

ONDERZOEKACTIVITEITEN "INWENDIGE AFWIJINGEN IN CONFERENCE-PEREN".

Periode januari 1997-September 1997

Vertrouwelijk

A.C.R. van Schaik (projectleider)

R.H. Veltman

H.W. Peppelenbos

S.A. Robot

M.G. Sanders

T.R. Lammers

Onderzoek in opdracht van:

- **Ministerie van Landbouw en Visserij, Den Haag**
- **Produktschap voor de Tuinbouw, Den Haag**

Onderzoekuitvoering door:

- **Agrotechnologisch Onderzoek Instituut (ATO-DLO), Wageningen**
- **Fruitteelt Praktijk Onderzoek (FPO), Wilhelminadorp**

2122063

1.0 Inleiding	4
2.0 Introductie	5
2.1 Gevoeligheid koolzuur en zuurstof tijdens bewaring	5
2.2 Bruinverkleuring gevolg van enzymwerking	5
2.3 Decompartimentatie	7
2.4 Schade aan membranen	7
3.0 Materiaal en methoden	8
3.1 Produkt, onderzoekmateriaal en bewaring standaardomstandigheden	8
3.2 Bewaring in doorstroomsysteem	8
3.3 Polyfenoloxidasen	9
3.4 Vitamine C	10
3.5 Laserexperimenten	10
3.6 Proefopzet lage zuurstofgehalten	11
4.0 Resultaten	13
4.1 Relatie tussen bruin, PPO activiteit en totaal polyfenolgehalte	13
4.2 Effect van gascondities op PPO activiteit	15
4.3 Effect van ascorbaat en glutathion op polyfenoloxidase	15
4.4 Vitamine C metingen in peren	17
4.5 Artificeel inbrengen vitamine C in peren	19
4.6 Laserexperimenten	21
4.6.1 Ethaanmetingen	22
4.6.2 Metingen aan acetaldehyde en ethanol	22
4.7 Bewaring in lage zuurstofgehalten	24
4.7.1 Ontwikkeling van hol en bruin is verschillend	24
4.7.2 Meer hol en bruin in lage zuurstofgehalten	24
4.7.3 Stevigheid en kleur	28
4.7.4 Conclusies bewaring in lage zuurstofgehalten	29
5.0 Verder onderzoek	30
5.1 Toepassingsgericht onderzoek	30
5.1.1 Lasermetingen	30
5.1.2 Vitamine C	30
5.1.3 Ontwikkeling toetsmethode voor hol en bruin	31
5.1.4 Adaptatieonderzoek	32
5.2 Fundamenteel onderzoek	33
5.2.1 MDA	33
5.2.2 PPO en substraten PPO	33
5.2.3 Vacuoles	34
Bijlagen	35

Samenvatting

In de periode januari tot en met september 1997 is in het project “Reductie inwendige afwijkingen in Conference-peren” uitvoerig aandacht besteed aan de onderwerpen die als prioriteit zijn aangegeven door de begeleidingscommissie.

Dit betreft de ontwikkeling van hol en bruin in CA in relatie met Polyphenoloxidase (PPO) activiteit en totaal polyfenolgehalte, vitamine C in relatie met afwijkingen en onderzoek naar signaalstoffen (ethaan) voor bruinverkleuring met laserfaciliteiten.

De meeste activiteiten hadden betrekking op de achtergronden van het proces van bruinverkleuring met als oogmerk de ontwikkeling van een betrouwbare toetsmethode om gevoelige partijen peren te onderkennen.

Een belangrijk resultaat was de relatie van vitamine C met het bruinverkleuringsproces. Bij extreme CA-condities (laag O₂- hoog CO₂) daalt de vitamine C concentratie vrij snel, in deze peren ontwikkeld zich bruinverkleuring vrij snel. Bekend is dat vitamine C een stof is die celmembranen beschermt tegen afbraak door radicalen en dat het ook rechtstreeks bruinverkleuring tegengaat. Mogelijk kan deze stof bij extreme CA-condities onvoldoende aangemaakt worden waardoor schade optreedt. Vitamine C of mogelijk ook andere scavengers kunnen eventueel als testmethode of signaalstof fungeren.

Ook is vastgesteld dat ethaan als vluchtige stof vrijkomt bij de ontwikkeling van het schadep proces. Of dit ook van praktisch belang wordt nader onderzocht.

Er zijn geen effecten vastgesteld van de gascondities op PPO en polyfenolen. PPO's en polyfenolen zijn nodig bij het bruinwordingsproces. Enzymactiviteiten en substraatconcentraties lijken echter niet limiterend bij het bruinverkleuringsproces.

