht en dat het theetannine uit meer dan één stof bestaat. De theetanninen zijn kleurloos en het gehalte in vers blad kan variëren van 20—30 % van het droge materiaal. Zo bevatten Pecco en het eerste blad relatief meer tanninen dan oudere bladen. Het gehalte kan echter behalve naar de ouderdom ook naar het type, seizoen e.d. variëren.

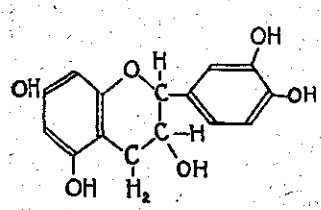
Deze tanninen spelen een belangrijke rol tijdens de fermentatie en door condensatie van de geoxydeerde tanninen kan de roodbruine kleur ontstaan.

Gaan we de geschiedenis der onderzoekingen over deze tanninen na, dan blijkt het dat reeds in 1914 Nanninga (124) een kristallijn product heeft verkregen uit theebladen met de volgende empirische formule — $C_{20}H_{16}O_9$ —. In 1923 kon Deuss (32) een amorphe tannine isoleren met de formule — $C_{20}H_{20}O_9$ —. Verder hebben Shaw (155) en Shaw & Jones een tannine-preparaat beschreven, dat zij uit het blad hebben verkregen en dat hetzelfde scheen te zijn als dat van Deuss, want zij kregen bij reactie met zuur geen galluszuur. We willen hierbij opmerken, dat het Deijs gelukt is om door middel van een tannase galluszuur af te splitsen. Mejuffrouw Tsujimura (Deijs-42) heeft enige belangrijke resultaten verkregen. Zij kreeg nl. een kristallijn product met een zelfde formule als die van Nanninga en isoleerde verder l-epicatechine (1), welke zij theecathechine noemde. Daarna in 1935 ontdekte zij in groene thee catechinegallaat (2). Deze substantie kon zij in het begin alleen als een amorph product verkrijgen, maar zij slaagde er toch in dit product in een kristallijne staat te isoleren. Zij ontdekte ook, dat in goede kwaliteit thee een 5-hydroxy-catechine (3) voorkomt en niet in slechte thee.

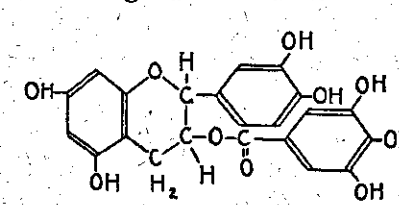
Een andere Japansche onderzoeker — Oshima — heeft dit laatste product (3) ook kunnen verkrijgen en daarnaast de catechine (1) van Tsujimura. Verder vond hij een andere amorphe tannine, waarvan hij de formule (4) ook gegeven heeft. Hij kon echter geen catechine gallaat (2) vinden.

Een der belangrijkste ontdekkingen over de theetanninen is wel die van Shaw in 1938. Hij heeft n.l. gevonden, dat de tanninen, die in de theeplant voorkomen, afhankelijk zijn van het deel van de plant, waaruit men hen isoleerde, verder van het klimaat en van erfelijke factoren (type). Volgens Roberts & Harrison — 1939 — moet in groen blad een mengsel aanwezig zijn van l-epicatechine en gallocatechine waarschijnlijk met hun eenvoudige condensatie-producten en de galloyl-ester van l-epicatechine. Bij een pH groter dan 5 zijn de tanninen labiel; de veranderingen in de theetanninen en andere polyphenolen gaan verder steeds samen met zuurstofopname.

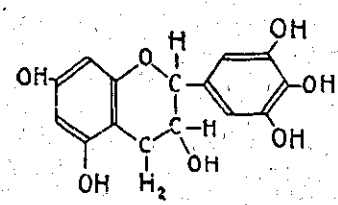
In hetzelfde jaar deed Deijs (42) nadere onderzoekingen over de theetanninen in Java-theeën. Hij ging uit van de door Tsujimura en ook door Oshima geisoleerde kristallijne tanninen en amorphe tannine van de volgende formules:



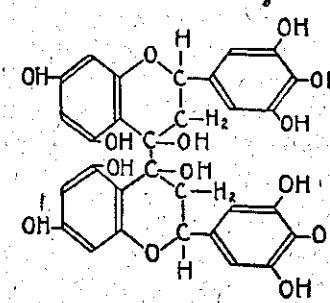
1 – Thee-cathechine



2 – Cathechine-gallaat



3 – Gallo-cathechine



4 – amorphe tannine (Oshima)

Deijs vond deze drie kristallijne producten in de Java-theeën. Het gehalte aan amorphe tannine is veel groter dan dat aan kristallijne tanninen. Dit werd zowel door Tsujimura als door Oshima gevonden.

Een eigenschap der amorphe tanninen is, dat ze goed oplosbaar

zijn in alcohol, ethylacetaat en aceton en onoplosbaar in chloroform. Voor de bepaling der theetanninen vond Deijs (42) de formaline-zout-methode de zuiverste en eenvoudigste. Deze methode werd ook door van Hulssen bij de bepaling van het tanninegehalte van gambir gebruikt. Er zijn nog andere bepalingsmethoden, welke door Barua & Roberts (137) met elkaar werden vergeleken. De reden hiervoor was, dat de bepaling der tanninen in zwarte thee moeilijkheden opleverde, omdat een deel der tanninen reeds geoxydeerd was en daardoor verschillen veroorzaakt.

Zo werden de volgende drie methoden met elkaar vergeleken:

1 de Tocklai-Löwenthal methode, waarbij gebruik gemaakt wordt van $KMnO_4$ en indigokarmijn.
2 de joodkali-methode van Shaw.
3 de $KMnO_4$-methode van Stamm.

In grote trekken berusten deze methoden hierop, dat de tanninen eerst worden geoxydeerd, waarna de overmaat van het oxydatiemiddel wordt teruggetitreerd. De eerste twee methoden gaven verschillen, doordat de tanninen slechts tot o-chinonen worden geoxydeerd en het eindpunt der oxydaties verschillend is. Daarom is de derde methode beter, waarbij de tanninen volledig tot CO_2 worden geoxydeerd. De genoemde onderzoekers maakten eerst een oplossing, waarin tanninen aanwezig zijn en daarnaast, door scheiding met gelatine plus verzadigd NaCl, een tanninevrije oplossing. De oplossingen worden eerst behandeld met $KMnO_4$ en NaOH en gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur weggezet. Vervolgens wordt dit mengsel aangevuld tot 250 mL en dan worden oxaalzuur, H_2SO_4 en $MnSO_4$ toegevoegd. Na schudden verandert de kleur en na verhitting bij 50°C wordt de rest van het oxaalzuur teruggetitreerd met 0,02 M. $KMnO_4$. Dit is de titer voor de totale tanninehoudende oplossing. Na aftrekking van de titer van de tanninelozе oplossing wordt dan de tannine titer verkregen.

Caffeïne — 1,3,7 - trimethylxanthine.

Het gehalte aan caffeïne blijft tijdens de theebereiding vrijwel constant en bedraagt gemiddeld ongeveer 3 %. Het kan n.l. variëren van 2—4 %, waarbij dan kan worden opgemerkt, dat oudere bladen over het algemeen minder caffeïne bezitten. Er zijn aanwijzingen, dat in levende cellen de caffeïne is af te leiden van xanthine, een stof, welke bij de splitsing van een bepaalde groep van eiwitten, de nucleoproteïden, wordt gevormd. Volgens Weevers (184) wordt deze op de een of andere manier weer in de stofwisseling opgenomen, wanneer de bladen hun levenscyclus hebben voleindigd. Proeven leerden, dat bij autolyse, d.w.z. in afgeplukte, door chloroformdamp gedode bladen, de afbraak van caffeïne kan plaats vinden, mits slechts in de omgeving

zuurstof aanwezig is. Wat bij die oxydatieve afbraak ontstaat is nog onbekend; men kan evenwel aannemen, dat de producten in normale gevallen gebruikt worden voor de eiwitopbouw.

Zetmeel.

Thee en o.a. ook de aardappel vormen zetmeel in het blad. Theeblad heeft ook andere overeenkomsten met aardappelblad, doordat beiden veel peroxydase bevatten en daarnaast ascorbinezuur. Daarom wordt thee door Deijs e.a. tot de „peroxydaseplanten" gerekend.

In oud blad wordt meer zetmeel gevonden, doordat er per oppervlakte-eenheid meer chlorophyl aanwezig is. In tegenstelling met wat bekend is van de planten in Europa vond Heubel (69), dat jonge theebladen op Java 's morgens vóór zonsopgang nog vrij veel zetmeel bevatten, waaruit blijkt, dat 's nachts weinig zetmeel wordt verbruikt.

Behalve een verschil in zetmeelgehalte bij oud en jong blad vond Heubel ook nog een verschil in zetmeelgehalte in de top en de voet van het blad. In de top is nl. meer zetmeel aanwezig. Tollenaar (178) toonde aan, dat het zetmeel gedurende de verflenzing verdwijnt en volgens Harler (68) kan een toename van suikers worden waargenomen. Dit is gemakkelijk te verklaren, daar tijdens de verflenzing reeds een afbraak plaats vindt, terwijl de opbouw ophoudt. Vooral Peccobladen verliezen bij het verflenzen sneller hun zetmeel dan oudere bladen. Men wist dit niet te verklaren. Uit onze proeven is gebleken, dat Pecco veel actiever fermenteert en waarschijnlijk ook actiever ademhaalt dan oudere bladen m.a.w. Pecco zet per tijdseenheid meer stoffen om.

Deijs (34) onderzocht het gedrag der koolhydraten in verflenst en bereid blad en vond, dat wanneer de loot geplukt wordt, de assimilatie snel ophoudt, terwijl de ademhaling blijft doorgaan. Evans (50) vond, dat de ademhaling van gekneusd vers blad anders is, dan van gekneusd verflenst blad. Terwijl de ademhaling van gekneusde verse bladen normaal bleef verlopen, daalde het ademhalingsquotient van gekneusde verflenste bladen van 0,8 tot 0,13. Er wordt nl. relatief minder CO_2 gevormd en meer O_2 opgenomen. Volgens Evans is deze daling het directe gevolg van de onmiddellijk intredende oxydatie. Ons inziens zal het ademhalingsquotient van gekneusd vers blad ook wel dalen, als men de gekneusde massa maar lang genoeg laat staan, hoewel moet worden toegegeven, dat er verschillen bestaan.

Neuville vond dat vers blad 0,2—0,5 % glucose bevat en geen sacharose. Dit is een punt van strijd geweest, want er werd wel eens beweerd, dat in thee ook sacharose voorkomt evenals in tabak. De meeste onderzoekers zijn echter van mening, dat dit onmogelijk is, daar zetmeel ongebouwd is uit alpha-glucose,

waarmee echter niet bewezen is, dat sacharose niet aanwezig kan zijn.

Eiwitten en gom-achtige bestanddelen.

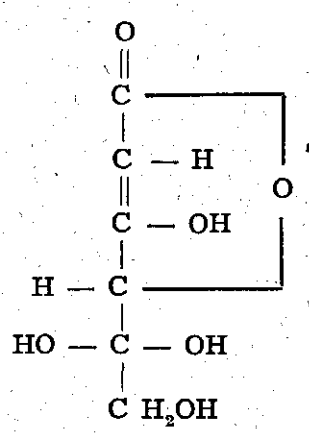
Harler (60) is van mening, dat de ontleding van eiwitten en gomachtige bestanddelen waarschijnlijk van geen belang is voor de theebereiding. Deijs is echter van mening, dat dit nog niet zeker is, omdat men daarvan nog te weinig weet. De Russische onderzoekers beweerden, dat eiwitten noodzakelijk zijn voor de geurvorming, maar dit werd niet bewezen.

Organische Zuren:

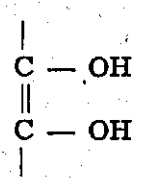
Van de organische zuren is tot nu toe het meest belangrijk het l-Ascorbinezuur ($C_5H_8O_6$).

Dit zuur is identiek aan het antiscorbutisch werkende Vitamine C, hoewel ook het geoxydeerde ascorbinezuur (dehydroascorbinezuur) antiscorbutisch kan werken. De eerste chemische onderzoekingen over dit Vitamine C werden door Szent-Gyorgyi, Tillmans & King verricht. (Zie Schopfer 159).

De structuur van dit zuur werd echter door Micheel & Kraft, Haworth & Hirst, Karrer e.c. en Reichstein gevonden en wordt als volgt aangegeven:



Het reducerend vermogen van dit zuur is te danken aan de dienol-groep:



een structuur, die zelden in de natuur voorkomt. Het reducerend vermogen wordt dan ook slechts overtroffen door glutathi-

on (SH-groep). Het ascorbinezuur komt zeer veel in planten voor, zowel in fruit als in het blad. Er zijn tal van homologen bekend, maar geen één, die de reducerende capaciteit van het Vitamine C zelf bezit.

Volgens Giroud (53) komt dit zuur hoofdzakelijk in de groene delen van de plant voor en wel in de chloroplasten. Dit werd echter door Reid tegengesproken, die van mening is, dat de vorming van Vitamine C onafhankelijk is van het chlorophyl, want de grootste concentraties vindt men in de groeiende delen van de plant bijv. in blad- en bloemknoppen, hoewel deze minder groen zijn dan de oudere bladen. Wij vonden zelf, dat ook bij de thee de nog opgerolde eerste bladen (Pecco) veel meer ascorbinezuur bevatten dan de oudere, daaropvolgende bladen, hoewel deze veel groener zijn. Daar het ascorbinezuur veel op suikers lijkt, ligt het voor de hand, dat de synthese via de suikers moet geschieden. Volgens proeven van Ray (1934) in steriele media kan mannose als voorloper van Vitamine C worden beschouwd. De transformatie geschiedt dan met behulp van een enzym en wel een dehydrogenase, welke door Guha & Ghosh (1934—1935) werd geëxtraheerd. In het laboratorium geschiedt de synthese ook met suikers als beginmateriaal en wel vooral xylose en sorbose. De biosynthese vindt daar plaats, waar de meeste suikers voorkomen, dus in de chloroplasten. Aan de andere kant echter is de tegenwoordigheid van het chlorophyl volgens Reid niet essentieel. Jonge zaailingen bijv. die nog niet groen zijn en waar geen photosynthese kan plaats vinden, kunnen toch ascorbinezuur vormen uit een voorloper (koolhydraat), die in de reserves van het zaad voorkomt.

We gaan thans na, welke uitwendige invloeden op de biosynthese van ascorbinezuur voor ons onderzoek van belang zijn:

1 Licht blijkt een belangrijke factor te zijn. (Srigawara, Reid — 1937). Het effect echter varieert met de golflengte; zo heeft licht met een kortere golflengte minder effect, zodat rood licht, dat de photosynthese sterk begunstigt, het meeste effect heeft op de vorming van ascorbinezuur.

2 Het minerale medium blijkt van invloed te zijn. Zo doet oa. Mn, dat aan een synthetisch medium werd toegevoegd, de productie van ascorbinezuur tot 75 % toenemen. Dit vond men bijv. bij Avena, Triticum, Hordeum, Phaseolus Mingo enz., zodat Mn dus als een co-enzym in de synthese van Vitamine C kan worden opgevat. (Rudra — 1939). Ook andere zouten als $Ca(NO_3)_2$ kunnen evenwel volgens von Haussen (1936) het vitamine C-gehalte doen toenemen.

3 In het donker neemt het gehalte van vitamine C bij Bryophylium calycinum bij 20°C gedurende 48 uur af, maar

bij 7° en 37° C neemt het toe. In het licht treden weer andere invloeden op, waardoor het moeilijk wordt om de invloed van de temperatuur op de biosynthese van vitamine C zuiver na te gaan.

De rol van ascorbinezuur is waarschijnlijk die van een voedende stof en koolhydraatreserve en ook als subtraat bij de oxydatie-reductie reacties. De oxydase, die het ascorbinezuur tot dehydroascorbinezuur oxydeert, is volgens Szent-Gyorgyi een Cu-proteine-complex.

We gaan nu na, welke uitwendige invloeden op de oxydatie van ascorbinezur van invloed zijn:

1 Licht blijkt een belangrijke factor te zijn, want volgens Guillement kan ultra-violet licht de oxydatie van ascorbinezuur doen toenemen, wat in tegenstelling is met de invloed van rood licht op de synthese. Het is mogelijk, dat het effect van licht op de oxydatie van ascorbinezuur varieert met de golflengte en wel, dat de stralen met een grotere golflengte minder effect hebben.

2 Volgens Szent-Gyorgyi, Wieringa (187) e.a. kan de oxydatie van ascorbinezuur worden geactiveerd door toevoeging van geioniseerd Cu en ook van Fe hoewel in mindere mate. Het is de vraag of het koper bij toevoeging aan een plantextract naast het specifieke enzym optreedt of dat het koper alleen in gebonden vorm, nl. met het co-enzym, optreedt, zoals dat met ijzer het geval is. Door het koken van het extract kan het Cu nl. van het co-enzym worden gesplitst en toch als katalysator optreden.

Wat betreft het voorkomen van ascorbinezuur in thee vonden Miura, Tsujimura, Okabe, Suttekichi Maruyama, Murlin, Mattel en Pratt vrij grote hoeveelheden Vitamine C in de groene thee. Dit is aannemelijk, daar de groene thee niet is gefermenteerd, maar direct geroosterd wordt, zodat de hoge temperatuur van het roosteren het enzym inactiveert, waardoor het ascorbinezuur voor een deel wordt bewaard.

Mitchell daarentegen kwam tot de conclusie, dat in groene thee geen vitamine C meer voorkomt. Deze tegenstelling heeft Deijs (38) er toe gebracht om het vitamine C gehalte in vers blad te bepalen en verder na te gaan hoe het gehalte variëert gedurende de verschillende phasen van de bereiding van groene thee. Door ineens onder sterke verhitting te roosteren is het hem gelukt om het enzym of de enzymen, die aansprakelijk zijn voor de oxydatie van ascorbinezuur, min of meer inactief te maken, waardoor hij groene thee kan bereiden, die een tamelijk hoog gehalte aan ascorbinezuur bevat. We willen hierbij echter de opmerking plaatsen dat zowel Deijs als de andere onderzoekers in de mening verkeren, dat de antiscorbutische wer-

king alleen door het ascorbinezuur wordt veroorzaakt. Volgens latere onderzoekingen echter is het gebleken, dat het geoxydeerde product van ascorbinezuur (dehydroascorbinezuur) ook een antiscorbutische werking bezit, zodat men onderscheid dient te maken tussen het vitamine C-gehalte en het ascorbinezuurgehalte. Zilva (190) veronderstelde dat het dehydroascorbinezuur in het organisme eerst gereduceerd wordt, voordat het antiscorbutisch kan werken.

Deijs (38) bepaalde het ascorbinezuurgehalte op drie verschillende manieren nl.:

1 door titratie met dichlorophenolindophenol volgens Tillmans.
2 door titratie met jodium in een zuur milieu volgens Stevens.
3 door gebruikmaking van ascorbinezuuroxydase, die geïsoleerd werd uit Moringa Oleifera. (Spruyt & Donath).

De beide eerste methoden gaven resultaten welke gemiddeld 10 % hoger zijn dan de waarden, welke verkregen zijn volgens de laatste methode. Deijs gebruikte de methode van Stevens, daar hij deze de eenvoudigste achtte.

In vers groen blad vond hij gemiddeld 4 mg ascorbinezuur per gram droge stof. Hij vond een hogere waarde, wanneer hij volgens Spruyt en Donath de extracten eerst behandelde met H_2S, waardoor het aanwezige dehydroascorbinezuur gereduceerd werd.

Deijs nam steeds 25 g vers blad en paste de jodiummethode als volgt toe: 25 g blad werd onder terugvloeiing gedurende 10 minuten in een CO_2 atmosfeer met 100 mL water gekookt. Na koeling in CO_2 werd het residu afgefiltreerd, 20 mL van het filtraat werd met 0,01 N jodium-oplossing na toevoeging van 4 mL 12 N zwavelzuur getitreerd.

Hij vond langs deze weg voor

Pecco	—	4,1 mg per g droge stof
1ste blad	—	4,4; 4,4 „
2de blad	—	3,6; 4,7; 4,5 per g
3de blad	—	4,2; 4,5; 3,9 „ „
5de blad	—	3,1; 3,4 „ „
steeltje	—	1,6; 1,7 „ „
oude bladen	—	2,8; 2,1 „ „

Deijs vond dus geen volkomen regelmaat, hoewel het duidelijk is, dat het 5e blad, het steeltje en de oude bladen minder ascorbinezuur bevatten.

Bij de bepalingen vond Deijs geen invloed van de aanwezigheid van de looistoffen op de waarde van het gehalte aan ascorbinezuur, in tegenstelling tot de mening van Roberts en Harrison (133). Bij dergelijke titraties is het van belang te weten of in het thee-extract ook redox-systemen voorkomen, waarvan de

normaal redoxpotentiaal lager is dan die van de stof, waarmee men titreert. Zo moet men bij de titratie met 2—6 dichlorophenol-indophenol weten of er in het extract ook cysteïne voorkomt, daar deze stof door de redox-indicator onder dezelfde omstandigheden als ascorbinezuur eveneens wordt geoxydeerd, zodat we hogere waarden krijgen indien deze stof in het extract voorkomt.

Enzymen (fermenten).

De eersten, die het voorkomen van fermenten in de thee aannamen waren Bamber (7) en Nanninga (124). Zo isoleerde Bamber in 1900 uit fermenterende thee een oxydase, welke ontdekking door Aso (4) werd bevestigd. Aso verklaarde verder, dat de kleur van de zwarte thee wordt veroorzaakt door de inwerking van een oxydase op de theelooistoffen. Dit werd later aldus gepreciseerd, dat de looistoffen zouden worden geoxydeerd door de moleculaire verbinding van peroxydase en waterstofperoxyde. In 1940 kwamen Lamb & Sreerangachar (91) hier echter weer tegenop, doordat het hun gelukt was de o-polyphenolen zonder waterstofperoxyde te oxyderen, zodat de polyphenolase het katalyserende enzym moet zijn en niet de peroxydase. Zij menen verder, dat de in het theeblad aanwezige peroxydase geen belangrijke rol speelt bij de oxydatie van de tanninen.

Vóór 1940 werd op grond van de onderzoekingen van Mann (105), Deijs (35), Jones (79) en Roberts (131) peroxydase als één der belangrijkste enzymen beschouwd en er zijn over dit enzym dan ook uitgebreide proeven gedaan.

Naast de peroxydase zijn de laatste jaren verscheidene andere enzymen bestudeerd, waarbij Deijs (41) vooral de werking van katalase en de aanwezigheid van tyrosinase heeft bestudeerd. We zullen nu enkele enzymen nader beschouwen, die in het theeblad een rol spelen. De cytochroomoxydase zullen we ook aan een nadere beschouwing onderwerpen, hoewel de aanwezigheid hiervan later door Sreerangachar (165) afdoende werd bestreden.

Peroxydase.

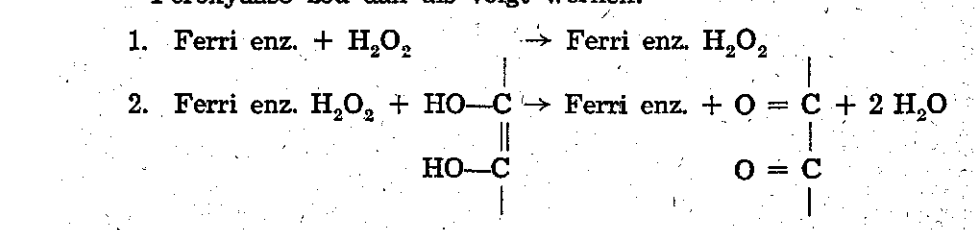
Dit enzym is specifiek ingesteld op waterstofperoxyde, persultaat, aethylperoxyde en perazijnzuur als positieve systemen, dus H-acceptoren en verder op phenolen, ascorbinezuur e.a. als negatieve systemen of H-donatoren. Verder reageert het enzym niet op moleculaire zuurstof. Wat de prosthetische groep betreft, werd deze reeds in 1931 door Kuhn als haematine gekwalificeerd, maar pas Keilin kon aantonen, dat het inderdaad een haematine-derivaat met driewaardig ijzer is.

H_2O_2 vormt met peroxydase twee soorten van moleculaire verbindingen nl.:

1 — in de verhouding 1 : 1
2 — met H_2O_2 overschot.

Daarbij blijft de waardigheid van het ijzer onveranderlijk, dus Ferri. Deze enzym-substraatverbindingen splitsen snel in tegenwoordigheid van H-donatoren, zoals hydrochinon, pyrogallol, ascorbinezuur enz.

Peroxydase zou dan als volgt werken:



Het verschil tussen peroxydase en katalase ligt in de eiwitgroep, het zg. apoferment, daar ze beiden dezelfde prosthetische groep of co-ferment bezitten.

Katalase.

Dit enzym, dat ook een haemine-derivaat is, is een noodzakelijk bestanddeel van aerobe cellen en komt zeer uitgebreid voor in plantaardige en dierlijke cellen. Het ijzer in het enzym is ook in Ferri-vorm aanwezig en desondanks is het bestand tegen reductiemiddelen als waterstof en hydrosulfiet. Deze bestendigheid is terug te voeren tot de binding met de specifieke eiwitgroep. Het enzym wordt echter bij hoge temperaturen en bij hoge concentraties van waterstofperoxyde vernietigd.

Ook gedurende de reactie verandert de ferri van het enzym niet. Het peroxyde wordt dan door de katalase via kettingreacties tot zuurstof en water gesplitst. We kunnen de functie van de katalase vergelijken met die van een regelaar, waardoor de cel beschermd zou worden tegen vergiftiging door het waterstofperoxyde. In de theeliteratuur vonden we, dat de activiteit van de katalase na het drogen vrijwel verdwenen is en dat het enzym volgens Deijs (41) moeilijk extraheerbaar is.

Cytochroomoxydase.

Hierover is in de theeliteratuur het eerst door Roberts (134) in 1940 het een en ander overgeschreven. Het lijkt ons van belang dit enzym aan een nader onderzoek te onderwerpen, omdat Roberts van mening is, dat het systeem cytochroom-cytochroomoxydase het ascorbinezuursysteem vervangt. Hoewel wij het hier niet mee eens zijn, willen we toch nagaan wat er in het algemeen over dit systeem bekend is.

Het cytochoom is in 1886 door MacMunn in de spieren en weefsels van dieren gevonden en in 1925 door Keilin als één

der voornaamste oxydo-reductie-enzymen vastgesteld. De drie soorten gereduceerde cytochromen a, b en c zou men reeds met een spectroscoop aan hun typische spectra herkennen.

Van de drie cytochroomen kon men tot nu toe slechts het in 1936 door Theorell nauwkeurig onderzochte cytochroom c isoleren. Dit komt doordat de andere cytochromen instabiel zijn.

Het enzym is ook een haematine-proteïde en heeft de volgende chemische samenstelling C 49,18 : H 7,33 : N 14,4 : S 1,18 : Fe 0, 34 : O 27,5 % en is in water oplosbaar.

Een kenmerkende eigenschap van het cytochroom is, dat het onbekwaam is om met moleculaire zuurstof te reageren. Het ijzer in dit enzym verandert echter bij reactie van Ferro in Ferri. Deze verandering kan echter niet zo maar plaats vinden, want daarvoor moet het Warburgse ademhalingsferment de cytochroomoxydase of indophenolase aanwezig zijn, want alleen dit ferment kan met de moleculaire zuurstof reageren.

Sreerangachar (1943) is echter van mening, dat cytochroom niet in thee voorkomt, hij kon nl. niet de typische spectra vinden.

Ter vergelijking met het voorgaande laten we hier een tabel over de chemische samenstelling zien, zoals deze in de Vraagbaak staat:

Chemische samenstelling van het theeblad.

	vers blad	verflenst blad	gefermenteerd blad	droge thee
Tannine	22%	22%	13%	12%
Caffeïne	4%	4%	4%	4%
Eiwitten	27%	—	—	coagulatie
Gommen, Dextrinen, Pectinen	7%	gedeeltelijke caramellisering		3%
Zouten	5,5%	5,5%	5,5%	5,5%
Cellulose, Vetten, Was, Chlorohpyl	25%	waarschijnlijk geen verandering gedeeltelijke ontleding		
Totaal in water oplosbare stof	48-45%			38-45%

De anorganische bestanddelen.

Er zijn heel wat thee-analyses bekend, maar deze verschillen vaak sterk van elkaar. Naar Sprecher von Bernegg (167) hebben we twee as-analyses overgenomen van twee verschillende onderzoekers, die ongeveer het gemiddelde moeten voorstellen of anders de grenzen, waarin de gehalten der verschillende stoffen kunnen variëren:

Anorganische bestanddelen in theeblad.

	volgens Nanninga	volgens Zöller
K_2O	40 —50	39,22
Na_2O	0,3 — 2	0,65
CaO	8 —10	4,24
MgO	7 —10	6,47
Mn_2O_3	0,05— 3	—,—
Al_2O_3	0,2 — 2	—,—
Fe_2O_3	0,05— 0,5	4,38
CuO	sp.	—,—
P_2O_5	12 —20	14,55
H_2SO_4	5 — 7	sp.
Cl	0,5 — 1,5	0,81
SiO_2	0,5 — 4	4,35
CO_2	5 —10	24,30

Leniger (93) en ook de Haan (70) hebben verschillende as-analyses verricht, die vrijwel met het bovenstaande overeenkomen. Het as-gehalte hangt in zekere mate van de samenstelling van de bodem af, hoewel het type ook zijn invloed zal hebben op de samenstelling van de plant. Zo zijn er verschillende onderzoekingen verricht om een verband te zoeken tussen de samenstelling van de plant of van de bodem en de kwaliteit van het eindproduct. Over het algemeen waren de resultaten negatief, doordat men de proeven niet juist heeft uitgezet en doordat de kwaliteit door de prijs werd voorgesteld. Hoewel dit op het eerste gezicht voor de hand ligt, schuilt er toch een grote fout in, want in de prijs zijn vraag en aanbod van de markt opgenomen en ook de fouten van de bereiding. Men heeft o.a. geen aandacht geschonken aan de verschillen van de grond, type, hoogte, cultuur enz., zodat de cijfers eigenlijk weinig vergelijkbaar zijn. Hoewel conclusies hierover voorbarig zouden zijn, daar de proeven over het algemeen genomen niet juist zijn opgezet, meende Sprecher von Bernegg (1936) reeds, dat het zeer onwaarschijnlijk is, dat men een verband kan vinden tussen de kwaliteit en het gehalte aan één of ander mineraal, omdat de kwaliteit teveel door verschillende factoren wordt beinvloed. Hij heeft ten dele gelijk, maar zolang er geen degelijke proeven hierover zijn verricht, mogen we deze mogelijkheden niet over het hoofd zien of verwerpen.

Eén der belangrijkste resultaten, die vorige onderzoekers hebben verkregen is het verband tussen Mn (en Fe) en de kwaliteit. Deze werden later tegengesproken. We geloven echter, dat deze sporen-elementen een belangrijke rol spelen in de

stofwisseling als co-enzymen. Dit geloof wordt versterkt door het werk van Thatcher (177) over de sporen-elementen. Hij verdeelde deze in twee groepen, die een verschillende functie hebben:

1 oxydatie-reductie-regulatoren (Mn, Cu, Zn en Fe)

2 onbekende functies (Bo).

Thatcher meende, dat Mn en Fe aan de ene kant en Cu en Zn aan de andere kant paren vormen. De eerste groep moet dan voor de opname of afgifte van zuurstof zorgen, terwijl de tweede groep voor het transport van de waterstof zorgt. Dat de sporen-elementen zo weinig in de plant voorkomen, zou dus samenhangen met de omstandigheid, dat zij als katalysatoren fungeren.

Volgens Mc Hargue (117) — 1923, 1926 en Bishop (19) — 1928 — zijn Mn, Zn en Cu in het chlorophyl-apparaat geconcentreerd. Mn zou dan in nauw verband staan met de oxydatie-reductie reacties in de plant en volgens Lundegårdh (103) is Mn belangrijk voor de ademhaling. Volgens hem is er echter een groot verschil tussen de werking van Mn en Fe, dus tegengesteld met de mening van Thatcher.

Volgens Hopkins (72) reoxydeert Mn, het tot Ferro gereduceerde ferrizout, waardoor de verhouding Mn : Fe van meer belang is dan het gehalte aan Mn.

Shive (157) beweert, dat de verhouding van Mn : Fe bij soja tussen 1/3—1/5 moet zijn.

Wat Cu betreft, moet er een verband bestaan tussen Cu en Zn. Zo vonden Hopkins & Morgan in 1936, dat er een verband bestaat tussen de oxydatie van ascorbinezuur en die van glutathion. Het is bekend, dat de oxydatie van ascorbinezuur in planten meestal wordt gekatalyseerd door de Cu-houdende ascorbinezuuroxydase of spoortjes Cu, terwijl bij de oxydatie van glutathion Zn een rol speelt.

Men weet nog te weinig van de invloed der sporen-elementen op de fermentatie van thee en het lijkt ons niet onmogelijk, dat er een verband bestaat tussen de kwaliteit en het gehalte aan enige van deze sporen-elementen.

B — De verschillende phasen van de bereiding.

Deze kunnen we als volgt in het kort samenvatten:

De bladen worden geplukt, wat in de regel 's morgens gebeurt. De plukwijze kan variëren naar de vraag en aanbod en is dus afhankelijk van de markt. In Sumatra wordt de laatste tijd veel gescheiden pluk toegepast, waarbij het derde blad apart geplukt en bereid wordt. Na de pluk worden de poetjoeks (theeloten) in doeken of beter in manden naar de fabriek getransporteerd, waar de bladen verflenst (vochtonttrekking), gerold, gefermenteerd, gedroogd en gesorteerd worden.

Hierna volgt dan een bewaring in grote triplexkisten, welke bekleed zijn met lood, alluminium e.a. soorten metaalpapier. Daarna, indien er voldoende zwarte thee is gemaakt, wordt de thee in speciale theekisten verpakt en verzonden.

Op Java worden de bladen nog vaak in doeken getransporteerd, wat beslist minder goed is voor de kwaliteit. De bladen worden dan meestal in doeken geperst om zoveel mogelijk te kunnen transporteren, waardoor ze gekneusd worden en de fermentatie onder zeer nadelige omstandigheden kan optreden. Andere bladen, die niet gekneusd worden, verflenzen reeds, zodat men op deze wijze een heterogene massa krijgt, die een onregelmatige fermentatie zal teweeg brengen, waardoor de kwaliteit van het eindproduct wordt benadeeld.

Verflenzing.

Het doel van deze phase van de bereiding is volgens de tegenwoordige mening tweeledig nl.:

1 — om het blad in een geschikte conditie te brengen, waardoor het goed rolbaar is. Het watergehalte moet dan dalen van ongeveer 75 % tot ongeveer 55 %.

2 — om een grondslag te leggen voor een goede fermentatie. Dit is niet erg duidelijk. Hoewel we niet twijfelen aan de invloed van de verflenzing op de fermentatie wordt de fermentatie echter ook door andere factoren beïnvloed zoals type van de struik, de airconditioning van de fermenteerruimte, temperatuur, spreiddikte der bladmassa enz.

Tijdens het verflenzen neemt het gehalte der looistoffen niet of slechts weinig af:

	volgens de Vraagbaak (127)	volgens andere gegevens
vers blad	— 22 %	26,2 %
verflenst blad	— 22 %	25,6 %

Er wordt dus slechts een heel klein gedeelte geoxydeerd waardoor we mogen aannemen, dat tijdens de verflenzing de fermentatie nog niet plaats vindt.

Shaw & Jones veronderstellen, dat er tijdens de verflenzing nog andere processen dan vochtonttrekking plaats vinden

1 — de actieve bestanddelen van het blad komen voor een deel met elkaar in aanraking, wat we betwijfelen, immers tijdens het verflenzen wordt het blad niet gekneusd. Zij laten ons vervolgens volkomen in het duister, welke deze „actieve bestanddelen" zijn.

2 — theotannine en caffeïne vormen samen caffeïne-theotannaat, welke verbinding het zg. „pungent principle" van de thee is.

3 — gedeeltelijke hydrolyse van pectinen (geur).
Deze bewering is moeilijk na te gaan, omdat men tot nu

toe nog niet weet, waaraan de vorming van de geur is toe te schrijven, hoewel er natuurlijk verschillende meningen hierover zijn geuit.

We geloven echter niet, dat tijdens de verflenzing de bekende theegeur wordt gevormd. Volgens niet gepubliceerde onderzoekingen van Deijs wordt de geur pas gevormd, wanneer de bladen gekneusd worden.

4 — pectinezuren geven via een metaalion met tannine verbindingen, die in heet water oplossen, echter minder goed in koud water. (Het zg. „creaming down"). Deze bewering is niet alleen wat vaag, maar ook voorbarig, omdat men hierover nog steeds in het duister tast.

5 — een synthetische peroxydase wordt gevormd .(theotannine met Mn). Hoewel na de verflenzing de peroxydase-activiteit (gemeten als purpurogalline-getal) groter is en dit door sommige onderzoekers zo wordt verklaard, dat er nieuw peroxydase wordt gesynthetiseerd, wil dit echter nog niet zeggen dat een verbinding van theotannine en Mn als zodanig optreedt.

We willen hierbij de onderzoekingen van Bernard en Welter (13) memoreren, die gevonden hebben, dat andere stoffen als zand, zetmeel enz., ook als peroxydase kunnen werken. Het is mogelijk, dat de oplossing van dit probleem hier ligt.

Deze stijging van de peroxydase-activiteit gaat in thee samen met een daling van het gehalte aan ascorbinezuur.

In de literatuur is een analoog geval bekend. Zo vonden Rubin & Stratschitzki bij kiemende koolzaad dat wanneer vitamine C wordt gevormd, dit gepaard gaat met verhoging van de activiteit van katalase en peroxydase. Omgekeerd vonden zij, dat een daling van het vitamine C-gehalte gepaard gaat met een daling van de activiteit van katalase, terwijl de activiteit van de peroxydase hoger wordt. Ook zij dachten aan nieuw gesynthetiseerde peroxydase. Deze correlatie gaat bij de thee echter niet op, indien de bladen gefermenteerd, dus beschadigd, worden. Er is dus een groot verschil tussen de physiologie van ongekneusde en gekneusde bladen.

Volgens de onderzoekingen van Deijs (35) neemt de activiteit van de peroxydase tijdens de verflenzing toe. Dit werd ook door andere onderzoekers als Roberts (131), Manskaja (109) en Lamb gevonden.

Stel de peroxydase-activiteit in vers blad op 100, dan is de activiteit in verflenst blad 116,5. Werd het verse blad echter in een omgeving bewaard, waarvan de relatieve vochtigheid 100 % is, dan steeg de activiteit zelfs tot 131,5. Dus voor de toename der activiteit is vochtverlies niet noodzakelijk. Bij lagere temperaturen is de toename minder dan bij hogere temperaturen. Daar de activiteit tijdens een zware verflenzing afneemt, concludeerde

Deijs, dat de activiteit tijdens de verflenzing door een maximum gaat. Roberts vermoedt, dat dit maximum optreedt bij een vochtgehalte van 72 %. Dit lijkt ons nogal tegenstrijdig, immers volgens de onderzoekingen van Deijs is het vochtgehalte niet essentieel voor de toename van de activiteit van peroxydase.

De verflenzing kan volgens de Vraagbaak door verschillende factoren worden beinvloed zoals temperatuur, relatieve vochtigheid, hoeveelheid lucht per tijdseenheid, flensduur en flensgraad. De laatste factor betekent het watergehalte van verflenste bladen, zodat deze factor eigenlijk niet direct de verflenzing beinvloedt, maar eerder een gevolg daarvan is.

Het rollen — Door het rollen worden de bladen gekneusd en opgerold.

Volgens de literatuur komen door het kneuzen aetherische oliën vrij, die de oorzaak zijn van de bekende theegeur. Welke stoffen hierbij een rol spelen weet men niet. De Russische onderzoekers beweerden, dat de geur veroorzaakt wordt door de splitsing der eiwitten. Hoe dit dan moet geschieden werd echter niet aangegeven. Het is mogelijk, dat door de kneuzing der cellen de exo-enzymen de eiwitten hydrolitisch splitsen, waardoor de geur ontstaat. Het is Deijs (particuliere mededeling) gelukt te bewijzen, dat de geur ontstaat door de fermentatie, dus direct na het kneuzen der bladen en dat het geur-optimum vóór het einde der fermentatie ligt. Door het rollen zal het sap veel meer aan de lucht worden blootgesteld, zodat andere omstandigheden worden ingesteld, met het gevolg, dat nu eerder sprake is van „fermentatie" dan van ademhaling.

Bij het rollen mag door de mechanische wrijving de temperatuur zo min mogelijk stijgen en men tracht dit tegen te gaan door de eerste rollingen zonder druk te laten geschieden. Nog beter is om de rolruimte net als de fermenteerruimte af te koelen met behulp van een air-conditioning.

Temperatuursverhoging boven een zekere grens heeft nl. nadelige gevolgen voor de kwaliteit. (Verlies van volheid en pungency).

Leniger (97) deed enige proeven met air-conditioning in de rolruimten en naar aanleiding hiervan stelde hij voor een gemeenschappelijke rol-fermenteerruimte te bouwen, waardoor de relatieve vochtigheid en de temperatuur overal dezelfde kunnen zijn. Er werden ook proeven gedaan om een air-conditioning in de roller zelf te bouwen, maar dit is te kostbaar.

