

**Oriënterend onderzoek naar de invloed van C.A. condities op enkele kwaliteitskenmerken bij zwarte bessen.**

Drs. S.P. Schouten  
M.P.A. Lips

**ato-dlo**



### **Samenvatting**

Monsters zwarte bessen werden gedurende 7 en 10 dagen bij 10°C blootgesteld aan een reeks CA condities. Deze condities omvatten een verhoging van koolzuur tot 21% en een zuurstofverlaging tot 1%. Als kwaliteitskenmerken werden getoets: gewichtsverlies, schimmelgroei, smaak en ethanolvorming. Verhoging van koolzuur en verlaging van zuurstof hadden een sterk remmende werking op schimmelgroei. De verlaging van zuurstof bleek een licht negatief effect te hebben op de smaak, terwijl sprake was van een vrij sterke toename in ethanolvorming in de bessen.

Voor praktische doeleinden is toepassing van CA condities door verhoging tot 20% Koolzuur aan te bevelen. Met een combinatie van koolzuurverhoging en zuurstofverlaging zal de nodige voorzichtigheid moeten worden betracht in verband met eventuele ophoping van ethanol.

## Inleiding

De teelt en afzet van houtig kleinfruit als vers produkt is zeer bescheiden van omvang. Tussen 1960 en 1982 daalt het areaal van rode, blauwe en zwarte bessen + frambozen + bramen + kruisbessen + rozebottels van 4717 ha naar 512 ha (Blommers c.s 1990). Recentelijk is echter uit marktonderzoek gebleken, dat bessen, bramen en frambozen bij een meer gespreide aanvoer betere prijzen opbrengen (Hilberts 1992). Dit betekent dus, dat bewaring teelt- en bewaarstechnieken, waarmee die spreiding kan worden gerealiseerd van belang zijn.

Het kwaliteitsverlies bij houtig kleinfruit verloopt snel door de aard van het produkt en door de meestal hoge temperaturen tijdens de distributie. Koeling komt de houdbaarheid ten goede en er zijn aanwijzingen, dat verhoging van de koolzuurspanning in de bewaaratmosfeer een bijdrage aan de verbetering van de houdbaarheid kunnen leveren (Kader 1989). Dit laatste geldt voor frambozen, kersen en rode en zwarte bessen, terwijl pruimen deze regel niet schijnen te volgen.

Ca bewaring van houtig kleinfruit kan voor 3 doeleinden van betekenis zijn: langdurige opslag teneinde seizoensverlenging te realiseren, transport in CA containers en MA verpakking teneinde het produkt beter te beschermen tegen kwaliteitsverlies tijdens de distributie. Het eerste doel wordt met succes nagestreefd met rode bessen (mondelijke informatie Dr A. de Jager) op het Proefstation voor de Fruittteelt te Wilhelminadorp. Ten behoeve van de andere twee doelen werd onderzoek op ATO-DLO uitgevoerd met zwarte bessen. In de zomerperiode van 1992 werd bij 10°C een screening van CA condities uitgevoerd op een aantal kwaliteitskenmerken bij de zwarte bessen. Dit rapport behandelt de resultaten van het uitgevoerde onderzoek.

## Materiaal en Methodes

De zwarte bessen werden betrokken van een teler van de veiling CVZ te Kapelle. het produkt was verpakt in consumenteneenheden van 500 gram. Op de dag, waarop de vruchten werden gehaald, werden ze na het transport en na weging van de individuele doosjes in doorstroomcontainers in de koelcel geplaatst. In deze situatie werden de bessen resp. 7 en 10 dagen opgeslagen.

De containers werden gesloten en de CA condities werden tot stand gebracht door de juiste mengverhoudingen van de afzonderlijke gassen door de containers te laten stromen.

CA condities:

<u>%CO<sub>2</sub> + %O<sub>2</sub></u>		<u>%CO<sub>2</sub> + %O<sub>2</sub></u>		<u>%CO<sub>2</sub> + %O<sub>2</sub></u>	
0	21	0	2	0	1
7	21	7	2	7	1
14	21	14	2		
21	21	21	2		

De doosjes met zwarte bessen werden in 20 doorstroomcontainers (experiment in duplo) geplaatst, waardoor de gewenste gassamenstelling stroomde na passage door een water wasfles om een zo hoog mogelijke Relatieve Vochtigheid te bereiken tijdens de bewaring.

Per container werden 6 doosjes bewaard. Voor elke uitslag na 7 en 10 dagen werden steeds 3 doosjes uit elke container voor analyses gebruikt.

De volgende bepalingen werden verricht:

- gewichtsverlies: de doosjes werden gewogen bij inslag en uitslag.
- parasitair bederf: de inhoud van elk doosje werd gecontroleerd op beschimmelde bessen. Deze werden gewogen per doosje.
- smaak: uit enkele objecten werd getracht afwijkingen te halen via proeven en groepsdiscussie onder leiding van een sensorisch deskundige .
- ethanolophoping: ethanol werd bepaald langs enzymatische weg volgens de voorschriften van Boehringer, dat als bijlage 1 aan dit rapport is toegevoegd.
- ademhaling: de doorstroomcontainers werden na 4 dagen bewaring afgesloten van de gastoevoer,

in een luchtmonster werden de aanwezige koolzuur geanalyseerd. Dit werd na enkele uren opnieuw gedaan en uit de toename in de koolzuurconcentratie werd de koolzuurproductie berekend in mg CO<sub>2</sub>.kg produkt.uur.

Data: de inslag vond plaats op 06-07-1992, terwijl de uitslagen plaatsvonden op 13 en 17-07-1992. De bepaling van de ademhalingsactiviteit werd verricht op 10-07-1992. De alcoholbepalingen werden gedaan in september 1992 na opslag van de monsters bij -20°C.

## Resultaten

De gedetailleerde resultaten zijn weergegeven in bijlage 2.

### Gewichtsverlies

De in bijlage 2 weergegeven gegevens uit werden gebruikt voor de samenvattende tabel 1.

Tabel 1: Invloed van CA condities op het gewichtsverlies van zwarte bessen na 7 en 10 dagen bewaring bij 10°C.

CA condities %CO <sub>2</sub> + %O <sub>2</sub>		Gewichtsverlies (%) na		Gemiddeld gewichtsverlies	
		na 7 dagen	na 10 dagen	na 7 dagen	na 10 dagen*
0	21	1.26	1.89	1.32	1.84
7	21	1.36	1.78		
14	21	1.37	6.62		
21	21	1.27	1.86		
0	2	1.19	1.53	1.19	1.58
7	2	1.22	1.61		
14	2	1.18	1.61		
21	2	1.16	6.30		
0	1	1.10	1.53	1.16	1.52
7	1	1.22	1.51		

\* de waarden van 14%CO<sub>2</sub> + 21%O<sub>2</sub> en 21%CO<sub>2</sub> + 2%O<sub>2</sub> niet meegerekend.