In het onderzoek naar de ontwikkeling van hol en bruin is vooral aandacht besteed aan de lage zuurstofgehalten. De eerste symptomen van hol en bruin zijn al na 5 weken zichtbaar, in eerste instantie treedt bruinverkleuring, wat na ongeveer 9 weken bewaring langzamerhand overgaat in holtevorming. Na ongeveer 20 weken is er sprake van een stabilisatie. In nabewaring bij hogere temperaturen wordt bruinverkleuring versneld omgezet in hol. In lage zuurstofgehalten

(< 2%) zijn de peren veel gevoeliger voor de afwijkingen vooral in combinatie met hogere koolzuurgasgehalten (>1%). De huidige bewaarconditie van 3% O₂ is daarom relatief veilig.

1.0 Inleiding

In dit rapport worden de onderzoekactiviteiten beschreven voor het project “*Reductie inwendige afwijkingen in Conference-peren*” die uitgevoerd zijn van januari 1997 tot september 1997.

De hoofddoelstelling voor het ATO-DLO zijn om de processen op te helderen die hol en bruin veroorzaken. Op basis van deze kennis moet een toets ontwikkeld worden om de gevoeligheid van Conference-peren te testen. Op basis van de ontwikkelde kennis en het gebruik van de testmethode kunnen veilige CA-condities gerealiseerd worden voor praktijktoepassing.

Tijdens de vergadering van de begeleidingscommissie is afgesproken dat het onderzoek van het ATO tijdens de verdere projectuitvoering gericht zal worden op:

- 1 Ademhaling, diffusie en energiehuishouding van de peer
- 2 Onderzoek aan:
 - rol van antioxidanten
 - signaalstoffen voor hol en bruin
- 3 Ontwikkeling van hol- en bruin bij diverse CO₂- en O₂-gehalten.

De afspraken hieromtrent zijn vastgelegd in een brief van het Produktschap voor de Tuinbouw van 25 maart 1997.

2.0 Introductie

In deze introductie wordt in het kort herhaald wat de wetenschappelijke achtergronden zijn van hol- en bruin gerangschikt naar fenomeen en proces.

2.1 Gevoeligheid voor koolzuur en zuurstof tijdens bewaring

Conference peren in Controlled Atmosphere (CA) bewaring kunnen inwendige afwijkingen vertonen. Twee van deze afwijkingen, die doorgaans samen genoemd worden, zijn Hol en Bruin. De directe oorzaken van Hol en Bruin zijn niet bekend, echter een aantal risico-factoren zijn goed omschreven. De problemen doen zich in de eerste maanden van bewaring voor. De peren worden eerst bruin, en -zover dat nu duidelijk is- vervolgens hol. Hol en Bruin begint meestal in de directe omgeving van de kern, het klokhuis. De gevoeligheid voor beide afwijkingen wordt bepaald tijdens de groei in de boomgaard. Verschillende locaties vertonen verschillende gevoeligheden. Naast de boomgaardfactoren speelt het klimaat een belangrijke rol. Statistieken geven aan dat er slechte jaren zijn en minder slechte. Daarnaast komen beide afwijkingen minder voor in de Zuideuropese landen.

Een andere factor is het pluktijdstip. Te laat geplukte peren zijn gevoeliger voor Hol en Bruin dan laat geplukte peren. Ook het te vroeg plukken van peren levert problemen op. Niet alleen de opbrengst ligt veel lager, maar ook is het vochtverlies groter tijdens bewaring en is de initiële smaakkwaliteit minder.

Hol en Bruin wordt gezien als een CO₂-afwijking wat in combinatie met een lager zuurstofgehalte versterkt wordt. Wat nu exact het effect is van hoge koolstofdioxide-concentraties op peren in bewaring en lage O₂, is niet geheel duidelijk. Wel zijn er een aantal ideeën over deze effecten. De grootste aandacht binnen het onderzoek in het nabije verleden ging en gaat uit naar de optimalisering van de bewaarcondities. Echter om tot een gefundeerd bewaaradvies te komen is kennis van de processen die tot hol en bruin leiden noodzakelijk.

De exacte werking van CO₂ en O₂ en de invloed op biochemische en fysiologische effecten zijn belangrijke kernpunten.