Volgens ouderwetse rolschema's wordt tijdens het rollen de massa slechts afgekoeld, door de gevormde „ballen" te breken in een zg. balbreker. Hierdoor worden de gerolde bladen niet alleen afgekoeld, maar ook in geringe mate gesorteerd in boeboek (fijn),panengah (midden) en badag (grof), doordat de bo-

dem van de heen en weer gaande balbreker van zeven is voorzien. De laatste tijd is aan dit natsorteren meer aandacht besteed, vooral om het zg. droogsorteren, dat na het drogen geschiedt, zoveel mogelijk te verkorten en te vereenvoudigen, omdat gebleken is, dat langdurig droogsorteren de thee grijs doet worden. Er werden betere, horizontaal draaiende zeven in gebruik genomen met meer sortatie-mogelijkheden. Hierdoor worden de apart gefermenteerde sortaties gemakkelijker gecontroleerd en het droogsorteren is daardoor veel eenvoudiger en korter.

Eén der belangrijkste factoren bij het rollen is, dat de temperatuur en de relatieve vochtigheid goed moeten zijn, want het is bekend, dat de fermentatie reeds begint bij het rollen, zodat het aan te raden is om in de rolruimte een gelijke temperatuur en relatieve vochtigheid te hebben als in de fermenteerruimte.

Het fermenteren.

Deze bereidingsfase is eigenlijk een voortzetting van de fermentatie, die reeds tijdens het rollen is begonnen, met dit verschil echter, dat we nu de atmosferische omstandigheden beter in de hand hebben. De bladmassa wordt in de praktijk na het rollen en balbreken naar de fermenteerruimte getransporteerd, waar ze òf op rekken òf op de tegelvloer wordt uitgespreid. Het grovere deel wordt meestal dikker gespreid dan het fijne, daar de aëratie in een massa van grove deeltjes beter is.

Over het algemeen is er geen eenheid te bespeuren in de fermenteertijd, fermenteertemperatuur, spreidikte en relatieve vochtigheid.

De spreidikte varieert voor het fijnere deel van 3—8 cm, voor het „midden stuk" 4—8 en voor het grovere deel 4—10 cm.

Mann prefereerde een spreidikte van 1—1.5 inch, dus dunne lagen. Ook Deuss was geen voorstander van een dikke spreiding, maar het omwerken der bladmassa achtte hij uit de boze. Wij zijn van mening, dat een matig omwerken der massa geen kwaad kan, daar uit onze experimenten is gebleken, dat een actieve fermentatie een goede invloed heeft op de kwaliteit.

Een voorstander van het omwerken van de massa is o.a. Bald (5), die nl. bevreesd is, dat de temperatuur in de massa gedurende de fermentatie te hoog zal oplopen, wat een onjuiste voorstelling is, omdat de enzymatische reacties gedurende dat korte tijdsbestek van pl.m. 4 uur onmogelijk de temperatuur zó hoog kunnen doen stijgen, dat de kwaliteit er veel door benadeeld wordt.

Wat de fermenteertijd betreft, verdient het de voorkeur om zoveel mogelijk op tijd te fermenteren, opdat het beter in het fabricageschema past. Hierdoor kunnen de drogers goed belast lopen, wat economisch is. De fermenteertijd moet natuurlijk van te voren door experimenteel onderzoek worden vastgesteld. Uit de fermentatie-enquête kunnen we opmaken, dat de fermenteertijd in de praktijk zeer kan variëren. Over het algemeen maakt

men onderscheid tussen lichtbladige typen (246 min.), donkerbladige typen (239 min.) en hybriden (202 min.)

Een andere gevolgtrekking is, dat de tijd ook afhankelijk is van het pluksysteem en wel voor grofpluk een kortere fermenteertijd. Dit is eigenaardig, daar Pecco (de beste kwaliteit van de poetjoek) juist korter fermenteert. Wordt er dus grof geplukt dan zal de fermenteertijd theoretisch gesproken langer worden, doordat er meer oudere bladen zijn geplukt. We moeten deze beslissing waarschijnlijk anders interpreteren. Wordt de fermenteertijd langer bij grof pluk, dan zal de bruine kleur wel beter zijn, maar dan is de Pecco in die tussentijd overgefermenteerd, wat een dunne schenk teweeg brengt. Men kiest dus een compromis door korter te fermenteren, zodat de Pecco haar invloed zoveel mogelijk kan laten gelden op de kwaliteit van het eindproduct.

Een dergelijke methode is naar onze mening niet juist, daar het derde blad daardoor ondergefermenteerd is, wat de goede invloed van de Pecco teniet kan doen. Het zou beter zijn om, zoals op Sumatra, het derde blad apart te plukken en te bereiden. Hierdoor kunnen de jongere zowel als de oudere bladen volledig worden gefermenteerd.

Verder bleek, dat in 87 van de 100 gevallen de relatieve vochtigheid groter was dan 90 %, zodat er wat dit betreft nog sprake is van een uniformiteit.

Over de fermenteertemperatuur zijn de practici het nog niet met elkaar eens, behalve dan dat ze unaniem een hoge temperatuur uit de boze vinden. Mann vond o.a. een beslist nadelige invloed van een tempreratuur boven 28° C.

Het is bij de fermentatie erg moeilijk te zeggen, wat de beste temperatuur, tijd en relatieve vochtigheid is, daar de geur, kleur en smaak als kwaliteitsfactoren een verschillend maximum hebben. Daarom is de contrôle van de fermentatie nog steeds een kwestie van proeven en zien.

Het drogen.

Wanneer men denkt, dat de fermentatie op zijn optimum is, dan wordt deze stopgezet door de massa in een droger te drogen.

Het blad wordt bij een temperatuur van 85—95° C gedurende 18—25 minuten gedroogd, waarbij het vochtgehalte van pl.m. 60 % tot 4—5 % wordt teruggebracht. De theemassa wordt dan zwart, waarbij de enzymen zijn gedood, zodat er dus geen verdere fermentatie kan optreden. Komt er later vocht bij gedurende het bewaren of verzenden, dan kunnen hierop allerlei micro-organismen groeien, waardoor de kwaliteit minder wordt. Daarom moet het pakmateriaal van goede kwaliteit zijn.

Bij het drogen moet men er voor zorgen, dat bij de droger geen ophopingen van fermenterende bladen ontstaan, zodat men voor een regelmatige afvoer moet zorgdragen. De spreiding van de

bladen in de droger moet regelmatig zijn, zodat de massa goed kan worden gedroogd. Daar bij de droging alles draait om een behoorlijke vochtonttrekking, moet men er voor zorgen, dat de droogruimte goed geventilleerd wordt en men moet daarbij voorkomen, dat de afgewerkte lucht opnieuw wordt gebruikt. Het is gebleken voordeliger te zijn, wanneer de ovens buiten de fabriek worden aangebracht. Een isolatie van de ovens brengt daarbij een aanzienlijke brandstofbesparing met zich mee.

Het is in de praktijk aan te bevelen, dat de gedroogde thee snel wordt afgekoeld, waarna men de zwarte theemassa in de verschillende handelsproducten als pecco, souchong, broken tea, orange pecco enz., sorteert.

Het is beter om de thee niet dadelijk te wannen, want deze moet eerst afgekoeld worden. Hierdoor voorkomt men, dat de nog te droge thee teveel zou verpoederen. Vervolgens brengt men de thee in de sorteermachines en elke soort, die te grof is en niet door de zeef kan, wordt opnieuw gesorteerd, waarbij men gebruik maakt van wijdgestelde messen.

Wat daarna nog te grof is, wordt opnieuw gesneden en gesorteerd, waarbij de messen nauwer gesteld worden. Het nauwer stellen der messen moet geleidelijk aan geschieden, zodat we kunnen voorstellen, dat het sorteren een langdurige geschiedenis kan zijn, waarbij de zwarte thee gemakkelijk grijs kan worden en zodoende in kwaliteit dalen kan.

Vervolgens wordt de thee uit de sorteermachine in de wan naverwerkt en daarna worden de steeltjes door vrouwen uitgezocht.

Het grote belang bij het sorteren is, dat men zo veel mogelijk standaard producten op de markt brengt en dat men de sortaties niet van namen voorziet, die deze niet verdienen, daar een dergelijke handelwijze de „goodwill", die men eventueel bij de kopers zou genieten, moedwillig zou teniet doen.

Na het sorteren wordt de thee in grote, met lood beklede kisten opgeslagen, totdat men voldoende thee voor een factuur of „chop" (d.i. 24 of meer kisten van een zelfde soort), heeft. Dan worden ze in stevige kisten van triplex met tin- of loodbekleding afgepakt. De bekleding mag niet te dun zijn, daar anders bij de verpakking de harde steeltjes er door heen prikken. Deze kisten hebben een internationale maat, zodat de gewichten van te voren bekend zijn. Zo is het gewicht van een hele kist maximum 55 kg, waarbij het watergehalte max. 6 % mag bedragen. „Fannings" en „Dust" worden in halve kisten verpakt. De kisten moeten geleidelijk aan worden gevuld, daar door een ruwe behandeling onnodig veel dust en fannings worden gevormd. De afpakmachines hebben alle het doel om de kisten een sterk trillende beweging te geven, waardoor de thee langzaam zakt en er dus ook meer in kan. Tenslotte zijn de kisten klaar om verzonden te worden.

C — De enzymatische omzettingen in het blad tijdens de bereiding.

Wat deze betreft heeft men hoofdzakelijk de peroxydase-activiteit tijdens de verschillende phasen van de bereiding onderzocht.

Mann (105) vermoedde reeds in 1901, dat in thee een peroxydase voorkomt. Zijn onderzoekingen werden later door Jones & Roberts en ook door Deijs bevestigd, hoewel de laatste onderzoeker meer van mening is, dat de oxydasen in de thee de belangrijkste enzymen zijn.

Bernard & Welter (13) vonden bij het onderzoek naar oxyderende fermenten allereerst, dat poedervormige stoffen als peroxydase kunnen reageren, zoals zand, glaszand, zetmeel e.d.; er is dus sprake van een katalytische werking. Verder vonden zij, dat bij overmaat waterstofperoxyde deze werking wordt opgeheven en het katalytische systeem er zelfs door vergiftigd wordt. Voegt men echter meer peroxydase toe, dan wordt de vergiftigende werking van de overmaat waterstofperoxyde weer opgeheven, zodat er sprake is van een evenwicht tussen peroxydase en waterstofperoxyde.

Daar peroxydase in combinatie met waterstofperoxyde op de looistoffen inwerkt, heeft men gedacht, dat de tanninen een grote invloed op de kwaliteit zullen hebben. Zo zocht Deuss naar een verband tussen de tanninen en de kwaliteit, maar kreeg negatieve reultaten, wat eigenlijk niet te verwonderen is, daar hij als maatstaf voor de kwaliteit de prijs aannam. Andere onderzoekers legden meer de nadruk op de peroxydase. Zo meende Bamber (7), dat de peroxydase en de looistoffen de koperrode kleur veroorzaken. Deze bewering werd later bevestigd en nog meer gepreciseerd en men verklaart tegenwoodig dit optreden van de rode kleur door aan te nemen, dat het oxydatieproduct van de tanninen gaat condenseren.

De onderzoekingen over de peroxydase werden later door Deijs, Jones & Roberts onafhankelijk van elkaar voortgezet. Zij vonden zoveel peroxydase in het theeblad, dat zij de plant onder de zg. „peroxydase-planten" gingen rangschikken.

Volgens de laatste onderzoekingen over de peroxydase is het gebleken, dat de peroxydase-werking afhankelijk is van de pH, temperatuur en hoeveelheid waterstofperoxyde.

De hoeveelheid peroxydase, welke meestal wordt voorgesteld als peroxydase-activiteit, wordt berekend door het zg. purpurogalline-getal (P.Z.) te bepalen, d.i. de hoeveelheid purpurogalline, die 1 mg van een preparaat in een mengsel van 5 g pyrogallol en 50 mg waterstofperoxyde, opgelost in 2 L water, bij 20° C in 5 minuten vormt.

Het gebruik van pyrogallol wordt door Dixon (49) bestreden. Deze is van mening, dat pyrogallol niet specifiek genoeg is

voor de bepaling van peroxydase, omdat pyrogallol ook door benzoilperoxyde kan worden geoxydeerd.

In Assam en ook op Java werd deze methode echter niet toegepast, daar de ether, die men voor de bepaling gebruiken moet zó sterk vervluchtigde, dat men er maar van af zag en uit moest zien naar een andere methode, waarvoor men die van Guthrie koos. Deze methode werd o.a. door Deijs (35) bij het onderzoek naar de peroxydase in theeblad toegepast. Deze bepaling berust hierop, dat peroxydasen bij aanwezigheid van waterstofperoxyde in een substraat, hetwelk alpha-naphtol en p-phenyleendiamine bevat, een oxydatie kunnen bewerkstelligen, waarbij uit de genoemde componenten de paarse kleurstof indophenol wordt gevormd. De hoeveelheid van deze kleudstof, welke in een bepaalde tijd ontstaat en die met behulp van een Hellige tintometer colorimetrisch wordt gemeten, is binnen zekere grenzen recht evenredig met de concentratie van het enzym.

Deze bepalingsmethode werd behalve door Deijs, ook door Roberts (131) toegepast. Terwijl Deijs de peroxydase-activiteit steeds in mg indophenol per gram droge stof aanduidde, bepaalde Roberts de peroxydase-activiteit in Indophenol units (I.U.) per gram drooggewicht in 10 gram blad.

Deijs vond dan, dat de peroxydase-activiteit in Pecco en in de bladsteel lager is dan in de oudere bladen. Bij het verflenzen neemt de activiteit toe. Deze toename is echter bij lage temperatuur geringer. Waarschijnlijk loopt de activiteit van peroxydase tijdens het verflenzen door een maximum. Volgens Roberts geschiedde dit bij een vochtgehalte van 72 %.

Roberts (131) vond de volgende cijfers:

Verloop van de peroxydase-activiteit in IU. per gram drooggewicht tijdens de bereiding van 10 g. blad.

	I	II
groen blad	—	894
verflenst blad	1051	1293
40 min. rollen	—	780
90 min. rollen	652	685
2.30 uur fermenteren	—	647
3.30 „ „	617	—
4 „ „	—	536
5 „ „	178	—
6.30 „ „	115	—
25 „ „	132	—
	—	7

De stijging van de peroxydase-activiteit na 25 uur fermenteren

werd zeer waarschijnlijk veroorzaakt door de werking der microorganismen.

De daling der peroxydase-activiteit tijdens het fermenteren werd ook door Mann (105) en Manskaja (109) gevonden; vooral tijdens het begin der fermentatie is een duidelijke daling waar te nemen.

Roberts en Deijs vonden onafhankelijk van elkaar dat de peroxydase-activiteit in zwarte thee slechts 5 % van die in gefermenteerd blad bedraagt, terwijl Lamb (86) een veel hoger cijfer vond nl. 40 %, wat nogal onwaarschijnlijk is.

Wat het voorkomen van de peroxydase betreft, bestaan er grote verschillen tussen de verschillende twijgjes van dezelfde struik en ook tussen verschillende struiken op dezelfde plek.

Roberts verkreeg goed reproduceerbare getallen door uit 20—30 lb. blad 10 g te analyseren en dit vier keer te herhalen. Deze werkwijze heeft echter het nadeel dat bladen van verschillende ouderdom en soort gemengd worden, waardoor de invloed van ouderdom en soort over het hoofd wordt gezien. Roberts vond verder, dat de peroxydase-activiteit wekelijks kan verschillen, waarbij als hoogste cijfer 950 I.U. en als laagste cijfer 300 I.U. werd gevonden, wat dus een belangrijk verschil betekent. Desondanks vond hij geen verschil in de mate van fermentatie, zodat men mag aannemen, dat de fermentatie niet door de peroxydase wordt geleid.

Bij onderzoek naar de peroxydase-activiteit in verschillende delen van de twijg kreeg hij ongeveer dezelfde resultaten als Deijs.

Peroxydase-activiteit in verschillende bladen van een twijg.

	Volgens Roberts in I. U. per gr. drooggewicht in 10 gr. blad.	Volgens Deijs in mg Indophenol per gram droge stof.
Pecco blad	286	36,3
eerste blad	486	54,6
tweede blad	556	57,5
derde blad	574	58,2
vierde blad	—	54,4
vijfde blad	—	50,6
„steel" (stengel)	493	35,6

Ouder blad heeft dus over het algemeen een hogere peroxydase-activiteit dan jongere bladen, waarbij Deijs nog een optimum vond bij het derde blad.

Wat de andere enzymen betreft, deze werden, behalve de kata-

lase, slechts kwalitatief onderzocht. Zo vond men o.a. nog glucosidase, invertase, proteolytische enzymen en tyrosinase.

Hoewel Roberts zijn theorie later tegensprak, verkreeg hij uit zijn eerste onderzoekingen, dat ascorbinase de snelheid van de fermentatie kan bepalen.

Wat de bestendigheid der thee-enzymen tegen invloeden van buiten betreft, is Lamb (86) van mening dat zij bestendig zijn tegen verhitting, wat echter door Deijs en ook door Roberts is tegengesproken.

Deijs (41) vond verder, dat de katalase-activiteit tijdens een normaal droogproces vrijwel geheel verdwenen is.

Hij onderscheidde drie factoren, die het inactiveren der enzymen kunnen veroorzaken:

1 — temperatuursverhoging
2 — chemische reacties
3 — uitdroging

Daar de enzymen thermolabiel zijn, is de inactivering door temperatuursverhoging niet omkeerbaar, zodat zij na de daling van de temperatuur inactief blijven. Wat de tweede factor betreft heeft Deijs gevonden, dat tijdens de fermentatie zowel peroxydase als katalase minder actief zijn geworden.

Wij hebben zelf gevonden, dat ook de activiteit van ascorbinase minder is geworden. (Hoofdstuk 5).

In tegenstelling tot het voorgaande is het inactief worden der enzymen door uitdroging wèl omkeerbaar, m.a.w. de enzymen zouden weer kunnen werken, mits we weer water toevoegen. Deijs merkte hierbij echter op, dat de inactivering toch irreversibel wordt, indien de prosthetische groep veranderd is.

Uit de proef van Deijs bleek, dat de enzymen geinactiveerd kunnen worden bij geringere temperatuursverhoging dan gewoonlijk wordt toegepast.

Het is hem nl. gelukt om de fermentatie te doen stopzetten bij een inlaattemperatuur van 55° C. Daarbij speelt de tijd natuurlijk een grote rol.

D — Het mechanisme van de fermentatie.

Een geheel nieuwe richting is het onderzoek naar het mechanisme van de fermentatie. In het begin maakte men geen onderscheid tussen de reacties in het verse blad en in het fermenterende blad, maar door de verschillen, die steeds meer op de voorgrond treden, maakt men tegenwoordig dit onderscheid wèl.

Daar de fermentatie enigszins op de ademhaling lijkt, heeft één der eerste onderzoekers nl. Roberts (130) zowel de zuurstofopname als de CO_2-afgifte bepaald en op grond van de op deze wijze verkregen resultaten een soort ademhalingsschema opgesteld voor fermenterende bladen.

Vanwege het grote peroxydase-gehalte werd de thee door hem

tot de zg. peroxydase-planten gerekend. (Deze indeling is niet erg bevredigend, doordat men nu gaat twijfelen aan de belangrijkheid van de rol die dit enzym tijdens de fermentatie speelt.)

Roberts trok een parallel met de aardappelplant, waarvoor Szent-Gyorgyi een ademhalingsschema had opgesteld en heeft met een variatie hierop in 1939 het volgende ademhalingsschema voor fermenterende thee opgesteld.

1 — ascorbinezuur + O_2 $\underset{\leftarrow}{\rightarrow}$ dehydroascorbinezuur + H_2O
ascorbinezuuroxydase

2 — theelooistoffen + H_2O_2 $\rightarrow$ chinonen van looistoffen
peroxydase

3 — chinonen $\rightarrow$ condensatieproducten (gekleurd)

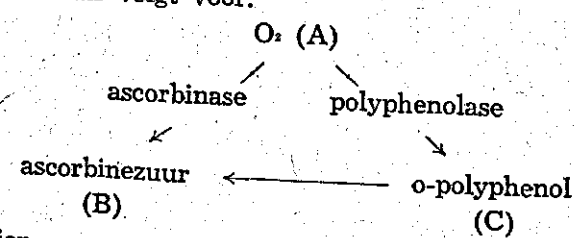
4 — chinonen + ascorbinezuur $\rightarrow$ dehydroascorbinezuur + tanninen

5 — 2 dehydroascorbinezuur + glucose $\rightarrow$ 2 ascorbinezuur + CO_2 + H_2O.

Dit schema baseerde hij op de volgende gegevens:

1 — in vers blad werd ascorbinezuur gevonden.

2 — voegt men aan gekneusd blad ascorbinezuur toe, dan treedt gedurende de eerste 20—25 minuten geen bruinkleuring op, zodat volgens Roberts de eerste reactie beslist voor moet gaan. Volgens Lamb is dit juist de fout van Roberts. Lamb is van mening, dat het ascorbinezuur pas geoxydeerd wordt, nadat een deel der o-polyphenolen is geoxydeerd door de zuurstof en polyphenolase. De gevormde chinonen zullen niet gaan condenseren, zolang er ascorbinezuur aanwezig is, want zij worden direct door dat zuur gereduceerd tot de oorspronkelijke tanninen. Hierdoor ontstaat er geen bruinkleuring. Dit zal inderdaad de weg zijn, indien er in het theeblad geen ascorbinase aanwezig is. Is het enzym echter wèl aanwezig, dan zijn we overtuigd, dat de reactie anders zal verlopen. We stellen ons de opname van zuurstof als volgt voor:



Indien er geen ascorbinase aanwezig is, zal de zuurstof worden opgenomen voor de oxydatie der o-polyphenolen, waarna de gevormde chinonen het ascorbinezuur zullen oxyderen. De reactie zal in dat geval dus verlopen in de richting A—C—B. Is ascorbinase echter wel aanwezig, dan

zal eerst het ascorbinezuur de zuurstof opnemen met behulp van het enzym. Is het grootste deel van het aanwezige ascorbinezuur geoxydeerd, dan zullen pas de o-polyphenolen oxyderen. De zuurstofopname van beide systemen vindt dan vrijwel achter elkaar plaats, dus eerst in de richting A—B en daarna in de richting A—C.
Wordt ascorbinezuur in het begin van de fermentatie toegevoegd, dan zal dit zuur ook eerder worden geoxydeerd, waardoor de bruinkleuring wordt geremd. Het is dus van groot belang te weten of ascorbinase in het theeblad aanwezig is.

3 — katalase is aanwezig en Roberts voegde er aan toe, dat dus ook waterstofperoxyde aanwezig moet zijn.

4 — ascorbinezuuroxydase is aanwezig, wat geconcludeerd wordt uit het feit, dat toevoeging van ascorbinase de fermentatie versnelt.

Dit laatste argument van Roberts bewijst ons inziens niets, immers het zelfde kan geschieden indien er geen ascorbinase in het theeblad aanwezig is.

Volgens Roberts' schema moet er na de fermentatie evenveel ascorbinezuur aanwezig zijn, als in het begin van de fermentatie, wat niet juist is, want Deijs vond, dat er na de fermentatie niet veel meer van dit zuur overblijft.

Roberts baseerde zijn eerste reactie op de onderzoekingen van Huszak (73), die vond dat er een verschil bestaat tussen door enzymen gekatalyseerde oxydatie van ascorbinezuur, welke reversibel is en door bijv. geioniseerd koper gekatalyseerde oxydatie, welke niet reversibel is.

De oxydatie van ascorbinezuur door de chionen is vermoedelijk niet reversibel, zodat het labiele dehydroascorbinezuur spoedig uiteen valt.

Szent-Gyorgyi vond, dat de oxydatie van ascorbinezuur in plantensappen door een enzym wordt gekatalyseerd en dat dit enzym een Cu-proteine-complex moet zijn.

Barron & Klemperer (9) vermelden in 1935, dat de oxydatie van ascorbinezuur in groentensappen hoofdzakelijk te wijten zijn aan spoortjes koper. Verder vonden zij, dat de oxydatiesnelheid in sommige plantensappen veel geringer is, dan het kopergehalte doet vermoeden, zodat dit metaal voor een deel in inactieve vorm aanwezig moet zijn.

Stotz, Harrer & King (171) — 1937 — gaan nog verder, want volgens hen zouden alle oxydatieve invloeden op ascorbinezuur zijn terug te brengen tot de aanwezigheid van koper. Zij bedoelen hiermee, dat niet alleen de directe katalyse door ascorbinase en geioniseerd koper hiertoe behoort, maar ook de indirecte katalyse door polyphenolase, die o-polyphenolen tot o-chinonen oxydeert, welke dan het ascorbinezuur kunnen oxyderen.

Nu kunnen chinonen ook gevormd worden door oxydatie van polyphenolen, door waterstofperoxyde en peroxydase, welk enzym Fe-houdend is. Ook bestaat er een indirecte katalyse door het systeem cytochroom-cytochroomoxydase, welk enzym ook Fe-houdend is. Daarom is de bewering van Stotz c.s. ons inziens dan ook onhoudbaar.

Mc Carthy, Green & King (116) — 1939 — toonden aan, dat de katalyse van de oxydatie van ascorbinezuur kan worden verkregen door een losse combinatie van spoortjes koper en proteïne. Zij twijfelden zelfs aan het bestaan van een ascorbinezuuroxydase, want zij vermelden, dat de aanwezigheid van een proteïne eerder remmend werkt, dan versnellend.

Meiklejohn & Stewart (122) — 1941 — zijn het niet met hen eens, want zij vonden, dat ascorbinezuuroxydase veel actiever werkt dan dezelfde hoeveelheid koper in geioniseerde toestand.

Een ander zwak punt van Roberts' proeven is de methodiek, die hij heeft toegepast nl. de bepaling der zuurstofopname, omdat de zuurstof ook voor andere oxydaties kan worden opgenomen, zoals die van vetten in koolhydraten.

Deijs (36) meende, dat de opname van zuurstof niet parallel behoeft te lopen met de veranderingen van andere eigenschappen tijdens de fermentatie, zoals geur, kleur en smaak m.a.w. de zuurstofopname geeft niet het gehele beeld van de fermentatie aan.

Deijs (38) onderocht verder het gehalte aan ascorbinezuur en de veranderingen tijdens de bereiding. Zo vond hij, dat tijdens de verflenzing slechts een klein percentage wordt geoxydeerd. De temperatuur, waaronder verflenst wordt is van belang, daar bij 8° C minder dehydroascorbinezuur wordt gevormd, dan bij de normale flenstemperatuur van 27—29° C. Wanneer de lucht met waterdamp verzadigd is, zodat er geen vochtverlies optreedt, dan ontstaat er toch een verlies aan ascorbinezuur, hoewel in mindere mate. Een andere factor, die het verlies van ascorbinezuur beinvloedt, is de tijdsduur na het plukken. Het komt dus hierop neer, dat tijdens het verflenzen zuurstof wordt opgenomen, waardoor met behulp van een enzym het ascorbinezuur wordt geoxydeerd.

Deijs vond verder, dat wanneer het verflenste blad wordt fijngerold, er praktisch geen ascorbinezuur meer in voorkomt, zodat we mogen aannemen, dat gefermenteerde thee geen ascorbinezuur bevat. Hij heeft daarna volgens de methode van Spruyt en Donath uit verse theebladen een enzymprepaaat verkregen, dat een zeer actieve ascorbinezuuroxydase bevat. De activiteit van dit enzym wordt ten zeerste door de pH beinvloed en Deijs vond een optimum bij een pH van 5,1—5,2.

Hij concludeerde, dat de hoeveelheid ascorbinezuuroxydase samen moet gaan met de snelheid der fermentatie, wat ook door Roberts werd gevonden. Deijs twijfelde aan de volledig-

heid van het schema van Roberts, doordat H_2O_2 ook op andere manieren kan worden gevormd, zoals bij de oxydatie van polyphenolen.

Bij de vergelijkingen van de snelheid van oxydatie heeft hij niet de zuurstofopname als maat genomen, maar de verandering van de kleur, omdat deze methode volgens hem een beter criterium is voor de fermentatie dan de zuurstofopname en meer overeenkomt met de praktijk. Om de kleine kleurverschillen goed van elkaar te kunnen onderscheiden maakte hij gebruik van een Hellige tintometer.

Verder heeft Deijs enige proeven ter hand genomen om een groene thee te bereiden met een hoog Vitamine-C-gehalte. De bereiding hiervan baseerde hij op het feit, dat wanneer hij ervoor zorgde, dat de ascorbinezuuroxydase geinactiveerd wordt, voordat zij het ascorbinezuur kan oxyderen, een groot gedeelte hiervan behouden blijft. Een verdere behandeling zoals het rollen en drogen bij een temperatuur van 98° C heeft weinig invloed op het ascorbinezuur, zodat men vitamine-C rijke groene thee kan verkrijgen. Hij ziet daarbij echter over het hoofd, dat door verhitting Cu vrijkomt, en als warmtestabiele katalysator kan optreden, zodat het ascorbinezuur toch kan worden geoxydeerd, hoewel in mindere mate. Het is hem dan ook nooit gelukt om groene thee te bereiden zonder een verlies van 25—30 % van het ascorbinezuur.

In gefermenteerde thee vond hij echter geen ascorbinezuur meer, zodat het niet lukken zal om zwarte thee met een hoog vit-C-gehalte te bereiden. Het is bekend, dat het ascorbinezuur de antiscorbutische werking bezit. Nu is het echter uit onderzoekingen van Zilva gebleken, later bevestigd door Dann, dat ook het enzymatisch gevormde dehydroascorbinezuur deze werking bezit, want dit zuur wordt in dierlijke en menselijke organen gereduceerd, waardoor het antiscorbutisch werkzaam wordt. Daarom is vitamine-C niet identiek met ascorbinezuur. Willen we dus nagaan of bijv. zwarte thee nog een antiscorbutische werking bezit, dan moeten we eerst het dehydroascorbinezuur, dat nog niet uiteen gevallen is, reduceren met H_2S, alvorens we met 2—6 dichlorophenol-indophenol willen titreren. Een andere methode om de totale antiscorbutische werking te bepalen is bijv. die van Roe & Keuther (142)—1943—, waarbij hydrazine wordt toegevoegd, welke ook dehydroascorbinezuur kan reduceren. De kleurverandering wordt dan met behulp van een photo-electrische colorimeter bepaald. De hydrazinemethode geeft meestal hogere waarden, dan de vorige methode. Het nadeel van de hydrazinemethode is, dat ook andere stoffen dan de twee genoemde, tegelijk worden gereduceerd, waardoor fouten kunnen worden gemaakt.

Om nu tot Roberts' schema terug te komen, twijfelde hij reeds in 1940 aan de rol van ascorbinezuuroxydase bij de opna-

me van zuurstof. Hij meende, dat de verschillende fermentatiesnelheden niet is overeen te brengen met de theorie, dat ascorbinezuur direct de moleculaire zuurstof opneemt, zoals dat in zijn schema van 1939 voorkomt.

Deze conclusie is geheel in tegenspraak met zijn vorige bewering. Hij gelooft nu veeleer, dat deze fermentatie-verschillen te wijten zijn aan meer dan één reactie. Inderdaad, maar we vinden het wat voorbarig van Roberts om op grond van zijn conclusies de ascorbinezuurtheorie zonder meer overboord te gooien. Daarnaast opperde hij de volgende bezwaren:

1 — de mate van fermentatie kan door de mate van verdunning worden beinvloed wat ook door ons is bevestigd. (Hoofdstuk 4). Dit verklaarde Roberts (134) door aan te nemen, dat door de verdunning de co-enzymen meer dispergeren en daardoor de fermentatie activeren.

2 — toevoeging van ascorbinezuur in het begin van de fermentatie remt de bruinkleuring, wat ook door Deijs is gevonden. Uit onze eigen onderzoekingen is gebleken, dat toevoeging van ascorbinezuur geen directe verhoging van de potentiaal veroorzaakt.

Dat toevoeging van ascorbinezuur de bruinkleuring enige tijd remt, moet ons inziens juist veroorzaakt worden, doordat het ascorbinezuur het eerst moet worden geoxydeerd en hiervoor kan moeilijk iets anders dan de ascorbinezuuroxydase aansprakelijk worden gesteld.

Ons inziens is de ascorbinezuurtheorie juist, hoewel deze gecompliceerder moet zijn dan het fermentatieschema van Roberts in 1939 voorstelt. Deze auteur nam in 1940 aan, dat de moleculaire zuurstof door het cytochroom-cytochroomoxydasesysteem wordt opgenomen en dat het gevormde waterstofperoxyde tezamen met peroxydase de tanninen zal oxyderen waarna de gevormde o-chinonen op hun beurt het ascorbinezuur oxyderen.

1 Ferro-haematine (cytochroom) + O_2 $\xrightarrow{\text{cytochroomoxydase}}$ Ferri-haematine + H_2O_2

2 theetanninen + Ferri-haematine → o-chinonen + Ferro-haematine

3 theetanninen + H_2O_2 $\xrightarrow{\text{peroxydase}}$ o-chinonen

4 o-chinonen → condensatieproducten

5 Ferri-haematine + CoH_2 (cozymase) → Ferro-haematine + Co

6 o-chinonen + C_0H_2 → theetanninen + Co

7 Co + substraten $\xrightarrow{\text{dehydrogenasen}}$ CoH_2 + reactieproducten

Indien de o-chinonen niet direct worden gereduceerd, blijven ze aanwezig of gaan condenseren. De aanwezigheid der o-chinonen is het kardinale punt, waarom beschadigde bladeren bruin worden en onbeschadigde groen blijven m.a.w. in vers blad of verflenst blad, dat nog niet beschadigd is, zullen de gevormde o-chinonen direct gereduceerd worden door het ascorbinezuur en eventueel andere reducerende stoffen.

Dit tweede fermentatieschema van Roberts bevredigt ons ook niet geheel, ten eerste omdat hij geen voldoende positieve bewijzen heeft aangevoerd voor zijn cytochroomtheorie en ten tweede omdat andere mogelijkheden als bijv. katalyse door zware metalen helemaal niet in beschouwing zijn genomen.

Een ander bezwaar van het tweede fermentatieschema van Roberts (1940) is dat geen enkele oxydatie van ascorbinezuur voorkomt, terwijl hierover geen twijfel bestaat.

Het is in ons onderzoek gebleken, dat gekookt extract toch ascorbinezuur kan oxyderen, zodat de zware metalen als katalysatoren in het theeblad aanwezig kunnen zijn.

Roberts' bewijs, dat een met alcohol bewerkt bladpreparaat toch nog ascorbinezuur kan oxyderen, zodat in het theeblad geen sprake zou zijn van ascorbinase moet ons inziens op een andere manier worden geinterpreteerd. Stel, dat de aanwezige ascorbinase door geconcentreerde alcohol volledig wordt geinactiveerd, dan kan het ascorbinezuur toch op andere manieren worden geoxydeerd zoals bijv. door de zware metalen Cu en Fe, zodat men de ascorbinezuurtheorie niet behoeft te verwerpen.

Andere onderzoekers als Lamb & Sreerangacher (91) — 1940 — verwierpen ook de ascorbinezuurtheorie op ongeveer dezelfde gronden als Roberts en vervolgens twijfelden zij aan de rol van peroxydase zoals die door Roberts wordt voorgesteld, want het is hun gelukt om o-polyphenolen in afwezigheid van waterstofperoxyde te oxyderen.

Hierbij komt de vraag bij ons op, wat dan de rol van de peroxydase moet zijn. Beide onderzoekers gaven hierop echter geen antwoord.

Zij deden hun onderzoekingen door naast elkaar een enzympreparaat, dat met aceton is bewerkt en een substraatpreparaat, dat door koken is verkregen, te bereiden en deze op elkaar te laten inwerken.

Deze werkwijze heeft ons inziens het nadeel, dat andere reacties, die normaal zullen plaats vinden in een dergelijk kunstmatig systeem niet kunnen geschieden, doordat de reagerende stoffen door de behandeling òf verdwenen òf geinactiveerd zijn. Daarom is het riskant om uitgaande van een locale reactie als de oxydatie van polyphenolen, algemene conclusies te trekken, die betrekking hebben op de totale reactie.

Zij hebben het belangrijke feit naar voren gebracht, dat de polyphenolen in theeblad door moleculaire zuurstof kunnen wor-

den geoxydeerd, zodat polyphenolase beslist aanwezig moet zijn. De kwantitatieve bepaling geschiedde door het mengsel met jodium en natronloog gedurende 15 minuten weg te zetten in het donker en daarna de jodium terug te tritreren met $Na_2S_2O_3$ na toevoeging van zwavelzuur. Deze bepaling is eigenlijk een zuivere bepaling van de oxydatie der polyphenolen, die volgens Lamb wel niet identiek is met de fermentatie, maar toch parallel loopt met de O_2-opname. Lamb e.c. onderscheidden oplosbare en onoplosbare enzymen en vonden, dat de onoplosbare actiever en dus belangrijker zijn. Deze beiden soorten hebben, hoewel ze geheel gelijk t.o.v. de o-polyphenolen reageren, toch enige verschillen. Zo is de

optimum temperatuur voor de oplosbare enzymen 49° C en opt. pH 6—7.

optimum temperatuur voor onoplosbare enzymen 27° C en opt. pH 5,4.

Wanneer waterstofperoxyde wordt toegevoegd, vonden zij, dat enzymactiviteit toeneemt en dat de werking niet meer specifiek is t.o.v. orthopolyphenolen, daar ook parapolyphenolen kunnen worden geoxydeerd.

Zij verklaren dit verschijnsel door aan te nemen, dat de gevormde o-chinonen met de toegevoegde waterstofperoxyde een „peroxydase-werking" vertonen. Dit lijkt ons wat te ver gezocht, want de methode van bereiding heeft ons inziens de peroxydase niet geinactiveerd.

Bij deze proeven is het de onderzoekers gebleken, dat vers blad na kneuzing anders reageert dan verflenst blad, dat gekneusd wordt, Zo vonden zij, dat gedurende het verflenzen de enzymactiviteit enigszins is toegenomen. Deze toename werd ook door andere onderzoekers opgemerkt, zoals Mann (105), Deijs (35), Jones en Roberts & Sarma (136), die deze echter via de peroxydase-activiteit hebben bepaald.

Sommige van hen verklaren dit verschijnsel door aan te nemen, dat nieuwe peroxydase is gesynthetiseerd.

Een ander belangrijk feit, dat Lamb e.c. vonden, is, dat CO_2-afgifte niets te maken heeft met de oxydatie der tanninen. Sreerangacher (162) onderzocht dit verder en vond, dat hoe meer het blad wordt fijngewreven, hoe groter de zuurstofopname en hoe kleiner de CO_2-afgifte. Daar normale verse bladen een ademhalingsquotiënt van ongeveer 1 hebben, meende hij, dat de toename van de zuurstofopname nodig is voor de oxydatie der polyphenolen en de vermindering van de CO_2-afgifte probeerde hij te verklaren, door aan te nemen, dat door het rollen het totale oppervlak der onbeschadigde deeltjes kleiner is geworden. Deze verklaring is, hoewel er wat voor te zeggen is, nogal vaag, want we weten hiermee nog niet, hoe het komt, dat onbeschadigde cellen CO_2- kunnen afgeven en beschadigde cellen hiertoe niet in staat zijn. Roberts heeft geprobeerd dit verschijnsel te ver-

klaren door aan te nemen, dat door het beschadigen der cel het vermogen van de cel om anaeroob te fermenteren wordt vernietigd. We zijn geneigd dit zodanig te preciseren, dat door het kneuzen de inwerking van de lucht veel intensiever is geworden en dat daardoor de enzymen die voor de CO_2-afgifte zorg dragen inactiever worden.

Tijdens de fermentatie wordt ook zuurstof opgenomen voor de oxydatie van glucose. Dit werd door Sreerangacher (162) — 1941 — bewezen, doordat toevoeging van glucose aan fermenterende thee een toename van de zuurstofopname en de CO_2-afgifte veroorzaakte. Uit deze proeven kunnen we concluderen, dat de moleculaire zuurstof door verschillende systemen kan worden opgenomen, zoals ascorbinezuur, polyphenolen en glucose.