In de tabel zijn twee sterk afwijkende waarden te vinden, namelijk na 10 dagen in de CA condities 14%CO<sub>2</sub> + 21%O<sub>2</sub> en 21%CO<sub>2</sub> + 2%O<sub>2</sub>. Mogelijk zijn deze data verkregen, nadat de slang waardoor het gas binnen de container komt van de voorwand heeft losgelaten. In dat geval wordt het gasmengsel vrij in de container geblazen zonder dat het gas eerst de water wasfles passeert. Verwacht moet in dat geval worden, dat het gewichtsverlies sterk zal toenemen, daar deze gassen in het algemeen zeer droog zijn. In bijlage 2 is te zien, dat in de betreffende containers 15 en 20 met de genoemde Ca condities de gewichtsverliezen in de herhalingen alle zeer hoog waren. Dit onderstreept de idee, dat er iets mis was met de betreffende containers.

De gemiddelden per zuurstofconcentratie geven een daling te zien met de afnemende zuurstofconcentratie weer. Het verschil tussen 1 en 2% zuurstof is niet aantoonbaar, hetgeen wel het geval is voor het verschil tussen 21% zuurstof en de verlaagde O<sub>2</sub> spanningen. Zeer verrassend is dit niet, daar een dergelijk effect veelvuldig is aangetoond. In dit geval moet dit effect niet worden toegeschreven aan een sterk verminderde ademhalingsactiviteit, maar aan het feit, dat zeer veel bessen vooral na 10 dagen beschimmeld waren. Dit vergroot altijd zeer sterk het vochtverlies, de hoofdcomponent van het gewichtsverlies.

## Parasitair bederf

In bijlage 2 zijn de gegevens met betrekking tot parasitair bederf samengevat. Uit deze gegevens werd onderstaande tabel 2 gemaakt.

Tabel 2: Invloed van CA condities op de hoeveelheid beschimmelde vruchten bij zwarte bessen na 7 en 10 dagen opslag bij 10°C.

CA condities %CO <sub>2</sub> + %O <sub>2</sub>		Schimmelgroei (%)		Gemiddeld
		7 dagen	10 dagen	7 + 10 dagen*
0	21	42.5	100.0	71.25 a
7	21	16.8	23.7	20.25 b
14	21	1.3	15.3	8.29 c
21	21	8.1	12.9	10.54 c
0	2	5.9	16.5	11.21 c
7	2	2.9	11.6	7.23 cd
14	2	5.4	7.9	6.67 de
21	2	1.0	2.3	1.62 f
0	1	1.0	5.6	3.28 ef
7	1	2.5	8.2	5.32 def

\* gemiddelden voor eenzelfde letter zijn niet significant verschillend.

Enkele effecten komen duidelijk naar voren. Op de eerste plaats is een verschil aantoonbaar tussen 7 en 10 dagen bewaring. De hoeveelheden beschimmelde vruchten nemen snel met de tijd toe. Verder blijkt met het oplopen van de koolzuurconcentratie minder beschimmelde vruchten te worden aangetroffen. Dit is het geval bij 21 en 2% zuurstof. Verder is de invloed van een lage zuurstofspanning op de ontwikkeling van de schimmels ook van groot belang. De gemiddelden over geven een dalende tendens weer van 21, naar 2 en 1% zuurstof.

De hoogste concentratie van 21% koolzuur en de lage concentratie zuurstof van 2% lijken de beste condities voor een goed bewaarresultaat. Ofschoon in dit onderzoek de hoogste CO<sub>2</sub> concentraties bij 1% zuurstof niet konden worden getoetst, is het de vraag of er nog verdere voordelen zijn te behalen als vergeleken wordt met de hoogste CO<sub>2</sub> concentraties bij 2% zuurstof.

### Smaak

De smaak van het produkt werd getest op beide uitslagdata. Bij de eerste uitslag werden zowel de bessen zelf als het sap er van gemaakt getest. De test met de bessen werd alleen bij de eerste uitslag gedaan. De saptest (1:1 verdund met water en 10% suiker toegevoegd) werd op beide uitslagdata uitgevoerd. De resultaten zijn gedetailleerd weergegeven in de bijlage 3.

De bessentest leverde geen duidelijk beeld op en de test op de sappen van bessen uit de 21%zuurstof condities van de eerste uitslagdatum leverde wat negatieve opmerkingen op over het aroma als "metallig", hetgeen overigens niet leidde tot een negatief algemeen oordeel.

De saptest van de tweede uitslag leverde een tweedeling op in de bessen uit de 21% zuurstof objecten en de bessen uit de condities met verlaagd zuurstof. De bessen uit de lage zuurstof containers bleken geen of heel weinig geur te bezitten, er werden opmerkingen gemaakt over een "zurige" indruk, waardoor het algemeen oordeel lager was dan van de bessen uit de 21% zuurstof condities.

## Ethanolvorming

De bij het vorige onderdeel het smaakonderzoek opgemerkte zwak negatieve opmerkingen werden aanleiding tot nader onderzoek naar eventuele alcoholvorming in de bewaarde bessen.

De in diepvries bewaarde monsters werden enzymatisch op de aanwezigheid van ethanol gecontroleerd. Het resultaat van dit onderzoek is vermeld in de bijlage 2 en samengevat in onderstaande grafiek, waarin de gemiddelden over de twee bewaarperioden zijn weergegeven.

Aan dit beeld valt het meeste op het grote verschil, dat kan worden gezien tussen de koolzuurreeks bij 21% zuurstof en de twee sterk verlaagde O<sub>2</sub> spanningen. Bij de lage zuurstofspanningen wordt significant meer alcohol gevormd dan bij atmosferische zuurstof. Verder is er ook een verschil aantoonbaar ( $p < 5\%$ ) tussen 2 en 1% zuurstof, waarbij de laagste spanning de meeste alcohol ophoopt.

Verder is duidelijk door het vrijwel horizontale verloop van de lijnen, dat de verhoging van het koolzuurgehalte de synthese van ethanol niet lijkt te beïnvloeden.