2.2. Bruinverkleuring is gevolg van enzym-werking

De bruining in het weefsel van de peer ontstaat door oxidatie van hydroxyfenol verbindingen als gevolg van een polyfenoloxidase. Polyfenoloxidases (PPO's) katalyseren één- en twee electronen oxidaties, waarbij fenolen omgezet worden in quinonen. Bij deze reactie is zuurstof vereist. PPO's katalyseren de orthohydroxylatie van een monofenol gevolgd door de oxidatie tot *o*-diquinon (ook wel chinon), of de oxidatie van een *o*-dihydroxyfenol tot *o*-diquinon, welke respectievelijk de *creolase* en de *catecholase* activiteit genoemd worden. De uit de hydroxyfenolen gevormde quinonen kunnen in een secundaire reactie reageren met aminozuren of peptiden. Deze

complexvorming zorgt voor een intensivering van de bruining. Tevens kunnen quinonen reageren met hydroxyfenolen (polymerisatie). Een speciaal geval van polymerisatie is de formatie van een donkergekleurde hoogmoleculaire polymeer: Melanine. Melanine wordt gevormd uit het fenolische aminozuur tyrosine. Melanine is reactief, en reageert met proteïnen. De nomenclatuur voor de verschillende PPO's is verwarrend. Tyrosinase -een in de peer voorkomend PPO- wordt ook wel monofenol mono-oxygenase, difenol oxidase, catechol oxidase of difenol oxygen oxidoreductase, afhankelijk van of men de creolase- dan wel de catecholase-activiteit beschrijft van hetzelfde enzym. In deze tekst wordt Tyrosinase aangehouden.

Een ander in de literatuur beschreven als veelvoorkomend PPO is Laccase. Laccase kent alleen een catecholase activiteit. Beide enzymen -laccase en tyrosinase- komen niet alleen voor in het plantenrijk, maar bijvoorbeeld ook in Fungi.

Het is algemeen geaccepteerd dat PPO's voorkomen in chloroplasten van planten. Transcriptie van het enzym vindt plaats in de kern. Het eiwit wordt zonder processing geïmporteerd in de chloroplast. De afwezigheid van een targeting sequentie is een ongewone uitzondering. In andere berichten wordt echter wel gesuggereerd dat het rijpe eiwit kleiner is, in andere woorden: er vindt processing plaats.

Tyrosinase kent een actieve en latente vorm. Tijdens senescentie kan het enzym geactiveerd worden. Aangenomen wordt dat het enzym gelocaliseerd is in de tylakoïden. Activatie vindt plaats door het loskomen van het eiwit van de tylakoïdmembraan, bijvoorbeeld tijdens de release van vetzuren bij de afbraak van deze membraan. De wijze van verankering van het enzym aan de membraan is overigens niet bekend.

Naast het membraangebonden tyrosinase, is het enzym tevens terug te vinden in de oplosbare fractie van de cel. In fungi komt het voor dat tyrosinase uitgescheiden wordt. Excretie is bij planten een uitzondering. Het enzym bevindt zich in dit geval in de celwand-fractie.

In appels is de mate van bruining o.a. afhankelijk van de compositie van de verschillende fenolische verbindingen (Hydroxycinnamides, Flavanolen en Flavonolen) en van andere factoren als: de cultivar, mate van rijping en post-harvest condities. Soortgelijke verschijnselen zijn in peren waargenomen. De activiteit van PPO verschilt per cultivar. hetzelfde geldt voor het totaal polyfenol gehalte en het gehalte chlorogeenzuur. Zowel de PPO-activiteit als het totaal polyfenolgehalte ligt in de cultivar 'Red' significant hoger dan in 'Bosc' peren. Chlorogeenzuur -een veel voorkomend polyfenol in peren- is betrokken bij de enzymatische bruining. PPO-activiteit, de concentratie Chlorogeenzuur -een veel voorkomend polyfenol in peren- en het totaal polyfenol gehalte nemen sterk af tijdens bewaring van peren bij kamertemperatuur. Het pH optimum van de PPO-activiteit bij beide cultivars ligt tussen de 5.0 (Bosc) en 5.5 (Red). Het temperatuur optimum voor beide rassen ligt tussen de 20 (Bosc) en 23 (Red) °C. Di- en trihydroxyfenolen zijn substraten voor PPO van beide cultivars. Beide enzymen vertonen geen specificiteit voor monohydroxyfenolen. Dit gegeven komt overeen met dezelfde resultaten bij d'Anjou en Yali peren: 4-methylcatechol, catechol, dopamine, caffeic acid (koffiezuur) en

chlorogeenzuur zijn respectievelijk de substraten, die het snelst geoxideerd worden door het enzym.