Deze feiten wijzen nog eens op de gebrekkigheid van de methodiek van de zuurstofopname, daar deze niet specifiek is voor een bepaalde reactie en ook niet voor de totale fermentatie, zodat ze misleidend kan werken. De onderzoekingen werden in 1943 door Sreerangachar (163) uitgebreid, waarbij is afgestapt van de manometrische methode. Daar volgens hem geen condensatie van o-chinonen plaats vindt, zolang er nog ascorbinezuur aanwezig is, lijkt hem het volgen van het ascorbinezuurgehalte een betere methode. Een nadeel is, dat hij uit theebladen een enzympreparaat heeft gemaakt, hetgeen hij eerst met aceton heeft behandeld. Volgens hem bestaat de oxydase alleen uit polyphenolase en bestaat er geen ascorbinezuuroxydase in de thee. Ons inziens is hij tot deze conclusie gekomen, doordat aceton de werking van ascorbinase inactiveert, wat door Srinivasan is bewezen. Sreerangachar is dus niet gerechtigd, om de ascorbinase zonder meer te verwerpen. Door het enzympreparaat te laten inwerken op een catechine- of een theetannineoplossing heeft hij de invloed van de pH en de temperatuur bestudeerd. Hij vond de optimum pH bij 5,4 en de optimumtemperatuur bij 27° C. Verder heeft hij (164) opgemerkt, dat het enzympreparaat anders reageert t.o.v. de verschillende polyphenolen dan het extract van theeblad. Zo wordt catechine door het enzympreparaat actiever geoxydeerd dan de theetannine, terwijl het thee-extract een tegengestelde werking bezit. Ook de invloed van oxydatieproducten van deze twee verschillende polyphenolen is geheel verschillend. Er is hier sprake van geinduceerde oxydatie, waarbij de polyphenolen dan als inductor optreden. Zo veroorzaakt toevoeging van oxydatieproducten van catechine een actievere oxydatie, terwijl de oxydatieproducten van theetannine geen verhoging van de oxydatie veroorzaken. Dus door toevoeging van catechine kan de zuurstofopname van fermenterende thee worden verhoogd. Verder heeft Sreerangachar (165) tegen de cytochroom-theorie van Roberts de volgende argumenten aangevoerd. Zo vond hij bij een spectrale analyse geen cytochroom-c. De bewijsvoering van Roberts, dat verhoging van

de zuurstofopname bij een hogere zuurstofspanning een bewijs is voor de aanwezigheid van cytochroom, heeft Sreerangachar tegengesproken, door aanvoering van een proef van Green van 1940, waarbij het gebleken is, dat vergroting van de zuurstofspanning juist geen invloed heeft op de oxydatie van Ferro-cytochroom. Dus juist het niet toenemen van de zuurstofopname is een bewijs voor de aanwezigheid van cytochroom.

Sreerangachar (166) heeft ook nagegaan, wat het actieve deel van de theeoxydase is en vond, dat dit net als bij de ascorbinase een Cu-proteine is; zo zelfs, dat er een positief verband bestaat tussen de activiteit van de polyphenolase en het Cu-gehalte.

In tegenstelling tot Kubowitz (85), die rapporteerde, dat door toevoeging van anorganisch Cu de activiteit van het enzym kan worden vergroot, kon Sreerangachar dit bij de thee niet vinden. Hij verkaarde dit door aan te nemen, dat de specifieke werking alleen kan plaats vinden, indien het Cu aan de prosthetische groep vastzit. Bij de oxydatie van ascorbinezuur is het gebleken, dat deze ook door geioniseerd koper kan worden gekatalyseerd. Hier hoeft het koper dus niet beslist aan de prosthetische groep vast te zitten. Het zou eigenaardig zijn, indien dit bij polyphenolase anders zou zijn dan bij ascorbinase. De bewering van Kubowitz heeft ons inziens dan ook nog niet haar waarde verloren.

Als een ander voorbeeld van verhoging van de oxydatiesnelheid van ascorbinezuur willen we tenslotte nog memoreren de onderzoekingen van Jorissen & Dekking (80) — 1943 — over de geinduceerde oxydatie, waarbij onderzocht wordt of toevoeging van glucose de oxydatie van ascorbinezuur kan verhogen. Dit bleek inderdaad het geval te zijn. Zij vergeleken de oxydatie van glucose met Cu, ascorbinezuur met Cu en ascorbinezuur met glucose en Cu en vonden, dat wanneer glucose aanwezig is, de totale zuurstofopname wel twee maal groter is dan bij de oxydatie van ascorbinezuur met alleen Cu. Dit bewijst niet veel, immers de grotere opname van de zuurstof kan worden veroorzaakt, doordat de glucose ook zuurstof opneemt.

Bij vergelijking met andere stoffen bleek het, dat niet alle stoffen als acceptor dienst kunnen doen en dat het verschil opmerkelijk groot is.

HOOFDSTUK II

DE OXYDATIE-REDUCTIE POTENTIAAL.

A — De ademhaling of het katabolisme.

Daar er een duidelijk samenhang bestaat tussen de fermentatie van de thee en de ademhaling in algemene zin, kan het voor een betere bestudering der problemen bij de theefabricage van groot nut zijn, indien we de ademhaling nader belichten.

Kluyver gaf in het Leerboek der algemene Plantkunde (deel 2) van Koningsberger c.s. een duidelijke uiteenzetting hierover. We kunnen hier volstaan met het noemen van de twee belangrijkste onderzoekers, die de grondslag hebben gelegd voor de tegenwoordige theorie omtrent de ademhaling. Het zijn Otto Warburg en Heinrich Wieland, wier theoriën in de aanvang geheel met elkaar in tegenspraak schenen. Dank zij vertogen van verschillende kanten, is het gebleken, dat er niets op tegen is, deze theorieën samen te bundelen tot de zg. „Einheitliche Deutung". Deze houdt in, dat de biologische oxydatie is terug te voeren tot een met behulp der dehydrogenasen verlopende dehydrogenatie van het ademhalingssubstraat, waarbij de zuurstof alleen als waterstofacceptor fungeert, door tussenkomst van Warburg's fermenthaemine.

Bij de ademhaling hebben we dus te maken met systemen, die trapsgewijze de oxydatie tot stand brengen, terwijl alleen het eerste systeem direct met de vrije zuurstof reageert.

Het is daarbij van groot belang te weten, welke factoren de ademhaling kunnen beinvloeden. Hierover zijn behalve met vele celsoorten ook met hogere planten proeven genomen en de resultaten zijn over het algemeen niet geheel dezelfde.

Weevers (183) heeft als uitwendige factoren o.a. genoemd: temperatuur, zuurstofconcentratie en licht.

Daar vrije zuurstof nodig is voor de ademhaling, is het van belang te weten of de concentratie van dit gas van invloed is op de ademhalingsprocessen. De gangbare voorstelling was tot voor kort, dat de zuurstofspanning binnen vrij ruime grenzen kon veranderd worden, zonder dat de intensiteit van het dissimilatieproces hierdoor gewijzigd wordt.

Blackmann en c.s. wijzen er evenwel op, dat deze mening gewijzigd zal moeten worden en in elk geval niet algemeen geldig is, daar uit hun proeven bleek, dat de CO_2 productie van plantendelen verandert met iedere verandering van de zuurstofconcentratie in de omgeving.

Wat de invloed van de temperatuur betreft, kan men zeggen, dat de verhoging van de ademhalingsintensiteit (Q_{10}) van hogere planten tot een temperatuur van 25—30° C ongeveer 2 bedraagt. Dit werd nl. in het Utrechtse laboratorium door Kuijper en daarna door Fernandes gevonden. Bij stijging van de temperatuur vindt een verlaging van de ademhalingsintensiteit plaats, zodat de kromme, die de invloed van de temperatuur op de ademhaling weergeeft een zg. optimum-kromme is.

Wat de invloed van het licht betreft, kan men zeggen, dat bij hogere planten ook in het licht ademhaling plaats vindt. Een bewijs voor het plaats vinden van de ademhaling in het licht is het bestaan van het zg. compensatiepunt, d.i. het punt, waarbij de CO_2-assimilatie en de ademhaling elkaar volkomen in evenwicht houden, dus geen gaswiseling van zuurstof en koolzuur plaats vindt.

Gessner heeft bij hogere planten een stijging der ademhaling na voorafgaande belichting waargenomen. Het bleek echter, dat de objecten eerst een donkere periode van enkele dagen moeten hebben doorgemaakt en dat de daarop volgende belichtingstijd minstens een uur moet zijn. Een verklaring hiervoor is o.a., dat door de belichting voldoende koolhydraten worden gevormd, waardoor de ademhaling intensiever wordt. Deze verklaring is echter onvoldoende, want door ultra-violette stralen wordt de ademhalingsintensiteit groter, wat vermoedelijk een pathologische O_2-opname is. Röntgenstralen hebben echter geen invloed op de ademhaling.

Andere factoren, die de ademhaling kunnen beinvloeden zijn o.a. ademhalingsstimulatoren, die aan de plant kunnen worden toegevoegd.

Hiervan kennen we:

1 Specifieke ademhalingsvergiften, die in zeer lage concentraties de ademhaling kunnen stimuleren bijv. hogere alcoholen, HCN, H_2S enz.

2 Kleine hoeveelheden reversibel reduceerbare basische kleurstoffen, bijv. methyleenblauw (rH_2 groter dan 8).

Genevois kon in 1928 met zure kleurstoffen geen verhoogde ademhalingsintensiteit waarnemen, omdat sommige zure kleurstoffen niet in het inwendige der cellen doordringen. Wat de stimulerende invloed van de basische kleurstoffen betreft, beweerde Genevois, dat de mate, waarin deze optreedt ongetwijfeld samenhangt met de waarde van de redoxpotentiaal en wel met dien verstande, dat kleurstoffen met een rH_2 kleiner dan 8 slechts een geringe en diegene met een rH_2 groter dan 8 een grotere verhoging der ademhalingsintensiteit bewerken. Bij de onderzoekingen van Geiger-Huber in 1931 bleek, dat de voorgeschiedenis der cellen van grote betekenis is en wel, dat oudere cellen sterker op neutraalrood reageren dan jonge cellen.

Greach vond in 1937, dat niet alleen de voorgeschiedenis, maar ook de cultuurvoorwaarden van belang zijn bij verscheidene giststammen. Hij beweerde verder dat dergelijke stimulerende systemen ook in de gistcel zelf voorkomen. Dit laatste is van groot belang, want indien dit juist is, dan moet bij toevoeging van perssap van snelademende gist aan het milieu van langzaam ademende gist, de ademhalingsintensiteit van de laatste verhoogd worden. Dit vond hij dan ook. Jammer genoeg heeft Greach niet verder nagegaan of het verschil tussen snel en langzaam ademende gistsoorten te danken is, aan de aanwezigheid van deze stimulatoren alleen of aan de mate van aanwezigheid dezer stoffen m.a.w. dat deze stoffen in mindere mate in langzaamademende gistsoorten voorkomen.

Roberts vond bijv. dat Betjan-thee sneller fermenteert dan Kharimata-thee. Hij verklaarde dit, door aan te nemen dat in Betjan meer ascorbinezuuroxydase voorkomt dan in Kharimata, zodat in Betjan dus per tijdseenheid meer ascorbinezuur wordt geoxydeerd en daardoor meer waterstofperoxyde wordt gevormd. Dit hoeft niet waar te zijn, daar H_2O_2 ook gevormd kan worden door de oxydatie der polyphenolen. In Betjan thee kan dus ook meer polyphenolase voorkomen.

Hieruit zou dan volgen, dat per tijdseenheid meer phlobaphenen worden gevormd en de fermentatie ook veel sneller verloopt. Het zou heel aardig zijn, indien Roberts het perssap van Betjan aan fermenterende Kharimata zou hebben toegevoegd om na te gaan of de fermentatie merkbaar wordt versneld. In dat geval kunnen ascorbinase en polyphenolase ook tot de zg. ademhalingsstimulatoren worden gerekend.

Om de invloed van uitwendige factoren op de ademhaling goed na te kunnen gaan, behoren we allereerst een maatstaf voor de ademhalingsintensiteit te vinden en dit is niet zo eenvoudig. De aerobe ademhaling is een dissimilatieproces, waarbij stoffen, waarin chemische energie is opgehoopt, worden afgebroken onder vorming van CO_2 en water. Het is dus logisch om de hoeveelheid gevormde CO_2 per tijdseenheid als maatstaf voor de ademhalingsintensiteit te nemen. Er doen zich hierbij echter enige bezwaren voor o.a. het optreden van anaerobe ademhaling, waarbij ook CO_2 wordt gevormd en daarnaast het optreden, hoewel tijdelijk, van organische zuren. Desondanks is de bepaling van de koolzuurproductie in sommige gevallen een betere methode dan de bepaling van de zuurstofopname, omdat de zuurstof ook gebruikt wordt voor de omzetting van vetten in koolhydraten.

Een andere moeilijkheid doet zich voor bij de vraag, waarop de hoeveelheid CO_2 betrokken moet worden. Vergelijkt men b.v. de ademhalingsintensiteit bij zaden, dan kan de hoeveelheid CO_2 per gram zaad als maatstaf worden gebruikt, maar het is minder gemakkelijk om de intensiteit der ademhaling van ongelijksoortige delen van de plant met elkaar te vergelijken. Dan moet de

berekening per gram drooggewicht of per gram vers gewicht en van hetzelfde plantendeel geschieden.

De onderzoekingen van Roberts zijn geschied met behulp van de bepaling van de zuurstofopname en later ook van de koolzuurafgifte. Beide methoden bleken volgens hem bevredigend te zijn, daar de resultaten dezelfde waren. Een nadeel, dat aan beide onderzoekingen kleeft, is gelegen in de grote hoeveelheid bladen, die hij steeds voor elk onderzoek nodig heeft. Immers bladen van verschillend gewicht en ouderdom hebben zeer waarschijnlijk een geheel verschillende ademhalingsintensiteit, zodat een gemiddelde geheel afhankelijk is van de hoeveelheid jong en oud blad, die in een dergelijk mengsel voorkomt. Het is niet aan te bevelen om dergelijke gemiddelden met elkaar te vergelijken. Om het verschil in ouderdom, grond en type te vermijden zouden we bijv. met bladplaatjes kunnen werken, die met een glazen buis als pons uit een blad kunnen worden gedrukt.

Voor dergelijke kleine bladplaatjes van 20 mg elk hebben we natuurlijk een zeer gevoelige methode nodig, die heel kleine reacties kan weergeven. De vraag is of de door Roberts gebruikte manometrische methode hiervoor geschikt is. We hebben hiermee echter geen ervaringen gehad, zodat we hierover geen oordeel kunnen vellen. Een bezwaar van de manometrische methode is oa. dat de zuurstof voor de oxydatie van verschillende systemen kan worden opgenomen. De colorimetrische methode van Deijs met behulp van een Hellige tintometer is wel gevoelig, doch geeft alleen de kleurveranderingen aan. We hebben daarom gemeend om de electrometrische methode, die de redoxpotentiaal meet, toe te passen, omdat de uitvoering zeer eenvoudig is, hoewel ook hieruit in eerste instantie geen conclusies kunnen worden getrokken over de afzonderijke reacties.

B — De oxydatie-reductie potentiaal en de afleiding der formules.

Zoals we in het voorgaande reeds hebben besproken zijn de voornaamste reacties bij de ademhaling gekoppelde dehydrogenaties en hydrogenaties, waarbij waterstof katalytisch wordt overgedragen, bijv.

$$AH + B \rightleftarrows A + BH$$

Deze reactie is omkeerbaar. Bekijken we bijv. $A + H \rightleftarrows AH$ electromotorisch dan krijgen we:

$$ox + n\Theta = red$$

Hierbij is n het aantal electronen, dat bij de oxydatie en reductie wordt overgedragen. Bij dergelijke reversibele reacties is het mogelijk om de beide reacties $AH \rightleftarrows A + H$ en $B + H \rightleftarrows BH$ van elkaar gescheiden te doen verlopen en wel door in elk sy-

steem een metaalelectrode te plaatsen, die dan metallisch via een potentiometer wordt verbonden, terwijl tevens de vloeistoffen, die de electrode omringen door een ionengeleidende vloeistofbrug in verbinding worden gebracht. De potentiaal van de ene halfcel (Calomel) wordt constant gehouden, zodat elke verandering van de potentiaal van de andere electrode-halfcel een verandering van de potentiaal van het gehele systeem aangeeft. De meting geschiedt met behulp van een potentiometer.

Wanneer de metaalelectrode onaantastbaar is, zoals platina, goud, palladium e.d., dan zal het potentiaal-verschil onafhankelijk zijn van de aard der electrode. De vorm en voorbehandeling van de electrode is van invloed op de mate van de nauwkeurigheid, daar bijv. een draadelectrode door het kleine oppervlak slechts een kleine uitslag van de Voltmeter veroorzaakt met het gevolg, dat de nauwkeurigheid van het aflezen minder wordt.

Afleiding der formules.

Volgens Clark c.s. (26) kan de reductie van ferri- tot ferro-ion als volgt worden voorgesteld:

$$2\ \text{Ferri} + H_2 \rightleftarrows 2\ \text{Ferro} + 2\ H \qquad (a)$$

$$2\ \text{Ferri} + O \rightleftarrows 2\ \text{Ferro} + O \qquad (b)$$

$$\text{Ferri} + e \rightleftarrows \text{Ferro} \qquad (c)$$

Een reductie kan dus zich voordoen als een opname van waterstof, als een afgifte van zuurstof of als een opname van electronen. Bij een oxydatie krijgen we het omgekeerde geval. Bij een reductie — of een oxydatieproces hebben we òf met één van de drie te maken òf met een combinatie er van. Formules (a) en (b) suggereren de meetmogelijkheid van waterstof resp. zuurstofdruk, wat echter praktisch onuitvoerbaar bleek te zijn. Formule (c) suggereert de mogelijkheid om electrisch te meten en dit is praktisch wel mogelijk.

Dus electrochemisch kan een oxydatie beschouwd worden als een verlies van één of meer electronen bijv.:

$$Fe^{**} \rightarrow Fe^{***} + e$$

$$Sn^{**} \rightarrow Sn^{****} + 2\ e$$

Een reductie kan dan omgekeerd worden beschouwd als een opname van electronen.

Toepassing van de massawerkingswet op de evenwichtsreactie:

$$Fe^{***} + e \rightleftarrows Fe^{**} \qquad \text{geeft:}$$

$$(e) = \frac{K\ (Fe^{**})}{(Fe^{***})} \qquad \text{(e) is de electronenconcentratie.} \qquad (1)$$

Brengt men in een oplossing, die ferri- en ferro-ionen (dus ook electronen) bevat, een niet aantastbare metaalelectrode bijv. Pt, dan gedraagt deze zich als een electronen electrode met een constante „electronen concentratie" = C_0. De potentiaal van deze electrode is op dezelfde wijze afhankelijk van de electronen-concentratie van een oplossing. Dan geldt voor de potentiaal der platina-electrode:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{C_0}{(e)} \qquad \text{waarbij} \qquad (2)$$

E = de potentiaalsprong tussen electrode en oplossing uitgedrukt in Volts.
R = de gasconstante, uitgedrukt in Joules per graad.
T = absolute temperatuur.
F = 1 Faraday = 96500 Coulombs d.i. de lading van een gramion.

$$E = \frac{RT}{F} \ln C_0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{(e)}{1}$$

Daar $(e) = K \frac{(Fe^{**})}{(Fe^{***})} = K \frac{(red)}{(ox)}$, kunnen we voor E schrijven:

$$E = \frac{RT}{F} \ln C_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(ox)}{(red)} + \frac{RT}{F} \ln \frac{1}{K} \qquad (3)$$

n = verschil van aantal electronen tussen geoxydeerde en gereduceerde vorm. C_0 is constant, zodat $\frac{RT}{F} \ln C_0$ is C.

$$C + \frac{RT}{F} \ln \frac{1}{K} = E_0$$

Als algemene formule krijgen we dus:

$$E_h = E_o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(ox)}{(red)} \qquad (4)$$

Na invoering van de Briggsche logarithmen in de algemene formule krijgen we bij 30° C:

$$E_h = E_o + \frac{0{,}06}{n} \log \frac{(ox)}{(red)} \quad \text{in volts uitgedrukt.} \qquad (5)$$

E_h is het potentiaalverschil tussen een metaalelectrode en de oplossing waarin zich het redoxsysteem bevindt, gemeten t.o.v. de normale waterstofelectrode.
E_0 is een constante, welke voor elk systeem een bepaalde waarde heeft, zo ook n, d.i. het aantal electronen, dat bij de reactie wordt overgedragen.

Terwijl deze twee waarden dus voor elk systeem bepalend zijn, varieert log $\frac{(ox)}{(red)}$ voor alle systemen op dezelfde manier, waardoor niet de absolute grootte der concentraties, maar de verhouding der concentraties van beide componenten bepalend zijn.

Indien deze verhouding één is, dan is het systeem voor 50 % geoxydeerd en voor 50 % gereduceerd en in dat geval is $E_h = E_0$, waarmee de waarde en de betekenis van de constante E_0 terstond is vastgesteld.

Aangezien het verloop van E_h t.o.v. E_0 verder alleen bepaald wordt door factor $\frac{0,06}{n}$, zal dit verloop voor alle systemen met gelijke waarde van n geheel overeenkomstig zijn. Dit betekent dus, dat voor ieder reversibel oxydatie-reductie systeem de waarde van zijn E_0 karakteriserend is. Geleidelijk is dan ook voor een groot aantal organische kleurstoffen de E_0-waarde vastgesteld, waardoor het mogelijk werd deze te ordenen in een reeks, waarvan de stoffen met een hogere E_0 oxyderend of dehydrogenerend op de stoffen met lagere E_0 inwerken. Daar deze kleurstoffen op reductie doorgaans met kleurverandering reageren — zij worden meestal kleurloos — heeft men ze als zg. redox-indicatoren kunnen toepassen, d.w.z. men heeft op deze wijze de reductie-intensiteit der levende cellen bij benadering kunnen vaststellen. Niet alleen de aard der zich in de cellen afspelende stofwisselingsprocessen is hierbij bepalend, maar ook en vooral de waterstofionenconcentratie. Het is bekend, dat deze invloed van de pH op de verschillende redoxsystemen zeer verschillend kan zijn. Zo kent men naast pH-gevoelige redoxsystemen ook pH-ongevoelige redoxsystemen. Heeft men bijv. een combinatie van twee redoxsystemen, wier potentialen zich in verschillende mate wijzigen bij verandering van de waterstofionenconcentratie van hun milieu, dan kan het voorkomen, dat afhankelijk van de pH de ene of wel de andere component als reductiemiddel fungeert.

Om de invloed van de pH in de bovengenoemde reeks weg te werken, heeft men de E_0 steeds bij een pH = o bepaald. Bij andere pH spreekt men dan van E_0'.

Dat de invloed van de pH zeer belangrijk is, zien we in de volgende vergelijkingen:

Indien alle milieu-condities bepaald en onveranderlijk zijn, dan is

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(ox)}{(red)}$$

Indien echter het milieu verandert, dan heeft dit invloed op de redoxpotentiaal.

De algemene formule wordt dan:

$$E = E_0' + \frac{RT}{nF} \ln \frac{(ox)}{(red)} + \frac{RT}{nF} \ln z,$$

waarbij men onder z een functie verstaat, waarin alle invloeden van het milieu (ionisatie, H-ionen) zijn samengevoegd.

De rH_2 of de reductie-intensiteit.

De benaming rH_2 voor de reductie-intensiteit werd voor het eerst door Clark (26) toegepast. Het stelt voor de negatieve logarithme van de waterstofspanning, waarmee bij de bepaalde E_h en pH de geplatineerde platina-electrode in evenwicht zou zijn.

In navolging van Wurmser e.a. werd voortaan de term rH_2 gebruikt. Daar het begrip reductie-intensiteit gekoppeld wordt aan de kracht, waarmee waterstof wordt afgestaan, kan men als absolute maat een reversibel systeem aannemen, dat in evenwicht is met een bepaalde waterstofgasdruk. Nu wordt de zuurgraad bepaald door meting van de potentiaal van het evenwicht tussen H-ionen en waterstofgas van 1 atmosfeer. Hierdoor is men er toe overgegaan dit reductie-evenwicht als nulpunt van de reductie-intensiteit te aanvaarden.

Men kan de potentiaal van de waterstofelectrode als volgt weergeven:

$$E_h = \frac{RT}{2F} \ln \frac{(H^\cdot)^2}{P_{H_2}} \qquad (1)$$

of bij 30° C met toepassing van de Briggse logarithme

$$E_h = 0{,}06 \log (H^\cdot) - 0{,}03 \log P_{H_2} \qquad (2)$$

waarbij: $(H^\cdot)$ = de waterstofionenconcentratie
P_{H_2} = de waterstofgasdruk

Daar — log (H) identiek is met het symbool pH, kunnen we formule (2) als volgt schrijven:

$$E_h = -0{,}06 \text{ pH} - 0{,}03 \log P_{H_2} \qquad (3)$$

Is de waterstofgasdruk constant, dan neemt de potentiaal, bij toename van de pH met 1 eenheid, met 58 mVolt af (bij 18° C.).

Hieruit kunnen we ook zien, dat de E_h beinvloed wordt door de pH. Voor de minimale reductieintensiteit of maximale oxydatieintensiteit, wordt de reversibele zuurstofelectrode aangenomen. Deze is theoretisch in evenwicht met een waterstofspanning van 10^{-41} atmosferen.

Het verband tussen de grootheden E_h, pH en rH_2 kunnen we gemakkelijk in de volgende formule, welke afgeleid is van (3), zien:

$$rH_2 = 2 \text{ pH} + \frac{E_h}{0{,}03} \qquad (4)$$

Volgens deze formule, kan de rH_2 van de verschillende redoxsystemen alleen worden aangegeven, indien de pH erbij vermeld wordt. Clark c.s. (26), die in de aanvang het gebruik van de rH_2 veel gepropageerd heeft, heeft later het gebruik ervan afgeraden. Ook doordat er verschillende redoxsystemen blijken te bestaan, die in een bepaalde pH-zone een vrijwel constante rH_2 bezitten. Dezelfde formule 4 is echter onvoldoende om het door Clark genoemde feit te verklaren.

Tenslotte willen we nog vermelden, dat tussen de waterstofelectrode en de zuurstofelectrode als uiterste grenzen, de rH_2 varieert tussen 0 en 41.

De electrische meting.

De methodiek is volgens Elema (51) van belang. Zo kan een eventuele polarisatie of tegenstroom op de metaalelectrode invloed hebben. Deze wordt echter door toepassing van de compensatiemethode van Poggendorf tot een minimum teruggebracht, maar desondanks is enige polarisatie onvermijdelijk. Potter heeft het gevaar van polarisatie tot een minimum proberen te brengen door gebruik te maken van een ballistische galvano-meter.

De electrode zelf kan ook van invloed zijn op de meting. Volgens Hewitt (63) voldoet blank platina het meest (draad of plaat).

Het electrodevat kan ook van invloed zijn door zijn vorm, die in verband staat met het doel van het onderzoek en de te onderzoeken vloeistof.

Een belangrijke factor is met welk meetinstrument men werkt. Zo gebruikte Hewitt bij zijn onderzoekingen een Lindemann-electrometer (binant electrometer). Dit instrument is zo gevoelig, dat het te veel beinvloed wordt door invloeden van buiten, waardoor het min of meer ongeschikt is. Zo vonden Müller & Geiszler dat zelfs een open raam invloed heeft op de Lindemann-electrometer.

Elema gebruikte voor zijn onderzoekingen een Philips-electrometerlamp 4060 als versterker.

Bij het eigen onderzoek hadden we de beschikking over de jonometer van Lautenschläger. Dit apparaat heeft het voordeel, dat men de E.M.K. van de te meten cel kan aflezen, terwijl bovendien de behandeling zeer eenvoudig is. Deze potentiometer heeft geen lampversterking zoals bijv. de Cambridge-electrometer, doch was voor ons onderzoek voldoende gevoelig om reproduceerbare cijfers te verkrijgen.

C — De oxydatie-reductie potentiaal in biologische stelsels.

Men kende het doel van het redox-potentiaal onderzoek reeds

lang, want dit werd reeds in 1902 door Fredenhagen uiteengezet. Sindsdien is er weinig principieels aan toegevoegd. Het belangrijkste is wel het onderzoek bij de biologische stelsels. Tot nu toe was dit onderzoek steeds beperkt tot micro-organismen en over de waarde dezer resultaten zijn verschillende meningen ontstaan.

Clark e.c. meenden in de oxydatie-reductie potentiaal een middel te hebben, waarmee de energie-processen van de ademhaling exact bestudeerd kunnen worden. Volgens hen heeft men echter in dit opzicht niet veel bereikt, doordat o.a. de verkregen cijfers niet reproduceerbaar zijn als gevolg van verschillende factoren, als het ontstaan van ireversibele systemen, onvolledige ionisatie, vorming van complexzouten enz. (schijnbare redoxpotentiaal).

Hewitt had echter wèl resultaten verkregen. Hij vond nl. dat de pH-invloed niet groot is bij biologische systemen. Verder vond hij, dat de biologische activiteit vaak gecorreleerd is met het gedrag tegenover de electrode. De oxydatie-reductie potentiaal bleek ook van belang te zijn voor het onderzoek van bacteriën e.d. Volgens Kostytchew moet wat Hewitt gevonden heeft ook gelden voor de osmotische waarde van het persap bij hogere planten.

Volgens Michaelis is de oxydatie-reductie-potentiaalbepaling nog niet rijp voor biologische stelsels, die vaak te labiel zouden zijn om ze te meten. Volgens hem komt de potentiaalsprong in biologische stelsels waarschijnlijk grotendeels voort uit z.g. sulfhydryl-stelsels (2RSH = RSSR + 2H bijv. cystine-cysteine), die de electrode waarschijnlijk op weinig reproduceerbare wijze beinvloeden.

Kroon daarentegen meent, dat hoewel biologische stelsels geen scherpe E_h's bezitten, de potentiaal toch wel reproduceerbaar zou zijn. Hij erkende wel het bezwaar, dat men bij het introduceren van een electrode direct coagulatie en vacuolisatie van het plasma erom heen krijgt. Dit bezwaar heeft men echter niet bij de bepaling van de oxydatie-reductie potentiaal in fermenterende thee, daar de cellen grotendeels vernietigd worden en de celsappen met elkaar vermengd worden.

Clark stelde voor om naast een electrometrische - als contrôle ook een colorimetrische meting in te voeren, omdat volgens hem de schijnbare oxydatie-reductie potentiaal de meting kan storen. Maar de colorimetrische bepaling is er nog niet rijp voor, daar ze niet bruikbaar is voor de intensiteitsbepaling.

Een ander bezwaar tegen de colorimetrische methode is, dat in biologische stelsels de indicator chemisch mee kan reageren en ze zelfs kan vergiftigen. Biologische stelsels kan men dus wel electrometrisch, maar in vele gevallen niet colorimetrisch meten.

Een praktische toepassing van de redox-indicatoren is de bepaling van Vitamine C. Dit zuur is een sterk reductiemiddel.

Met het trichloorazijnzuurextract van de te onderzoeken stof titreerden Birch, Harris en Ray (18) — 1933 — een bekende hoeveelheid redoxindicator tot kleurloos. Als indicator gebruikten zij het door Tillmans in 1928 gepropageerde 2—6 dichlorophenolindophenol. Deze reactie verloopt chemisch kwantitatief, zodat zij uit de benodigde hoeveelheid extract het gehalte aan ascorbinezuur kunnen berekenen.

De meeste vorderingen over de toepassing van de redoxpotentiaal werden in het begin gemaakt door biochemici, die speciaal het mechanisme van de ademhaling in levende organen hebben bestudeerd. Opmerkelijk zijn bijv. de onderzoekingen van Hopkins (72) e.a. over glutathion en de thiol-componenten. Verder die van Quastel en zijn assistenten, die de werking van kleurstoffen op enzymen onderzochten.

De onderzoekingen van biologische stelsels met behulp van de oxydatie-reductie-potentiaal groeien nog steeds in aantal en daarom hebben we niet geschroomd om ondanks de geopperde bezwaren deze methode toe te passen op de theefermentatie. Ook omdat enkele bezwaren als het heel houden der cellen bij ons onderzoek niet op gaan. Verder kunnen storingen door slechte ionisatie hier vermeden worden, doordat we de bladmassa suspenderen alvorens deze te onderzoeken. Hoe de resterende bezwaren zich zullen gedragen tijdens de proeven, dienen we af te wachten.

HOOFDSTUK III

DE ELECTROMETISCHE TITRATIE VAN ASCORBINEZUUR IN THEEBLAD

A — De electrometrische titratie van Ferro (Mohr's-zout) met twee verschillende electroden.

Als materiaal voor dit deel van ons onderzoek hebben we Mohr's zout genomen. Het ferro-ammoniumsulfaat wordt door $KMnO_4$ geoxydeerd volgens:

$$5\ Fe^{**} + MnO_4^- + 8\ H^* \rightarrow 5\ Fe^{***} + Mn^{**} + 4\ H_2O$$

waarbij het paarse permanganaat wordt ontkleurd.

Door plaatsing van een platina-electrode in het vat kan deze titratie electrometrisch worden gevolgd.

We hadden verschillende draad- en plaatvormige platinaelectroden tot onze beschikking. De electrometrische titratie-curven zullen met elkaar worden vergeleken, om te zien welke electrode zich het best leent voor een electrometrisch onderzoek.

Uitvoering

In een bekerglas van 250 mL inhoud wordt 10 mL van een 0,1 N oplossing van Mohr's zout verdund met 100 mL gedestilleerd water en daarna 10 mL verdund zwavelzuur (1 : 5) toegevoegd.

In de oplossing wordt behalve een platina-electrode een glazen roerder geplaatst, welke door een motor wordt aangedreven. Boven de oplossing wordt een bûret opgehangen, waarin 0,1 N $KMnO_4$. Deze oplossing wordt dan met behulp van een agarbrug met verzadigd KCl in verbinding gebracht met een tweede vat, waarin verzadigd KCl. Door in dit tweede vat een calomelelectrode te steken, is een compleet element verkregen. Wanneer we de beide electroden in verbinding brengen met een potentiometer, dan kan de titratie electrometrisch worden gevolgd. (Als potentiometer werd een jonometer van Lautenschläger gebruikt).

Na elke halve mL $KMnO_4$, die we uit de bûret in de oplossing druppelen, wordt de oxydatie-reductie potentiaal bepaald en na een paar seconden nogmaals bepaald, om te zien of de meting niet is teruggelopen en dus constant blijft. Daar Ferro geoxydeerd wordt tot Ferri, zal de potentiaal stijgen en de stijging zal het grootst zijn, indien vrijwel alle Ferro in Ferri is veranderd. Op het punt, dat de potentiaal relatief de grootste stijging vertoont,

heeft ook de kleuromslag plaats gevonden, zodat de visuele titratie objectief kan worden gecontroleerd (aequivalentiepunt ligt op 11,4cc 0,1 N $KMnO_4$). Deze werkwijze heeft het voordeel, dat we zuiver kunnen titreren, ondanks bijv. een donkere kleur van de reagerende vloeistof, waardoor een kleuromslag moeilijk of haast niet te zien is.

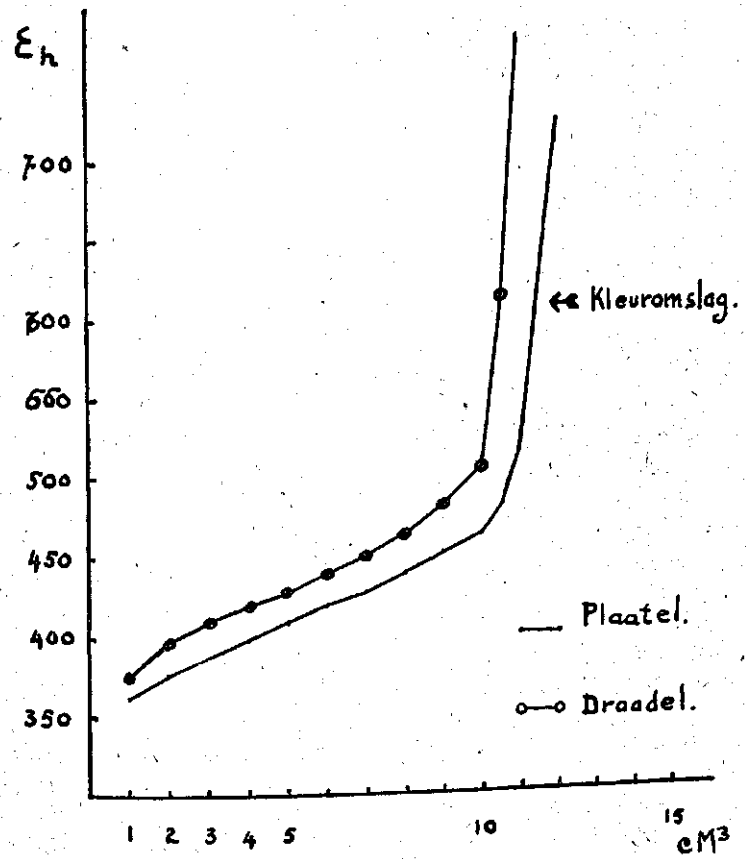


Fig. 1

Electrometrische titratie-curves van Mohr's zout.

De titratie met de plaatelectrode werd nogmaals herhaald, daar reeds bij de eerste metingen was opgevallen, dat hiermee veel gemakkelijker het stilstaan van de naald van de Voltmeter kan worden bepaald. Bij de draadelectrode was de uitwijking van de naald bij het sluiten van de stroom zó klein, dat deze nauwelijks van het stilstaan der naald kan worden onderscheiden. De curves werden met elkaar vergeleken en daarbij viel het op, dat de potentiaal,gemeten met de draadelectrode reeds steeg, terwijl er nog geen kleuromslag te bespeuren is. Hoewel de draadelectrode

dus gevoeliger is, werkt men er niet prettig mee, daar de potential niet voldoende zuiver kan worden gemeten. Het slechte uitslaan van de naald bij de meting met de draadelectrode wordt waarschijnlijk veroorzaakt, doordat het oppervlak kleiner is dan van een plaatelectrode. We hebben daarom besloten in het vervolg steeds met de plaatelectrode te werken.

De potentialen (Fig. 1) zijn gemeten t.o.v. een verzadigde calomelelectrode die zelf een constante potentiaal van 250 mV t.o.v. de waterstofelectrode bezit. Dus voor de berekening van de potentiaal t.o.v. de waterstofelectrode moet bij de gemeten waarde nog 250 mV opgeteld worden.

B — De electrometrische titratie van synthetisch ascorbinezuur.

De gewone visuele titratie van ascorbinezuur geschiedt volgens de methode van Tillmans c.s. — 1928 —. Deze titratie berust op het reducerende vermogen van ascorbinezuur. Wordt een redox-indicator toegevoegd, die een hogere normaal redox-potentiaal bezit, dan wordt het ascorbinezuur geoxydeerd tot dehydroascorbinezuur. Daarbij wordt H afgesplitst, hetwelk de indicator (2—6 dichlorophenol-indophenol) reduceert tot zijn leucoverbinding. In de loop der jaren zijn er enige variaties op deze methode gemaakt zoals die van Birch, Harris en Ray (18)— 1933. Zij pasten n.l. de omgekeerde titratie toe, waarbij met een trichloorazijnzuur-extract van het blad een bekende hoeveelheid indicator tot kleurloos wordt gereduceerd. Deze reactie verloopt chemisch kwantitatief, zodat zij uit het benodigde extract het ascorbinezuur-gehalte kunnen bepalen. Deze omgekeerde titratie heeft echter bij verschillende onderzoekers enige critiek opgewekt. Zo waren Lund, Spur en Fredericia (102) in 1934 er sterk tegen gekant, omdat zij menen, dat het beter is te titreren totdat er een kleur ontstaat, dan totdat de kleur verdwijnt. Voor een visuele titratie kunnen we ons dat inderdaad indenken. We willen dan ook nagaan of deze omgekeerde titratie moeilijkheden oplevert, indien de titratie electrometrisch wordt gevolgd.

De indicator.

Birch c.s. gebruikten Tillmans indicator (2—6 dichlorophenol-indophenol) en wel een 0,01 M oplossing of 200 mg kleurstof in 100 mL gedestilleerd water. De indicator is in alkalisch milieu blauw en in zuur milieu rood. De kleuromslag is kleurloos tot bleekgeel soms tot bruin, indien de indicator een paar weken oud is, zodat het aan te raden is om de indicator vrij spoedig te verversen. Mathot (115) ververste bijv. zijn indicator om de drie dagen.

Tillmans en ook Lund e.c. namen in plaats van 0,01 M, een nog verdunder oplossing n.l. 0,001 M d.i. 100 mg kleurstof opgelost en aangevuld met gekookt water tot 500 mL.

Een nog verdunder oplossing is niet aan te bevelen, daar de kleuromslag te zwak zou zijn. Deze moeilijkheid zou ook vermedan kunnen worden, door de titratie electrometrisch te volgen.

De bereiding van het extract:

Het is in sommige gevallen niet mogelijk, al het ascorbinezuur in oplossing te krijgen, daar het in de celstructuren achterblijft. Daarom moet de bladmassa goed fijngewreven worden om de celstructuur zo goed mogelijk te vernietigen. Beter is het om na het filtreren nog eens te wrijven en te filtreren, waardoor minder ascorbinezuur in de cellen achterblijft. Een andere en nog betere methode is het extraheren der bladmassa.

De sterkte van het beschermende zuur:

Birch e.c. raadden aan om de bladmassa met een overmaat trichloorazijnzuur en wel 20 % fijn te wrijven en daarna te verdunnen tot 5 %. Hierdoor wordt het ascorbinezuur beschermd tegen oxydatie door enzymen, doordat bij die lage pH de enzymen intactief zijn. Een nadeel van een dergelijk sterk zuurextract is, dat het destructief werkt op de indicator, die langzaam wordt ontkleurd. Deze fout is bij titratie van een trichloorazijnzuur extract, dat rijk is aan ascorbinezuur, niet noemenswaard, maar wordt vrij aanzienlijk, wanneer het extract arm is aan ascorbinezuur. Volgens Mc Henry en Graham — 1935 — wordt de tijd, die nodig is om de indicator te ontkleuren, groter, naarmate deze 15—20 maal met gedistilleerd water wordt verdund.

Om de destructieve kracht van het trichloorazijnzuur te verminderen, namen Mc Henry en Graham een minder sterke oplossing n.l. 3 %. Deze oplossing is volgens hen voldoende beschermend en heeft de destructieve werking niet. Mathot daarentegen werkte liever met een 8 % oplossing.