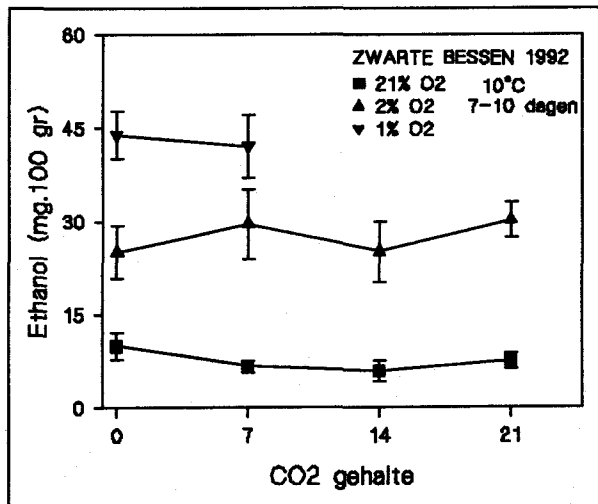


Fig 1: Gemiddelde invloed van de O<sub>2</sub> en CO<sub>2</sub> concentratie op ethanolophoping in zwarte bessen tijdens opslag gedurende 7 en 10 dagen bij 10°C.

## Ademhaling

De ademhalingsactiviteit van de bessen bleek met de beschikbare apparatuur moeilijk te meten. met name lukte het niet betrouwbare cijfers te verzamelen over de ademhalingsactiviteit uitgedrukt in koolzuurproductie, van de bessen bewaard in hoge CO<sub>2</sub> concentraties. Uit de verzamelde cijfers blijken grote fluctuaties, zelfs negatieve koolzuurproductie werd gevonden. We vermelden daarom alleen de koolzuurproductie van de objecten: 0%CO<sub>2</sub> + 21%O<sub>2</sub>, 0%CO<sub>2</sub> + 2%O<sub>2</sub> en 0%CO<sub>2</sub> + 1%O<sub>2</sub>. In tabel 3 zijn de gegevens samengevat.

Tabel 3: Invloed van de zuurstofconcentratie op de ademhalingsactiviteit van zwarte bessen, bewaard gedurende 4 dagen bij 10°C.

CA conditie	Ademhalingsactiviteit	
%CO <sub>2</sub> %O <sub>2</sub>	(mg.kg.uur)	
0 21	39.85	38.83
0 2	18.39	17.37
0 1	16.35	16.35

Uit deze gegevens blijkt een groot verschil tussen 21% zuurstof en anderzijds de twee sterk verlaagde zuurstof concentraties. De koolzuurproductie wordt tot meer dan de helft gereduceerd. Het verschil tussen 1 en 2% zuurstof is zeer gering. Mogelijk wordt hier dicht tegen de grens van anaërobe ademhaling gewerkt, zoals waarschijnlijk werd gemaakt met de cijfers weergegeven in figuur 1.

## Discussie

Het toepassen van CA condities, met name het verhogen van het koolzuurgehalte is een maatregel, die de houdbaarheid van zwarte bessen gunstig beïnvloedt. Echter ook de verlaging van de zuurstofspanning gaat schimmelgroei tegen. Hierdoor is het toepassen van koolzuurverhoging en het verlagen van de zuurstofspanning aantrekkelijk geworden, daar de bessen zeer gemakkelijk beschimmeld raken tijdens opslag in lucht.

Het verlagen van de zuurstofconcentratie bleek ethanolophoping tot gevolg te hebben en er werden wat negatieve opmerkingen over de smaak van het produkt gemaakt. Het is niet uitgesloten, dat de keuze van de 1 en 2% zuurstof al aan de te lage kant is geweest en dat de verhoogde ethanolvorming hiermee alles van doen heeft. De ademhaling bij 2% zuurstof gaf hierover geen uitsluitel, daar deze aanzienlijk lager was dan de ademhaling in normale lucht. Gewenst is nader onderzoek naar ademhaling en ethanolophoping in een reeks zuurstofconcentraties om te bepalen waar het omslagpunt voor zwarte bessen ligt. Met het omslagpunt wordt bedoeld die zuurstofconcentratie, waarbij het produkt overgaat van een normale ademhaling naar anaërobe ademhaling. Metingen van zuurstofconsumptie dient dan te geschieden naast CO<sub>2</sub> produktie en ethanolvorming.

## Referenties

Blommers J., A.N. van Eendenburg, C. Geense, A.A. van Oosten en D.L. Verwijs De Teelt van Hcutig Kleinfruit. IKC Akker- en Tuinbouw, Afd Fruitteelt, Wilhelminadorp, (1990).

Hilberts W. Meer omzet door spreiding aanvoer. Groenten en Fruit, vakdeel Fruit (20), 8 (1992).

Kader A.A. A Summary of CA Requirements and Recommendations for Fruits other than Pome Fruits. Int. CA. Res. Conf. 5th Proc. Vol.2, 303-328 (1989).

# Ethanol

## UV-method

for the determination of ethanol in foodstuffs and other materials

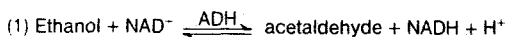
Simplified procedure for the determination of ethanol in alcoholic beverages see pt. 1.2.

Cat. No. 176 290

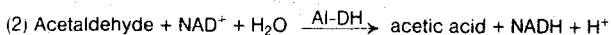
Test-Combination for ca. 30 determinations

### Principle (Ref. 1,2)

Ethanol is oxidized to acetaldehyde in the presence of the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) by nicotinamide-adenine dinucleotide (NAD). (1).



The equilibrium of this reaction lies on the side of ethanol and NAD. It can, however, be completely displaced to the right at alkaline conditions and by trapping of the acetaldehyde formed. Acetaldehyde is oxidized in the presence of aldehyde dehydrogenase (Al-DH) quantitatively to acetic acid (2).



NADH is determined by means of its absorbance at 334, 340 or 365 nm.

### The Test-Combination contains

1. Bottle 1 with approx. 100 ml solution, consisting of: potassium diphosphate buffer, pH 9.0; stabilizers.
2. Bottle 2 with approx. 30 tablets, each tablet contains: NAD, approx. 4 mg; aldehyde dehydrogenase, 0.8 U; stabilizers.
3. Bottle 3 with approx. 1.6 ml enzyme suspension, consisting of: ADH, 7000 U; stabilizers.
4. Ethanol standard solution.

### Preparation of solutions

1. Use contents of bottle 1 undiluted.
2. Dissolve **one** tablet of bottle 2 with **3 ml** solution of bottle 1 in a beaker or in a centrifuge tube for each assay (blank or samples) depending on the number of determinations. Use forceps for taking the tablets out of bottle 2. This results in reaction mixture 2\*.
3. Use contents of bottle 3 undiluted.

### Stability of solutions

Solution 1 is stable for one year at +4°C.  
Bring solution 1 to 20–25°C before use.  
Reaction mixture 2 is stable for one day at +4°C.  
Bring reaction mixture 2 to 20–25°C before use.  
Contents of bottle 3 are stable for one year at +4°C.

### Procedure

Wavelength<sup>1</sup>: 340 nm, Hg 365 nm or Hg 334 nm  
Glass cuvette<sup>2</sup>: 1 cm light path  
Temperature: 20–25°C  
Final volume: 3.15 ml  
Read against air (without a cuvette in the light path), against water or against blank<sup>3</sup>.  
Sample solution: 0.5–12 µg ethanol/cuvette<sup>4</sup> (in 0.1–0.5 ml sample volume)

1 The absorption maximum of NADH is at 340 nm. On spectrophotometers, measurements are taken at the absorption maximum; when spectralline photometers equipped with a mercury vapour lamp are used, measurements are taken at a wavelength of 365 nm or 334 nm.

2 If desired, disposable cuvettes may be used instead of glass cuvettes.

3 For example, when using a double-beam photometer.

4 See instructions for performance of the assay.

Not for use in *in vitro* diagnostic procedures for clinical diagnosis



**biochemical analysis**  
**food analysis**

Recommendations to methods and standardized procedures see references.

Pipette into cuvettes	blank	sample
reaction mixture 2*	3.00 ml	3.00 ml
redist. water	0.10 ml	–
sample solution**	–	0.10 ml
mix***, after approx. 3 min read absorbances of the solutions (A <sub>1</sub> ). Start reaction by addition of		
suspension 3	0.05 ml	0.05 ml
mix***, after completion of the reaction (approx. 5–10 min) read absorbances of the solutions immediately one after another (A <sub>2</sub> ).		

It is absolutely necessary to stopper the cuvettes, e.g. with Parafilm<sup>®</sup>, during measurement (see "Instructions for performance of assay").

\* For simplification of the assay performance it is also possible to pipette directly 3 ml of solution 1 into the cuvette. Afterwards add 1 tablet of bottle 2 and dissolve it (for solubilisation crush the tablet with a glass rod, if necessary). Continue as described in the scheme. The volume error of approx. 1% (the increase of volume caused by one tablet/3.15 ml final volume) has to be taken into account in the calculation by multiplication of the result with 1.01.

\*\* Rinse the enzyme pipette or the pipette tip of the piston pipette with sample solution before dispensing the sample solution.

\*\*\* For example, with a plastic spatula or by gentle swirling after closing the cuvette with Parafilm<sup>®</sup> (registered trademark of the American Can Company, Greenwich, Ct., USA).

Determine the absorbance differences (A<sub>2</sub>–A<sub>1</sub>) for both blank and sample. Subtract the absorbance difference of the blank from the absorbance difference of the sample.

$$\Delta A = \Delta A_{\text{sample}} - \Delta A_{\text{blank}}$$

The absorbance differences measured should as a rule be at least 0.100 absorbance units to achieve sufficiently accurate results (see "Instructions for performance of assay").

### Calculation

According to the general equation for calculating the concentration in reactions in which the amount of NADH formed is stoichiometric with half the amount of substrate:

$$c = \frac{V \times \text{MW}}{\epsilon \times d \times v \times 2 \times 1000} \times \Delta A \text{ [g/l]}, \text{ where}$$

V = final volume [ml]

v = sample volume [ml]

MW = molecular weight of the substance to be assayed [g/mol]

d = light path [cm]

ε = absorption coefficient of NADH at:

$$340 \text{ nm} = 6.3 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Hg } 365 \text{ nm} = 3.4 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

$$\text{Hg } 334 \text{ nm} = 6.18 \text{ [l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}\text{]}$$

It follows for ethanol:

$$c = \frac{3.15 \times 46.07}{\epsilon \times 1 \times 0.1 \times 2 \times 1000} \times \Delta A = \frac{0.7256}{\epsilon} \times \Delta A \text{ [g ethanol/l sample solution]}$$

If the sample has been diluted during preparation, the result must be multiplied by the dilution factor F.

When analyzing solid and semi-solid samples which are weighed out for sample preparation, the result is to be calculated from the amount weighed:

$$\text{content}_{\text{ethanol}} = \frac{c_{\text{ethanol}} \text{ [g/l sample solution]}}{c_{\text{sample}} \text{ [g/l sample solution]}} \times 100 \text{ [g/100 g]}$$



## Instructions for performance of assay

The amount of ethanol present in the cuvette should range between 1 µg and 12 µg (measurement at 365 nm) or 0.5 µg and 6 µg (measurement at 340, 334 nm), respectively. The sample solution must therefore be diluted sufficiently to yield an ethanol concentration between 0.01 and 0.12 g/l or 0.005 and 0.06 g/l, respectively.

Because of the high sensitivity of the method it has to be taken care that ethanol free water is used and it is worked in an ethanol free atmosphere.

### Dilution table

estimated amount of ethanol per liter measurements at		dilution with water	dilution factor F
340 or 334 nm	365 nm		
< 0.06 g	< 0.12 g	-	1
0.06-0.6 g	0.12-1.2 g	1 + 9	10
0.6 -6.0 g	1.2 -12 g	1 + 99	100
6.0 -60 g	12 -120 g	1 + 999	1000
> 60 g	> 120 g	1 + 9999	10000

Because of the volatility of ethanol, the dilution of samples should be carried out as follows:

Fill the volumetric flask half with water and pipette the sample with an enzyme test pipette or a piston type pipette under the surface of the water. Fill up to the mark with water and mix.

If the absorbance difference measured ( $\Delta A$ ) is too low (e.g.  $< 0.100$ ), the sample solution should be prepared anew (weigh out more sample or dilute less strongly) or the sample volume to be pipetted into the cuvette can be increased up to 0.5 ml. The volume of solution 1 or reaction mixture 2, respectively, remains the same (3.00 ml). The volume of water pipetted into the blank cuvette must then be increased so as to obtain the same final volume for the sample and blank in the cuvettes. The new sample volume  $v$  and the new final volume ( $V$ ) must be taken into account in the calculation.

## 1. Instructions for sample preparation

### 1.1. Liquid foodstuffs

Use clear, colorless or slightly colored solutions directly or after dilution according to the dilution table for the assay. Filter turbid solutions or clarify with Carrez reagents. Strongly colored solutions, which are used undiluted for the assay because of their low ethanol concentration, are to be decolorized with polyamide or polyvinylpyrrolidone (PVPP). Carbonic acid containing beverages are to be degassed, beverages with low ethanol content should be adjusted to the alkaline pH range. During the whole procedure it is to be taken care that the ethanol is not evaporated. For example, when diluting an ethanol containing sample, it is to be pipetted under the surface of the water.