Een ander nadeel van een sterk zuur milieu is, dat het op de agar-brug inwerkt, waardoor een diffusie-potentiaal kan optreden. We moeten dus eenzelfde agarbrug niet te vaak achter elkaar gebruiken.

Een ander zuur, dat voor het eerst door van Eekelen werd toegepast, is het metaphosphorzuur, dat òf in een 3 % oplossing wordt gebruikt (Deijs) òf in een 2 % oplossing (Mathot). Dit zuur heeft bovendien het voordeel, dat het Cu bindt, zodat katalyse der ascorbinezuur-oxydatie door Cu achterwege zal blijven.

Al deze maatregelen om het ascorbinezuur tegen oxydatie te beschermen zijn genomen, omdat plantaardige pulp geen mechanisme bezit om het ascorbinezuur tegen oxydatie te beschermen, terwijl dierlijke organismen wèl over een dergelijk systeem beschikken, bijv. het glutathion-systeem.

Enkele storende factoren.

Daar in een alkalisch milieu ook glutathion de indicator kan reduceren, moet bij de titratie steeds voor een zuur milieu worden gezorgd met een pH kleiner dan 2,5. Birch c.s. kenden slechts een reductiemiddel-cysteine-, dat onder de zelfde omstandigheden reducerend op de indicator werkt. Het is dus aan te raden het uitgangsmateriaal eerst op cysteine te onderzoeken bijv. door de methode van Sullivan of die van Emmerie met Hg-acetaat toe te passen.

Ook Adrenaline kan invloed uitoefenen, maar het komt in zulke kleine hoeveelheden voor in de verschillende plantaardige en dierlijke producten, dat zijn invloed slechts heel klein is.

Het gloeien der electrode

Het is bekend, dat de voorgeschiedenis van de electrode invloed heeft op de potentiaal. Om tot reproduceerbare resultaten te komen moet men de electrode steeds op dezelfde manier voorbehandelen. Hierin slaagt men het best door de electrode te reinigen met gedistilleerd water, alcohol en aether, waarna de electrode tot zwak rood even wordt uitgegloeid. Na voldoende te zijn afgekoeld, kan de electrode worden gebruikt.

Een andere, meer ingewikkelde maar betere methode is, de electrode eerst een nacht in bichromaat-zwavelzuur te zetten. Daarna wordt de electrode eerst met gedestilleerd water en vervolgens met alcohol afgespoeld om de electrode volkomen vetvrij te maken. Na deze voorbehandeling wordt de electrode boven een spiritusbrander gegloeid en daarna in gedestilleerd water afgekoeld.

We hebben nagegaan hoe lang het duurt, voordat de electrode in gewoon gedestilleerd water de constante potentiaal aangeeft. Het bleek, dat pas 45 minuten na het gloeien de electrode voldoende in evenwicht is gekomen.

Het gebruik van gedestilleerd water.

In gewoon gedistilleerd water komen spoortjes Cu, Fe en andere metalen voor, die de oxydatie van ascorbinezuur kunnen activeren door hun katalytische werking. Uit de onderzoekingen van Zilva en Kellie (191) is gebleken, dat in gewoon gedestilleerd water na 20 uur geen ascorbinezuur meer aanwezig is. Reeds in 1922 vond Hess, dat gepasteuriseerde melk actiever antiscorbutisch is, wanneer het gepasteuriseerd is in glazen vaten en minder in koperen vaten. In 1933 vond Euler dat ascorbinezuur sneller O_2 opneemt in tegenwoordigheid van bepaalde metalen. Volgens Zilva en Kellie wordt het ascorbinezuur het beste bewaard in „kwarts-gedestilleerd" water. In elk geval beter dan wanneer het water in koperen vaten is gedestilleerd.

Zelfs wanneer O_2 wordt geleid door een oplossing van ascorbinezuur, dat in „glasgedestilleerd water" is opgelost, is de oxydatie nog onbeduidend. De oxydatie moet dus veroorzaakt worden door stoffen, die in normaal gedistilleerd water voorkomen en niet in glasgedestilleerd water. Bij indamping van normaal gedestilleerd water ontstaat een residu, waarin spoortjes Cu, Fe e.d worden gevonden. Hoewel gekookt gedestilleerd water beter is dan ongekookt gedestilleerd water, is een dergelijke behandeling toch niet voldoende beschermend. Voor onze proeven zullen we gebruik maken van dubbelgedestilleerd water.

De opstelling der instrumenten.

Daar een bekerglas te groot is voor ons onderzoek, kwamen wij na enige voorproeven tot een redoxvat, dat cylindervormig is met een diameter van 3 cm en 6 cm lang. Deze cylinder heeft een ronde, enigszins puntvormige bodem, waaraan in het midden een kraantje is bevestigd. Ter halverhoogte van de cylinder zijn tegenover elkaar twee openingen gemaakt, waarvan de ene het uiteinde is van een vultrechter en de andere dient om het ene uiteinde van een agarbrug met verz. KCl doorheen te steken.

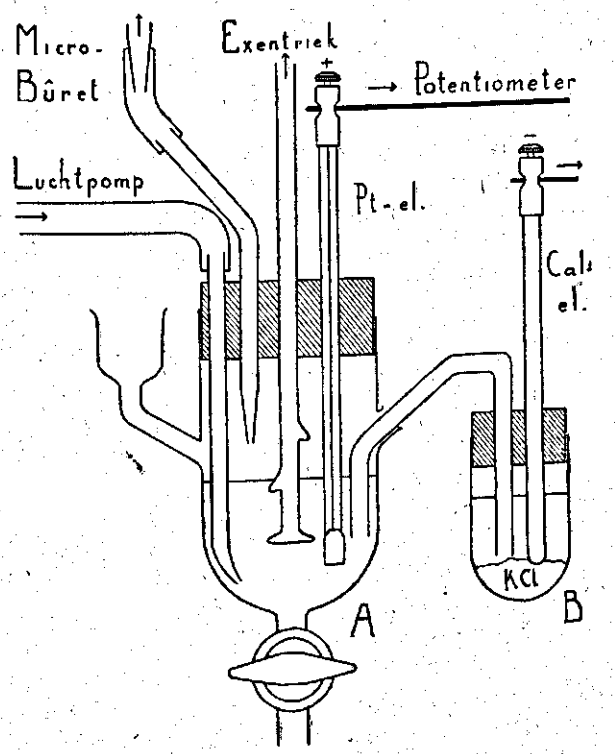


Fig. 2

Dit redoxvat (zie fig. 2) wordt met een rubberstop afgesloten, waarin in het midden een doorboring is gemaakt voor de exentriek en daarnaast nog 3 andere gaten voor de Platina-electrode, de microburet en de luchtbuis. Vat A wordt dan via de agar-brug verbonden met vat B, waarin zowel de calomelelectrode als het andere uiteinde van de hevel in verzadigd KCl wordt opgehangen.

Wanneer het ascorbinezuurgehalte van een vloeistof moet worden onderzocht, dan wordt de suspensie of oplossing via de vultrechter in het redoxvat gegoten. Nadat de stand van de microburet is opgetekend, de jonometer van Lautenschläger op nul is gesteld en de excentriek aan het werk wordt gezet, kan de electrometrische titratie een aanvang nemen.

Wanneer de eerste druppel van de indicator in de oplossing is gevallen, wordt deze door de exentriek spoedig met de oplossing vermengd. De exentriek heeft dit voordeel boven en roerder, dat de druppel van de indicator, die een neiging vertoont om langzaam te zakken direct door de op en neer gaande beweging in de oplossing wordt getrokken en de oxydatie spoedig kan plaats vinden. Na het druppelen wachten we enige seconden, drukken daarna op de stroomsluiter en lezen af.

Is de titratie afgelopen, dan maken we het kraantje van het redoxvat open en nadat de onderzochte oplossing eruit gelopen is, wordt het vat enige malen met gedestilleerd water schoongespoeld.

Wanneer de electrode niet gebruikt wordt dan is het goed om haar in gedestilleerd water op te hangen, zodat neerslaan van vuil op de electrode kan worden voorkomen. De agarbrug moet men uit het redoxvat halen en beide uiteinden in een oplossing van verzadigd KCl ophangen, waardoor de agarbrug steeds voor gebruik gereed is.

Bijwijze van proef zullen we synthetisch ascorbinezuur volgens de methode van Tillmans en ook volgens die van Birch electrometrisch titreren om na te gaan of de grootste stijging of daling van de potentiaal goed te zien is en of deze gepaard gaat met de kleuromslag.

1 cc ascorbinezuuroplossing (20 mg/100 cc) werd na aanvulling tot 10 cc met 2 % metaphosphorzuur electrometrisch getitreerd met 0,001 M 2—6 dichlorophenol-indophenol.

Na toevoeging van 2,6 cc indicator werd de kleuromslag bereikt en deze ging gepaard met een plotselinge stijging van de E_h. Dus 1 cc van de ascorbinezuuroplossing wordt door 2,6 cc indicator geheel geoxydeerd. Vervolgens voegden we een overmaat indicator toe, totdat we in totaal 7 cc hebben toegevoegd, waardoor er een overmaat aanwezig is van 4,4 cc. Wordt deze volgens

de methode van B i r c h getitreerd met de te onderzoeken ascorbinezuuroplossing, dan hebben we theoretisch nodig $\frac{4,4}{2,6}$ x 1 cc ascorbinezuuroplossing is 1,69 cc.

Na de titratie bleek echter, dat we 1,75 cc ascorbinezuuroplossing nodig hebben, waardoor we een fout hebben gemaakt van 3,4 %. Deze fout behoefden we niet te maken, indien we na 1,5 cc met kleine hoeveelheden gingen titreren.

We kunnen dus de conclusie trekken, dat noch de titratiemethode van T i l l m a n s, noch de omgekeerde titratie-methode van B i r c h bezwaren oplevert, indien deze electrometrisch wordt gevolgd.

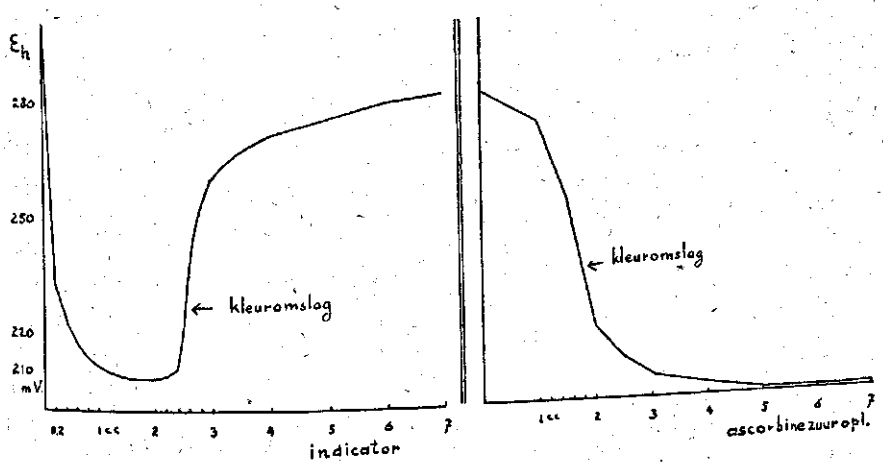


Fig. 3

Normale- en omgekeerde potentiometrische titratie van ascorbinezuur.

Bekijken we de electrometrische titratiecurve, dan valt het ons op, dat deze geen normale S-vorm heeft. Desondanks is de bepaling juist, zodat deze afwijking geen bezwaren oplevert voor de toepassing van de methodiek.

M a t h o t, die ongeveer in dezelfde tijd als wij potentiometrische titraties verrichtte van ascorbinezuur in allerlei vruchtenextracten, heeft naar aanleiding hiervan de titraties vergeleken bij verschillende pH's n.l. bij 2, 4 en 6. Daarbij bleek, dat naarmate de pH lager wordt, de potentiaal sneller afgelezen wordt en een hogere waarde heeft. Bij pH 6 is de omslag heel slecht te zien en kan men meer spreken van een omslagtraject, maar desondankss was de kleuromslag en de grootste stijging van de potentiaal bij de drie verschillende pH's gelijk. We zien dus, dat de pH geen invloed heeft op de bepaling.

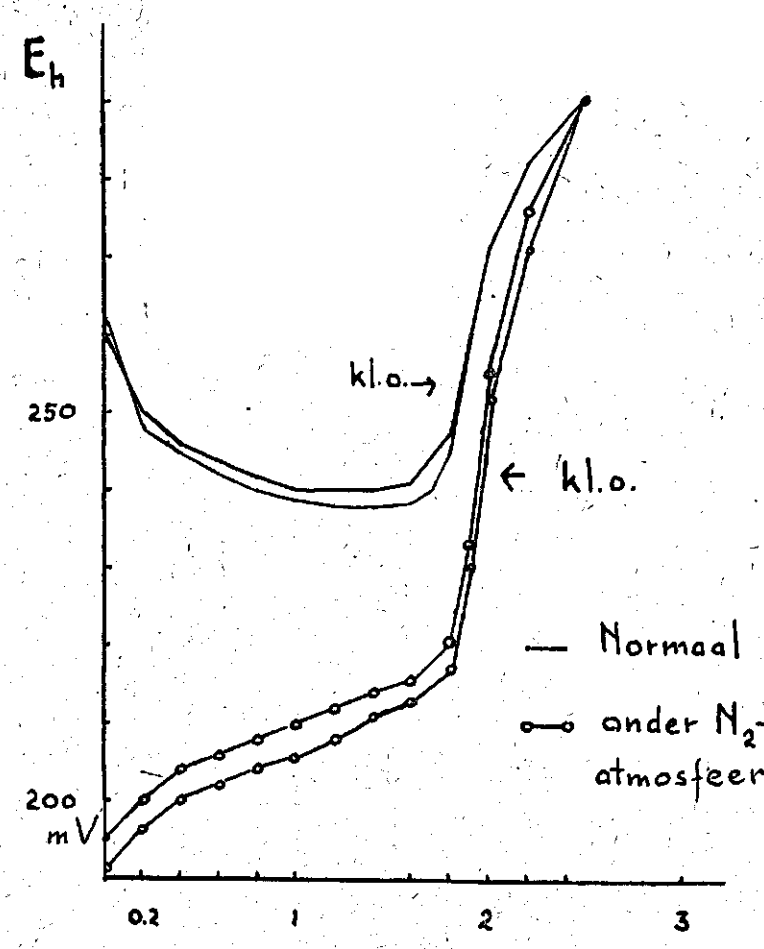


Fig. 4

Potentiometrische titratie.

Bekijken we de electrometrische titratiecurve van ascorbinezuur (fig. 4), waarvan de potentiaal steeds gemeten werd t.o.v. verzadigd KCl, zodat we steeds 250 mV er bij op moeten tellen willen we de potentiaal t.o.v. de waterstofelectrode weten, dan zien we een eigenaardig verschijnsel, n.l. dat de potentiaal tegen de verwachtingen in gaat dalen. We vermoeden, dat in het begin der meting nog geen sprake is van een evenwicht tussen de electrode en de vloeistof. Het dalende stuk van de curve bleek dan ook slecht reproduceerbaar te zijn. Wordt de zuurstof in de oplossing verwijderd door enige tijd voor de meting stikstof door de

oplossing te leiden, dan verwachten we, dat de curve meer de S-vorm gaat aannemen, n.l. een normaal aanzien zal krijgen. Hoe langer de voordoorleiding duurt, hoe zuiverder dan de curve er uit zal zien. Dit is inderdaad uitgekomen. We zien echter ook, dat de lucht een invloed heeft op de titratie zelf, want de titratie onder de stikstofatmosfeer gaf een groter ascorbinezuurgehalte dan een titratie onder een normale atmosfeer. We vonden n.l. dat 0,15 mg ascorbinezuur bij een normale titratie wordt geoxydeerd door 1,85 mL 0,001 M 2—6 dichlorophenol-indophenol, terwijl onder een stikstof atmosfeer 1,95 mL van de indicator nodig is. Het verschil is dus 5,4 %. Daar de duplo dezelfde waarde aangeeft en de microburet op 0,05 mL nauwkeurig kan worden afgelezen kunnen we dit verschil moeilijk als een toevalligheid beschouwen. Het is mogelijk, dat de autoxydabele karakter van ascorbinezuur hier een rol speelt.

Concluderend kunnen we zegggen, dat een titratie van ascorbinezuur, welke electrometrisch gvolgd wordt, onder een stikstofatmosfeer de meest zuivere waarden zal geven.

Gaan we in de literatuur na of ook andere onderzoekers deze aanvankelijke daling van de curve bij de electrometrische titratie van ascorbinezuur hebben gevonden, dan blijkt dit niet het geval te zijn.

Noch Becker & di Gleria — 1937 — noch Harris, Mapson & Wang (65) — 1942 — hebben de door ons gevonden typische daling van de E_h in de aanvang van de titratie gemeten. De eerste onderzoekers gebruikten een platina electrode, welke echter niet voorafgegloeid werd en vonden bij de titratie eerst vrijwel een horizontale lijn en slechts een geringe stijging, waardoor het eindpunt moeilijk is te bepalen. Harris c.s. dachten dat deze veroorzaakt wordt door het feit, dat een zuivere platinaelectrode een dergelijke bepaling van het eindpunt bemoeilijkt en pasten daarom in navolging van Kirk & Tressler — 1939 — een bimetalische electrode toe. In plaats van platina en Wolfram (Kirk) namen ze een electrode van platina, welke heel dun bekleed is met een laagje kwik. Volgens Harris heeft een dergelijke werkwijze de volgende voordelen n.l. de curve verloopt vrijwel horizontaal om dan na het eindpunt ineens te stijgen. Ten tweede bestaat er geen verband tussen de pH en de potentiaal en ten derde werkt de dubbele electrode tot het eindpunt als een kwikelectrode en daarna als een platinaelectrode. Het is niet duidelijk, waarom na het eindpunt een dergelijke electrode zich anders zal gedragen dan daarvoor. Een nadeel noemt Harris het langzaam bereiken van de maximum potentiaal. Dit nadeel bleek zo groot te zijn, dat hij later toch er toe overging om blank platina als electrode te gebruiken. De kleine stijgingen probeert Harris weg te werken, door steeds 2 tot 3 keer contact te maken om deze kleine stijgingen te

compenseren. Wij hebben deze meetmethode ook toegepast en inderdaad vonden we, dat vrij spoedig een vrijwel horizontale lijn werd verkregen om dan ineens te stijgen, zodat er dan sprake is van een knik. Als eindpunt nam Harris dan de plaats, waar de knik wordt geconstateerd. Een dergelijke werkwijze lijkt ons niet juist. Het is ten zeerste de vraag of we kleine stijgingen mogen compenseren en ten tweede ligt het eindpunt niet bij de knik, maar bij de relatief grootste stijging.

Een belangrijk verschil met onze werkwijze is, dat de door ons toegepaste platinaelectrode steeds vóór elke meting wordt gegloeid, om storingen te vermijden.

Desondanks is het eigenaardig, dat de daling van de E_h in de aanvang van de oxydatie niet door de andere onderzoekers werd gevonden. Harris e.c. opperde, dat het lang duurde, voordat de electrode met de oplossing in evenwicht is gekomen. Het is dus mogelijk dat Harris eerst even wacht, voordat hij met de titratie begon, maar het is ook mogelijk, dat hij de daling heeft weggewerkt door zijn wijze van meten.

C — Het ascorbinezuurgehalte van verschillende bladen van een struik.

Het ascorbinezuurgehalte werd omgerekend in mg ascorbinezuur per gram vers blad en om na te gaan in hoeverre de ouderdom invloed heeft op het ascorbinezuurgehalte werden van tien lootjes (P + 2) de bladeren apart onderzocht.

mg. Ascorbinezuur per gram vers blad bij verschillende bladgewichten.

Pecco		1e blad		2e blad	
mg bladgew.	mg asc.z.	mg bladgew.	mg asc.z.	mg bladgew.	mg asc.z.
34	1,48	79	1,40	318	1,06
156	0,97	316	0,99	611	1,19
41	1,32	108	1,40	401	1,31
45	1,51	108	1,02	408	1,28
46	1,53	121	1,24	412	1,15
50	1,39	140	1,07	501	1,24
76	1,18	145	1,32	530	1,12
80	1,12	148	1,15	566	1,01
83	1,09	170	0,89	567	1,13
91	0,99	200	1,15	578	1,07

Bepalen we de rekenkundig gemiddelde, dan is deze $\frac{(x)}{n} = X$ waarbij n is het aantal waarnemingen en x de waarneming zelf.

De gemiddelde fout bij dit gemiddelde is volgens van Uven $\varepsilon = \sqrt{\frac{(uu)}{n}}$, waarbij (uu) is de som van u^2 en $u = x - X$. Van Pecco is het gemiddelde bladgewicht 69,2 mg ± 34,4 mg en het gemiddelde gehalte aan ascorbinezuur 1,25 ± 0,24 mg vers blad.

Het feit dat de lootjes zo in ouderdom verschillen, heeft deze grote gemiddelde fout veroorzaakt, zodat we niet veel waarde kunnen hechten aan deze cijfers, althans niet wanneer we ze als vergelijkingsmateriaal willen gebruiken. Daar het gemiddelde ascorbinezuurgehalte van het eerste en tweede blad respectievelijk 1,16 ± 0,17 en 1,15 ± 0,09 bedraagt en het verschil dus klein is, terwijl de gemiddelde fouten vrij groot zijn, kunnen we aannemen, dat er geen invloed is waar te nemen van de ouderdom op het ascorbinezuurgehalte.

We kunnen slechts de conclusie trekken, dat Pecco meer ascorbinezuur bezit dan de oudere bladen. Dit resultaat is in tegenstelling met dat van Deijs (38) — 1940 —, die tussen Pecco en de twee daaropvolgende bladen geen verschil kon vinden. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het feit, dat Deijs bladen van meer dan één struik heeft geplukt. Hij vond echter wel, dat het vijfde blad een lager gehalte heeft aan ascorbinezuur.

Het feit, dat in de jongste bladen, dus waar het groeiproces het sterkst is, meer ascorbinezuur wordt gevonden, wordt ook door andere onderzoekers bij andere planten gevonden. Meestal bestaat er een parallel tussen het ascorbinezuurgehalte en het katalasegehalte. Soms vindt men ook meer peroxydase in de jongste plantendelen, hoewel dit niet vaak voorkomt. Deijs en ook Roberts vonden een geringere peroxydaseactiviteit in de jongste theebladen.

HOOFDSTUK IV

DE BEPALING VAN DE OXYDATIE-REDUCTIE POTENTIAAL IN FERMENTERENDE THEE EN DE INVLOED VAN VERSCHILLENDE FACTOREN OP DE FERMENTATIE.

A — Vooronderzoek ter verkrijging van een methode, welke geschikt is voor fermenterende thee.

De richtlijnen die wij bij het vooronderzoek moeten volgen, zijn tweeërlei, n.l. een beschouwing van de wijze van meten en van de eigenschappen van het te onderzoeken materiaal.

Voor de wijze van meten zijn de volgende punten van belang:

A — Een plaat-electrode is beter dan een draad-electrode.
B — Voor een reeks van metingen moet de electrode vooraf gegloeid worden.
C — Na gloeiing moet de electrode ongeveer 45 minuten in gedistilleerd water verblijven.

Wat de thee betreft kunnen we het volgende opmerken:

A — Gekneusde theebladen „fermenteren" ook onder water, indien we lucht door het water leiden.
B — Het te onderzoeken materiaal was beperkt tot 2 struiken: Thea Assamica — Manipuri, welke in een kas zijn gekweekt, zodat het beschikbare bladmateriaal zeer klein is.

Allereerst werd het materiaal onderzocht. Het is bekend, dat voor de theebereiding slechts de jongste bladen worden geplukt. Men kan op verschillende manieren plukken, hetgeen afhankelijk is van de markt.

Een pluktwijg bestaat tijdens het groei-stadium uit een nog opgerold blad — Pecco, — verder maximum 4—5 oudere bladen en een niet getand, doorgaans klein blaadje — de kèpèl.

Tijdens het rust-stadium bestaat een pluktwijg uit een bladknop (de boeroengknop), wat oudere bladen en een kèpèl.

Men kan volgens twee methoden plukken:

In het ene geval laat men hele bladen aan de heester achter en in het andere geval laat men een gedeelte van het blad aan de struik achter.

Onder de eerste groep kent men verschillende soorten als:

imperial pluk	—	alleen Pecco — P
wit- of goudpuntpluk	—	pecco plus volgende blaadje — P + 1
fijnpluk	—	P + 2 (verschil in jonge of oude pluk)
medium pluk	—	P + 2 (oud) of P + 3 (jong)
grofpluk	—	P + 3

enz. (nominaties van Prillwitz)

In Sumatra wordt vaak de gescheiden pluk toegepast (P + 2 en derde blad apart geplukt en bereid). Dit doet men, omdat het bekend is, dat het derde blad de kwaliteit van P + 2 vermindert, indien ze tegelijk wordt bereid. Zodoende krijgt men thee van P + 2 en thee van het derde blad, welke van mindere kwaliteit is.

In de kas te Wageningen werd de thee afhankelijk van het weer in Februari of Maart gesnoeid en daarna levert ze bladen tot omstreeks September-October. Daarna treedt er een ruststadium op, gedurende welke geen nieuwe bladen worden gevormd. We zullen echter geen bepaalde pluk toepassen, daar we toch van plan zijn de bladen apart te onderzoeken, zodat de pluk anders zal zijn dan in de praktijk. Ook zal indien nodig de fermentatie van P + 2 en het derde blad met elkaar worden vergeleken.

Als eerste proef werd de fermentatie van thee onder water bestudeerd, waar lucht wordt doorgeleid. Hiervoor werd P + 2 met een bladgewicht van 794 mg genomen, die eerst tot 55 % vochtgehalte werd verflenst en daarna in een mortier met een beetje water werd fijngewreven. Deze suspensie werd daarna in een bekerglas van 100 cc afgespoeld en tot 30 cc met gedistilleerd water aangevuld. In de vloeistof werd dus behalve de electrode en de agarbrug nog een glazen buis geplaatst, waar lucht werd doorgeleid. Na verbinding met de potentiometer werd reeds na een fermentatie van 5 min. de oxydatie-reductie potentiaal bepaald. De bepaling geschiedde om de 5 minuten. De potentiaal stijgt in het begin vrij snel, daarna wordt de stijging steeds minder, totdat na ongeveer 4 uur de redoxpotentiaal niet meer stijgt en vrijwel constant blijft. De kleur van de suspensie, welke eerst lichtgroen was, werd na allerlei nuances van geelgroen via lichtbruin na 4 uur roodbruin.

Op dezelfde wijze werd een Peccoblad met een bladgewicht van 80 mg. gefermenteerd en hier kunnen we zien (fig. 5), dat het Peccoblad veel eerder uitgefermenteerd is. Het verschil van anderhalf uur lijkt te groot en het is mogelijk dat dit vergroot is doordat de concentraties verschillend zijn nl. voor Pecco en de twee opvolgende bladen (P + 2) 794 mg blad in 30 ml water, terwijl voor het Peccoblad slechts een concentratie werd genomen van 80 mg in 30 ml water.

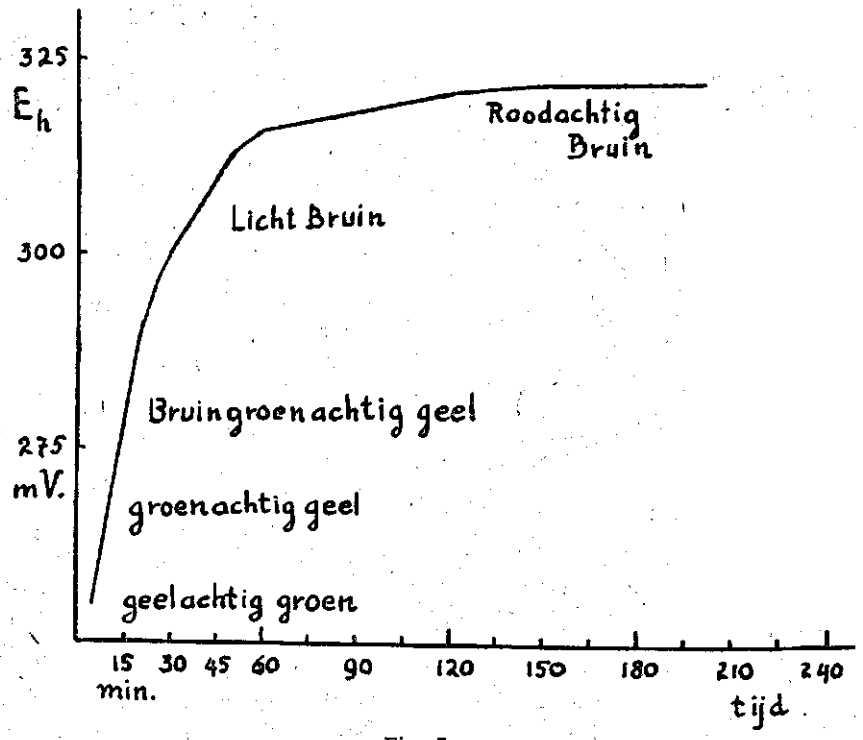


Fig. 5
Redox curve van Peccoblad bij een bladconcentratie van 80 mg/30 mL water

Fig. 5 zouden we als volgt kunnen interpreteren. De stijging van de redoxpotentiaal zouden we kunnen terugbrengen op de vermindering van de enzymen-activiteit tijdens de fermentatie, totdat deze na een bepaalde tijd vrijwel nihil is geworden. Het zou dus onnodig zijn om na dat tijdstip nog langer te fermenteren. Het is van groot nut, dat het optimale punt der redoxcurve vrijwel samenvalt met het geheel roodbruin worden der suspensie. Voor de praktijk is het van belang om op kleur te fermenteren en deze phase van de bereiding te remmen, indien de bladmassa vrijwel roodbruin is geworden. Te lang fermenteren heeft het nadeel, dat de geur veel minder is geworden.

Het fermenteren op kleur is echter niet zo gemakkelijk als het lijkt, want de geur en de kleur hebben niet hetzelfde optimum, zodat het zuiver een kwestie van oefening is. Deze proeven, hebben het nadeel, dat de fermentatie niet overeenkomt met de praktijk, immers daar wordt de bladmassa na het rollen en balbreken naar de fenmenteerkamer gebracht, waar ze in dunne lagen op houten bakken of op de tegelvloer aan een koele, vochtige atmosfeer wordt blootgesteld.

De thee wordt dus niet met water vermengd en in de praktijk vermijdt men zelfs angstvallig het druppelen van water op de massa, daar anders vlekken op het afgetrokken blad zullen ontstaan, die volgens de makelaar de kwaliteit benadelen, wat echter ten zeerste moet worden betwijfeld.

We hebben geprobeerd dit fermentatie-proces in het laboratorium na te doen en hebben daarvoor een fermenteerkast van triplex (bekleed met alluminiumpapier) geconstrueerd, waar het water met behulp van een draaiende kegelkraan in dampvorm in een mengkamer wordt gespoten. Eén zijde van deze kamer bestaat uit een metalen wand met langwerpige openingen en tegenover deze wand is een opening, waaroverheen een draadelement wordt gespannen. Met behulp van een electrische ventilator wordt dan lucht langs het element geblazen, welke zich daarna met de waterdamp vermengt en door de openingen in de fermenteerkamer terechtkomt. In deze ruimte wordt dan een redoxvat geplaatst in de vorm van een champagneglas, waarvan de bodem gevormd wordt door een houten stop, waardoor een platina electrode en een agarbrug met verzadigde KCl-oplossing wordt gestoken. Deze brug staat dan in verbinding met een ander vat, waarin verzadigd KCl en een calomelectrode.

Nadat de fijngewreven theebladen in dit redoxvat waren uitgespreid, werd het toestel in de bovenbeschreven fermenteerkast geplaatst. Het bleek toen, dat de fermentatie in de bovenste laag anders is (sneller) dan in de onderste lagen, zodat het werken met de fermenteerkast niet praktisch was. We hebben de fermentatie in dit redoxvat herhaald met dit verschil echter, dat lucht in de massa wordt geblazen. Dit geschiedde door middel van een dunne buis, welke een dicht uiteinde heeft en openingetjes, die op regelmatige afstanden zijn gemaakt. Zie fig. 6.

De fermentatie geschiedde in de buurt van de openingen sneller dan ergens anders. Het bladsap zakt naar de bodem en door de platinaplaat en het uiteinde van de KCl-brug hierin te laten hangen kan de potentiaal vrij goed worden gemeten. Hoewel de electrometrische curve regelmatiger verloopt dan zonder de luchtbuis was het verloop van de curve toch onregelmatiger dan wanneer de fermentatie geheel onder water plaats vindt.

Een ander voordeel van het werken met een bladsuspensie is, dat de fermentatie veel sneller geschiedt, waardoor we per dag veel meer onderzoekingen kunnen verrichten.

Het werken in een bekerglas stelde ons teleur, daar we van mening zijn, dat de fermentatie nog regelmatiger kan plaats vinden, indien we een ander redoxvat nemen, dat speciaal voor dit doel moet worden geconstrueerd. Het bekerglas heeft nl. een vlakke bodem, zodat de luchtstromingen niet in de randen van de bodem komen. Om dit te verkrijgen moet de bodem niet vlak zijn, maar gebogen. We hebben dan ook een redoxvat ontwor-

pen, dat een enigszins puntvormige bodem heeft, waarbij aan het uiteinde van de bodem een kraantje is bevestigd.

Om na te kunnen gaan, welke methode de beste resultaten oplevert, werden de electrometrische curven van fermenterende thee volgens de drie verschillende methoden met elkaar vergeleken, o.a.

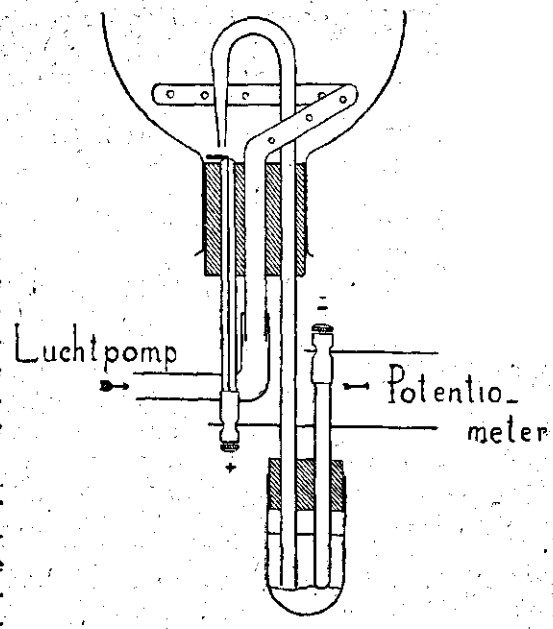


Fig. 6

a fermentatie zonder water toe te voegen, zoals in de praktijk gebruikelijk is. (champagneglasmodel pl. luchtdoorleiding)
b fermentatie met watertoevoeging in een bekerglas met een vlakke bodem en met luchtdoorleiding.
c fermentatie met watertoevoeging in een vat met een ronde bodem, waarbij lucht doorgeleid wordt.

We willen hierbij nog vermelden dat de redoxpotentiaal van de bladmassa of de bladsuspensie zo spoedig mogelijk na het fijnwrijven wordt gemeten. De tijd welke verloopt tussen het fijnwrijven en de eerste meting is ca. 1 minuut.

Doordat het bladgewicht en de concentratie (verhouding bladmassa: water) bij de verschillende methoden ook verschillend zijn, is behalve de fermentatieduur ook het verloop der curves zeer verschillend.

Het is voor ons doel niet zo belangrijk om deze verschillen op een grafiek te tonen. Het is voldoende om de conclusie te trekken, dat de laatste methode voor ons doel het meest geschikt bleek, doordat de fermentatieduur korter is dan bij de eerste methode en doordat de curve regelmatiger verloopt door de betere verdeling van lucht in de suspensie.

We hebben al meermalen opgemerkt, dat verschil in concentratie een verschil in fermentatieduur en fermentatieactiviteit teweeg kan brengen. Dit kan op verschillende manieren worden verklaard, maar we hechten de meeste waarde aan de verklaring van Roberts, die dit feit verklaarde door aan te nemen, dat

bij een lagere concentratie de enzymen beter dispergeren. Daar de verschillen vrij groot zijn, is het van belang voor de toekomstige proeven te beslissen, welke concentratie we zullen nemen. We hebben besloten om steeds de verhouding 20mg blad in 10 cc water te nemen. Voordat we tot deze beslissing kwamen, hebben we eerst een proef opgezet met verschillende concentraties, zoals 20 mg blad in 3 cc, in 5 cc en in 10 cc water en vonden, dat de fermentatie in 3 cc het langzaamst geschiedt en in 10 cc het snelst en het actiefst, wat ook in de kleurveranderingen te zien is. Hoe het verloop van de fermentatiecurve bij nog verdere verdunning zal zijn hebben we niet verder nagegaan. We hebben gemeend, dat dit vooronderzoek van de invloed ven de verdunning op de fermentatie voor ons doel voldoende was.

We hebben bij enige voorproeven waargenomen, dat verschil in verflenzing enig verschil in de activiteit van de fermentatie veroorzaakt, zodat we bij eventuele vergelijkingen moeten letten op de flensgraad.

Willen we bijv. Boeroeng 1 en Boeroeng 2 (het eerste en tweede blaadje na een boeroengknop — ruststadium —) met elkaar vergelijken, dan moeten we allereerst zorgen, dat de flensgraad dezelfde is, wat echter moeilijk te verkrijgen is. Ook de temperatuur veroorzaakt verschillen in de potentiaal, zodat het van belang is om steeds de temperatuur van de fermentatie gelijk te houden of indien dit niet gelukt de temperatuur, waaronder men werkt te vermelden. De fermentatie-temperatuur van onze proef is 19° C. Het bladgewicht van B1 is 110 mg en van B2 is 323 mg. Na het verflenzen tot een vochtgehalte van ongeveer 55 % worden de bladen in een mortier met een weinig water fijngewreven en water toegevoegd, waarbij er voor moet worden gezorgd, dat de concentraties gelijk zijn. Hiervan wordt dan 10 cc afgepipetteerd en deze gefermenteerd, waarbij lucht wordt doorgeleid. De bladeren werden na elkaar geplukt, zodat we datgene aan de struik achter lieten, wat nog onderzocht moest worden.

Voor het verflenzen maakten we gebruik van een soort droogtunnel. Een eenvoudige doos van triplex zonder de dwarsvlakken met aan één uiteinde een verwarmingselement in de vorm van gloeidraadjes. Vóór dit element plaatsten we een ventilator, waarvan we de snelheid konden regelen met behulp van een regelbare weerstand. In de tunnel werd aan beide uiteinden een thermometer gehangen om de temperatuur in de tunnel te regelen.

Meestal waren na 1—1$^1/_2$ uur drogen de bladen bij 27° C tot een gewichtsverlies van 17 % verflenst, wat vrijwel overeen komt met een daling van het vochtgehalte tot 55 %, als we het gemiddelde vochtgehalte ongeveer 72 % rekenen.

In fig. 7 zien we dan, dat B1 veel actiever fermenteert en ook veel intensiever dan B2.

Een actieve fermentatie wil zeggen, dat per tijdseenheid meer stoffen worden geoxydeerd.

Een intensieve fermentatie wil zeggen, dat begin en eindpotentiaal veel van elkaar verschillen.

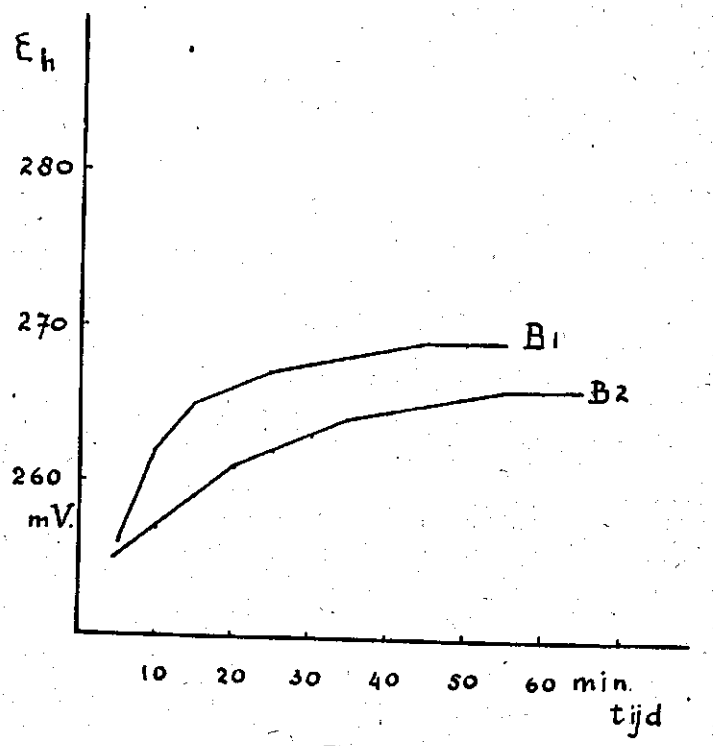


Fig. 7

Electrometrische fermentatiecurve van B_1 en B_2

Vervolgens hebben we onderzocht, welke mate van aëratie we moeten toepassen om behoorlijke vergelijkingen te maken en of de aëratie een invloed heeft op de fermentatie. Vergeleken werd een B 1, dat met een matige aëratie werd gefermenteerd (ongeveer 200 luchtbellen per min.) en een ander bladplaatje van hetzelfde blad, dat met 400 luchtbellen per minuut werd gefermenteerd. Deze heftige aëratie is waarschijnlijk te hevig, want reeds na 5 minuten begon de curve horizontaal te lopen. Het eigenaardige is, dat de redoxpotentiaal vrij constant blijft en dat er geen kleurveranderingen optreden. Het feit, dat er geen of weinig reacties hebben plaats gevonden, kan waarschijnlijk worden verklaard, doordat de hoeveelheid van 400 luchtbellen per minuut in het kleine redoxvat zulk een borreling deed ontstaan.

dat de platina-electrode niet steeds door de vloeistof wordt omgeven, waardoor de zuurstof een storende werking heeft op de electrode.