#### Examples:

##### Determination of ethanol in fruit juices

a) Use clear light juices after neutralization or dilution, depending on the ethanol content, for the assay (see dilution table).

b) Decolorize intensely colored juices by addition of 2% polyamide or polyvinylpyrrolidone (PVPP) (e.g. 5 ml juice + 100 mg polyamide or PVPP), stir for 2 min (vessel must be stoppered) and filter. Use the mostly clear solution after neutralization for the assay. Decolorization can often be omitted on dilution.

c) Filter turbid juices and clarify with Carrez-solutions, if necessary: Pipette 10 ml of juice into a 25 ml volumetric flask, add 1.25 ml Carrez-I-solution (3.60 g potassium hexacyanoferrate-II,  $K_4[Fe(CN_6)] \cdot 3 H_2O/100$  ml), 1.25 ml Carrez-II-solution (7.20 g zinc sulfate,  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O/100$  ml) and 2.50 ml NaOH (0.1 mol/l), shake vigorously after each addition, dilute to 25 ml with water, filter (dilution factor  $F = 2.5$ ). Use the clear sample solution, which may be weakly opalescent, for the assay directly or diluted, if necessary.

##### Determination of ethanol in alcohol-deficient and alcohol-free beer

Add solid potassium hydroxide or solid sodium hydroxide to approx. 100 ml sample in a beaker while stirring carefully until a pH value of approx. pH 8-9 is obtained. Use solution, diluted according to the dilution table, if necessary, for the assay.

##### Determination of ethanol in vinegar

Filter, if necessary and neutralize vinegar. Neutralization can be omitted on dilution.

## Determination of ethanol in alcoholic beverages

a) *Wine* (Ref. 14): Dilute wine with redist. water to the appropriate concentration (see dilution table). Decolorization and neutralization are not necessary.

b) *Beer*: To remove carbonic acid, stir approx. 5-10 ml of beer in a beaker for approx. 30 s using a glass rod or filter. Dilute the sample 1:1000 (1+999) with water and use the diluted sample solution for the assay.

c) *Liqueur*: Pipette liquid liqueurs for dilution into an appropriate volumetric flask and fill up with water to the mark. Weigh approx. 1 g of viscous liqueurs (e.g. egg liqueur) accurately into a 100 ml volumetric flask, fill up to the mark with redist. water, keep it in a refrigerator for separation of fat, and filter. Dilute the clear solution 1:100 (1+99) with water and use it for the assay.

d) *Brandy*: Take care as mentioned for taking the sample of alcoholic beverages and dilute to a certain concentration (e.g. 1+999). Convert the measured values (g ethanol/l solution) into volume percentage (v/v) with the aid of conversion tables.

## 1.2. Simplified determination of ethanol in beer, wine (Ref. 14) and brandy

### Sample preparation

Dilute beer, wine and brandy according to the dilution table.

### Reagent solution for 10 determinations

Dissolve 10 tablets of bottle 2 with 30 ml solution from bottle 1, add 0.5 ml suspension from bottle 3, and mix.

(Attention: Prepare reagent solution with alcohol-free water in alcohol-free atmosphere. Store in a container tightly stoppered.)

### Stability

The reagent solution is stable for 8 h at 20°C.

### Procedure

Pipette 3.00 ml reagent solution into the cuvette and read absorbance  $A_1$ . Start reaction by addition of 0.1 ml diluted sample. On completion of the reaction (approx. 5 min) read absorbance  $A_2$ . Determine absorbance difference of  $A_2 - A_1 = \Delta A$ .

### Calculation

$$c = \frac{0.714}{\epsilon} \times \Delta A \times F \text{ [g ethanol/l sample]}$$

F = dilution factor

### 1.3. Pasty foodstuffs

Homogenize semi-solid samples, extract with water or dissolve, respectively, and filter, if necessary. Clarify with Carrez-solutions or decolorize.

#### Examples:

##### Determination of ethanol in chocolates, sweets and other alcohol-containing chocolate products

*Chocolates with liquid filling compound (brandy balls, brandy cherries):*

Open, e.g., one brandy ball carefully, pipette 0.50 ml of the liquid filling into a 50 ml volumetric flask filled with approx. 25 ml water, taking care that the tip of the pipette dips into the water. Fill up to the mark with water, stopper and mix. Dilute the solution with water in a ratio of 1:20 (1+19). Use 0.1 ml of the diluted solution for the assay (dilution factor  $F = 2000$ ).

*Chocolate products with highly viscous filling:*

Weigh accurately the filling of one or several sweets or chocolates into a 50 ml volumetric flask filled with approx. 5 ml water (when the sample is weighed by means of a pipette, the tip of the pipette must not touch the water surface). Fill up to the mark with water, mix, filter, if necessary, and dilute until the alcohol content of the sample is less than 0.12 g/l.

##### Determination of ethanol in jam

Homogenize sample thoroughly (mixer, etc.) and weigh approx. 10-20 g into a beaker. Add some water, mix and neutralize the mixture with KOH, if necessary. Transfer the mixture quantitatively into a 100 ml volumetric flask and fill up to the mark with redist. water.

Decolorize solution with 2% polyamide or PVPP, if necessary (see "Instructions 1.1.b") and filter. Use the filtrate for the assay undiluted.

##### Determination of ethanol in honey

Weigh approx. 20 g honey accurately into a 100 ml volumetric flask and dissolve with some water under slightly agitation at approx. 50°C (ascending tube!), cool to room temperature and fill up to the mark with redist. water. Use the solution for the assay, clarify with Carrez-solutions (see "Instructions 1.1.c"), if necessary (dilution factor  $F = 2.5$ ). Use the clear solution for the assay after filtration.

### Determination of ethanol in dairy products (e.g. curds, kefir)

Weigh approx. 10 g of the homogenized sample accurately into a 100 ml volumetric flask, add approx. 50 ml water and keep the flask (ascending tube!) at 50°C for 15 min under slightly agitation. For protein precipitation add 5 ml Carrez-I-solution, 5 ml Carrez-II-solution and 10 ml NaOH (0.1 mol/l) (see "Instructions 1.1.c"), shake vigorously after each addition. Allow to cool to room temperature and fill up to the mark with water. Mix and filter. Use the clear, possibly slightly turbid solution for the assay.

#### 1.4. Solid foodstuffs

Homogenize solid or semi-solid samples (using a mortar, etc.), extract with water or dissolve; filter, if necessary.