Tijdens een andere proef, die we in een andere paragraaf van dit hoofdstuk uitvoeriger zullen behandelen, bleek, dat 300 luchtbellen per minuut een actievere fermentatie veroorzaken dan 200 luchtbellen per minuut. Het is dus voor vergelijkende proeven een vereischte, dat de mate der aëratie zoveel mogelijk dezelfde is.

Daar we reeds verscheidene proeven hebben genomen, waarbij steeds met 200 luchtbellen per minuut werd geaëreerd, hebben we besloten, om voor de volgende proeven met dezelfde mate van aëratie te fermenteren.

Niettegenstaande een gelijke concentratie, aëratie, enz. werden er toch nog onregelmatigheden gevonden, die dus door andere factoren moeten worden veroorzaakt. We onderzochten de ligging van het uiteinde van de luchtbuis t.o.v. de electrode en vonden verschillen, welke kunnen worden verklaard, doordat de afstand tussen de luchtbellen en de electrode van invloed is op de te meten potentiaal.

Een vaste opstelling der instrumenten in het redoxvat is dus gewenst.

Verder vonden we, dat een wijde agarbrug voordelen heeft boven een nauwe agarbrug nl. een wijde brug kunnen we langer gebruiken, doordat er relatief minder KC1 uitloopt en doordat de Voltmeter bij een wijde agarbrug beter uitslaat, waardoor de nauwkeurigheid groter wordt.

Na een vergelijkende proef bleek een diameter van 3,8 mm beter te zijn dan een van 2,5 mm.

Samenvattend kunnen we dus zeggen, dat we getracht hebben de meting zo goed mogelijk vrij te houden van storende factoren en we zijn van oordeel, dat de gevolgde methode in eerste instantie bevredigend is.

We zullen dus voor de meting gebruik maken van een redoxvat met een enigszins toelopende ronde bodem, een platinaelectrode welke vooraf roodgegloeid moet zijn en een agarbrug met een diameter van 3,8 mm.

Verder zal gewerkt worden met een concentratie van 20 mg blad in 10 mL water, dat tweemaal gedestilleerd is. Voor de fermentatie zal steeds met 200 luchtbellen per minuut worden geaëreerd. Als potentiometer gebruikten we een jonometer van Lautenschläger. Voor de luchttoevoer hebben we gebruik gemaakt van een luchtpomp, waarbij de lucht eerst door enige wasflesjes met sterk zwavelzuur en daarna door sterk loog werd geleid ter zuivering.

B — Invloed van de verflenzing op de fermentatie

Alvorens het verloop der redoxpotentialen van verschillende theebladen met elkaar te vergelijken, dienen we na te gaan of de verflenzing invloed heeft op de fermentatie. We kunnen nl. de flensgraad van de te vergelijken bladen niet steeds dezelfde nemen. Wordt er voor een onderzoek van een theeloot (bijv. P + 2) één der bladen onderzocht, dan zullen de andere bladen, indien ze reeds geplukt zijn, verder verflenzen, waardoor een goede vergelijking der verschillende bladen onmogelijk wordt. Willen we bijv. de rest der bladen onder water bewaren, dan zal er wel geen vochtverlies optreden, maar het blad verandert toch, wat o.a. te zien is in het minder worden van het ascorbinezuurgehalte. Worden dergelijke, onder water bewaarde bladen bijv. verflenst, dan zal bij een gelijke flensgraad de toestand in de bladen toch anders zijn dan van een normaal verflenst blad, zodat het bewaren onder water voor ons doel niet geschikt is.

Om deze moeilijkheid te vermijden, moeten we de fermentatie der verschillende bladen of zoveel mogelijk tegelijk laten verlopen of de bladen moeten onverflenst worden gefermenteerd, wat gemakkelijker kan geschieden door de bladen pas vlak voor de proef te plukken.

We hebben in ons vooronderzoek gezien, dat kleine verschillen in opstelling en vorm der electrode en agarbrug afwijkingen veroorzaken, zodat we de redoxopstelling zoveel mogelijk moeten beperken tot bijv. twee redoxvaten, die geheel gelijkvormig zijn.

Dit brengt met zich mee, dat de bladen steeds twee aan twee met elkaar kunnen worden vergeleken. Indien mogelijk werken we echter bij voorkeur slechts met één redoxvat, waardoor de moeilijkheden nog meer worden gereduceerd.

We hebben allereerst vergeleken de fermentatie van vers P 1 en verflenst P 1 van hetzelfde blad. Het bladgewicht bedroeg vers 43 mg. Om fouten te voorkomen, die veroorzaakt kunnen worden door het verschil in de aard der bladen, werd geen ander blad ter vergelijking genomen, maar werden beide monsters genomen van hetzelfde blad. Hieruit werd vlak na het plukken met behulp van een glazen buisje een bladplaatje gebruikt, dat een bladgewicht heeft van 20 mg. Dit werd direct in een mortier met een weinig water fijngewreven, daarna aangelengd tot 10 cc en vervolgens op de bekende manier gefermenteerd. De rest van het blad werd daarna verflenst, totdat het bladgewicht terugliep van 23 mg tot 14 mg en vervolgens op analoge wijze gefermenteerd.

Er was een behoorlijk verschil tussen de fermentatiecurven waar te nemen (fig. 8). We zien dan, dat de fermentatiecurve van verflenst blad hoger ligt dan die van het verse blad.

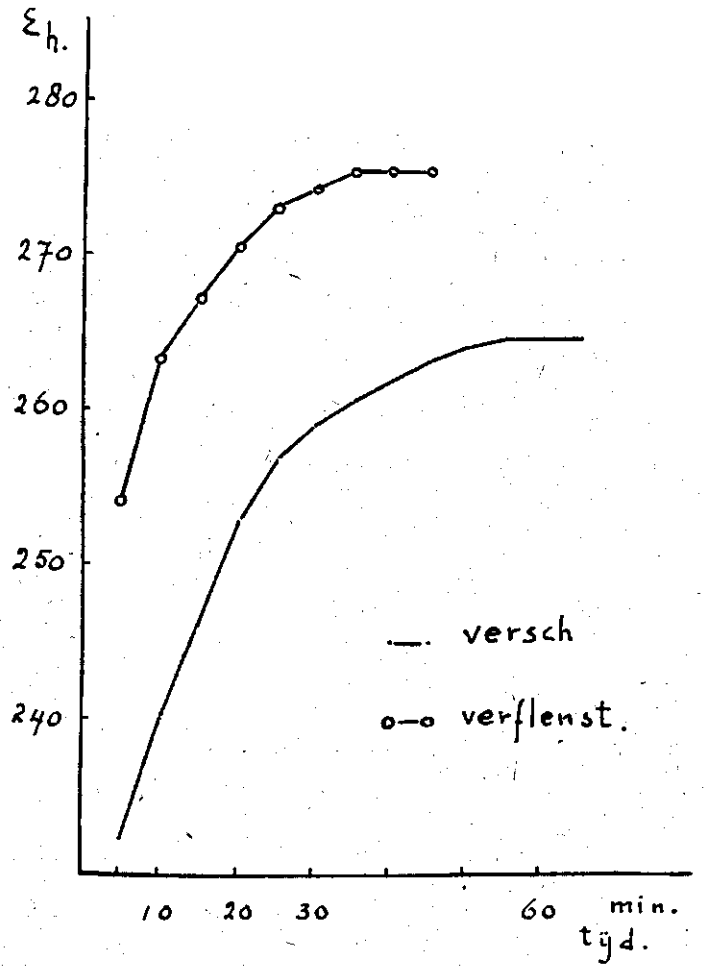


Fig. 8
Electrometrische fermentatiecurves van vers en verflenst blad.

Het potentiaal verschil tussen 5 en 10 minuten is bij het verflenste blad iets groter dan bij het verse. We kunnen hieruit de conclusie trekken, dat in de eerste 5 minuten het verloop van de potentinaal bij het verflenste blad per minuut ook groter moet zijn. Dit betekent dus, dat de fermentatie-activiteit van het verflenste blad groter is. Het verflenzen heeft vervolgens het voordeel, dat de fermentatieduur korter is. Theoretisch kunnen we zeggen, dat gedurende het verflenzen de ademhaling verder gegaan is, waardoor behalve het ascorbinezuur ook een deel der polyphenolen zal zijn geoxydeerd. Een aanwijzing hiervoor is o.a. het feit, dat de kleur van het aftreksel van verflenst blad geel tot geelgroen is, terwijl de kleur van het aftreksel van vers blad groen is.

De vraag is nu of het verschil nog duidelijk is, indien we de fermentatie van een sterk verflenst blad en van een zeer sterk verflenst blad met elkaar vergelijken. Voor deze proef hebben we een P 2 genomen met een bladgewicht van 147 mg. Dit blad werd eerst verflenst tot 83 mg (gewichtsverlies is 43,5 %) en vervolgens werd een bladplaatje van 21 mg uitgedrukt en op de gewone wijze gefermenteerd. De rest d.i. 62 mg werd verder verflenst tot 48 mg (gewichtsverlies is totaal 56,4 %) en hiervan werd weer een bladplaatje uitgedrukt en gefermenteerd. Ook hier zien we een duidelijk verschil (fig. 9). De aanvangspotentiaal van het zwaarder verflenste blad ligt ook hier beduidend hoger, hoewel we hier niet zo duidelijk kunnen waarnemen, dat de curve gedurende de eerste minuten van de fermentatie steiler gelopen heeft. Het is mogelijk, dat de activerende invloed van de verflenzing op de fermentatie bij een zwaardere verflenzing relatief minder wordt. Ook hier is de fermentatieduur van zwaarder verflenst blad duidelijk korter.

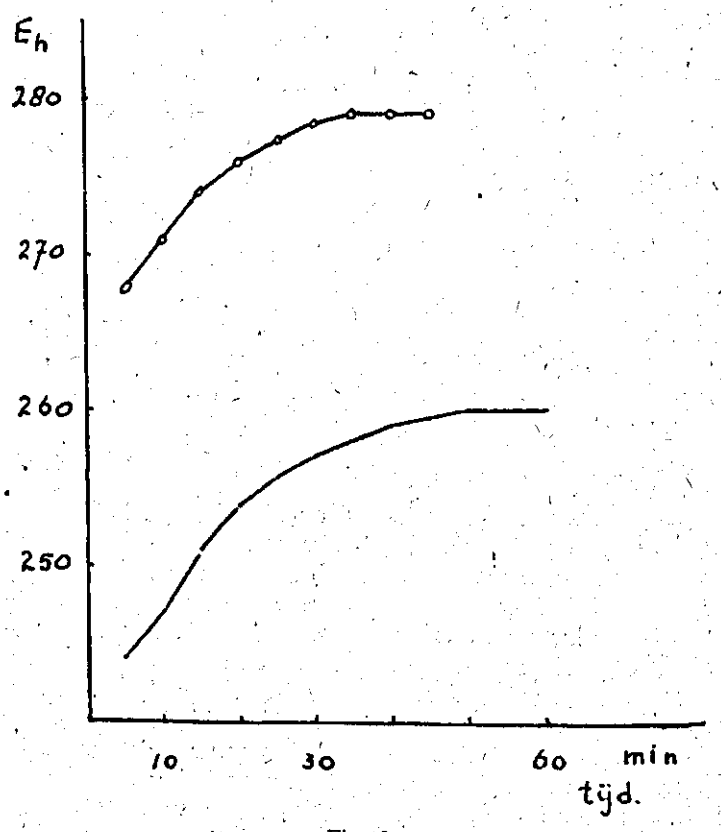


Fig. 9
Electrometische fermentatiecurves van lichter (•—•) en zwaarder (o—o) verflenst blad.

Daar te zwaar verflenste bladen in de praktijk niet geschikt zijn, doordat ze te droog zijn en daardoor moeilijk te rollen zijn, is het ten alle tijde aan te bevelen om de flensgraad niet te groot te nemen. De praktijk zal zelf moeten beslissen bij welke flensgraad de bladen het beste rolbaar zijn, daar we van mening zijn, dat goed gerolde bladen één der voornaamste factoren zijn ter verkrijging van een zo goed mogelijke kwaliteit.

Tenslotte kunnen we het vermoeden uitspreken, dat gedurende de verflenzing reeds verschillende substraten als ascorbinezuur, polyphenolen, glucose enz. voor een deel geoxydeerd zijn, waardoor de fermentatie van verflenste bladeren eerder afgelopen is. Daar de enzymen door de verflenzing volgens Deijs en ook volgens Roberts een grotere activiteit hebben verkregen is het mogelijk geworden, dat door de verflenzing behalve een grotere fermentatieactiviteit ook een grotere fermentatiesnelheid wordt verkregen.

C — De electro-metrische fermentatie-curves van de opvolgende bladen van een theeloot.

Het is bij het vooronderzoek gebleken, dat oudere bladen minder actief fermenteren dan jongere bladen. De vraag is nu, of dit steeds opgaat en of de verschillen duidelijk genoeg zijn om te kunnen concluderen dat Peccobladen, die van beter kwaliteit zijn, actiever moeten fermenteren. We namen voor de proef een P + 3 plus het „steeltje" (stengeltje), waarvan de bladgewichten respectievelijk bedroegen 33, 87, 124 en 209 mg.

Om fouten te vermijden, die in twee verschillende redoxvaten kunnen voorkomen, hebben we slechts met één redoxvat gewerkt. Er werd steeds één blad tegelijk geplukt, n.l. dat, wat nodig was voor de proef. De rest blijft aan de struik, zodat we de invloed van de verflenzing uitsluiten. Er worden desondanks toch nog fouten gemaakt, doordat de bladen aan de struik blijven doorgroeien en door de stofwisseling verschillen ontstaan. We nemen echter aan, dat deze fouten kleiner zijn, dan wanneer we de te onderzoeken bladen tegelijk plukken.

De bladen werden vervolgens apart zoveel mogelijk tot een watergehalte van ongeveer 55 % verflenst (praktijk voorschrift, waardoor de bladen het best rolbaar zijn). Hierna werden ze onder een kleine hoeveelheid dubbelgedestilleerd water fijngewreven, aangelengd tot de vereiste hoeveelheid en lucht doorgeleid, waardoor de fermentatie kan plaats vinden.

Het hoogteverschil tussen de curves (fig. 10) zouden we kunnen verklaren door aan te nemen, dat gedurende het verflenzen in jongere bladen over het algemeen meer substraten worden geoxydeerd.

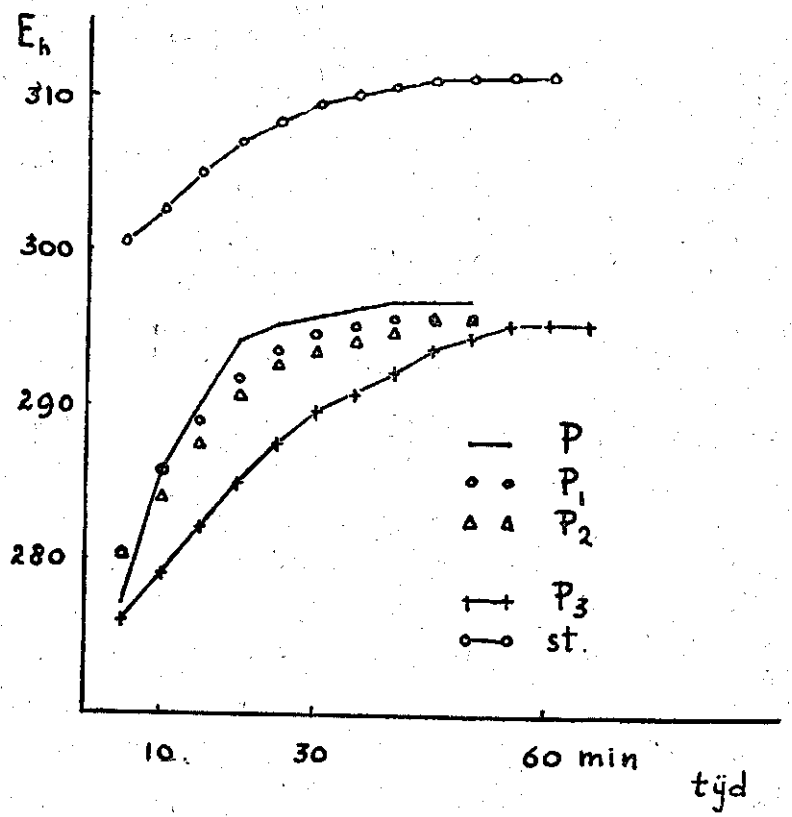


Fig. 10
De electrometische fermentatiecurves van de verschillende bladen en van het steeltje van een theeloot.

In fig. 10 zien we ook, dat het Peccoblad een grotere fermentatieactiviteit bezit dan de oudere bladen. Tussen P 1, P 2 en P 3 is het verschil in de fermentatie-activiteit niet groot, hoewel P 1 in een iets gunstiger positie verkeert. Wat de fermentatieduur betreft, is die van Pecco, P 1 en P 2 korter dan die van het derde blad (P 3). Wat de fermentatieintensiteit betreft, d.i. het verschil tussen de aanvangspotentiaal en de indpotentiaal, is die van Pecco groter dan die van P 1 en P 2. De fermentatiecurve van het steeltje wijkt echter geheel af van die der bladen, zodat we mogen aannemen, dat het steeltje een geheel andere constitutie bezit. In de praktijk verwijdert men de steeltjes na de bereiding uit de zwarte thee, daar men van mening is, dat het steeltje de kwaliteit benadeelt. Dit is uit onze onderzoekingen duidelijk geworden, want tijdens het verflenzen zijn in het steeltje óf vrijwel alle substraten geoxydeerd, of de enzymen-

activiteit is bijna nihil geworden. Hierdoor heeft het steeltje door zijn afwijkende inhoud een aparte plaats ingenomen t.o.v. de bladen, daar tijdens de fermentatie in het steeltje weinig oxydaties hebben plaats gevonden.

Het is echter niet duidelijk, waarom de practici de steeltjes pas nà de bereiding tijdens het droogsorteren verwijderen en niet reeds voor de verflenzing.

We zien vervolgens, dat het niet juist is om een „poetjoek" of theeloot van P + 3 in zijn geheel te fermenteren, daar het derde blad zo'n uitzonderlijke plaats inneemt. Fermenteert men op kleur, dan zal men pas ophouden met fermenteren, wanneer de twee eerste bladen reeds lang uitgefermenteerd zijn, zodat de kwaliteit er door benadeeld wordt. Laat men de fermentatie eerder ophouden, dan is het derde blad nog niet uitgefermenteerd, waardoor de kleur van het eindproduct te groen is en de kwaliteit minder wordt. Hoewel de laatste methode te verkiezen is, is het toch aan te bevelen om het derde blad apart te fermenteren.

Eén der belangrijkste conclusies, die wij uit deze proef kunnen trekken is, dat er een positief verband bestaat tussen de electrometrisch controleerbare fermentatieactiviteit en de ouderdom der bladen.

Bij de voorproeven is duidelijk gebleken, dat de potentiaal gedurrende de eerste 5 minuten niet stijgt, maar daalt. We hebben geprobeerd dit verschijnsel te verklaren door aan te nemen, dat de aanwezige zuurstof een storende werking bezit op de electrode en dat we het redoxsysteem, dat de zuurstof opneemt pas kunnen meten, indien dit reeds zodanig is geoxydeerd en de potentiaal hoog genoeg is.

Wij willen nu het beginverloop der curves van een P + 2 met elkaar vergelijken om na te gaan of er een zekere regelmaat bestaat. Dit hebben we inderdaad gevonden (fig. 11).

We zien dan, dat de Peccocurve veel eerder begint te stijgen, m.a.w. dat Pecco zijn ascorbinezuur veel eerder kwantitatief oxydeert dan de oudere bladen. Tussen P 1 en P 2 is er geen groot verschil waar te nemen. P 1 oxydeert zijn ascorbinezuur iets sneller.

Het verschil tussen Pecco en de andere bladen is opmerkelijk groot, wat ook te zien is in de vorige grafieken 8 en 9. Pecco neemt dus een aparte plaats in. Hoewel dit nog opgerolde blad over relatief meer ascorbinezuur beschikt, is de oxydatie van dit zuur veel eerder verlopen, zodat Pecco relatief over meer ascorbinezuuroxydase of andere specifieke katalysatoren moet beschikken.

We hebben in de bovenstaande gevolgtrekking steeds de oxydatie van ascorbinezuur als criterium genomen, daar dit zuur een veel groter reducerend vermogen bezit dan bijv. de polyphenolen.

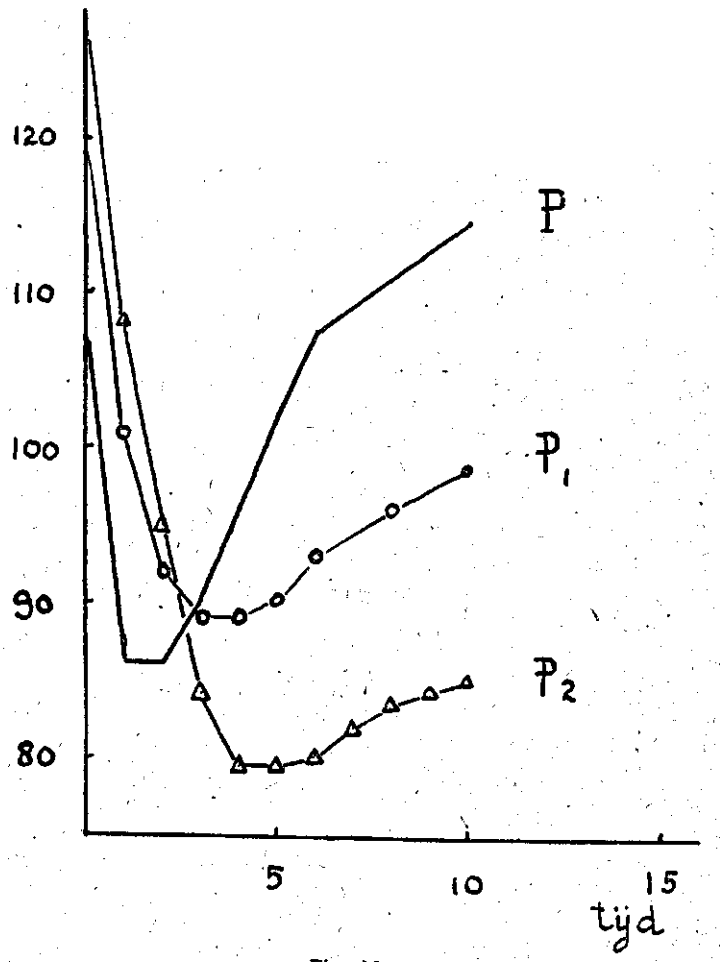


Fig. 11
De aanvang der fermentatiecurves van P + 2.

Bij eventuele aanwezigheid van het specifieke enzym ascorbinase, zal dus eerst het grootste deel van het aanwezige ascorbinezuur worden geoxydeerd alvorens andere oxydaties kunnen plaats vinden. We nemen echter aan, dat de oxydatie van ascorbinezuur zo snel plaats vindt, dat deze in hoofdzaak slechts het begin der fermentatie kan bepalen. De volgende oxydatie, n.l. die van de polyphenolen zal door haar overmaat een veel belangrijker rol spelen, wat ook reeds eerder door Roberts en Debb (135) is gesuggereerd. Is er geen ascorbinase aanwezig, dan zullen echter eerst de polyphenolen oxyderen, waarbij een deel der gevormde chinonen door het aanwezige ascorbinezuur wordt gereduceerd.

Over de al of niet aanwezigheid van ascorbinese willen we in het volgende hoofdstuk terugkomen. We hebben echter gezien, dat de oxydatie van ascorbinezuur direct of indirect met de fermentatie te maken heeft. We kunnen hieruit de conclusie trekken, dat er een positief verband moet bestaan tussen de oxydatieactiviteit van ascorbinezuur en de potentiële kwaliteit. Voor de beoordeling van de potentiële kwaliteit kunnen we dus zowel de oxydatieactiviteit van ascorbinezuur gebruiken als de fermentatieactiviteit van het blad.

D — De invloed van de temperatuur op de fermentatie.

In de praktijk is het bekend, dat een hogere temperatuur dan 28° C een nadelige invloed moet hebben op de kwaliteit van het eindproduct. Uit de enquête over de fermentatie (92) is het duidelijk gebleken, dat het niet bekend is, welke temperatuur de beste resultaten geeft. Men huldigt hierover verschillende meningen, zodat er geen sprake is van een uniformiteit. Men kan hierover geen verklaringen geven, omdat het niet geheel zeker is, dat de temperatuur werkelijk een grote invloed heeft op de kwaliteit en of er geen andere factoren zijn, die tegelijk met de temperatuur de reacties beinvloeden bijv. de hoogteligging.

Het is bekend, dat hooggelegen ondernemingen over het algemeen betere thee maken. Nu heerst er op dergelijke ondernemingen niet alleen een lagere temperatuur, een lagere relatieve vochtigheid, maar zeer waarschijnlijk is er meer ozon, doordat er meer ultra-violette stralen voorkomen. Daar de fermentatie enigszins op de ademhaling lijkt, moeten we eerst nagaan wat er in het algemeen onderzocht is over de invloed van de temperatuur op de ademhaling. Volgens onderzoekingen o.a. van Kuyper en van Fernandes (82) bedraagt de verhoging van de ademhalingsintensiteit (Q 10) tot een temperatuur van 25—30° C ongeveer 2. Bij stijging boven deze grens treedt veelal een duidelijke daling van de ademhalingsintensiteit op, zodat de invloed van de temperatuur op de ademhaling kan worden voorgesteld door een z.g. optimum kromme. De hogere temperaturen oefenen een schadelijke invloed op het proces uit, die des te sterker is, naarmate de hoge temperatuur langer duurt en meer van de optimum-temperatuur verwijderd is. We zouden hieruit kunnen concluderen, dat ook voor de thee de optimumtemperatuur tussen deze twee grenzen ligt. In de praktijk is het algemeen bekend, dat thee niet boven 28° C moet worden gefermenteerd. Hoe men deze grens in de praktijk heeft gevonden, werd in de literatuur niet aangegeven. Zeer waarschijnlijk is dit door het proeven gebeurd, wat dan vrij subjectief is en daardoor moeilijk nauwekurig kan worden uitgevoerd. Daarom

is hiertegen nogal oppositie gekomen. In de praktijk wordt wel eens beweerd dat de optimum temperatuur boven 30° C ligt, maar de meesten zijn het hier toch niet mee eens.

Deze onzekerheid of beter tegenspraak heeft ons er toe genoopt, om hierover wat meer te weten, n.l. door twee verschillende fermentatietemperaturen, 22° en 30° C, met elkaar te vergelijken. Daar de formule van de E_h aangeeft, dat de potentiaal van de temperatuur afhankelijk is, dienen we er voor te zorgen, dat de fermentatietemperatuur zoveel mogelijk constant blijft: De kamertemperatuur was 22° C, zodat we voor deze proef geen bijzondere voorzorgen hoeven te nemen, maar om bij 30° C te fermenteren, moet het toestel en het benodigde water van te voren enige tijd bij 30° C worden geplaatst, totdat zowel het toestel als het water die temperatuur hebben aangenomen. De lucht, die door de suspensie wordt geleid, wordt ook eerst verwarmd, door de wasflessen reeds enige tijd te voren in een verwarmde ruimte te plaatsen. Hierdoor kan men voorkomen, dat de temperatuur in de fermenterende suspensie daalt, waardoor de potentiometrische meting zou worden gestoord.

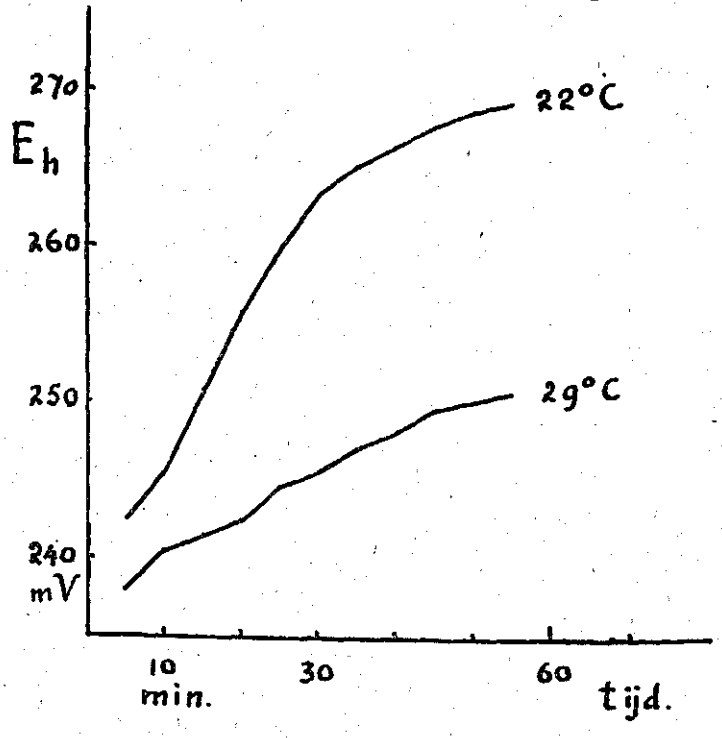


Fig. 12
Invloed van de temperatuur op de fermentatie.

Voor de proef hebben we het eerste boeroengblad genomen met een bladgewicht van 227 mg, dat eerst tot een vochtgehalte

van 55 % wordt verflenst. Vervolgens werden twee bladplaatjes uitgedrukt en terwijl het eerste bij kamertemperatuur werd gefermenteerd, werd het andere in de verwarmde ruimte bij 30° C gefermenteerd. In beide redoxvaten werd ter contrôle een thermometer opgehangen om na te gaan of de temperatuur niet verandert. De temperatuur van de suspensie in de verwarmde ruimte daalde één graad om daarna constant te blijven.

Figuur 12 toont aan, dat bij 22° C een veel actievere fermentatie plaats vindt dan bij 29° C. Hieruit kunnen we concluderen, dat het beter is om bij 22° C te fermenteren, dan bij 29° C, wat dus overeenkomt met de praktijk.

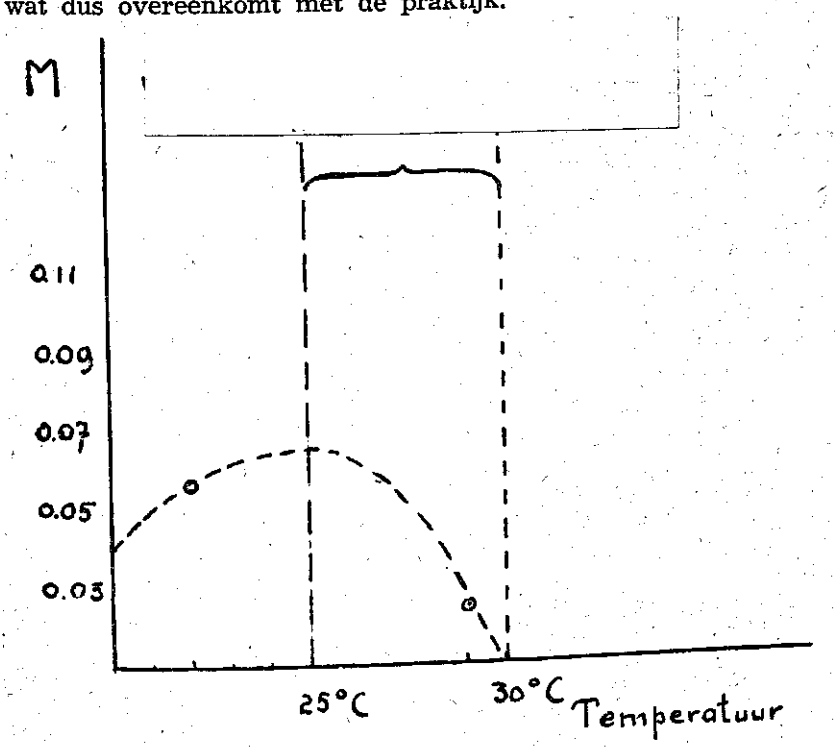


Fig. 13
Schatting van de optimum-invloed van de temperatuur op de fermentatie-activiteit.

Dit bijzondere gedrag is zonder meer kennis van de afzonderlijke reacties moeilijk te verklaren. Zeer waarschijnlijk wordt de optimum temperatuur van de fermentatie bepaald door de onoplosbare enzymen (zie Leerangochan 163).

In hoofdstuk 6 hebben we de fermentatie-activiteit wiskundig vastgelegd en van beide curves werd volgens de gebruikte formules de fermentatie activiteit berekend en we vonden bij 22° en 29° C respectievelijk M = 0,056 en M = 0,024. We plaatsen

deze twee waarden op een grafiek, waarvan de ordinaat de fermentatieactiviteit (M) aangeeft en de abscis de temperatuur. De conclusie van Kuyper en van Fernandes leggen we ook op deze grafiek vast door bij 25 en 30° C een verticale gestippelde lijn te trekken. Vervolgens trekken we een parabool door de twee M's, waarvan de top tussen 25—26° C moet liggen, dus een zuivere schatting. (Fig. 13.)

Deze komt ongeveer overeen met de optimumtemperatuur van onoplosbare enzymen, welk door Sreerangachar (163) op 27° C werd vastgesteld.

E — De invloed van de aëratie op de fermentatie.

In de praktijk zorgt men er meestal voor, dat de lucht in de fermentatieruimte ververst wordt. De ventilatie moet dan zo geschieden, dat de lucht, na vooraf bevochtigd en gekoeld te zijn, aan één zijde de ruimte intreedt en aan de andere zijde de ruimte verlaat, zodat de gehele fermenteerruimte vochtig en koel blijft en de afgewerkte gassen als CO_2 worden weggewerkt.

De snelheid, waarmee de lucht wordt ververst, is hierbij natuurlijk van groot belang. Volgens de Vraagbaak (127) moet de hoeveelheid lucht in 10—30 min. worden ververst.

Het is ook aan te raden om de ruimte na elke fermentatie goed te luchten, zodat het steeds fris ruikt. Niet alleen om de atmosfeer, maar ook om de zindelijkheid moet men de ruimte goed fris houden, daar anders gisten en schimmels nadelig op de fermentatie werken.

Te snelle verversing tijdens de fermentatie heeft echter het nadeel dat de relatieve vochtigheid van de lucht, die zoveel mogelijk op 90—94 % moet worden gehouden, gaat dalen, waardoor de fermenterende thee kan verdrogen, wat weer nadelig werkt op de uiteindelijke kwaliteit.

Daar de fermentatie bij ons steeds geheel anders plaats vindt dan in de praktijk, kan de invloed van de relatieve vochtigheid niet worden nagegaan, maar wel de invloed van de hoeveelheid luchtbellen, die tijdens der fermentatie per minuut wordt doorgeleid.

Voor dit onderzoek hebben we een P 1 met een bladgewicht van 115 mg genomen. Het blad werd eerst verflenst tot een gewicht van 83 mg en daarna werden twee bladplaatjes uitgedrukt en in 10 cc water gefermenteerd, waarbij door de ene suspensie 200 luchtbellen en door de andere 300 luchtbellen per minuut werden geleid.

Figuur 14 toont aan, dat de fermentatieactiviteit met 300 luchtbellen per minuut groter is, zodat het voordelig is om voor een behoorlijke luchtverversing te zorgen. We hebben echter bij een voorproef met 400 luchtbellen gevonden, dat de reactie niet te

meten was, doordat de luchttoevoer in het kleine redoxvat te groot was, waardoor de electrode nauwelijks door vloeistof omgeven werd.

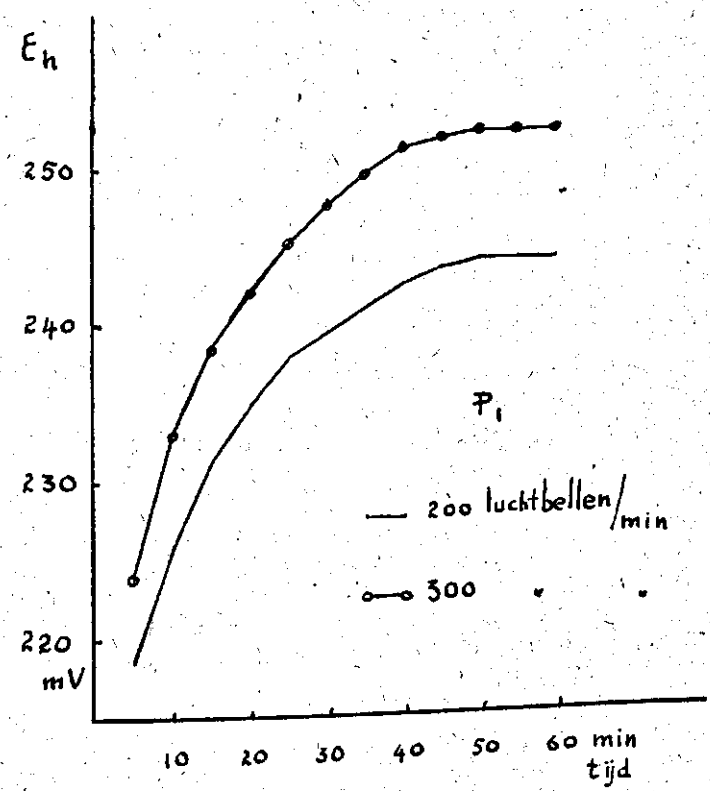


Fig. 14
Invloed van de aëratie op de fermentatie-activiteit.

Hoewel er geen andere proeven tot onze beschikking zijn, zijn we overtuigd dat de invloed van de aëratie op de fermentatie-activiteit steeds positief is, hoewel deze bij steeds grotere luchtverversingen relatief minder zal worden. We zouden deze invloed dus kunnen voorstellen door een hyperpool.

We kunnen echter in de praktijk niet steeds doorgaan met de luchtverversing op te voeren, daar we rekening moeten houden met het feit, dat daardoor de massa kans loopt uit te drogen, waardoor de fermentatie van de massa onregelmatig zou verlopen. De juiste mate van aëratie zal in de praktijk door experimenten moeten worden bepaald.

F — Nabeschouwing.

Deze onderzoekingen hebben ertoe geleid, dat wij een beter inzicht hebben gekregen in de vele problemen, waarvoor wij tot nu toe zo goed als geen verklaring hebben gevonden.

Zo is het in de praktijk gebleken, dat vele wenken er op gericht zijn om de potentiële kwaliteit zoveel mogelijk intact te houden. We hebben zelf in onze proeven opgemerkt, dat een goede flensgraad, lagere fermentatie-temperatuur dan 28° C enz. kunnen worden teruggbracht tot het in stand houden van de fermentatieactiviteit. Deze grootheid loopt dus parallel met de potentiële kwaliteit. Het doel van de bereiding is nu duidelijker gemerkt nl. het constant houden van de fermentatieactiviteit.

We hebben in tegenstelling met de praktijk de bladen steeds fijngewreven en niet slechts gekneusd en gerold, waardoor de fermentatie in ons laboratorium naar gebleken is actiever plaats vindt dan in de fabriek. Daar een kleinere concentratie een grotere fermentatieactiviteit veroorzaakt, moeten we tot de conclusie komen, dat in de praktijk de bladen zo goed mogelijk moeten worden gekneusd, waardoor de fermentatieactiviteit het meest tot haar recht komt en tevens de potentiële kwalieit zoveel mogelijk wordt behouden.

We zullen enige belangrijke problemen nader belichten:

a. Uit onze proeven is gebleken, dat verflenzing de fermentatieduur korter maakt, terwijl zij met vrij grote zekerheid een grotere fermentatieactiviteit veroorzaakt. Waarschijnlijk is de invloed van de verflenzing op de fermentatie-activiteit bij zwaardere verflenzing relatief minder.