Extract fat-containing samples with warm water (approx. 50°C) in a small flask with ascending tube. Allow to cool for separation of fat, rinse the ascending tube with water and filter.

Deproteinize protein-containing sample solutions with perchloric acid (1 mol/l) in a ratio of 1:3 (1+2) and centrifuge. Neutralize with KOH (2 mol/l).

## 2. Specificity

The influence of aldehydes and ketones is eliminated by the order of reagent addition during the assay. Methanol is not converted because of the unfavourable  $K_m$ -values of the used enzymes.

n-Propanol is quantitatively converted under assay conditions, higher primary alcohols lead to sample dependent creep reactions. Secondary, tertiary and aromatic alcohols do not react. Even higher concentrations of glycerol do not disturb the assay.

## 3. Sources of error

The presence of ethanol in the used redist. water or in air results in increased blanks or in creep reactions, respectively. Therefore it is necessary to cover the cuvette during the assay.

### Detection of interferences of the test system

When the enzymatic reaction is complete after the time given in "Procedure" it can be concluded in general that the reaction is not interfered. For assurance of results a re-start of the reaction (qualitatively or quantitatively) by the addition of 'standard material' can be done: a further change of absorbance proves suitability of measurements.

For the detection of gross errors when performing the assays and of interfering substances in the sample material it is recommended to analyze a sample solution in a double determination with two different sample volumes (e.g. 0.10 ml and 0.20 ml): the measured absorbance differences have to be proportional to the sample volumes.

When analyzing solid samples it is recommended to weigh in two different amounts (e.g. 1 g and 2 g) into 100 ml volumetric flasks and to perform the determinations with the same sample volume: the absorbance differences have to be proportional to the amounts weighed in.

## 4. Further applications (s. References)

The method may also be used in the examination of cosmetics, pharmaceuticals, and in research when analyzing biological samples.

For details of sampling, treatment and stability of the sample see Bernt, E. & Gutmann, I. (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.) 2nd ed. vol. 3, p. 1500, Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, Inc. New York and London.

### Examples:

#### 4.1. Determination of ethanol in blood, plasma or serum, respectively (Ref. 2)

Mix 0.5 ml blood with 4.0 ml ice-cold perchloric acid (0.33 mol/l) and centrifuge. Use 0.1 ml for the assay.

The dilution factor F (depending on sample preparation) is obtained from the sample volume (0.5 ml), the perchloric acid volume (4.0 ml), the specific gravity of the sample material (1.06 g/ml blood, 1.03 g/ml plasma or serum) and the fluid content (0.80 in case of blood and 0.92 in case of plasma or serum):

$$F_{\text{blood}} = \frac{0.5 \times 1.06 \times 0.80 + 4.0}{0.5} = 8.85$$

$$F_{\text{plasma, serum}} = \frac{0.5 \times 1.03 \times 0.92 + 4.0}{0.5} = 8.95$$

### Calculation:

$$c = \frac{0.7256 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \text{ [g ethanol/l sample]}$$

$$c = \frac{15.75 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \text{ [mmol ethanol/l sample]}$$

### Ethanol in blood:

Wavelength	Hg 365 nm	340 nm	Hg 334 nm
c [g/l]	1.889 x $\Delta A$	1.019 x $\Delta A$	1.039 x $\Delta A$
c [mmol/l]	41.00 x $\Delta A$	22.13 x $\Delta A$	22.55 x $\Delta A$

### Ethanol in plasma or serum, respectively:

Wavelength	Hg 365 nm	340 nm	Hg 334 nm
c [g/l]	1.910 x $\Delta A$	1.031 x $\Delta A$	1.051 x $\Delta A$
c [mmol/l]	41.46 x $\Delta A$	22.38 x $\Delta A$	22.81 x $\Delta A$

## 4.2. Determination of ethanol in urine (Ref. 12)

Dilute urine with bidest. water according to the dilution table. Use the diluted sample for the assay (dilution factor = F).

### Calculation:

$$c = \frac{0.7256 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \text{ [g ethanol/l sample]}$$

$$c = \frac{15.75 \times \Delta A \times F}{\epsilon} \text{ [mmol ethanol/l sample]}$$

Wavelength	Hg 365 nm	340 nm	Hg 334 nm
c [g/l]	0.2134 x $\Delta A \times F$	0.1152 x $\Delta A \times F$	0.1174 x $\Delta A \times F$
c [mmol/l]	4.632 x $\Delta A \times F$	2.500 x $\Delta A \times F$	2.549 x $\Delta A \times F$

## 4.3. Determination of ethanol in fermentation samples and cell culture media

Place the sample (after centrifugation, if necessary) into a water-bath at 80°C for 15 min (cover the tube because of the volatility of ethanol) to stop enzymatic reactions. Centrifuge and use the supernatant (diluted according to the dilution table, if necessary) for the assay. Alternatively, deproteinization can be carried out with perchloric acid or with Carrez-solutions. See the above-mentioned examples.

Homogenize gelatinous agar media with water and treat further as described.

## 5. Technical instructions

1. Ethanol is very volatile. Therefore it is necessary to be very careful when handling ethanol containing samples, diluting samples and pipetting sample solutions into the assay system.

When filtering solutions the filtrate should not drop into the container but rinse down the wall.

When dispensing ethanol containing solutions, always pipette these solutions under the surface of water (when diluting) or of buffer (when performing the assay).

2. When pipetting highly diluted sample solutions into the assay system, rinse measuring glass pipet (enzyme test pipet) at least 5 times. The tip of the piston type pipet should be rinsed 3 times.

3. Do not use the same piston type pipet for diluting the sample and pipetting the sample solution into the assay system.

4. Always work in alcohol-free atmosphere with ethanol-free water.

## References

- 1 Beutler, H.-O. & Michal, G. (1977) Neue Methode zur enzymatischen Bestimmung von Äthanol in Lebensmitteln, *Z. Anal. Chem.* **284**, 113-117.
- 2 Beutler, H.-O. (1984) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H. U., ed.) 3rd ed., vol. VI, pp. 598-606, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel
- 3 Schweizerisches Lebensmittelbuch (1981) Kapitel 61B/2.1.
- 4 Gombocz, E., Hellwig, E., Vojir, F. & Petuely, F. (1981) *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **77**, 8.
- 5 Bücher, T. & Redetzki, H. (1951) Eine spezifische photometrische Bestimmung von Äthylalkohol auf fermentativem Wege, *Klinische Wochenschrift* **29**, 615-616.
- 6 Tanner, H. & Brunner, E. M. (1965) Zur Bestimmung des in alkoholfreien Getränken und in Aromadestillaten enthaltenen Äthylalkohols, *Mitt. Gebiete Lebensm. Unters. u. Hyg.* **56**, 480-487.
- 7 Quast, P. (1978) Weitere Notwendigkeiten und Möglichkeiten der Fruchtanalyse beim Apfel, *Mitt. Obstbauversuchsanstalt des Alten Landes* **9**, 293-301.
- 8 Henniger, G. & Boos, H. (1978) Anwendung der enzymatischen Analyse bei der Untersuchung kosmetischer Präparate- dargestellt an einigen Beispielen, *Seifen - Öle - Fette - Wachse* **104**, 159-164.
- 9 Henniger, G. & Hoch, H. (1981) Enzymatische Substratbestimmungen in der pharmazeutischen Analytik, dargestellt an den Bestimmungen von L-Ascorbinsäure, Äthanol und Lactose, *Deutsche Apotheker Zeitung* **121**, 643-649.

10 Kohler, P. (1982) Enzymatische Ethanol-Bestimmung in Glace- und Schokolade-  
produkten, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 73, 44-49.  
11 Jung, G. & Féraud, G. (1978) Enzyme-coupled measurement of ethanol in whole  
blood and plasma with a centrifugal analyzer, Clin. Chem. 24, 873-876.  
12 Beutler, H.-O. (1985) unpublished results.  
13 Pfandl, A. & Menschig, D. (1984) Ein Beitrag zur enzymatischen Glycerin- und  
Ethanolbestimmung, Pharm. Ind. 46, 403-407.  
14 Die Methode ist zugelassen bei der Untersuchung von Wein im Rahmen der

Qualitätsweinprüfung in Rheinland-Pfalz (1985; Landwirtschaftskammer Bad  
Kreuznach) und in Hessen (1986; Ministerium für Landwirtschaft und Forsten).  
The use of the method is admitted for the investigation of wine within quality  
wine examination in Rheinland-Pfalz (1985; Landwirtschaftskammer Bad Kreuz-  
nach) and in Hessen (1986; Ministerium für Landwirtschaft und Forsten).  
15 Buckee, G.K. & Baker, C.D. (1986) Enzymatic Determination of Ethanol in  
Alcohol-Free and Low Alcohol Beers, Monatsschrift für Brauwissenschaft 39,  
257-259.

# Ethanol standard solution

for the Test-Combination Ethanol  
UV-method, Cat. No. 176 290

**Concentration\***: see bottle label.

Ethanol standard solution is a stabilized aqueous solution of ethanol.  
It serves as standard solution for the enzymatic analysis of ethanol  
in foodstuffs and other materials.

## Application

1. *Addition of ethanol standard solution to the assay mixture:*  
Instead of sample solution the standard solution is used for the assay.

## 2. Restart of the reaction, quantitatively:

After completion of the reaction with sample solution and measuring of  $A_2$ ,  
add 0.05 ml standard solution to the assay mixture. Read absorbance  $A_3$   
after the end of the reaction (approx. 5 min). Calculate the concentration  
from the difference of ( $A_3 - A_2$ ) according to the general equation for cal-  
culating the concentration. The altered total volume must be taken into  
account. Because of the dilution of the assay mixture by addition of the  
standard solution, the result differs insignificantly from the data stated on  
the bottle label.

## 3. Internal standard

The standard solution can be used as an internal standard in order to  
check the determination for correct performance (gross errors) and to see  
whether the sample solution is free from interfering substances:

Pipette into cuvettes	blank	sample	standard	sample + standard
reaction mixture 2	3.00 ml	3.00 ml	3.00 ml	3.00 ml
redist. water	0.10 ml	-	-	-
sample solution	-	0.10 ml	-	0.05 ml
standard solution	-	-	0.10 ml	0.05 ml

mix, and read absorbances of the solutions ( $A_1$ ) after approx. 3 min.,  
Continue as described in the pipetting scheme under "Procedure".  
Follow the instructions given under "Instructions for performance of  
assay" and the footnotes.

The recovery of the standard is calculated according to the following  
formula:

$$\text{recovery} = \frac{2 \times \Delta A_{\text{sample + standard}} - \Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times 100 [\%]$$

©1989

**BOEHRINGER MANNHEIM GMBH**  
**Biochemica**

Object	Gewverl (%)		Schimmel (%)		Ethanol mg/100g		
	7 dgn	10 dgn	7 dgn	10 dgn	7 dgn	10 dgn	
0-21	1.25	1.25	1.77	35.68	100	7.9	
	1.18	1.18	1.91	43.62	100	12.4	
	1.35	1.35	1.99	46.18	100	9.7	
7-21	1.46	1.46	1.78	13.23	27.41	5.1	6.5
	1.3	1.3	1.69	19.65	23.39	6.4	8.8
	1.33	1.33	1.88	17.53	20.27	4.3	9
14-21	1.48	1.48	6.39	2.02	11.59	3.9	5.9
	1.34	1.34	6.67	1.5	17.44	8.4	7.5
	1.3	1.3	6.81	0.32	16.85	6.5	3.8
21-21	1.28	1.28	1.7	6.67	18.33	8.2	4.4
	1.29	1.29	1.67	10.16	11.78	8.9	8.6
	1.24	1.24	1.71	7.58	8.71	7.8	7.9
0-2	1.24	1.24	1.47	4.73	9.58	28.8	28.5
	1.09	1.09	1.45	1.16	17.99	22.1	30
	1.24	1.24	1.68	11.86	21.93	20.1	20.9
7-2	1.26	1.26	1.65	1.53	9.31	16.2	47.7
	1.19	1.19	1.49	4.74	4.59	14.5	31.9
	1.2	1.2	1.7	2.39	20.79	24.2	43
14-2	1.23	1.23	1.62	5.52	10.94	23.3	36.8
	1.09	1.09	1.51	5.87	5.21	24.2	26
	1.21	1.21	1.7	4.91	7.57	13.8	26.9
21-2	1.16	1.16	6.29	2.28	3.3	25.8	36
	1.09	1.09	6.36	0.55	1.79	31	34.5
	1.24	1.24	6.26	0.13	1.65	29	25.4
0-1	1.19	1.19	1.51	1.63	4	38.5	55.3
	1.03	1.03	0.87	0.53	7.4	29.5	49.6
	1.08	1.08	2.2	0.69	5.42	39.9	45.4
7-1	1.22	1.22	1.47	1.71	11.17	38	38
	1.14	1.14	1.41	2.58	8.28	48.4	47.1
	1.29	1.29	1.65	3.14	5.07	38.2	42.9

ZWARTE BESSEN

14-7-92.

als bestw.