De kortere fermentatieduur van verflenste bladen wijst er ons inzien op, dat gedurende de verflenzing reeds substraten als ascorbinezuur, polyphenolen en glucose voor een deel zijn geoxydeerd, evenals het feit dat het aftreksel van verflenste bladen over het algemeen genomen geler is dan het groene aftreksel van verse bladen. Tenslotte kunnen we de praktijk het volgende voorschrijven: Tracht de beste flensgraad te vinden, waardoor de bladen het beste rolbaar zijn en er niet veel plat stuk voorkomen. Voor de praktijkman is dit oud nieuws, maar het is nu duidelijk gebleken, hoe belangrijk deze eis is, want goed gerolde bladen geven een beter eindresultaat dan overflenste en onderflenste bladen, die slecht rolbaar zijn.

b. Een ander vraagstuk is of het inderdaad beter is om in schemerdonkere ruimten te fermenteren dan in lichte ruimten. Wij zouden kunnen zeggen, dat in schemerdonkere ruimten geen fotosynthese plaats vindt, zodat de afbraak der stoffen niet wordt tegengewerkt door een opbouw. We hoeven echter niet bevreesd te zijn, dat dit geschieden zal, immers enige tijd na de pluk treedt er vrijwel geen assimilatie meer op, zodat dit bezwaar niet meer geldt. Er zou dus geen reden meer zijn om voorkeur te hebben voor schemerdonkere ruimten. Daar de oxydatie van ascorbinezuur een belangrijke rol speelt, willen we eerst nagaan wat er in het algemeen bekend is van de invloed van licht op deze reactie. Guillemet (58) vond, dat de oxydatie

van dit zuur door ultra-violette stralen kan worden geactiveerd, doordat volgens hem de zuurstof van de lucht wordt geactiveerd tot ozon. Op grond hiervan zouden we de verwachting kunnen uitspreken, dat de fermentatie enigszins door deze stralen moet worden beinvloed. Dit zou dan de verklaring kunnen zijn voor het overigens onverklaarbare feit, dat de ademhalingsintensiteit van sommige planten door bestraling met ultra-violette stralen kan worden vergroot. Nu is het de vraag of deze verklaring ook geldt voor het feit, dat thee van hoger gelegen ondernemingen altijd beter is dan die van lagere streken, immers in hogere streken zijn er meer ultra-violette stralen te vinden. We kunnen deze vraag in ons laboratorium moeilijk beantwoorden, maar deze lijkt ons toch belangrijk genoeg voor een nader onderzoek in de ondernemingen zelf.

c. Vervolgens hebben we gezien, dat het derde blad en het steeltje veel minder actief fermenteren dan de jongere P + 2, zodat het verklaarbaar is geworden, waarom men in de praktijk het derde blad soms apart plukt en bereidt n.l. doordat dit blad volgens de practici een andere „sapconcentratie" heeft, wat erg vaag klinkt. Het is echter eigenaardig, dat men de steeltjes, die nòg meer afwijken, meebereidt en ze pas later nà de droging bij de droogsortatie verwijdert.

Het lijkt ons veel logischer en waarschijnlijk economischer om de steeltjes in groene toestand, dus vòòr de verflenzing aan de lopende band uit te zoeken, zodat zij de kwaliteit van de bladen niet kunnen benadelen en het uitzoeken na de droging achterwege kan worden gelaten.

In de praktijk is men van mening, dat het onjuist is om het derde blad tegelijk met de jongere bladen te bereiden, omdat dit door zijn andere samenstelling de fermentatie onregelmatig laat geschieden en daardoor een slechtere kwaliteit veroorzaakt. Uit onze proeven is gebleken, dat het derde blad door zijn geringere fermentatieactiviteit, zijn langeren fermentatieduur en zijn grotere fermentatieintensiteit een geheel aparte plaats inneemt. Hiedoor wordt de fermentatie van P + 3, dus waarbij het derde blad aanwezig is, onregelmatig en kunnen we het eindpunt van de fermentatie niet door de kleur bepalen, daar het derde blad veel langer groen blijft. Ten tweede heeft het derde blad een geringere fermentatieactiviteit, waardoor de kwaliteit van het eindproduct wordt benadeeld.

d. Wat de optimum-fermentatietemperatuur betreft, deze hebben we ongeveer geschat op 26° C. Waar deze precies ligt is moeilijk te zeggen en waarschijnlijk zal het ene type iets anders reageren dan een andere.

Deze optimum-temperatuur komt vrijwel overeen met de optimum-temperatuur, die door andere onderzoekers werd verkregen

Vergelijken we deze met die van Sreerangachar (163) en die van Roberts, dan zien we het volgende:

optimum-temperatuur volgens ons onderzoek	optimum-temperatuur van onoplosbare enzymen volgens Sreerangachar	optimum-temperatuur van de O_2-opname volgens Roberts
26° C.	27° C	29,5° C

Die van Roberts lijkt te hoog, wat misschien veroorzaakt wordt, doordat O_2-opname niet identiek is met de door ons bepaalde fermentatie-activiteit, welke met behulp van de potentiometer is geschied. We moeten er voor zorgen, dat in de fermenteerruimte zoveel mogelijk een temperatuur van pl.m. 26° C heerst. Daar de fermentatie reeds direct tijdens het rollen begint, moet de optimum-temperatuur ook in de rollers heersen. Een grote hitte door mechanische wrijving kan n.l. de kwaliteit benadelen door een dunnere schenk.

Men kan veel moeilijkheden vermijden door een gemeenschappelijke rolfermenteerruimte te bouwen wat reeds door Leniger (97) is voorgeschreven, waarbij overal de zelfde temperatuur kan heersen. Er is ook getracht om in de rollers zelf een air-conditioning te bouwen, maar de resultaten zijn niet bevredigend en de toepassing ervan is niet economisch gebleken.

e. De laatste tijd worden de brokens op de theemarkten beter geprijsd en men prefereerde deze zelfs boven de bladtheën. We zouden deze verandering als volgt kunnen verklaren. Wanneer we de bladen zo rollen, dat er meer brokens worden gevormd, dan zal door het grotere oppervlak der bladdeeltjes de fermentatie actiever plaats vinden dan die van bladthee. Hierdoor zal de kwaliteit bij brokens beter zijn dan van bladthee.

f. In fig. 11 zien we, dat Pecco zijn ascorbinezuur sneller oxydeert dan de oudere bladen en daardoor veel eerder zijn polyphenolen gaat oxyderen. We hebben dit proberen te verklaren, door aan te nemen, dat in Pecco relatief meer ascorbinezuuroxydase aanwezig is.

g. Voegen we ascorbinezuur toe aan het begin van de fermentatie, dan duurt het langer voordat de bruinkleuring optreedt, m.a.w. al het ascorbinezuur, dus ook het toegevoegde, moet eerst worden geoxydeerd, voordat de oxydatie der polyphenolen een aanvang kan nemen. Wij nemen aan dat de oxydatie der polyphenolen ook kan worden geremd, indien we stoffen toevoegen, die beter dehydreerbaar zijn dan de polyphenolen.

Volgens Deijs (particuliere mededeling) wordt bij een dergelijke handelwijze niet alleen de kleurvorming, maar ook de

geurvorming tegengehouden. Hieruit moeten we concluderen, dat de oxydatie van ascorbinezuur beslist primair is.

Voegen we het ascorbinezuur op een latere stadium toe, dan bleek dat de potentiaal de eerste ogenblikken niet verandert om na enige tijd weer te stijgen. Dit toegevoegde ascorbinezuur, dat met zijn oxydatieproduct een veel lager normaal potentiaal heeft, stoort de totale redoxpotentiaal, waarna het zuur òf door moleculaire zuurstof òf (en) door de gevormde chinonen wordt geoxydeerd.

Tijdens de fermentatie, dus na het kneuzen der bladen, worden de substraten beter aan de lucht blootgesteld, zodat o.a. zowel ascorbinezuur als polyphenolen met de zuurstof kunnen reageren. Daar het ascorbinezuur een sterker reducerend vermogen bezit, zal dit zuur echter eerder worden geoxydeerd.

De gedachte, dat eerst polyphenolen moeten worden geoxydeerd, totdat er voldoende chinonen worden gevormd om het ascorbinezuur te kunnen oxyderen kan slechts gegrond zijn, wanneer bewezen is, dat er inderdaad geen ascorbinase aanwezig is in het theeblad. De al of niet aanwezigheid van dit enzym is dus van doorslaggevende aard voor het opstellen van het fermentatieschema. We willen dan ook met behulp van de methode van Wachholder (182) nagaan of in het theeblad een dergelijk enzym aanwezig is en welke enzymen bij de oyxdatie van ascorbinezuur een rol spelen.

HOOFDSTUK V

ONDERZOEK NAAR HET VERMOGEN VAN HET THEEBLAD OM ASCORBINEZUUR TE OXYDEREN.

A — Inleiding.

We hebben in hoofdstuk 4 geconcludeerd, dat de activiteit van de fermentatie voor een deel bepaald wordt door het vermogen van het blad om ascorbinezuur te oxyderen. Om de mogelijkheid te bestuderen, of de fermentatieactiviteit willekeurig kan worden geregeld, moeten we het oxyderend vermogen van het theeblad t.o.v. ascorbinezuur aan een nader onderzoek onderwerpen.

In de literatuur kent men de volgende typen van oxydatie van ascorbinezuur:

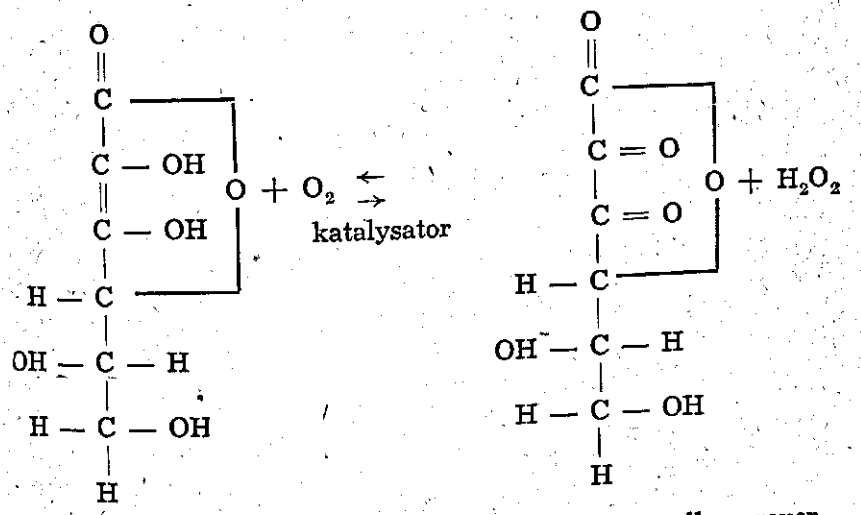
1 — de autoxydatie. Deze komt onder physiologische omstandigheden niet voor.
2 — de oxydatie door katalyse.
  a — door warmtestabiele katalysatoren als Cu en Fe.
  b — warmtelabiele katalyse door fermenten.
    1 — direct door ascorbinezuuroxydase (ascorbinase).
    2 — indirect door het systeem.
      a — polyphenolen-polyphenoloxydase.
      b — flavonen-peroxydase (+ H_2O_2).

Indirecte katalyse vindt men, wanneer bijv. flavonen eerst door peroxydase en waterstofperoxyde worden geoxydeerd, waarna de geoxydeerde vorm der flavonen (chinonen) het ascorbinezuur oxydeert. Bij de directe katalyse wordt het ascorbinezuur geoxydeerd door de zuurstof, waarbij de ascorbinase katalyserend werkt.

Deze oxydaties van ascorbinezuur met behulp van bovengenoemde katalysatoren werden bekend door onderzoekingen van Szent-Gyorgïi, Tauber en Spruyt & Donath, e.a.

Stotz, Harrer, Schultze & King kenden nog een andere katalysator nl. het systeem cytochroom-cytochroom (indophenol)-oxydase. Tenslotte kenden Fisher en ook Lemberg en medewerkers nog een andere ascorbinezuuroxydatie nl. door haemoglobine-derivaten bijv. haemochromogeen.

Volgens de literatuur wordt het ascorbinezuur bij aanwezigheid van zuurstof door wegneming van 2 H-atomen tot dehydroascorbinezuur geoxydeerd, hetwelk een zeer labiele stof is die verder uiteen kan vallen.



De oxydatie van ascorbinezuur is volgens Zilva alleen reversibel, wanneer het enzymatisch katalytisch wordt geoxydeerd en in dat geval heeft het de antiscorbutische werking niet verloren. Bij sterk zure reacties kan het verder worden afgebroken, waarbij tenslotte oxaalzuur en l-threonzuur kan ontstaan. (Carteni & Morelli).

Om na te gaan, welke katalysatoren in theeblad voorkomen, dienen we eerst de totale katalyse te kennen. Deze bepalen we door een bladextract, hetwelk na 24 uur laten staan werd gecentrifugeerd en gefiltreerd, te laten inwerken op een ascorbinezuur-oplossing van bekende sterkte. Door verhitting bij 100° C gedurende enige tijd worden de enzymen gedood, zodat we het aandeel der zware metalen aan de katalyse min of meer kunnen bepalen. Dit is echter niet zo eenvoudig als het lijkt, want het is vaak voorgekomen, dat door enigszins langdurige verhitting het vermogen van een plantaardig preparaat om ascorbinezuur te oxyderen groter wordt. Een mogelijke verklaring hiervoor is, dat gedurende het langdurige koken de enzymen, die aan de oxydatie van ascorbinezuur deelnemen, welke Cu-proteiden zijn, gesplitst worden en het vrijgekomen Cu als zodanig aan de katalyse gaat deelnemen. De katalytische werking der vrijgekomen zware metalen zou dan groter zijn dan die der enzymen, welke die metalen in hun prosthetische groep hebben gehad. Wachholder (182), die nadere onderzoekingen hierover deed, verhitte de planten-extracten steeds gedurende 10 minuten bij 100° C., waardoor vergelijkbare cijfers worden verkregen.

Een andere verklaring voor de vergroting van het vermogen om ascorbinezuur te oxyderen door langdurig te koken is volgens Wachholder het voorkomen van warmtelabiele remstoffen.

Een dergelijke remstof meenden Zilva, Mariquand e.a. (182) in citroensap te vinden, hoewel dit door andere onderzoekers werd bestreden. Wachholder bevestigde Zilva's resultaten, want hij vond voor citroensap een langzamere oxydatie dan voor een zuivere ascorbinezuuroplossing van gelijke sterkte. Hetzelfde vond hij bij tomaten en rabarber, hoewel niet zo gelijkmatig als bij citroen. Bij alle drie de planten was het vermogen om ascorbinezuur te oxyderen na verhitting groter geworden, doordat blijkbaar de warmte-labiele remstoffen wegvallen.

Volgens deze verklaring zullen plantenextracten, welke deze remstoffen niet bezitten, ook na langdurig koken geen groter vermogen hebben om ascorbinezuur te oxyderen.

Daar er verschillende enzymen aan de katalyse van de oxydatie deelnemen, hebben verschillende onderzoekers vermoed, dat de planten ingedeeld zouden kunnen worden in verschillende typen. Zo veronderstelde Huszak (182) dat er alleen een polyphenolase- en een peroxydase-type zijn. Hij heeft echter geen onderzoekingen in bladen gedaan en zich alleen beperkt tot de vruchten. Banga en Philipot (182) meenden, dat er maar weinig ascorbinase in de plant voorkomt, zodat de rol van de ascorbinase in de katalyse slechts heel klein is, of zelfs afwezig is.

Wachholder is het echter niet eens met deze conclusie. Hij heeft nl. in veel bladen veel van dit enzym gevonden en merkt op, dat in de bladen het ascorbinezuur hoofdzakelijk door ascorbinase katalytisch wordt geoxydeerd en daarnaast in mindere mate indirect door peroxydase of/en polyphenolase.

De auteur onderscheidde t.o.v. de oxydatie van ascorbinezuur de planten in de volgende types:

1 — ascorbinase-type
2 — polyphenolase-type
3 — peroxydase-type
4 — fermentarme type

We geloven, dat deze indeling meer volledig had gekund door het cytochroom-type en het haemoglobinetype op te nemen. Een ander nadeel van deze indeling is, dat Wachholder niet nader omschreven heeft, welk plantendeel moet worden onderzocht om de gehele plant te kunnen representeren, daar we van mening zijn, dat in een plant verschillende types kunnen voorkomen. Daarom hoort hier een soort afspraak om vergissingen te voorkomen.

Om de verschillende types van elkaar te onderscheiden, hebben de onderzoekers gebruik gemaakt van verschillende rem- en activeringsstoffen. Het is nl. bekend, dat verschillende enzymen zich specifiek t.o.v. dergelijke stoffen gedragen.

Het is dus mogelijk om ook in het theeblad na te gaan, welke enzymen aan de oxydatie van ascorbinezuur deelnemen. Daarnaast dienen we na te gaan of in het theeblad sprake kan zijn van een katalyse door zware metalen en hoe groot hun aandeel is.

Gaan we in de literatuur na, wat er over het aandeel der fermenten bekend is, dan bemerken we, dat dit nog maar heel weinig is. De katalyse door zware metalen is integendeel veel beter onderzocht. Vooral Holtz & Triem (182) en verder Schaler hebben het voorkomen hiervan onderzocht en bewezen. Andere onderzoekers weer hebben meer het specifieke van de Cu- en Fe-katalyse onderzocht. Resumerend kunnen we over deze literatuurstudie, welke we grotendeels uit het artikel van Wachholder hebben overgenomen, het volgende mededelen:

Cu-katalyse wordt door

1 KCN volledig geremd (Szent-Gyorgyi)
2 glutathion geremd (von Euler, Barron & Klemperer)
3 CO geremd (Barron, de Meio & Klemperer)
4 metaphosphorzuur geremd (Lymann, Schultze & King) doordat het Cu wordt gebonden.
5 citraten geremd en door orthophosphorzuur versneld (Beszonof & Woloszyn)
6 aminozuren geremd (Deijs) (part. mededeling).

Fe-katalyse wordt door

1 pyro- en orthophosphaten geremd en wel krachtens hun vermogen om Fe te binden (Goldstein & Kacherowa)
2 gluthation niet geremd (Barron & Klemperer)

Wat de andere remstoffen betreft, deze zijn t.o.v. de Fe-katalyse nog niet onderzocht. Zo te zien werkt alleen orthophosphorzuur verschillend t.o.v. de Cu- en Fe-katalyse, terwijl de overige remstoffen verschillend sterk remmen en daardoor minder geschikt zijn om deze twee soorten van katalyse van elkaar te onderscheiden.

Wachholder tracht een onderscheid te maken tussen deze katalyses door gebruik te maken van het verschil in katalyse van de oxydatie van ascorbinezuur, want zoals bekend is de Cu-katalyse sneler dan de Fe-katalyse. Een nadeel is, dat deze verschillen wegvallen, indien we te maken hebben met combinaties.

Wat de katalyse door de enzymen betreft is er nog zeer veel tegenstrijdigs en nog zeer veel problematisch, waarvoor we nog geen verklaring weten te vinden. Hierbij treedt als bijzondere complicatie op, dat het plantenweefsel een grote invloed heeft

op de resultaten van het onderzoek. Zo vonden de Caro & Giani, dat het weefsel de katalyse door zware metalen kan beinvloeden. Szent-Gyorgyi isoleerde een ascorbinase uit kool, die ongevoelig is voor KCN, terwijl Ghosh & Gurka een ascorbinase uit de pompoen hebben gewonnen, welker werking reeds door 0, 001 M KCN wordt geremd. Deze verschillen werden door Johnson & Zilva bevestigd en desondanks geloven zij, dat het ferment hetzelfde is, zodat het verschil moet worden gezocht in het verschil van het plantenweefsel. Ook de polyphenolase kan verschillend werken. Zo is bijv. de polyphenolase van aardappelen 70 maal gevoeliger voor KCN dan de polyphenolase van appels. Deijs (part. mededeling) is van mening, dat dit ook veroorzaakt kan worden door beschermende onzuiverheden van het enzyme-preparaat.

Wachholder twijfelde dan ook aan het nut van cyanide als onderscheidingsmiddel der enzymen, welke aan de oxydatie van ascorbinezuur deelnemen.

Geconcentreerde alcohol bleek een beter remmiddel te zijn. Wachholder gebruikte voor zijn experimenten een 99 % oplossing.

Huszak vond bijv., dat peroxydase ongevoelig is voor geconcentreerde alcohol, terwijl de werking van ascorbinase volgens hem volledig er door geremd wordt. Maar alcohol heeft ook een verschillende invloed op ascorbinase, want Tauber en Spruyt & Donath en ook Johnson & Zilva vonden, dat kool- en pompoen-ascorbinase door geconcentreerde alcohol volkomen wordt geremd, terwijl bloemkool- en augurken-ascorbinase veel minder wordt geremd.

Ook het CO werd als remmiddel onderzocht, maar men vond wel enige verschillen t.o.v. de polyphenolase en peroxydase, maar de gevoeligheid van ascorbinase van verscheidene planten is weer zeer verschillend.

Wat de gevoeligheid t.o.v. glutathion betreft, nam men over het algemeen aan, dat de bescherming afhankelijk is van de pH, waarbij men werkt. Wachholder werkt in dat geval zoveel mogelijk bij een pH van 5,8 — 5,9.

Wat de activeringsstoffen betreft, deze zijn veel minder uitgebreid onderzocht. Men kent bijv. toepassingen van pyrocatechine en van vanilline om na te gaan over welk ferment de plant beschikt om ascorbinezuur te oxyderen. Zo zal door toevoeging van vanilline de oxydatie van ascorbinezuur worden versneld, indien het extract een sterke en actieve peroxydase bezit. Voegt men daarbij hydroxylamine, dan wordt de peroxydase-werking volledig geremd, zodat men het aandeel van de peroxydase in de katalyse kan nagaan.

Beschikt het extract echter over een polyphenolase, dan blijkt bij toevoeging van pyrocatechine de oxydatie alleèn versneld

te worden, indien het extract geen ascorbinase bezit, daar dit enzyme een storende werking heeft op polyphendase. (Wachholder).

Deze proef is dus minder gunstig dan die t.o.v. peroxydase, maar Wachholder kon voor de onderscheiding van de polyphenolase geen betere methode vinden.

Op deze gegevens heeft hij een methode opgesteld, waardoor men van een plant, of een deel van een plant kan nagaan over welke enzymatische katalysatoren zij beschikt.

De methodiek van Wachholder.

Daar we niet over een uitgebreid plantenmateriaal kunnen beschikken, hebben we de hoeveelheden van het onderzochte extract verkleind, zodat de gegeven hoeveelheden anders zijn dan de oorspronkelijke.

Het bladextract wordt op de volgende manier bereid:

1 gewichtsdeel van het bladmateriaal wordt met 5 gewichtsdelen dubbelgedestilleerd water en wat glaszand fijngewreven in een porceleinen mortier en na flink schudden wordt het extract een uur weggezet en vervolgens gecentrifugeerd en gefiltreerd, waarna het heldere extract een etmaal wordt weggezet om al het aanwezige ascorbinezuur in het extract te laten oxyderen.

Vervolgens wordt 2,5 cc van dit bladextract vermengd met 2,5 cc phosphaatbuffer (pH 5,87), 2,5 cc ascorbinezuuroplossing (15 mg ascorbinezuur opgelost in 100 cc dubbelgedestilleerd water) en 2,5 cc dubbelgedestilleerd water of pyrocatechine- of vannilline-oplossing naar gelang het onderzoek. Dit mengsel wordt gedurende een uur in een thermostaat van 37° C geplaatst, terwijl na 2, 15, 30 en 45 of 60 minuten steeds 2,5 cc wordt afgepipetteerd en aan 2,5 cc metaphosphorzuur van 4 % wordt toegevoegd, zodat verdere oxydatie wordt stopgezet. Tenslotte kan dit mengsel met 0,001 M 2—6 dichlorophenol-indophenol worden getitreerd, welke door ons steeds electro-metrisch wordt gevolgd.

Wachholder gebruikte 22 % sulfosalicylzuur om verdere oxydatie te remmen, maar met dit zuur bleek de titratie moeilijk te verlopen, doordat de indicator langzaam ontkleurd wordt en voor een electro-metrische titratie is dit zuur helemaal niet geschikt, daar het enige tijd duurt, voordat het evenwicht werd bereikt. Metaphosphorzuur bleek in onze proeven beter te voldoen. Wachholder voegde vóór de titratie nog wat water toe, maar daar onze oplossing nogal kleurloos is lijkt deze verdunning ons overbodig en laten we deze dan ook achterwege.

Voor de activerings- en remproeven gebruikten we de volgende stoffen, in concentraties als door Wachholder werden aangegeven: o.a.

Een oplossing van 30 mg pyrocatechine in 100 cc water, 100 mg vanilline in 100 cc water en 96 % alcohol. De toevoeging van alcohol geschiedt door het blad onder alcohol fijn te wrijven, waardoor de ascorbinase wordt geinactiveerd.

Het extract wordt een nacht weggezet, om het ascorbinezuur, dat in het extract aanwezig is, te laten oxyderen, waardoor we het geoxydeerde deel van het toegevoegde ascorbinezuur kunnen berekenen.

B — Het onderzoek naar de katalysatoren van de oxydatie van ascorbinezuur in het theeblad.

We hebben reeds in het vorige hoofdstuk op het belang van het onderzoek naar de aanwezigheid van ascorbinase gewezen, want hiermee staat of valt de mening dat de fermentatie van thee met de oxydatie van ascorbinezuur begint. Hoewel we op grond van het sterkere reducerende vermogen van ascorbinezuur mogen aannemen, dat de oxydatie van ascorbinezuur de voorrang geniet boven die der polyphenolen, is deze motivering niet voldoende.

Wachholder meent op grond van talrijke onderzoekingen zowel in fruit als in bladen van talloze planten, dat de oxydatie van ascorbinezuur in het blad over het algemeen direct wordt gekatalyseerd door ascorbinase. We kunnen dan, gebruik makende van de methode van Wachholder de verwachting uitspreken, dat toevoeging van pyrocatechol aan het mengsel van bladextract en ascorbinezuur geen verhoging van de oxydatie van ascorbinezuur zal veroorzaken. Mocht dit wel het geval zijn, dan is er geen ascorbinase aanwezig en wordt het ascorbinezuur, zoals Lamb & Sreerangachar (91) reeds meenden, door de chinonen geoxydeerd, welke o.a. gevormd worden door oxydatie der polyphenolen door polyphenolase en O_2.

We onderzochten een P + 2, waarbij de titratiewaarden in mg geoxydeerd ascorbinezuur worden omgewerkt.

Invloed van remstoffen op de oxydatie van ascorbinezuur door theebladextract.

tijd min.	zonder toevoeging	met pyrocatechol	met vanilline	gekookt extract
2	1,50	1,50	2,40	0,15
15	7,90	7,90	8,20	3,35
30	13,00	13,00	13,35	6,55
50	14,05	14,05	14,40	9,55

Maken we van deze gegevens een grafiek, dan kunnen we heel duidelijk zien, dat toevoeging van pyrocatechol geen verandering van de oxydatie teweeg brengt. Volgens Wachholder moet dit juist het bewijs voor de aanwezigheid van ascorbinase zijn, daar de werking van polyphenolase in deze proef door ascorbinase wordt gestoord.

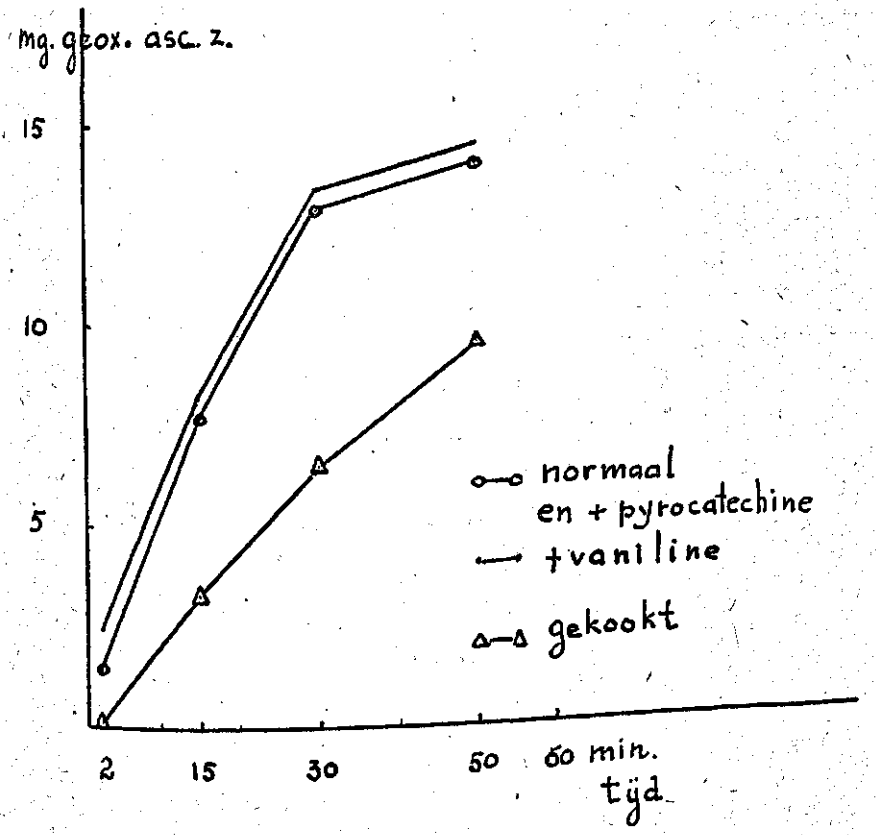


Fig. 15
Oxydatiecurves van Ascorbinezuur na toevoeging van bladextract en kleine hoeveelheden pyrocatechol of vanilline.

Een bezwaar voor een dergelijke conclusie is, dat thee door het hoge gehalte van looistoffen een uitzonderlijke plaats inneemt. Daar er een overmaat van polyphenolen in het blad aanwezig is, konden we door toevoeging van pyrocatechol verwachten, dat er geen sprake zal zijn van een vermeerdering der oxydatie. Wat deze betreft verkeert de peroxydase eigenlijk in dezelfde positie en desondanks kregen we een kleine vermeerdering van de oxydatie door toevoeging van vanilline. De uitspraak van Wachholder t.o.v. polyphenolase en ascorbinase moet dus toch wel waarde hebben.

De toevoeging van pyrocatechol heeft geen uitsluitsel kunnen geven over het al dan niet aanwezig zijn van polyphenolase. Daar het bestaan van dit enzym er niet door bestreden werd, zouden we de conclusie van Lamb kunnen aannemen, dat in het theeblad polyphenolase aanwezig is. Ten opzichte van de peroxydase kunnen we nog opmerken, dat het jammer is, dat we het aandeel van dit enzym niet hebben nagegaan, wat we volgens Wachholder door toevoeging van hydroxylamine hadden kunnen bepalen. We hebben dit achterwege gelaten, omdat we overtuigd zijn, dat de rol van dit enzym niet zo belangrijk is als die van ascorbinase en polyphenolase.

Wordt het extract gekookt, dan worden alle enzymen geïnactiveerd en hebben we dus te maken met door verhitting vrijgekomen Cu-ionen en misschien ook Fe-ionen, die toch katalytisch kunnen werken. Het vrijwel regelmatige verloop van de oxydatie door het gekookte extract is vermoedelijk een bewijs van de katalyse door de zware metalen.

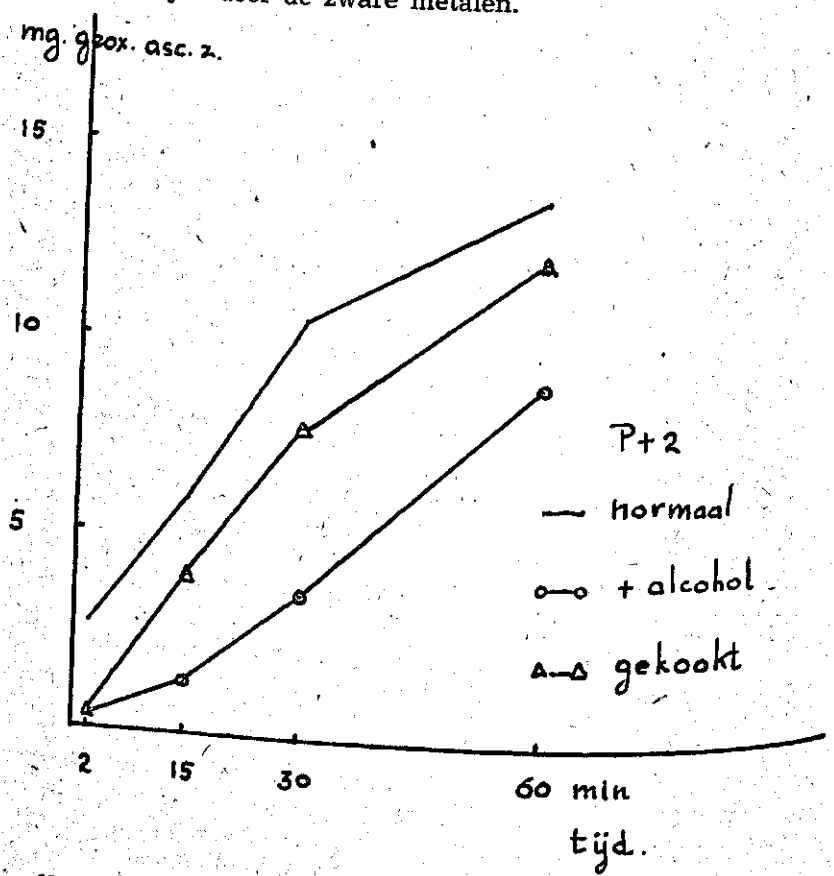


Fig. 16
Vergelijking oxydatiecurves van acorbinezuur na toevoeging van waterig-, alcoholisch- en gekookt bladextract.

Willen we de invloed van geconcentreerde alcohol onderzoeken, om na te gaan of deze de activiteit van ascorbinase volledig remt, dan merken we, dat de remming niet volledig is, doordat de peroxydase en Cu- en Fe-ionen, die misschien in het ongekookte extract aanwezig zijn, ongevoelig zijn voor geconcentreerde alcohol.

In fig. 16 zien we, dat de oxydatie door het gekookte extract groter is dan door een alcoholisch extract, zodat in het verse blad zeer waarschijnlijk geen geioniseerd Cu en Fe aanwezig zijn. Het feit, dat het gekookte extract nog zulk een grote oxydatie van ascorbinezuur kan veroorzaken is voor de volgende twee uitleggingen vatbaar:

1 Door het koken komen Cu-ionen uit de Cu-proteine-complexen (fermenten als ascorbinase en polyphenolase vrij en gaan dan aan de katalyse deelnemen.
2 door het koken zullen eventueel aanwezige warmtelabiele remstoffen inactief worden, zoals bij citroenen en tomaten. (Wachholder)

Hoewel er geen positief bewijs is, dat ook in thee zulke remstoffen aanwezig zijn, kunnen we deze mogelijkheid niet zonder meer verwerpen.

Wachholder vond echter bij citroenen en bij tomaten, dat door het koken de oxydatie van ascorbinezuur veel actiever werd dan in het verse extract, wat hij alleen kon verklaren door aan te nemen, dat dergelijke remstoffen aanwezig moeten zijn. Nu is de oxydatie bij het theeblad door het gekookte extract niet groter geworden: zodat we met vrij grote zekerheid kunnen aannemen, dat in het gekookte extract geioniseerd Cu en misschien Fe als enige katalysatoren fungeren.

Tenslotte willen we nog opmerken, dat het voor de exacte bepaling van de activiteit van ascorbinase van belang is, vast te stellen hoe we het extract maken, nl. of het juist is om bladsuspensie direct te centrifugeren en te filtreren of eerst wegzetten, voordat we het extract filtreren. Immers de oxydase zit vast aan de cel-bestanddelen, waardoor ze in mindere mate in het extract terecht komt, indien het extract direct wordt gecentrifugeerd en gefiltreerd.

Dat een verschil in de behandeling van het extract een andere oxydatie-curve teweeg kan brengen, is gebleken bij de volgende proef. Wordt het blad na het fijnwrijven eerst een uur weggezet en daarna gecentrifugeerd en vervolgens 24 uur weggezet, dan is het oxydatievermogen kleiner, dan wanneer het fijngekreven blad eerst gedurende 24 uur wordt weggezet en daarna gecentrifugeerd en gefiltreerd. Dit kan verklaard worden, doordat gedurende het wegzetten van het ongefiltreerde bladsuspensie het enzym meer tijd heeft gekregen om in het water te dispergeren.

Het ascorbinezuur in het theeblad wordt tijdens het wegzetten grotendeels geoxydeerd.

Dit verschil heeft ons weer eens gewaarschuwd om zo veel mogelijk onder dezelfde omstandigheden te werken.

In het vorige hoofdstuk hebben we gezien, dat jongere bladen het ascorbinezuur veel actiever oxyderen dan de oudere bladen, zodat we mogen verwachten, dat bijv. P + 2 een groter oxydatievermogen bezit dan het derde blad van dezelfde twijg.

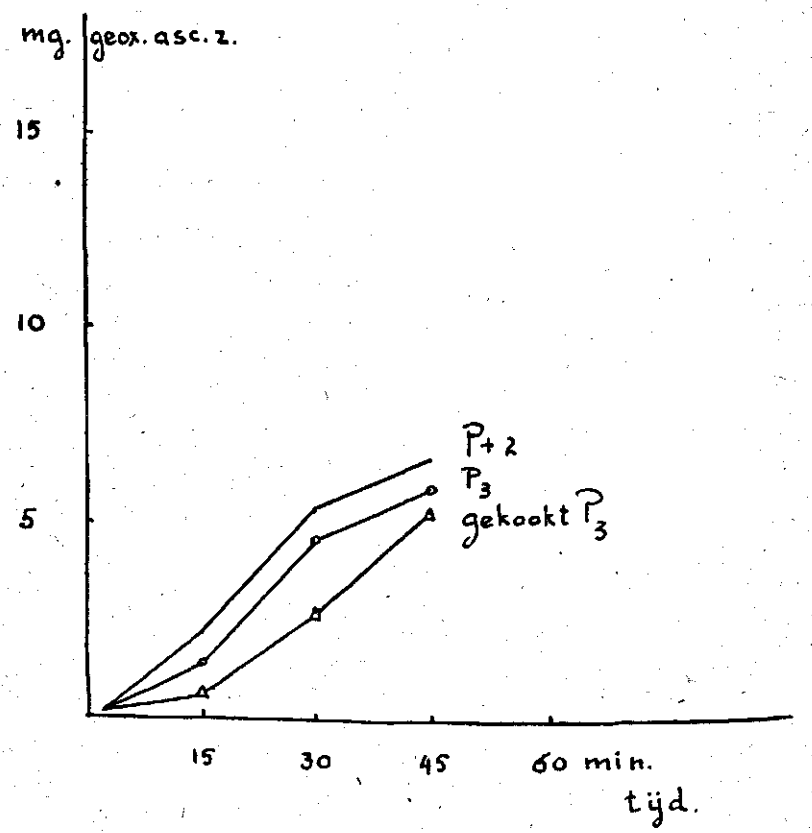


Fig. 17

Oxydatiecurve van ascorbinezuur door P_3 en $P+_2$.

In fig. 17 zien we, dat onze verwachting is uitgekomen. Ook hier zien we weer, dat het gekookte bladextract niet veel minder actief oxydeert dan het ongekookte extract.

C — Invloed van zware metalen als Cu en Fe op de oxydatie van ascorbinezuur.

Om na te gaan hoe groot de invloed zou zijn van Cu, werd aan een oxyderend extract een weinig geioniseerd Cu toegevoegd. De Cu-oplossing mag echter niet te sterk zijn, daar deze anders de platina-electrode kan vergiftigen. We hebben aan 2,5 cc van het extract 2,5 cc van een koperoplossing (200 $\gamma CuSO_4 5H_2O$ per 100 cc water) toegevoegd en na toevoeging van de ascorbinezuur-oplossing en de buffer hebben we de oxydatie hiervan vergeleken met een normale oxydatie.

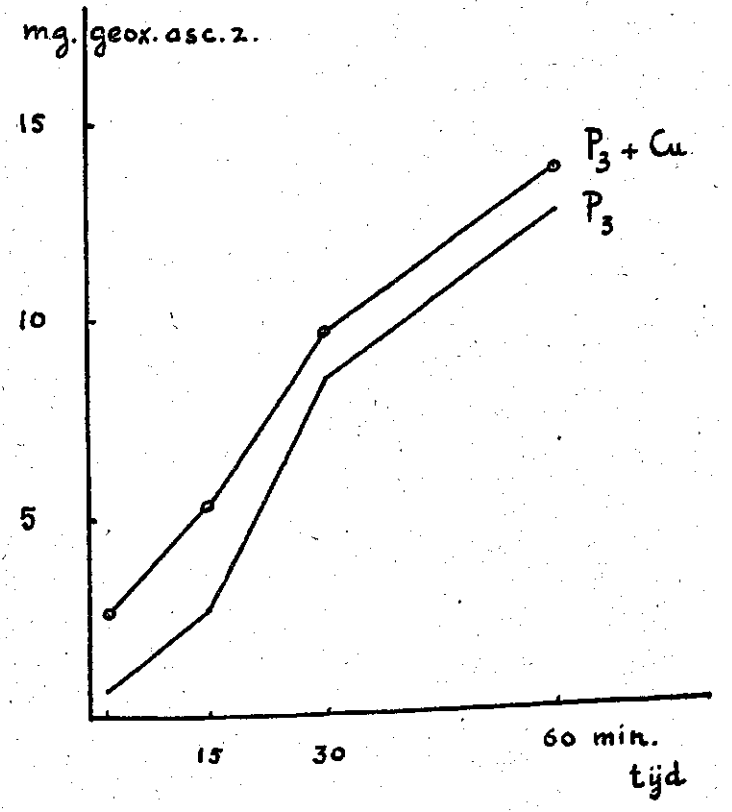


Fig. 18

Invloed van Cu op de oxydatie van ascorbinezuur door P_3.

In deze grafiek zien we, dat reeds een kleine hoeveelheid Cu (per 2,5 extract 1,3 γ Cu) voldoende is om het oxydatievermogen van het blad te vergroten. Namen we in plaats van het derde blad P + 2, dan kan dezelfde hoeveelheid Cu het oxydatievermogen ook vergroten, hoewel deze vergroting kleiner is dan bij het derde blad. Er moet dus een grens bestaan tot welke we het

oxydatievermogen kunnen vergroten en die door de Pecco het dichtst wordt benaderd.