ALGEMEN OORDEEL

nummer	ZOET / ZUUR	SMAAK / AROMA	Consistentie	ALGEMEN OORDEEL
1-21	<ul style="list-style-type: none"> <li>- veel zoet / zuur</li> <li>- a.d. zure kant</li> <li>- iets bitterig</li> <li>- schil wrang</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zw. b. ar. zwak</li> <li>- sterk 'kruisb. achtig'</li> <li>- heterogeen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- vrij zacht</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geen afwijking,</li> <li>- lijkt 'overryp'</li> </ul>
- 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- redelyk zoet / zuur</li> <li>- a.d. zoetige kant</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- duidelyk specifiek zw. b. ar</li> <li>- iets 'pynboom' achtig.</li> <li>(harsig)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- vrij zacht (gelijk 0-21)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zeer specifiek harsachtig ribb aroma</li> </ul>
- 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zuur</li> <li>- niet wrang</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zwak zw. b. ar.</li> <li>- iets kartonig</li> <li>- iets 'groen'</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- vrij zacht</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geen afwijking</li> <li>- zwak zw. b. aroma / iets onryp.</li> <li>- zuur.</li> </ul>
1-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- redelyk zoet / zuur</li> <li>- duidelyk a.d. zure kant</li> <li>- zeer zure schil</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- + geen zw. b. ar.</li> <li>- iets kartonig</li> <li>- iets 'groen'</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zacht tot stevig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geen afwijking</li> <li>- maakt onrype indruk</li> <li>- vrij zuur</li> <li>- zeer zwak zw. b. ar.</li> </ul>
- 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- goed zoet / zuur</li> <li>- vrij veel zoet</li> <li>- heterogeen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- redelyk zw. b. aroma</li> <li>- vrij sterk harsachtig</li> <li>- soms iets vlierb. achtig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- redelyk stevig</li> <li>- soms iets melig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geen afwijking</li> <li>- redelyk zw. b. aroma</li> <li>- totaal geen sterk (harsachtig)</li> <li>- zeer heterogeen.</li> </ul>

ZWARTE Bessen

14-7-92

016 SAP

zw. b. sap 1  
H2O 1  
suiker 10%

nr. ster	ZOET / ZUUR	SMARF / AROMA	ALGEMEEN OORDEEL
-21	<ul style="list-style-type: none"> <li>- goed zoet / zuur</li> <li>- a. d. zure kant</li> <li>- niet wrang</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- specifiek zw. b. aroma.</li> <li>- harsachtig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geen afwijking</li> <li>- goed zw. b. aroma.</li> <li>- goed zoet / zuur</li> </ul> <p>(goed)</p>
-21	<ul style="list-style-type: none"> <li>- redelijk zoet</li> <li>- redelijk zuur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- redelijk zw. b. aroma (minder dan 0-21)</li> <li>- iets metallig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geen afwijking</li> <li>- redelijk zw. b. ar.</li> <li>- minder gewrig dan 0-21</li> <li>- redelijk zoet / zuur (goed-redelijk)</li> </ul>
-21	<ul style="list-style-type: none"> <li>- redelijk zoet</li> <li>- vrij zuur</li> <li>- iets wrang</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- redelijke zw. b. ar. (zwakker dan 0-21)</li> <li>- iets metallig.</li> <li>- iets 'catty' (= 'kattenpis')</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- iets vreemd? → vrij duidelijke 'catty' comp.</li> <li>- minder harsachtig</li> <li>- vrij zuur.</li> </ul> <p>(?)</p>
-21	<ul style="list-style-type: none"> <li>- goed zoet / zuur</li> <li>- a. d. zure kant (zuur dan 0-21)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- redelijk sterk zw. b. ar.</li> <li>- iets harsachtig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geen afwijking</li> <li>- goed zw. b. ar. aroma</li> <li>- iets minder vol dan 0-21</li> </ul> <p>(goed)</p>

ZWARTE BESSEN 17-7-92

als sap

Zw. b. 1  
H<sub>2</sub>O 1  
Suiker 10%

	ZOET/ZUUR	SMAR/AROMA	ALGEMEEN GORDEEL
1-21	- redelyk zoet/ zuur - hasmaak zuur/wrang	- zwak zw. b. ar. - specifieke geur.	- geen afwijking - zwak zw. b. aroma - redelyk zoet/zuur - wrangige hasmaak.  (redelyk)
1-21	- goed zoet/zuur - iets wrangig	- zwak zw. b. ar. - specifieke geur	- geen afwijking - zwak zw. b. ar - goede zoet/zuur verhouding - 'milde' smaak.  (redelyk/goed)
-21	- goed zoet/zuur (iets a. d. zure kant)	- redelyk zw. b. aroma - haast spec. geur zurig fruitige geur	- geen afwijking - redelyk zw. b. aroma - goed zoet/zuur  (goed/redelyk)
-2	- redelyk zoet/ zuur - iets a. d. zure kant	- zwak zw. b. aroma - redelyk vol - zwakke zw. b. geur	- geen afwijking - zwak zw. b. aroma - redelyk zoet/zuur  (redelyk)
-2	- redelyk zoet/zuur - a. d. zure kant	- ± geen zw. b. ar. - zurig fruitig ar. (als rode bes) - ± geen geur	- geen afwijking - ± geen zw. b. aroma - ± geen geur - wat waterig  (zeer matig)
-2	- zwak zoet/ zuur	- zeer zwak zw. b. ar. - zeer zwakke geur	- geen afwijking - zeer zwak zw. b. bes - zwak zoet/zuur  (matig)

	ZOET/ZUUR	SMACKE/AROMA	ALGEMEEN OORDEEL
-2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- veel zoet/zuur</li> <li>- scherp zuur in nasmaak</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zeer zwak zw. b. aroma</li> <li>- zurig/fruitig aroma (rode bes)</li> <li>- zure geur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geen afwijking</li> <li>- zeer zwak zw. b. aroma</li> <li>- scherp zuur</li> </ul> <p>(matig/redelijk)</p>
-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- intens zoet/zuur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zeer zwak zw. b. ar.</li> <li>- ± geen geur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geen afwijking</li> <li>- zeer zwak zw. b. aroma</li> <li>- veel zoet/zuur</li> </ul> <p>(matig/redelijk)</p>
-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- redelijk zoet/zuur</li> <li>- scherpe nasmaak</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- niet zeer specifiek zw. b.</li> <li>- fruitig.</li> <li>- zure geur.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geen afwijking</li> <li>- ± geen zw. b. ar</li> <li>- redelijk zoet/zuur</li> </ul> <p>(matig)</p>