Volgens de onderzoekers is de activering door Fe veel kleiner dan door Cu, en naar aanleiding daarvan hebben we nagegaan hoe het extract zich gedraagt, indien we in plaats van Cu, Fe aan het extract toevoegen.

We gebruiken voor deze proef Ferriammoniumsulfaat: $Fe_2(SO_4)_3.(NH_4)_2SO_4.24H_2O$.

Per 2,5 cc bladextract hebben we toegevoegd 5 γ Fe en na toevoeging van de ascorbinezuuroplossing en de buffer hebben we nagegaan, of het oxydatievermogen van het derde blad na toevoeging van Fe opmerkelijk zal toenemen en of deze inderdaad minder zal zijn dan Cu.

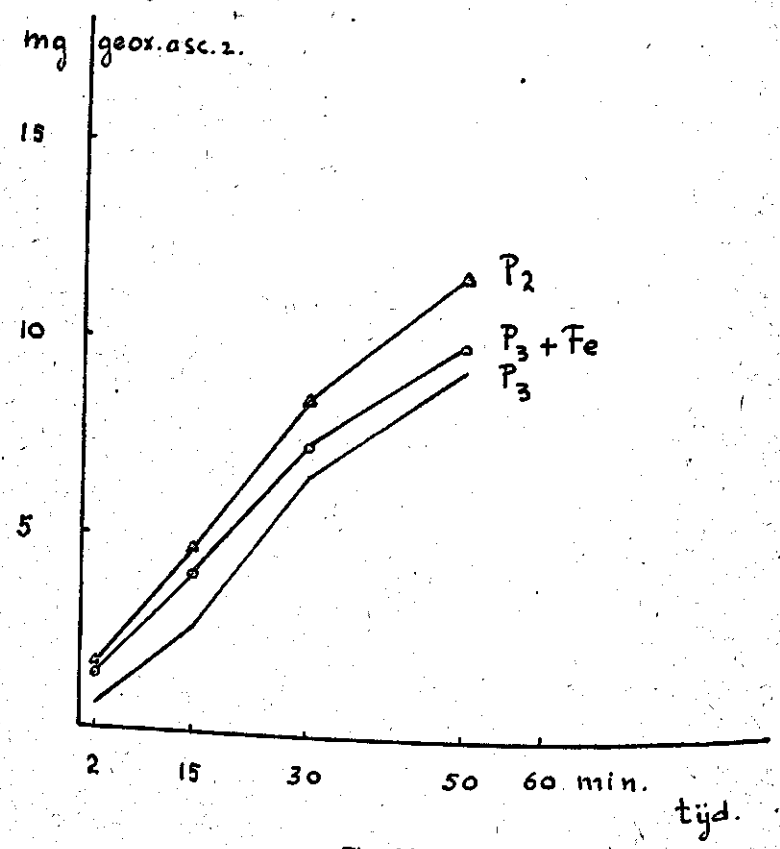


Fig. 19

Invloed van Fe op de oxydatie van ascorbinezuur door P_3.

Op deze grafiek zien we dat het oxydatievermogen van het derde blad ook door Fe kan worden vergroot en dat deze vergroting kleiner is dan door Cu, ondanks dat minder Cu wordt toegevoegd. (vergelijk fig. 18 met fig. 19)

Ter vergelijking hebben we de oxydatiecurve van het jongere P + 2 van dezelfde loot berekend en dan zien we dat deze toch nog groter is dan het versterkte derde blad.

Vergelijken we fig. 18 met 19, dan zouden we willen concluderen, dat de invloed van Cu op de oxydatie van ascorbinezuur groter is dan van Fe, wat ook reeds o.a. door Wieringa (187) werd gevonden.

D — Nabeschouwing

Mack & Kertesz (112) beweren, dat ijzer alleen de oxydatie van ascorbinezuur niet kan katalyseren. Is er echter daarnaast ook Cu aanwezig, dan achten zij het waarschijnlijk, dat de werking van Cu er door versterkt wordt. Daar in het theeextract reeds Cu aanwezig moet zijn, kunnen we de bewering van Mack en Kertesz niet onderzoeken.

Samenvattend kunnen we zeggen,

1 dat ascorbinase de oxydatie van ascorbinezuur direct katalyseert. De indirecte katalyse door polyphenolase konden we niet waarnemen, doordat er ascorbinase in het extract aanwezig is, zodat de mogelijkheid hiervan nog open blijft. De aanwezigheid van polyphenolase is echter reeds door Lamb e.c. bewezen.
2 dat de ascorbinase na enige tijd minder actief wordt.
3 dat het oxydatievermogen van P + 2 groter is dan het derde blad.
4 dat het gekookte extract slechts weinig minder actief is dan het ongekookte, doordat het Cu uit de Cu-houdende fermenten treedt en in geioniseerde vorm aan de katalyse gaat deelnemen.
5 dat toevoeging van 1,3 γ Cu aan 2,5 cc extract een grotere activering veroorzaakt dan 5 γ Fe.

Het feit, dat de katalytische werking van ijzer bij de oxydatie kleiner is dan die van koper in geioniseerde vorm, is reeds door andere onderzoekers zoals Wieringa (187) ontdekt. Het is mogelijk, dat de kleinere katalyse door geioniseerd ijzer veroorzaakt wordt, doordat het ijzer volgens Warburg voor oxydaties alleen in haeminebinding actief is.

De oxydatie van ascorbinezuur door het gekookte extract bleek groter te zijn dan door het alcoholische extract. Door alcohol wordt hoofdzakelijk de ascorbinase vergiftigd, terwijl peroxydase actief blijft en misschien ook gedeeltelijk polyphenolase.

Het feit dat toch de oxydatie door het alcoholische extract vrij gering is, komt waarschijnlijk, doordat er weinig waterstofperoxyde beschikbaar is, m.a.w. dat de polyphenolase ook min of meer door de alcohol is vergiftigd. Door het koken van het extract komt het koper uit de prosthetische groep vrij en kan in geioniseerde vorm aan de katalyse deelnemen. Daar zowel poly-

phenolase als ascorbinase beide Cu bezitten is het mogelijk, dat vrij veel koper vrijkomt, waardoor de oxydatie van ascorbinezuur een behoorlijke omvang kan aannemen.

Wachholder gelooft meer aan het inactief geraken van warmtelabiele remstoffen door het koken. Een dergelijke remstof voor de oxydatie van ascorbinezuur is o.a. glutathion en voorzover bekend ook carotine. De aanwezigheid van glutathion in theeblad is nog nooit onderzocht, maar carotine is zeker aanwezig.

Wat de oxydatie van ascorbinezuur door ascorbinase en zuurstof betreft, is deze volgens Huszak (73) reversibel. Men dacht eerst dat hetzelfde enzym ook voor de omgekeerde reactie zorg draagt. Dit werd nog in 1936 door Stewart & Stewart en in 1938 door Fujita & Numata ondersteund, maar Crook — 1941 — betwijfelde dit, omdat het hem gelukt is om de verantwoordelijke enzymen van elkaar te scheiden en te zuiveren. Crook & Morgan (27) — 1944 — vonden bij bloemkool, dat de reductie van dehydroascorbinezuur 4,5 maal zo groot is als de vorming van dehydroascorbinezuur, zodat het duidelijk is, dat de twee enzymen niet identiek zijn. Zij noemden het enzym voor de reductie reductase, wat nogal vaag is. Immers deze benaming kan ook voor andere reducties gelden.

Op grond van onze proeven en in combinatie met de resultaten van andere onderzoekers als Lamb, Deijs, Sreerangachar en Roberts hebben we een fermentatieschema samengesteld, hetgeen er als volgt uit ziet:

1 — ascorbinezuur + O_2 $\underset{\text{ascorbinase}}{\overset{\text{reductase}}{\rightleftarrows}}$ dehydroascorbinezuur + H_2O_2

2 — o-polyphenolen + O_2 $\underset{\text{polyphenolase}}{\overset{?}{\rightleftarrows}}$ o-chinonen + H_2O_2

3 — tanninen + (H_2O_2 en peroxydase) → chinonen

4 — ascorbinezuur + chinonen $\underset{\text{enzym ?}}{\rightarrow}$ dehydroascorbinezuur tanninen

5 — chinonen → condensatieproducten

Op grond van de aanwezigheid van ascorbinase en de grotere reductiecapaciteit van ascorbinezuur, kan worden aangenomen, dat de moleculaire zuurstof het eerst wordt opgenomen door het systeem ascorbinezuur en ascorbinase. Voor de omgekeerde reactie zou dan volgens Crook & Morgan (27) een ander enzym nl. reductase als katalysator optreden. Wanneer het

grootste deel van het ascorbinezuur geoxydeerd is, zal de redoxpotentiaal voldoende zijn gestegen, zodat andere stoffen met een hoger redoxpotentiaal door de moleculaire zuurstof kunnen korden geoxydeerd. In ons geval zullen de o-polyphenolen en polyphenolase met de zuurstof reageren. Het is mogelijk, dat ook deze reactie een omkeerbare reactie is, welke dus als een onderdeel van de gekoppelde oxydoreductieprocessen kan worden beschouwd.

Daar volgens de onderzoekingen van Roberts en ook Lamb tijdens de fermentatie veel meer zuurstof wordt opgenomen dan tijdens de normale ademhaling, zullen er veel meer chinonen worden gevormd, zodat niet alles door het ascorbinezuur wordt gereduceerd. Hierdoor zal de rest der chinonen, welke niet stabiel zijn, gaan condenseren. Bij de reductie van de chinonen door het ascorbinezuur kan waarschijnlijk ook een enzym als katalysator optreden.

De polyphenolase heeft een specifieke werking op de orthopolyphenolen. Lamb & Sreerangachar (91) deden proeven met amorphe tanninen, die zij zonder aanwezigheid van waterstofperoxyde kunnen oxyderen door toevoeging van een enzympreparaat uit theebladen. Waarschijnlijk kan de peroxydase, welke in het begin der onderzoekingen als het enzym voor de oxydatie der tanninen werd beschouwd, ook andere polyphenolen aantasten, o.a. meta- of parapolyphenolen.

Dat tijdens de fermentatie een duidelijk positief verband bestaat tussen de zuurtofopname en het tanninegehalte kan als volgt worden verklaard, dat tijdens de fermentatie door de intensievere blootstelling aan de lucht het aandeel van de polyphenolen in de zuurstofopname groter is geworden en daarbij de voornaamste rol speelt, doordat in thee een overmaat aan polyphenolen is.

Hierdoor worden er veel meer chinonen gevormd dan dat zij kunnen worden gereduceerd, zodat zij door hun labiele karakter gaan condenseren en daarbij de roodbruine kleur vormen, welke door sommigen aan phlobaphenen wordt toegeschreven.

Een andere belangrijke oxydatie, die nog niet behoorlijk onderzocht is, is de directe oxydatie van glucose tijdens de fermentatie. Sreerangachar (162) — 1941 — vond nl. dat een toevoeging van glucose zowel de zuurstofopname als de CO_2-afgifte doet toenemen.

Tijdens de normale ademhaling is het ademhalingsquotient gelijk aan 1, zodat er dus ook een indirect verband bestaat tussen de oxydatie der tanninen en de CO_2-afgifte, maar blijkens de proeven van Sreerangachar (164) bestaat er tijdens de fermentatie een dergelijk verband niet, doordat de beschadigde cel niet in staat is om CO_2 af te geven en doordat er voor de oxydatie der tanninen veel meer zuurstof nodig is.

HOOFDSTUK VI

WISKUNDIGE BEREKENING VAN DE FERMENTATIE-ACTIVITEIT EN VAN HET VERMOGEN VAN HET THEE-BLAD OM ASCORBINEZUUR TE OXYDEREN, TEN BEHOEVE VAN DE KWALITATIEVE-SELECTIE.

A — Inleiding.

De bepaling van de factoren, die verantwoordelijk zijn voor goede of een slechte kwaliteit van bijna elk landbouwkundig product, vormt steeds één van de meest subtiele en moeilijkste problemen. Nu is dit bij tabak, tarwe, aardappelen, katoen, druiven enz. reeds min of meer bepaald, maar men heeft daarbij meestal de nadruk gelegd op de grond, het klimaat, een bepaalde wijze van bewerking enz. en veel minder op het karakter van het product zelf. Hoewel men in de laatste tijd veel bereikt heeft met rasverbetering, is dit in de thee tot nu toe slechts beperkt tot de selectie van de factor voor productie, dus de kwantitatieve selectie. Men heeft echter in Ceylon opgemerkt, dat de struiken, die eerst op de kwantiteit waren geselecteerd, opmerkelijke verschillen vertonen wat betreft de kwaliteit. Er zijn bijv. struiken, die onder geen enkele omstandigheid willen fermenteren en die, welke reeds binnen één uur rollen gefermenteerd waren. Hieruit kunnen we concluderen, dat de factor(en) voor kwantiteit niet samengaat met die voor de kwaliteit.

Nu wordt in Ceylon de kwaliteit eerst beoordeeld, nadat de bladen van elke struik met gebruikmaking van een micromethode zijn bereid. Men bedoelt dus met kwaliteit de beoordeling van de zwarte thee en daar de wijze van bereiding verschillend kan zijn, kan de beoordeling van dezelfde struik zeer verschillend zijn. We moeten dus onderscheid maken tussen de potentiële kwaliteit, die het verse blad van de tuin meekrijgt en de kwaliteit, die na de bereiding verkregen wordt.

Om deze twee verschillende begrippen niet te verwarren, stellen we de volgende indeling voor:

1. potentiële kwaliteit d.i. het vermogen van het blad om de eindbeoordeling zo gunstig mogelijk te doen uitvallen. Dit wordt dan bepaald door het type, ouderdom, bemesting, snoei enz.

2. kwaliteit van het eindproduct, d.i. het eindresultaat, dat door de bereiding wordt verkregen. Dit wordt o.a. bepaald door fouten in de verschillende phasen van de bereiding en door de markt.

De toegepaste micromethode is voor de kwalitatieve selectie minder geschikt, daar zowel bereidings- als beoordelingsfouten in de eindconclusie worden opgenomen, zodat eenzelfde struik verschillend kan worden beoordeeld. Het zou dus voor de kwalitatieve selectie ideaal zijn, indien deze op een objectieve basis kan worden gefundeerd n.l. door de wiskundige berekening van de fermentatieactiviteit, daar deze grootheid parallel loopt met de potentiële kwaliteit. Het gemis van een objectieve beoordeling werd reeds heel vroeg aangevoeld, want reeds in 1910 heeft Hope (71) geprobeerd een verband te zoeken tussen de kwaliteit van het eindproduct en bepaalde chemische stoffen, als tannine, totale oplosbare gedeelte enz., maar hij kon begrijpelijkerwijs niets vinden. Immers in de prijs is niet alleen de invloed van de markt opgenomen, maar er schuilen ook fabricagefouten in. Deze onderzoekingen werden later door Deuss (32) uitgebreid, maar door dezelfde fouten waren de resultaten nihil.

De theorie van Sprecher von Bernegg (167) — 1936 —, dat er wel geen verband zal bestaan tussen minerale stoffen en de kwaliteit is slechts ten deele juist. Het klinkt in elk geval voorbarig; immers hij baseerde deze conclusie op foutieve proeven, zodat hierover nog niet het laatste woord is gezegd.

Nu hebben we in de vorige hoofdstukken steeds weer opgemerkt, dat de potentiële kwaliteit samen gaat met een actieve fermentatie, zodat het voor de kwalitatieve selectie van groot belang zal zijn, indien het ons zal lukken deze fermentatieactiviteit wiskundig vast te leggen.

Het meest voor de hand liggend echter is de berekening van de reactieconstante. Een bezwaar is echter, dat deze voor zulk een gecompliceerde reactie als de fermentatie niet is te berekenen, daar we de concentratie na een tijd t niet kunnen berekenen. Geheel anders wordt het, wanneer we de reactieconstanten gaan bepalen van de oxydatie van ascorbinezuur.

Daar de zuurstof steeds in overmaat aanwezig is kan de oxydatie van ascorbinezuur als een monomoleculaire reactie worden beschouwd.

Dan is de formule voor de reactieconstante

$$K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a - x}$$

waarbij t = de tijd
a = de beginconcentratie van ascorbinezuur in mol/L
x = de concentratie van geoxydeerd ascorbinezuur in mol/L na een tijd t.

Als voorbeeld zullen we de oxydatiecurve van P + 2 en die van P 3, nemen, zoals deze op fig. 17 wordt voorgesteld.

De beginconcentratie a is 15 mg/100 cc H_2O = 150 mg/L = 0,852 mol/L (mol. gew. ascorbinezuur is 176).

Na 15 min. was er 2,07 ascorbinezuur geoxydeerd. Dus x = $\frac{20,7}{176}$ mol/L = 0,118 mol/L.

$$K = \frac{1}{15 \times 60} \ln \frac{0,852}{0,734} \frac{1}{900} \frac{\lg 1,161}{0,4343} = 0,00016$$

Op dezelfde manier was K na 30 min. 0,00024 en na 45 min. 0,00021. De gemiddelde K met 10^5 vermenigvuldigd, was voor P + 2 en voor P3 respectievelijk 20,3 en 17,0.

P3, die een kleiner vermogen bezit om ascorbinezuur te oxyderen, heeft dus duidelijk een geringere gemiddelde reactieconstante.

Daar de gemiddelde reactieconstante slechts bepaald werd uit drie waarnemingen, mogen we geen grote waarde hechten aan de gemiddelde reactieconstante. Passen we de formules van van Uven toe voor de gemiddelde fout, dan wordt de gemiddelde reactieconstante

$$K \times 10^5 = 20,3 \pm 3,3.$$

De gemiddelde fout is dus te groot om de reactieconstante als vergelijkingsmateriaal te gebruiken, zodat deze berekening voor de praktijk geen waarde heeft.

B — De toepassing van de rechtlijnige vereffening op het vermogen van het blad om ascorbinezuur te oxyderen.

We hebben als voorbeeld de oxydatiecurve van een P + 2 (fig. 15) genomen. Door logarithmering van de hoeveelheid geoxydeerde ascorbinezuur en van de tijd, wordt de oxydatiecurve in een rechtlijnige veranderd. Voor de berekening van de mate van oxydatie werd dan de formule van van Uven voor de rechtlijnige y = mx + q toegepast met de beperking, dat één reeks der waarnemingen zonder fouten zijn gemaakt n.l. de tijd. Stel de gelogarithmeerde tijd is x en de gelogarithmeerde hoeveelheid geoxydeerd ascorbinezuur is y, dan wordt na middeling der waarnemingen, van elke waarneming het verschil met de gemiddelde waarneming berekend, dus u = x — X en v = y — Y, waarbij de gemiddelde waarneming dan door een hoofdletter wordt voorgesteld.

Vervolgens worden dan de volgende formules toegepast:

$$M = \frac{(guv)}{(guu)} \qquad Q = Y - MX$$

De gemiddelde fout: $\sigma^2 = \dfrac{(gvv) - \dfrac{(guv)^2}{(guu)}}{n\text{-}2}$

$$\sigma^2_M = \frac{\sigma^2}{(guu)} \qquad \sigma^2_Q = \frac{\sigma^2}{(gvv)}$$

Hierbij is (guu) bijv. de som van guu's en g is de schaal en dat is hier 1.

Voor deze P + 2 is: $M = 0{,}48 \pm 0{,}003$
$Q = 0{,}27 \pm 0{,}013$

Om na te gaan hoe deze twee waarden zich gedragen, wanneer het vermogen van het blad om ascorbinezuur te oxyderen bijv. kleiner wordt, wordt van een andere P + 2 (fig. 17) de beide waarden berekend.

$M = 0{,}61 \pm 0{,}005$
$Q = 0{,}009 \pm 0{,}014$

Het kleine aantal waarnemingen maakt dat de cijfers weinig waarde hebben, wat ook te zien is aan vrij grote fouten, die we daarbij maken. Desondanks kunnen we concluderen, dat een kleiner vermogen van het blad om ascorbinezuur te oxyderen samengaat met een stijging van de M en een daling van de Q. Daar de mate van oxydatie door beide cijfers wordt bepaald, zijn we gedwongen om voor de kwalitatieve selectie beide cijfers te aanvaarden, waardoor deze methodiek minder geschikt is. Een ander nadeel is, dat de oxydatie van ascorbinezuur slechts een onderdeel van de totale fermentatie is en daardoor te riskant is om de fermentatie door deze oxydatie te bepalen.

C — De toepassing van de rechtlijnige verefening op de electrometrische fermentatiecurve.

De toepassing van dezelfde formule op de electrometrische fermentatiecurve heeft dit voordeel dat er meer waarnemingen zijn verricht, waardoor de cijfers meer representatief zijn en beter als vergelijkingsmateriaal kunnen dienen.

Als voorbeeld nemen we de fermentatiecurve van een Peccoblad van fig. 9. We zullen hiervan de gehele berekening laten volgen, daar deze methode, zoals straks blijken zal, van groot nut kan zijn voor de kwalitatieve selectie.

tijd	log tijd x	E_h	log E_h y	u	v	guu	guv	gvv
5 min.	0,699	280	2,447	-0,517	-0,019	0,267	0,0090	0,00040
10 min.	1,000	288,5	2,460	-0,216	-0,006	0,047	0,0010	0,00003
25 min.	1,301	297,5	2,472	0,085	0,006	0,007	0,0005	0,00003
30 min.	1,477	298,5	2,475	0,261	0,009	0,068	0,0015	0,00008
40 min.	1,602	299,5	2,476	0,386	0,010	0,149	0,0040	0,00010

$$X = \frac{(x)}{n} = 1{,}216$$

$y = 2{,}466$
$(guu) = 0{,}538$
$(guv) = 0{,}016$
$(gvv) = 0{,}00064$

(voor nadere gegevens zie: Mathematical Treatment — M. J. van Uven)

$M = 0{,}029 \pm 0{,}0004$
$Q = 2{,}433 \pm 0{,}313$

De gelogarithmeerde electrometrische fermentatiecurve stellen we ons voor als een rechte lijn $y = Mx + Q$, waarbij M de tangens is van de hoek, die deze rechte met de abscis maakt, terwijl Q de afstand is tussen het snijpunt der rechte met de ordinaat en het nulpunt. Hieruit kunnen we duidelijk zien, dat Q de hoogte der rechte lijn bepaalt, terwijl M juist de steilheid der rechte lijn, dus de fermentatieactiviteit voorstelt. Nu wordt Q behalve door de kwaliteit veel meer beinvloed door andere factoren als pH en concentratie en deze kunnen we dus weglaten, waardoor de berekening eenvoudiger wordt. Daarom menen we, dat M voldoende is, om de potentiële kwaliteit te bepalen, wat voor de praktijk van veel nut kan zijn.

Nu zal M evenredig stijgen, naar gelang de fermentatieactiviteit groter wordt, dus naar gelang het blad jonger is.

We kunnen hieruit de conclusie trekken, dat de potentiële kwaliteit door M kan worden bepaald.

Dit onderzoek zou vollediger geweest zijn, indien door de oorlogsomstandigheden geen schade was toegebracht aan ons plantmateriaal, want dan zouden we met behulp van deze methode de potentiële kwaliteit van een gehele struik kunnen bepalen en ook hoeveel bladen we daarvoor per struik nodig hebben. Het is van groot belang, wanneer dit alsnog door onderzoekers ter hand wordt genomen.

SLOTBESCHOUWING.

De electrometrische methode, welke door ons is toegepast, heeft voor het onderzoek van de theefermentatie veel nut gehad. We zijn van mening, dat deze methode ook voor verder onderzoek bij andere oxydaties goede diensten zou kunnen bewijzen. Een moeilijkheid is, dat reeds kleine verschillen als de vorm en grootte van de electrode, de diameter van agarbrug en opstelling der instrumenten van invloed kunnen zijn op de potentiaal of de nauwkeurigheid van de meting. Na enig vooronderzoek is het gebleken, dat een plaatelectrode beter is dan een draadelectrode. Vervolgens moet de agarbrug een diameter hebben van ongeveer 3,8 mm, daar een nauwere agarbrug sneller moet worden vernieuwd, het redoxvat moet een enigszins puntvormige bodem hebben en de luchtbuis moet niet te dicht bij de electrode worden opgehangen Voor het verkrijgen van vergelijkbare cijfers moeten we ons dus zoveel mogelijk houden aan deze standaardisatie. In elk geval moeten de instrumenten uniform zijn.

De bladen van een lootje kunnen van pH verschillen, waarbij de oudere bladen meestal een lagere pH bezitten dan de jongere. Zo bezit Pecco een pH van bijv. 5,56 en het derde blad van hetzelfde lootje een pH van 4,05. Hoewel een verschil van 1 pH een verschil kan veroorzaken van 58 mV. (Bij het stijgen van 1 pH, daalt de potentiaal met 58 mV.), was het verloop der curves vrijwel gelijk, alleen liggen de curves hoger of lager. Daar er slechts weinig invloed op het verloop is te bespeuren en mede op grond van de bevindingen van Hewitt, hebben we de toevoeging van een buffer achterwege gelaten.

De temperatuur heeft echter een invloed op de reactie zelf, zodat het van groot belang is om de temperatuur gelijk te houden en indien dit niet kan, de temperatuur, waaronder men gewerkt heeft, te vermelden.

De aëratie heeft ook een invloed op de reactie, zodat we steeds gefermenteerd hebben met ± 200 luchtbellen per minuut.

Wat de resultaten van het onderzoek zelf betreft, lijkt het ons het beste deze in drie groepen te verdelen, daar zij drie verschillende terreinen beslaan. Deze verdeling heeft nog meer zin, doordat we in de inleiding drie op de voorgrond tredende vragen hebben gesteld:

A — De invloed van de aard der bladen en de verschillende phasen van de bereiding op de fermentatie kunnen we als volgt samenvatten:

Pecco fermenteert actiever en sneller dan oudere bladen, terwijl het derde blad door het relatief grotere gehalte aan substaten veel langzamer en minder actief fermenteert dan de jongere bladen.

Vergelijken we deze resultaten met kwaliteitsverschillen van de bladen onderling, dan kunnen we een parallel trekken tussen de potentiële kwaliteit en de fermentatieactiviteit.

Het doel van de bereiding moet dus zoveel mogelijk gericht zijn op het behoud van de fermentatieactiviteit. Uit onze onderzoekingen is gebleken, dat de oxydatie van ascorbinezuur en vooral die van de o-polyphenolen de fermentatie voor een belangrijk deel bepalen, zodat we de fermentatieactiviteit voor een deel kunnen terugbrengen op de oxydatie-activiteit ten aanzien van ascorbinezuur en polyphenolen.

We hebben nagegaan welke factoren de oxydatie van ascorbinezuur, kunnen beinvloeden en vonden, dat o.a. kleine hoeveelheden geioniseerd Cu en Fe de oxydatie kunnen activeren. Een andere mogelijkheid is waarschijnlijk de belichting met ultra-violette stralen.

Hoewel we deze proef niet hebben opgezet, willen we hierbij naar de onderzoekingen van Guillemet verwijzen, wien het gelukt is om door middel van ultra-violette stralen de oxydatie van ascorbinezuur op te voeren. Hij verklaarde deze activering, door aan te nemen, dat de stralen de zuurstof in ozon zouden hebben omgezet.

De vraag is nu of ozon ook op de oxydatie van o-polyphenolen een activerende invloed heeft. Deze vraag kunnen we echter niet beantwoorden, daar er in de literatuur hierover niets bekend is.

In de theeliteratuur is het bekend, dat in 1913 Bosscha en Maurenbrecher (15) hebben nagegaan, wat de invloed zou zijn van looizuur op de prijs van het eindproduct. Het blad werd na het verflenzen fijngehakt en vervolgens werden dan vergeleken:

a — 100 gram thee plus 50 cc gedestilleerd water
b — 100 „ „ „ 50 cc 1 % tannineoplossing
c — 100 „ „ „ 50 cc 2 % „

Daarna werd de massa gedurende 1 uur gefermenteerd, gedroogd en vervolgens ter beoordeling opgezonden naar Edwards, een in dien tijd bekende thee-expert in Batavia. Deze vond, dat b en c van beter kwaliteit zijn dan a.

Dit bracht Bosscha en Maurenbrecher op het idee om de proef nogmaals, maar dan in het groot, te herhalen.

120 kg blad werd na het verflenzen gerold met 600 g tannine. Na het fermenteren en drogen werd het eindresultaat met een blanco proef vergeleken. Hoewel er volgens de cijfers, welke door Edwards werden gegeven, weinig positieve verschillen

waren, meenden de onderzoekers de conclusie te kunnen trekken, dat thee met toegevoegde tannine beter is.

Dat de proef in feite zo goed als niets heeft opgeleverd, wordt dan ook het beste geillustreerd door het feit, dat de proef noch door hen noch door andere onderzoekers werd herhaald.

Ons inziens zou de proef heel wat betere resultaten hebben opgebracht, indien bij de tweede proef van Bosscha en Maurenbrecher de bladen niet werden gerold, maar fijngehakt, desnoods met toevoeging van water. Waarschijnlijk zouden ze al betere resultaten hebben gehad, indien zij er naar gestreefd hadden om zoveel mogelijk „brokens" te produceren. Door het rollen worden de tanninen en de enzymen niet voldoende gedispergeerd, want volgens Deijs (part. mededeling) zit de polyphenolase tamelijk vast aan de celdeeltjes. De tannine zou dan pas goed geoxydeerd kunnen worden, indien de bladen werden fijngehakt en goed gerold.

Een andere mogelijkheid ter activering van de oxydatie der polyphenolen is waarschijnlijk de toevoeging van geioniseerd Cu, want evenals de ascorbinase bezit dit enzym Cu in de prosthetische groep. Hoewel Sreerangachar (116) het tegensprak, is het Kubowitz (85) gelukt om de oxydatie der polyphenolen door toevoeging van geioniseerd Cu te activeren.

In plaats van geioniseerd Cu zouden we ook de specifieke enzymen kunnen toevoegen of anders remplacanten ervan. Zo is het door de onderzoekingen van Lampitt en Clayson (99) bekend, dat een mengsel van geioniseerd Cu, Ca $(HCO_3)_2$ en een alkaliphosphaat dezelfde werking bezit als ascorbinezuuroxydase. Verder kunnen Cl-, Br- en J-ionen een inducerende werking uitoefenen op de oxydatie van ascorbinezuur.

Hoe deze ionen op de oxydatie der polyphenolen reageren is echter niet bekend.

Wat de invloed van de verschillende phasen van de bereiding op de fermentatie betreft, lopen de resultaten parallel met de wenken, die in de praktijk worden gegeven.

Een goede verflenzing is van zeer groot belang voor het behoud van de fermentatieactiviteit, want deze wordt niet alleen groter, maar ook de fermentatieduur neemt door de verflenzing af. De invloed van de verflenzing op de fermentatieactiviteit wordt relatief minder bij zwaardere verflenzing. Daar een goede flensgraad van groot belang is voor een goede rolling der bladen, mogen we geen al te zware verflenzing toepassen, daar anders de bladen te droog worden, zodat veel „plat stuk" ontstaat, dat slecht fermenteert en een dunne schenk geeft.

Wat het rollen betreft, kunnen we concluderen, dat de fermentatieactiviteit en parallel hiermee de potentiële kwaliteit, zoveel mogelijk wordt behouden, indien de bladen zo goed

mogelijk worden gekneud, daar door een dergelijke handelwijze relatief meer substraten en enzymen aan de lucht worden blootgesteld.

We kunnen in de praktijk echter niet onbegrensd gaan rollen, daar te kleine sortaties niet door den consument worden geapprecieerd. Het produceren van „brokens" heeft het voordeel, dat de fermentatieactiviteit beter wordt behouden dan bij bladtheeën, terwijl de sortatie groot genoeg is en geen hinder vormt bij het drinken. Het produceren van „brokens" moet men trachten te bereiken door veel keren te rollen met korte roltijden. Te lange roltijden hebben het nadeel dat door de mechanische wrijving de temperatuur van de massa te hoog wordt, waardoor de fermentatieactiviteit ongunstig wordt beinvloed.

Tijdens de volgende phase van de bereiding n.l. de fermentatie, is de temperatuur, de airconditioning en de relatieve vochtigheid van groot belang. Zo hebben we de optimum temperatuur geschat op ongeveer 26° C welke overeenkomt met de optimumtemperatuur van „onoplosbare enzymen", welke door Sreerangachar (163) werd gevonden. Het is mogelijk, dat de polyphenolase en ascorbinase tot deze onoplosbare enzymen behoren, daar het bekend is, dat deze enzymen tamelijk vast aan de celdeeltjes zitten.

Wat de invloed van de aëratie betreft, kunnen we aannemen, dat deze relatief minder wordt naarmate de aëratie groter wordt, m.a.w. een goede luchtverversing heeft een gunstige invloed op de fermentatieactiviteit, maar een te snelle luchtverversing is niet aan te bevelen, daar deze een drogende werking heeft op de natte fermenterende massa, waardoor de fermentatie onregelmatig plaat vindt.

Welke graad van aëratie in de praktijk het beste is, zal in de fabriek zelf moeten worden beslist, als men daarbij maar steeds er voor zorgt, dat de relatieve vochtigheid niet te laag wordt, bijv. zoveel mogelijk boven de 90 % (zie Enquête fermentatie).

Wat de spreiddikte betreft, moet men er voor zorgen, dat de oxydatie zo goed mogelijk plaats kan vinden; zo zullen grovere deeltjes dikker mogen worden uitgespreid dan kleinere deeltjes. Over het algemeen moet een dunne spreiddikte juist worden geacht. We geloven niet, dat een woeling der bladen ongunstig op de fermentatieactiviteit werkt, integendeel een regelmatige woeling zal zelfs aen gunstige invloed hebben.

Wat het fermenteren in schemerdonkere ruimten betreft, bestaat er in de laatste tijd een neiging om aan te nemen, dat licht geen invloed zal hebben op de fermentatie, daar er toch geen fotosynthese meer optreedt. We hebben in hoofdstuk 5 aangetoond, dat de fermentatieactiviteit waarschijnlijk voor een groot deel door de oxydatieactiviteit van ascorbinezuur en o-polyphenolen wordt bepaald. Volgens Guillemet kan de oxydatie

van ascorbinezuur door ultraviolette stralen worden geactiveerd, waarbij de zuurstof door deze stralen tot ozon zou zijn geactiveerd. Het is niet onmogelijk dat ook de oxydatie van o-polyphenolen door dezelfde stralen wordt geactiveerd. In dat geval heeft licht, in het bijzonder ultra-violet licht, dus toch wel invloed op de fermentatieactiviteit.

B — De tweede vraag, die wij in de inleiding hebben gesteld, heeft betrekking op het systeem of de systemen, die zuurstof opnemen.

Er bestaan nl. hierover drie verschillende meningen. Zo heeft Roberts (130) in 1939 beweerd, dat de zuurstof door het ascorbinezuursysteem wordt opgenomen. In 1940 echter heeft hij zijn eerste theorie verworpen,

a. doordat toevoeging van ascorbinezuur in het begin van de fermentatie geen directe verhoging van de zuurstofopname heeft teweeggebracht. Hij concludeerde hieruit, dat er dus geen ascorbinase aanwezig was, want anders zou er wel een vergroting van de zuurstofopname per tijdseenheid hebben plaats gevonden. Deze redenering is o.i. niet juist, want de toename van de zuurstofopname per tijdseenheid zou alleen kunnen plaats vinden, indien de ascorbinezuurconcentratie de beperkende factor was. Blijkbaar is dit niet het geval. We nemen dan ook aan, dat het enzym ascorbinase de mate der zuurstofopname per tijdseenheid kan bepalen.

   Het door Roberts geconstateerde feit slaat dus niet op de vraag of er ascorbinase aanwezig is, maar geeft slechts aan, dat de hoeveelheid ascorbinase niet veranderd is. Immers Roberts heeft geen enzym aan fermentereende thee gegeven, maar het substraat ascorbinezuur. Daar het ascorbinezuur één der sterkste reductiemiddelen in de natuur is, zal dus eerst het grootste deel van dit zuur moeten worden geoxydeerd, voordat andere reacties kunnen plaats vinden, m.a.w. ook de bruinkleuring zal worden uitgesteld.

   Electrometrisch gezien, zal de redoxpotentiaal van de fermenterende thee na toevoeging van ascorbinezuur niet direct stijgen, maar eerst vrijwel horizontaal verlopen.

b. doordat bij de fermentatie een verband bestaat tussen het tanninegehalte en de zuurstofopname, welke volgens Roberts afwezig zou zijn indien het theeblad ascorbinezuur zou bevatten. Ook deze redenering is niet juist, want deze waarneming wijst o.i. op het feit, dat de tanninen ook door de moleculaire zuurstof kunnen worden geoxydeerd, waarbij polyphenolase het specifieke enzym is. De oxydatie van de tanninen kan dus best naast een andere oxydatie plaats vinden of anders vlak achter een andere.

Inplaats van ascorbinezuur-ascorbinase, dacht Roberts (134) aan cytochroom of een soortgelijk werkend systeem en baseerde zijn mening op de volgende gronden:

a. een grotere zuurstof-spanning heeft een grotere zuurstofopname veroorzaakt. Deze conclusie slaat o.i. ook op ascorbinezuuroxydatie. Trouwens Sreerangachar (162) heeft deze bewering van Roberts weerlegd, door een proef van Green (162) aan te voeren, waarbij het gebleken is, dat een grotere zuurstofspanning juist geen activering van de oxydatie van Ferro-cytochroom veroorzaakt.
b. De theeoxydase oxydeert meer dan één systeem nl. ascorbinezuur en polyphenolen, zodat deze niet specifieke werking volgens Roberts moet berusten op de aanwezigheid van cytochroom. Het feit dat meer dan één substraat geoxydeerd wordt, wil echter niet zeggen, dat er maar één oxydase of dehydrogenase aanwezig is. Er kan heel goed zowel ascorbinase als polyphenolase aanwezig zijn.
c. Roberts (135) vond, dat toevoeging van CO in het donker een vermindering van de zuurstofopname veroorzaakt. Lamb c.s. (91) die deze proef heeft herhaald, kon dit echter niet beamen.

Eén der sterkste argumenten tegen de aanwezigheid van cytochroom is, dat Sreerangachar niet het typische spectrum van cytochroom-c kon vinden. Wanneer deze cytochroom-theorie wegvalt, blijven er nog twee meningen over de zuurstofopname tijdens de fermentatie bestaan nl. de eerste theorie van Roberts, dat de zuurstof door ascorbinezuur wordt opgenomen en ten tweede de mening van Lamb en Sreerangachar, dat de zuurstof wordt opgenomen door de o-polyphenolen. Is er geen ascorbinase aanwezig, dan wordt de zuurstof in hoofdzaak door de o-polyphenolen opgnomen. De gevormde chinonen zullen dan worden gereduceerd door het ascorbinezuur. Is er wel ascorbinase aanwezig, dan wordt de zuurstof door het sterker reducerende ascorbinezuur opgenomen. Het onderzoek naar de aanwezigheid van dit enzym is dus van doorslaggevende betekenis. Door toepassing van de methode van Wachholder, waarbij gebruik is gemaakt van enige rem- en activeringsstoffen, hebben we gevonden dat ascorbinase in het theeblad voorkomt.

De conclusie is gebaseed op de bewering van Wachholder, dat wanneer er ascorbinase aanwezig is, de werking van polyphenolase op de achtergrond geraakt. Daar toevoeging van pyrocatechol (o-polyphenol) geen toename van de oxydatie van ascorbinezuur heeft veroorzaakt, hebben we, gebruikmakende van de conclusie van Wachholder, aangenomen, dat er in het theeblad ascorbinase aanwezig moet zijn. We moeten toegeven, dat deze conclusie niet op sterke gronden staat, ten eerste omdat het ris-

kant is om op een negatief bewijs de aanwezigheid van een stof te bewijzen en ten tweede omdat er in het theeblad een overmaat van tanninen voorkomt, zodat de toevoeging van een polyphenol wel geen merkbare verandering zal teweeg brengen. Hier zij echter opgemerkt, dat peroxydase, die ook de tanninen oxydeert, hoewel met waterstofperoxyde, min of meer in dezelfde positie verkeert als polyphenolase en desondanks heeft toevoeging van vanilline een vermeerdering van de oxydatie van ascorbinezuur veroorzaakt. We kunnen dit verschil in oxydatie, hoewel vrij klein, niet als proeffout beschouwen.

We geloven dan ook, dan de conclusie van Wachholder niet van alle grond ontbloot is. We kunnen concluderen, dat in het theeblad ascorbinase, polyphenolase en peroxydase aanwezig is, die allen direct of indirect een katalytische invloed hebben op de oxydatie van ascorbinezuur.

In verband hiermee bestaat er geen bezwaar om de beide overgebleven meningen betreffende de zuurstofopname met elkaar te combineren, welke combinatie we als volgt hebben geschematiseerd:

1 — ascorbinezuur + O_2 $\underset{\text{ascorbinase (Huszák)}}{\overset{\text{reductase (Crook)}}{\rightleftarrows}}$ dehydroascorbinezuur + H_2O_2

2 — o-polyphenolen + O_2 $\overset{?}{\underset{\text{polyphenolase}}{\rightleftarrows}}$ o-chinonen + H_2O_2

3 — tanninen + (H_2O_2 en peroxydase) → chinonen

4 — ascorbinezuur + chinonen → dehydroascorbinezuur + tannine

5 — chinonen $\xrightarrow{\text{enzym?}}$ condensatieproducten

enz.

De oxydatie van ascorbinezuur geniet bij de zuurstofopname de voorrang, daar het zuur een sterker reducerend vermogen bezit dan de o-polyphenolen en deze oxydatie, welke volgens Huszák reversibel is, wordt door ascorbinase gekatalyseerd. Naar aanleiding van de onderzoekingen van Crook en Morgan, die beweren, dat de omgekeerde reactie gekatalyseerd wordt door reductase en niet door ascorbinase, hebben we gemeend, dat een ander enzym voor de reversibele reactie zorgdraagt. De naam reductase is ons inziens ongelukkig gekozen, daar deze naam eventueel ook voor de katalysator van andere reducties kan worden toegepast. De tweede reactie is die van de oxydatie der o-polyphenolen, welke door polyphenolase wordt gekatalyseerd.

De polyphenolase katalyseert echter slechts de oxydatie van orthopolyphenolen en daar het gehalte aan amorphe tanninen, welke ook o-polyphenolen zijn, groter is dan dat aan andere tanninen, mogen we aannemen, dat bij deze oxydatie hoofdzakelijk de amorphe tanninen worden geoxydeerd. De andere tanninen en mogelijk ook de para-polyphenolen worden dan door peroxydase en waterstofperoxydase geoxydeerd tot chinonen.

Door de kneuzing wordt de inhoud der cellen intensiever aan de lucht blootgesteld, waardoor per tijdseenheid meer substraten worden geoxydeerd. Uit de electrometrische fermentatie-curve welke een oxydatie voorstelt, kunnen we concluderen, dat door de kneuzing de enzymen, welke de reductie katalyseren, inactief zijn geworden. Dit heeft tot gevolg, dat de gevormde chinonen niet of slechts gedeeltelijk worden gereduceerd, waardoor de overige chinonen door hun labiele karakter gaan condenseren.

C — De laatste vraag betreft de mogelijkheid of de fermentatie ten behoeve van de kwalitatieve selectie wiskundig kan worden vastgesteld. We hebben zowel in hoofdstuk 4 als 5 gevonden, dat er een verband bestaat tussen de potentiële kwaliteit, d.i. de kwaliteit van het onbereide blad en de fermentatieaciviteit. Deze conclusie is van groot belang voor de kwalitatieve selectie, immers bij de tegenwoordig gevolgde methode bestaat er geen objectieve beoordeling van de kwaliteit.

De fermentatieactiviteit wordt in ons onderzoek voorgesteld door de helling van de electrometrische fermentatiecurve en stelt voor de hoeveelheid electronen, welke bij de oxydaties per tijdseenheid worden vrijgegeven en welke met behulp van een potentiometer in millivolts kan worden bepaald.

We willen hierbij opmerken, dat er een verschil is tussen de fermentatieactiviteit en de fermentatieduur. De laatste immers stelt de tijd voor, die nodig is totdat de redoxpotentiaal der fermentatie niet of bijna niet meer stijgt.

Door logarithmering van de potentiaal op de ordinaat en de tijd (in minuten uitgedrukt) op de abscis, verandert de gebogen fermentatiecurve in een rechte lijn $y = mx + q$. Door toepassing van de formules voor de rechtlijnige vereffening, welke door van Uven in zijn „Mathematical treatment of agriculture results" zijn weergegeven, werd de gemiddelde m of M berekend en deze grootheid stelt de tangens van de hoek van de rechte lijn met de abscis voor. Deze M is dus een waardemeter van de fermentatieactiviteit. De andere grootheid q kunnen we weglaten, daar deze behalve door de fermentatieactiviteit veel meer nog door de pH en de concentratie van de bladsuspensie wordt bepaald.

Door berekening van de M van verschillende bladen van een heeloot, hebben we gevonden, dat er een positief verband be-

staat tussen de M en de potentiële kwaliteit. Het is bekend, dat de microbereiding voor de kwalitatieve selectie haar bezwaren heeft, zoals de subjectieve beoordeling van de bereide thee, de tijd, die nodig is om de thee te bereiden en die ongeveer een dag kan duren en tenslotte het feit, dat de micromethode de kwaliteit van het eindproduct en niet de potentiële kwaliteit bepaalt. Immers in de kwaliteit van het eindproduct worden ook verschillen van de microbereiding opgenomen, waardoor er vrij veel kans bestaat, dat er fouten worden gemaakt.

De bepaling van de M heeft als voordelen, dat de bepaling ten eerste objectief plaats vindt, dat ten tweede de potentiële kwaliteit wordt bepaald en ten derde de korte tijd van ongeveer een uur, die nodig is om het blad fijn te wrijven, te fermenteren en om de M te berekenen.

We hebben reeds in ons vooronderzoek gewezen op de bezwaren bij het gebruik van meer redoxvaten, daar er vaak verschillen in de te meten potentiaal ontstaan, wanneer de instrumenten enigszins verschillen. Daardoor hebben de waarden van M slechts waarde voor één en dezelfde redoxvat en indirect voor één en dezelfde onderneming.

Willen we toch een batterij van meer redoxvaten gebruiken, dan dienen we er voor te zorgen, dat zowel de instrumenten als de wijze van opstelling zoveel mogelijk gelijk zijn. Verder dienen we steeds dezelfde concentratie van de bladsuspensie te nemen en pas wanneer de redoxcurve van gelijke bladsuspensies in de verschillende redoxvaten gelijk is, dan kunnen we er toe overgaan een dergelijke batterij te gaan gebruiken. Deze methode heeft het voordeel, dat er per dag meer struiken kunnen worden onderzocht.

We dienen echter allereerst te onderzoeken hoeveel bladen we van een struik moeten nemen om de potentiële kwaliteit van de gehele struik te kunnen bepalen. Door oorlogsomstandigheden, waardoor in de kas van het laboratorium van tropische landbouwplantenteelt verschillende theestruiken zijn vernield, hebben we door gebrek aan plantenmateriaal dit onderzoek helaas moeten staken.

SAMENVATTING.

Het doel van ons onderzoek was om

1o — een verband op te sporen tussen enerzijds de fermentatie en anderzijds de ouderdom der theebladen, de flensgraad, de temperatuur en de mate van luchtverversing, daar bekend is, dat de fermentatie van groot belang is voor de uiteindelijke kwaliteit.

2o — vast te stellen, welke enzymen een rol spelen bij de oxydatie van ascorbinezuur in het theeblad en hoe de moleculaire zuurstof wordt opgenomen; er bestaan hierover drie verschillende theorieën.

3o — na te gaan of de fermentatie ten behoeve van de kwalitatieve selectie wiskundig kan worden vastgelegd.

Wij werkten een methode uit, die geschikt is om de fermentatie van één afzonderlijk blad te onderzoeken, nl. de bepaling van de redoxpotentiaal, die vrij eenvoudig is en nog niet bij het theeonderzoek is toegepast. In ons vooronderzoek is gebleken, dat we de vorm en grootte der instrumenten, de plaatsing der verschillende onderdelen in het redoxvat en de wijze van voorbehandeling van de platinaelectrode zoveel mogelijk gelijk moeten houden, daar kleine verschillen reeds afwijkingen kunnen veroorzaken.

Wij gebruikten een redoxvat met een enigszins puntvormige bodem, een platina-plaat-electrode en een agarbrug met een diameter van 3,8 mm. Als potentiometer gebruikten we een ionometer van Lautenschläger. Wij onderscheidden de potentiele kwaliteit van het verse blad en de kwaliteit van de zwarte thee.

We hebben eerst door potentiometrische titratie het gehalte aan ascorbinezuur in verschillende theebladen bepaald en vonden, dat Pecco relatief meer ascorbinezuur bezit dan oudere bladen. Gemiddeld over tien loten van een zelfde struik vonden we, dat Pecco per gram nat blad 1,25 mg ascorbinezuur bezit en de andere bladen respectievelijk 1,16 mg, 1,15 mg en 1,09 mg. Hoewel de gemiddelde fout bij deze proef vrij groot is, ondersteunen de cijfers bovengenoemde conclusie.

Het potentiometrisch onderzoek van de theefermentatie moest onder water geschieden onder doorleiding van lucht. Deze omstandigheden wijken van de normale in de fabriek af. De fermentatieduur blijkt korter te zijn, naarmate de concentratie van de bladsuspensie kleiner is. We verklaarden dit door een betere dispergering van co-enzymen en de substraten, waardoor een actievere fermentatie wordt veroorzaakt.

Door het geheel fijnwrijven der bladen zal de fermentatie vollediger plaats vinden, wat aan het onderzoek ten goede komt. Door toepassing van deze potentiometriche methode hebben we het volgende aangetoond:

1 — Pecco fermenteert actiever dan oudere bladen. Het is bekend dat Pecco van beter kwaliteit is dan oudere bladen.
2 — Naarmate het blad zwaarder verflenst wordt is de fermentatie actiever en van korteren duur.
3 — De optimum temperatuur voor de fermentatie wordt door ons op ongeveer 26° C geschat.
4 — Hoe beter de aëratie, hoe actiever de fermentatie zal zijn, hoewel de gunstige invloed bij sterkere aëratie relatief minder wordt.
5 — De fermentatie activiteit wordt bepaald door de mate van kneuzing, d.w.z. de fermentatie zal actiever plaats vinden bij een zwaardere kneuzing.
6 — Het ascorbinezuur wordt eerder geoxydeerd dan de polyphenolen, omdat toevoeging van ascorbinezuur de bruinkleuring remt.
7 — Pecco oxydeert zijn ascorbinezuur sneller dan de oudere bladen.

Op grond van deze feiten hebben we de volgende theorie opgesteld:

„Een goede potentiële kwaliteit gaat samen met een actieve fermentatie."

Voor de praktijk kunnen we mededelen, dat de bladen optimaal moeten worden verflenst; dergelijke bladen kunnen goed gerold worden. Men moet veel rollingen met korte roltijden toepassen om de fermentatieactiviteit zo groot mogelijk te krijgen. Zowel de rolruimte als de fermenteerruimte moeten een temperatuur hebben van ongeveer 26° C en de luchtverversing moet intensief zijn zonder dat de bladen gaan uitdrogen.

Wat de enzymen betreft, die direct of indirect een rol spelen bij de oxydatie van ascorbinezuur, werd de aanwezigheid van ascorbinase reeds door Roberts, Lamb c.s. en ook Deijs verworpen. Volgens hen wordt het ascorbinezuur alleen door de chinonen geoxydeerd, welke oxydatieproducten zijn van de polyphenolen. Bestudering van de aanwezigheid van ascorbinase is dan ook van groot belang. Door toepassing van de methode van Wachholder — 1942 —, waarbij gebruik gemaakt wordt van enige rem- en activeringsstoffen, hebben we gevonden, dat in het theeblad ascorbinase, polyphenolase en peroxydase een rol spelen bij de oxydatie van ascorbinezuur. Door combinatie van onze resultaten met die van Roberts, Lamb & Sreerangachar, Deijs e.a. hebben we het volgende fermentatieschema opgesteld:

reductase (Crook & Morgan)

1 — ascorbinezuur + O_2 $\rightleftarrows$ dehydroascorbinezuur + H_2O_2

ascorbinase (Huszak)

?

2 — o-polyphenolen + O_2 $\rightleftarrows$ o-chinonen + H_2O_2

polyphenolase

3 — tanninen + (H_2O_2 en peroxydase) → chinonen

4 — ascorbinezuur + chinonen → dehydroascorbinezuur + tanninen

enzym?

5 — chinonen → condensatieproducten (roodbruin)

enz.

De oxydatie van ascorbinezuur vindt eerder plaats, omdat het een sterker reducerend vermogen bezit. Deze oxydatie wordt door ascorbinase gekatalyseerd. Het is mogelijk, dat ook in theeblad het dehydroascorbinezuur wordt gereduceerd en dat daarbij de door Crook en Morgan gevonden reductase de omgekeerde reactie katalyseert.

Wanneer het ascorbinezuur grotendeels is geoxydeerd en de redoxpotentiaal voldoende hoog is geworden, dan kunnen de o-polyphenolen worden geoxydeerd, welke reactie door polyphenolase of catechineoxydase wordt gekatalyseerd. Het is mogelijk, dat ook deze reactie een omkeerbare reactie is en door een bebaald enzym wordt gekatalyseerd.

Door het kneuzen der bladen zullen veel meer o-polyphenolen worden geoxydeerd, waarvoor veel meer zuurstof wordt opgenomen. Het grootste deel van het hierbij gevormde waterstofperoxyde wordt door de aanwezige katalase gesplitst, terwijl de rest met peroxydase de overige tanninen, dus o.a. ook de parapolyphenolen oxydeert. De gevormde chinonen worden echter niet geheel gereduceerd door het nog aanwezige ascorbinezuur, maar zullen door hun labiele karakter gaan condenseren, waarbij de roodbruine kleur wordt gevormd.

Het belangrijke verschil tussen de fermentatie en de ademhaling van theebladen is, dat tijdens de fermentatie meer zuurstof wordt opgenomen en minder CO_2 wordt afgegeven. In tegenstelling met andere theorieën komen we tot de conclusie, dat in theeblad verschillende systemen de moleculaire zuurstof opnemen o.a. ascorbinezuur-ascorbinase en o-polyphenolen en polyphenolase, waarbij het laatste systeem door het grote gehalte aan tanninen een zeer belangrijke rol speelt en de meeste zuurstof opneemt.

Daar het gebleken is, dat de potentiële kwaliteit samengaat met de fermentatieactiviteit is de studie hiervan van groot belang. We kunnen deze in hoofdzaak terug brengen op de oxydatiesnel-

heid van ascorbinezuur en o-polyphenolen. We vonden, dat Pecco veel eerder het toegevoegde ascorbinezuur (hoofdstuk 5) oxydeert dan oudere bladen, wat dus zeggen wil, dat Pecco een groter vermogen bezit om ascorbinezuur te oxyderen en het is niet onmogelijk, dat Pecco ook meer polyphenolase bezit, daar dit enzym een belangrijke rol speelt bij de katalyse van de indirecte oxydatie van ascorbinezuur.

Daar zowel ascorbinase als polyphenolase beide Cu in hun prosthetische groep bezitten, hebben we nagegaan of toevoeging van spoortjes Cu^{**} aan een bladextarct de oxydatie van ascorbinezuur versnelt. Dit bleek inderdaad het geval te zijn. Ook Fe^{***} bleek de oxydatie van ascorbinezuur te kunnen versnellen, hoewel in mindere mate.

Door toevoeging van Cu^{**} of (en) Fe^{***} kan dus de fermentatieactiviteit worden vergroot en we geloven op grond hiervan, dat de uiteindelijke kwaliteit hierdoor min of meer zal worden beinvloed.

Ten behoeve van de kwalitatieve selectie hebben we nagegaan of we de fermentatieactiviteit wiskundig kunnen vastleggen. Daar tegenwoordig deze selectie nog steeds gebaseerd is op een microbereiding, waarna de zwarte thee subjectief door proeven wordt beoordeeld, zal de toepassing van de berekening van de fermentatieactiviteit een groot hulpmiddel blijken te zijn. Door logarithmering en toepassing van de rechtlijnige vereffening kan de fermentatieactiviteit, M, worden berekend en we vonden, dat jongere bladen, die dus een betere potentiële kwaliteit bezitten, een grotere M bezitten.

SUMMARY.

As to the fermentation of tea we wanted to investigate

1rst — whether there is a correlation between the „fermentation" and the mature of the leaves, grade of withering, temperature and aeration respectively, as fermentation is to be considered of utmost importance to the quality of the finished product.

2nd — the nature of the processes involved in the oxidation of ascorbic acid during fermentation and the way in which the oxygen - uptake is accomplished as three different theories on this subject exist.

3rd — whether the process of „fermentation" can be expressed mathematically in behalf of the qualitative plantbreeding in practice.

A semi-micro-method has been used; one leaf was fermented individually. The electrometric determination of the redox potential has been used for our purpose because of its simplicity and of the fact that it has not yet been used in tea research. In our preliminary investigations we found that the shape and the size of the elements of the redox-cell, their arrangement, the shape and the treatment of the Platimum-electrode have to be quite constant since slight differences may cause considerable deviations.

We used a redox-cell with a slightly attenuated bottom, a plate electrode of Platinum, heated red-hot before using it, a saturated calomel-electrode, an agarbridge with a bore of 3,8 mM and a „Ionometer of Lautenschläger" as potentiometer.

To avoid any misunderstanding a distinct discrimination was made between „potential quality" of a fresh leaf and the quality of the tea, obtained at the end of the manufacture.

We determined the amount of ascorbic acid of tea leaves by electrometric titration with 2—6 dichlorophenol-indophenol and we found that Buds (Pecco) contain more ascorbic acid than more mature leaves. As an average of ten plucked sprays of the same tree an amount of 1,25 mg ascorbic acid per gram of fresh Bud-leaves was found, 1,16 mg per gram of first leaves, 1,15 mg per gram of second leaves and 1,09 mg per gram of third leaves. These figures cannot be taken as absolute values but may serve only as an illustration.

An objection to the use of the electrometric method is that the fermentation takes place in aerated water. Under these conditions the fermentation will differ from the normal one in the factory as we may expect that the co-enzymes and the substrates will dispers better. Therefore, the fermentation will take place more active and much quicker under our experimental conditions than in actual practice.

By grinding the leaves the fermentation will be more complete, which is to be considered an advantage from an experimental point of view. In our experiments we used a constant amount of 20 mg of a leaf in 10 mL water, twice distilled.

The following results were obtained:

1 — Buds ferment more active and quicker than older leaves. It is known that Buds yield a better quality than more mature leaves.

2 — The fermentation is more active and more complete in shorter time the more the leaves have been withered.

3 — The optimum temperature of the fermentation is computed at about 26° C.

4 — The more intense the aeration is, the more active the fermentation will be, though the increase of the stimulating effect of aeration will become relatively smaller when the flood of air is increased to very high values.

5 — The fermentation activity is best when the leaves have been ground as thorough as possible.

6 — The ascorbic acid must be first oxidized because it inhibits the formation of the reddish brown discoloration of fermenting tea-leaves.

7 — In Pecco the ascorbic acid is oxidized much more quickly than in mature leaves.

These facts have led us to the following hypothesis:

„A good „potential quality" is correlated with an active fermentation". Transferred into practical terms this means that the tea leaves have to be rolled as well as possible, because under these conditions the fermentation activity is highest. Taking into account the various requirements of the manufacture the quality of the finished tea will be best with many short lasting rollings.

In the rolling- and fermenting-room there must be a temperature of about 26° C and an intense aeration, preventing however drying of the leaves.

As to the enzymes acting in the oxidation of the ascorbic acid in tea leaves, the existence of ascorbinase is already rejected by Roberts, Lamb & Sreerangachar and Deijs. They state that the ascorbic acid can only be oxidized by the quinones, which are oxidation products of the polyphenols. It is therefore of importance to study whether there is an ascorbinase in tea leaves.

By application of the method of Wachholder — 1942 — who used several inhibitors and activators, we have found that the oxidation of ascorbic acid in tea leaves is directly catalized by ascorbinase; peroxidase and polyphenolase catalise the oxidation of ascorbic acid indirectly.

Combining our results with those of Lamb, Sreerangachar, Roberts, Deijs etc. we come to the following scheme of the fermentation:

$$1 \text{ — ascorbic acid} + O_2 \underset{\text{ascorbinase — Zilva, Huszak etc.}}{\overset{\text{reductase — Crook \& Morgan}}{\rightleftarrows}} \text{dehydroascorbic acid} + H_2O_2$$

$$2 \text{ — o-polyphenols} + O_2 \underset{\text{polyphenolase}}{\overset{?}{\rightleftarrows}} \text{o-quinones} + H_2O_2$$

3 — tannins + (H_2O_2 and peroxidase) → quinones

4 — ascorbic acid + quinones → dehydroascorbic acid + tannins

5 — quinones $\xrightarrow{\text{enzym?}}$ condensation products (reddish brown)

etc.

The oxidation of ascorbic acid, catalized by ascorbinase, will take place first because its being a strong reducing substance. It is possible however that the dehydroascorbic acid in tea leaves will be catalitically reduced by a reductase, an enzyme of the type which has been found in cauliflower by Crook & Morgan.

When ascorbic acid has been oxidized for the greater part, the redoxpotential being sufficiently high, the oxidation of the o-polyphenols can take place, catalized by polyphenolase or catechol oxidase. It is not impossible that the quinones will be partly reduced, catalized by an enzyme.

It is known from literature that by grinding the leaves, more polyphenols will be oxized than in normal respiration; more oxygen is taken up, but less CO_2 is evoled. The greater part of H_2O_2 is eliminated by catalase, while, peroxidase being present, the remainder can oxidize other tannins. The greater part of the quinones will not be reduced by ascorbic acid, but, being labile, will form condensation products.

Contrary to other theories we assume that in „tea-fermentation" several systems taking up oxygen exist. We want to lay special stress in this respect on the ascorbic acid-ascorbinase system and the o-polyphenol-polyphenolase system, the latter being of particular interest in fermentation.

It is evident that the „potential quality" of fresh leaves runs hand in hand with the fermentation activity. We have found

that this activity can be measured as the oxidation of ascorbic acid and probably as that of the o-polyphenols. As „Buds" oxidise its ascorbic acid much quicker than more mature leaves we may assume that there will be more ascorbinase and probably more polyphenolase in Buds.

It is noted that both enzymes contain Cu in the prosthetic group. We have found that addition of traces Cu^{**} and of Fe^{***} are able to increase the capacity of the leaf to oxidise ascorbic acid. We assume therefore that by addition of Cu^{**} and (or) $Fe^{*,**}$ the fermentation activity may be increased. This means that the potential quality can be increased by addition of traces of these heavy metals.

In behalf of the qualitative plantbreeding we have examined whether the fermentation activity can be expressed mathematically. As the qualitative plantbreeding at present is still based on a micro-manufacture of tea after which the black tea must be tasted by a tea-expert, we are convinced that application of the mathematical analysis of the fermentation activity will be of great importance in practice.

By application of rectiliniair adjustment the fermentation activity M can be determined and we found higher values of M for Buds than for more mature leaves.

LITERATUURLIJST

1. Ammann P. — Nouvelle contribution à l'etudes des The's d'Indochine. l'Agronomie coloniale. 1930—19.
2. Ames, Ziegenhagen en Elvehjem — Journ. Biol. Chem. 1946—165—81.
3. Arcus en Zilva — The photo-chemical decomposition of l-ascorbic acid. Biochem. Journ. 1940—34—61.
4. Aso K. — Bull. Coll. Agr. Tokyo 1901—4—No. 4.
5. Bald Cl. — Indian Tea, its culture and manufacture.
6. Bamber G. — Report on Ceylon Tea soils and their effects on the quality of tea. 1900.
7. Bamber G. — The chemistry and agriculture of tea. 1893.
8. Barron, de Meio en Klemperer. — Journ. Biol. Chem. 1936—112—625.
9. Barron en Klemperer. — Journ. Biol. Chem. 1937—116—563.
10. Bersin Th. — Kurzes Lehrbuch der Enzymologie. 1938.
11. Besson A. A. — Zur beurteilung des Tees. Chemiker Zeitung 1911—813.
12. Bernard Ch. — Over de aanwezigheid van gisten in fermenterende thee en de eventuele invloed daarvan op de fermentatie. Med. Landb. Proefst. Thee 1909—5.
13. Bernard en Welter — Med. Landb. Proefst. Thee 1911—12 en 13.
14. Bosscha en Brzesowsky — Proefnemingen over het wezen der theefermentatie gedaan in het laboratorium Malabar. Med. Landb. Proefst. Thee 1916—47.
15. Bosscha en Maurenbrecher — Med. Landb. Proefst. Thee 1913—24.
16. Bouma — Bioch. Zeit. 1918—92—385.
17. Boxwell en Whiting — Annales of Bot. 1938—2—847.
18. Birch, Harris en Ray — A microchemical method for determining the hexuronic acid (Vit. C) content of Foodstuffs. Bioch. Journ. 1933—27—590.
19. Bishop W. B. S. — Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1928—5—125.
20. Bolomy en Klemperer — Journ. Biol. Chem. 1946—165—377.
21. Carpenter en Harler — Quarterly J. Ind. Tea Ass. 1923—1—1.
22. Carpenter en Cooper — Quarterly J. Ind. Tea Ass. 1922—44.
23. Carpenter en Cooper — Quarterly J. Ind. Tea Ass. 1922—99.
24. Carrol G. H. — The role of ascorbic acid in Plant nutrition The Bot. Rev. 1943—9—41.

25. Chiu Y. T. — Analyses of Chinese foods 3.— Chinese Teas.
Lingnan Sci. J. Vol. 2/3 — 409.

26. Clark, Cohen, Sullivan etc. — Studies on oxidation-reduction.
U.S. Publ. Health Repr. 823, 826, 834, 848, 904, 915, 1001 en 1017. Suppl. 54, 55, 61, 69, 71 en 74.

27. Crook en Morgan — The reduction of dehydroascorbic acid in Plant extracts.
Bioch. Journ. 1944—38—10.

28. Curtler E. A. — The cultivation and manufacture of tea in Ceylon and India.

29. Deuss J. J. B. — De theecultuur—1930.

30. —— — Enkele aantekeningen over de theebereiding.
Med. Landb. Proefst. Thee 1925—93.

31. —— — Over enkele bestanddelen van theeblad gedurende een periode lopende van snoei tot snoei.
Archief Theecultuur 1928—124.

32. —— — Note sur le tannin du Thé.
Rec. Trav. Chim. Bays-Bas 1923—42—496 en 1053.

33. —— — Chem. Weekblad 1923—20—253.

34. Deijs W. B. — Archief Theecultuur 1937—81.

35. —— — De peroxydase van theeblad.
Archief Theecultuur 1939—13—231.

36. —— — Beschouwing over het mechanisme van de fermentatie van thee.
Archief Theecultuur 1939—13—309.

37. —— — Measurements of the respiration of tealeaves 1943 (niet gepubliceerd).

38. —— — Vitamin C in tealeaf.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 1940—567.

39. —— — Over het chemisme van de fermentatie. I.
Archief Theecultuur 1940—14—26.

40. —— — Over het chemisme van de fermentatie, III, (inactivering der enzymen).
Archief Theecultuur 1940—14—129.

41. —— — Over het chemisme van de fermentatie, II, (katalase).
Archief Theecultuur 1940—14—82.

42. —— — Catechins isolated from tealeaves.
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 1939—58—805.

43. —— — Over het chemisme van de fermentatie, IV, (ademhaling).
Archief Theecultuur 1941—15—235.

44. —— — Veranderingen van het gehalte aan oplosbare looistoffen tijdens de theebereiding.
Archief theecultuur 1939—12—5.

45. —— — Ademhaling en fermentatie.
Voordracht 20 Aug. 1941.

46. Deijs W. B. en Leniger — Het verflenzen van thee.
Archief Theecultuur 1937—11—1.

47. —— en —— — Verdere onderzoekingen over verflenst blad.
Archief Theecultuur 1939—12—26.

48. —— en —— — Het fermenteren van thee 2.
Archief theecultuur 1939—13—290.

49. Dixon — A note on peroxidase specificity. Bioch. Journ. 1934—28—2061.
50. Evans — Ann. Rep. Tea Res. Inst. of Ceylon 1928—34.
51. Elema B. — De bepaling van de oxydatie-reductie potentiaal in bacterie cultures en hare betekenis voor de stofwisseling. 1932.
52. Finley D. W. — Heat in relation to manufacturing process. Quarterly J. Ind. Tea Ass. 1939—62.
53. Giroud A. — l'Acide ascorbique dans la cellule et les ti sus. 1938.
54. Glick — Journ. Biol. Chem. 1935—109—433.
55. Goth A. — Der gegenwartige stand der Vit. C-forschung. Zeits. Vit.-forschung 1943—103.
56. Greach P. — Recherches sur la respiration de la cellule de levure. 1937.
57. Green — The potentials of ascorbic acid. Bioch. Journ. 1935—27—1044.
58. Guillemet — Bull. Soc. Chim. Biol. 1942—4/6—186.
59. Gurthrie — Am. Chem. Soc. 1931—55—242.
60. Harler C. — The culture and marketing of tea.
61. Haas en Hill — An introduction to the chemistry of Plant-products.
62. Mc Henry en Graham — Observations on the estimation of ascorbic acid by titration. Bioch. Journ. 1935—29—2013.
63. Hewitt L. F. — Oxidation-reduction potentials in Bacteriology Biochemistry. London county council 1936.
64. Harrison — Experiments on the quality of tea.
65. Harris, Mapson en Wang — Vitamin Methods- A simple potentiometric method for determining ascorbic acid, suitable for use with coloured extracts. Biochem. Journ. 1942—36—183.
66. Hoedt — Theecultuur en bereiding. Bergcultures 1937—1469.
67. Hoedt en Leniger — Het mangelen van theeblad ter vervanging van het rollen. Archief Theecultuur 1936.
68. Harler — Quarterly J. Ind. Tea Ass. 1930—147.
69. Heubel — Orienterende waarnemingen over het zetmeel in theeblad. Archief theecultuur 1935—10.
70. de Haan Iz. — De asbestanddelen van jong en oud theeblad, alsmede de invloed van snoei en pluk op de assamenstelling van het jonge blad. Archief Theecultuur 1939—12—52.
71. Hope — Experiments on the quality of tea. Quarterly J. Ind. Tea Ass. 1910—2—31.
72. Hopkins — Manganesse, an Essential element for a green Alga. Am Journ. Bot. 1930—17—1047.
73. Huszak — Z. Phys. Chem. 1937—247—239.
74. Huyskes J. A. — Oxydatie-reductie potentialen (niet gepubl.)
75. van Itallie — De chemische samenstelling van gewassen in verband met landbouwkundige vraagstukken. 1938.
76. Jamada en Jodlbauer — Bioch. Zeit. 1908—8—61.

77. James en Gragg — New Phyt. 1943—42—28.
78. Jones — Tea manufacture of South-India.
79. Jones — Ann. Rep. U.P.A. South-India 1937/1938-38.
80. Jorissen en Dekking — Ascorbic acid as inductor and as oxidation catalyst. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 1943—62—431.
81. Karsten — Plantaardige kleurstoffen. 1943.
82. Kluijver, Wassink, etc. — Leerboek der Algemene Plantkunde 2.
83. Kolthoff en Stenger — Volumetric analysis 1. 1942.
84. Knight — Oxidation-reduction studies in relation to bacterial growth. Bioch Journ. 1930—24—1066, 1075 en 1496.
85. Kubowitz — Bioch. Z. 1938—296—443.
86. Lamb J. — Research and the practical manufacture of tea.
87. —— — The chemistry of tea. Quarterly J. Ind. Tea Ass. 1938—103.
88. —— — Studies on the firing of tea. I. Quarterly J. Ind. Tea Ass. 1939—171.
89. —— — A note on the manufacture of leaf from selected individual bushes. Quarterly J. Ind. Tea Ass. 1939—183.
90. —— — Quaterly J. Ind. Tea Ass. 1940—13—38.
91. Lamb J. en Sreerangachar — The nature of the enzyme system and oxidizing enzyme. Biochem. J. 1940—34—1472.
92. Leniger H. A. — Enquête Fermentatie 1938. Archief Theecultuur 1939—248.
93. —— — De asbestanddelen van theeblad afkomstig van verschillende grondtypen en verschillende hoogten. Archief Theecultuur 1936—236.
94. —— — De invloed van een langdurige verflenzing op de kwaliteit van de thee. Archief Theecultuur 1938—141.
95. —— — Bijdrage tot de kennis van de invloed van de hoogteligging van een theeaanplant en van een theefabriek op de kwaliteit van de thee. Archief Theecultuur 1939—13—117.
96. Leniger H. A. — Enquête verflenzing. Archief Theecultuur 1937—No. 4.
97. —— — Air-conditioning in theefabrieken. Bergcultures 1937—12.
98. Leniger H. A. en Spoon — Onderzoekingen over de veranderingen in het watergehalte van thee tijdens transport naar Europa en tijdens bewaren enz. Archief Theecultuur 1937—127.
99. Lampitt en Clayson — The nature of ascorbic acid oxidase. Bioch. J. 1945—39—XV.
100. Lampitt, Clayson en Barnes — The nature of ascorbic acid oxidase. Bioch. J. 1945—39—XVI.
101. Lemberg, Cortis e.c. — Coupled oxidation of ascorbic acid and haemochromogens. Bioch. J. 1938—32—149.

102.	Lund, Spur en Frederica	The biological and titrimetric determination of Vitamin C. Bioch. J. 1934—28—1825.
103.	Lundegårdh H.	Mangan als katalysator der Pflanzenatmung. Planta 1939—29—419.
104.	Lymann, Schultz en King	J. Biol. Chem. 1937—118—737.
105.	Mann H. H.	Indian Tea Ass. 1901.
106.	——	Indian Tea Ass. 1903.
107.	——	Indian Tea Ass. 1904.
108.	——	Indian Tea Ass. 1907 No. 4.
109.	Manskaja S.	Bioch. Asp. Tea Ind. Georgia U.S.S.R. 1935—96.
110.	Mapson	Influence of halides on oxidation of ascorbic acid. Bioch. J. 1941—35—1332.
111.	——	Influence of Halides on oxidation of ascorbic acid. Biochem. J. 1945—39—228.
112.	Mack en Kertesz	Food research 1936—1—377.
113.	Marsh en Goddard	Am. J. Bot. 1939—26—724.
114.	Mathot H. J.	Vit. C-gehalte van vroege aardappelen. Bepalingsmethode en oriënterend onderzoek. Med. Inst. ond. Fruit en Groenten, No. 10, Reeks 1.
115.	——	Factoren, die de variatie van het Vit. C-gehalte in de plant bepalen. Diss. 1945.
116.	Mc Carthy, Green en King	J. Biol. Chem. 1939—128—455.
117.	Mc Hargue J. S.	Am. J. Physiol. 1926—77—245.
118.	——	Effect of Manganese on Plant growth. J. Agric. Research 1923—24—781.
119.	Maurenbrecher	Een kopje thee. Teysmania 1912—492.
120.	Michaelis	Oxidation-reduction potentials. Monop. Ges. Geb. d. Phys. d. Pfl. Bd. 1929—17.
121.	Michaelis (Green)	Currents in Biochemical Research 1946.
122.	Meiklejohn en Stewart	Ascorbic acid oxidase in cucumber. Bioch. J. 1941—35—755.
123.	Nanninga	Theecultuur in Ned.-Indië.
124.	——	De scheikundige samenstelling van theeblad.
125.	Penney en Zilva	Interfering substances in the Roe & Kuether method for determining of ascorbicc acid. Bioch. J. 1945—39—392.
126.	Pfankuch	Naturwissenschaften 1934—22—831.
127.	Proefst. West-Java	Vraagbaak voor de cultuur en bereiding van thee. 1937.
128.	Remy	Zeit. fur Unters. Lebensm. 1937—73—452.
129.	Richter	The action of inhibitors on the catechol oxidase of potatoes. Bioch. J. 1934—28—901.
130.	Roberts E. A. H.	The mechanism of fermentation. Bioch. J. 1939—33—842.
131.	——	Some properties of tea peroxidase. Bioch, J. 1939—33—836.
132.	Roberts E. A. H. en Sarma	The fermentation process in tea manufacture (the role of peroxidase). Bioch. J. 1938—32—1819.

133. Roberts E. A. H. en Harrison — Tea tannin and its fermentation products. Bioch. J. 1939—33—1408.

134. Roberts E. A. H. — Cytochrome oxidase and its problable rôle and the effect of dilution on the rate und extent of oxidations in fermenting tea leaf suspension. Biochem J. 1940—34—500.

135. Roberts E. A. H. en Debb — The respiraion and anaerobic fermentation of tea leaf and their relationship etc. Bioch. J. 1940—34—1507.

136. Roberts E. A. H. en Sarma — Tannins as hydrogen carriers in biological oxidation. Bioch. J. 1940—34—1517.

137. Roberts E. A. H. en Barua — Methods for volumetric estimation of tea-tannin in green leaf and black tea. A new alkaline permanganate method. Bioch. J. 1940—34—1524.

138. —— — The influence of external factors on fermentation rate. Bioch. J. 1941—35—909.

139. —— — The nature of oxidase system and the relation of tea fermentation to respiration. Bioch. J. 1941—35—1209.

140. Roberts E. A. H. — The chemistry of tea fermentation. Advances in Enzymology 1942. Vol. 2—113.

141. Robertson R. N. — Austr. J. Exp. Biol. en Med. Sci. 1940—19—265.

142. Roe en Kuether — J. Biol. Chem. 1943—147—399.

143. Ronnerstrand S. — Untersuchungen über oxydase, peroxydase und ascorbinase in einigen meeralgen. Diss. 1943.

144. Reedman en Mc Henry — Combined ascorbic acid in plant tissues. Bioch. J. 1938—32—85.

145. van Roggen — Iets over kwalitatieve selectie in de thee. Bergcultures 1937—11—1904.

146. Reijnst — Een beknopt overzicht van thee als cultuur-, handels- en consumptieproduct.

147. Romburgh en Lohmann — Onderzoekingen naar de samenstelling van op Java gecultiveerde theeën. Eerste verslag 1894—6.

148. —— — Eerste verslag 1894—17.

149. —— — Eerste verslag 1894—21.

151. —— — Tweede verslag 1895—5.

150. —— — Derde verslag 1896—5

152. —— — Derde verslag 1896—21.

153. —— — Vijfde verslag 1898—28.

154. van Sandich F. H. — Pogingen om langs chemische weg de kwaliteit van thee te bepalen (niet gepubliceerd).

155. Shaw — — Tannin Principles of Tea. Un. Plant. Ass. S-India 1930.

156. Shen, Hsieh en Chen — Effects of MgC1 and Manganus nitraat upon the content of ascorbic acid in Soybean during germination with obeservations on the activity of ascorbic acid oxidase. Biochem. J. 1945—39—107.

157. Shive J. W. — Significant roles of trace elements in the nutrition of plants. Plant Physiol. 1941—16—435.
158. Sinclair, Webster en Lloyd — The estimation of ascorbic acid for clinical purposes by the hydrazine method. Biochem. J. 1945—39—XVII.
159. Schopfer W. H. — Plants and Vitamins. 1943.
160. Stiles W. — Respiration II. The Bot Rev. 1946—12—165.
161. —— — Trace elements in Plants and animals. 1946.
162. Sreerangachar H. B. — Respiration and tea fermentation. Biochem. J. 1941—85—1106.
163. —— — Estimation of the oxidizing enzymeactivity. Bioch. J. 1943—37—53.
164. —— — Comparitive rates of oxidation of different polyphenolic subtrates by tea oxidizing enzymes. Bioch. J. 1943—37—656.
165. —— — The nature of the tea-oxidase system. Bioch. J. 1943—37—661.
166. —— — The prosthetic group of tea oxidase. Biochem. J. 1943—37—667.
167. Sprecher von Bernegg — Tropische und Subtropische Weltwirtschaftpflanzen. 1936. (Tee und Matee). Teil 3—107.
168. Staub W. — Nadere onderzoekingen over de in fermenterende thee zich bevindende micro-organismen. Med. Landb. Proefst. Thee 1912—18—1.
169. Steensma F. A. — Hoofdlijnen der Biochemie. 1942—108.
170. Stone — Ascorbic acid oxidase and the state of ascorbic acid in vegetable tissues. Bioch. J. 1937—31—508.
171. Stotz, Harrer en King — The chemical nature of ascorbic acid oxidase Science 1937—86—35.
172. Stotz en King — J. Biol. Chem. 1937—119—511.
173 Stirling — The catalysis of peroxide oxidation by ferro-ions. Bioch. J. 1934—28—1048.
174. Strömgen S. — Over het beoordelen van thee. Archief Theecultuur 1937—192.
175. Szent-Gyorgyi — On the mechanism of biological oxidation and the function of the supprarenal gland. Science 1930—72—125.
176. Tendeloo c.s. — Handleiding voor de practica. Phys-, Colloid-, anorg- en anal.-chemie.
177. Thatcher R. W. — A proposed classification of the chemical elements with respect to their functions in plant nutrition. Science 1934—79—463.
178. Tollenaar — Omzettingen van koolhydraten in het blad van Nicotiana Tabacum. 1925.
179. Tubb F. R. — Tea selection (the present position). Quarterly J. Ind. Tea Ass. 1946—18—59.
180. Tunstall — Quarterly J. Ind. Tea Ass. 1924—4—126.
181. Warburg — Chem. constitionen von Fermenten.
182. Wachholder K. — Uber das ascorbinsaure-oxydationsvermögen Pflanzlicher Extrakte. Bioch. Z. 1942—312—394.

183. Weevers Th. De ademhaling der hogere planten. Leerboek der alg. Plantkunde — 530.
184. —— De alkaloiden en glucosiden der planten. 1943.
185. Wellensiek S. J. De veredeling van de theeplant. Grondslagen der Alg. Plantenveredeling. 1943.
186. Wieringa K. Voorlopige mededelingen betreffende een onderzoek naar het Vit. C-gehalte bij tomaten. Landb. Tijdschrift 1939—51—608.
187. —— Invloed van Koper op de oxydatie van Vit. C. Overdruk Lab. Tuinbouw Wageningen 1938—1939.
188. Weinstraub R. L. The Bot. Rev. 1944—10—383.
189. Zilva Bioch. J. 1914—8—656.
190. —— The reversible enzymic oxidation of Vit. C. Bioch. J. 1934—28—663.
191. Zilva en Kellie The catalytic oxidation of ascorbic acid. Bioch. J. 1935—29—1028.