2.3 Decompartimentatie

Een aantal effecten van CO₂ tijdens bewaring zijn in de literatuur beschreven. CO₂ remt de respiratie. Door remming van bepaalde enzymen (succinaat dehydrogenase) ontstaat er in appels een ophoping van succinaat, één van de componenten van de citroenzuurcyclus. Een verklaring voor deze effecten is een pH verlaging van het vruchtvlees als gevolg van CO₂. Tevens wordt de vorming van ethyleen geremd. Schilkleur, hardheid, ethyleenproductie en respiratiesnelheid tonen aan dat rijping vertraagd wordt door bewaring bij hoge CO₂-concentraties. Het mechanisme en het gevolg van dit effect zijn onbekend.

Peren bewaard onder CO₂ vertonen ultrastructurele veranderingen in organellen: mitochondriën, plastiden en vacuole. Mitochondriën fragmenteren en worden kleiner. De vorm van het organel gaat over van elliptisch naar rond. In plastiden maakt een systeem van lamellen plaats voor kleine, ronde membraan inclusies en vasiculaties. De tonoplast vertoont proliferatie in dochter compartimenten. Er ontstaat een groot aantal kleine vacuolen in de cel. Al deze verschijnselen duiden erop dat CO₂ direct of indirect een invloed heeft op de structuur van membranen. De compartimentatie van processen in de cel wordt (tijdelijk) opgegeven. Bij het proces van decompartimentatie is de ouderdom en samenstelling van de membranen vanzelfsprekend van belang. Aangenomen wordt dat polyfenoloxidasen gelokaliseerd zijn in de thylakoïden van de chloroplast, of in vesicles of andere lichaampjes in niet-groene plastide typen. In appels is polyfenoloxidase tevens in de mitochondriën gevonden. Anderzijds is het substraat van het enzym gelokaliseerd in de vacuole. In onrijpe appels -zo is beschreven in de literatuur- zijn 97% van de polyfenolen gecompartmenteerd in de vacuole. De overgebleven 3% bevindt zich in de celwand, en niet in het cytosol. De concentratie polyfenolen kan oplopen van 100 mM in onrijpe tot 1-10 mM in rijpe appels.

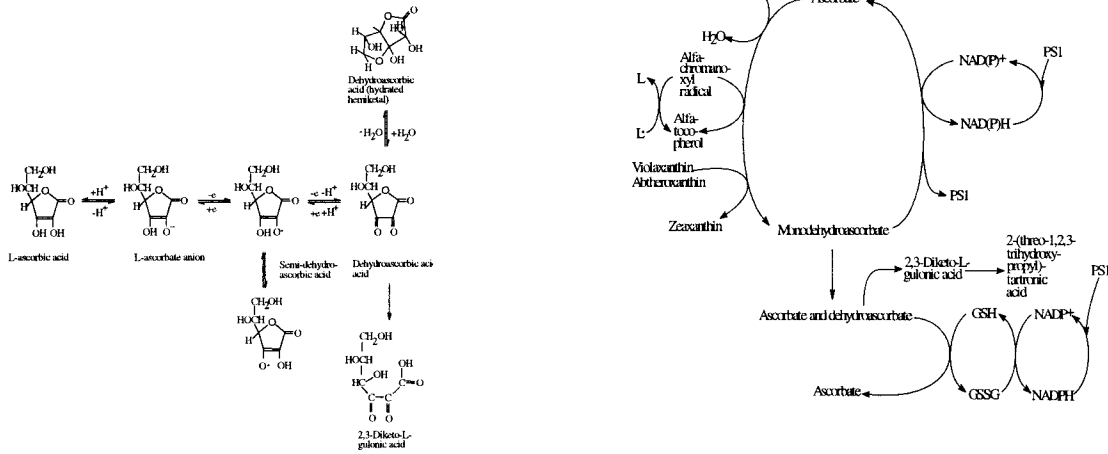
Uit deze gegevens uit de literatuur hebben wij onze hypothese voor het ontstaan van bruining gedestilleerd. Tijdens het proces van decompartimentatie ontmoet het polyfenoloxidase, door lekkage of vernietiging van interne membraan structuren, het substraat (polyfenolen). De reactie gekatalyseerd door PPO, leidt uiteindelijk tot bruining van het weefsel.

2.4. Schade aan membranen

De samenstelling van membranen (fosfolipiden) hangt af van de functie van het membraan, van de biologische leeftijd van de plant, de temperatuur, etc.. Normaal bestaat de membraan van planten uit fosfolipiden met C18 en C16 vetzuurstaarten. Deze vetzuren kunnen verzadigd dan wel onverzadigd zijn afhankelijk van het wel of niet voorkomen van dubbele bindingen in het molecuul.

Verzuren kunnen geoxideerd worden. Dit proces wordt lipide peroxidatie genoemd.

Peroxidatie van membranen wordt veroorzaakt door radicalen en kan leiden tot blijvende schade, bijvoorbeeld lekkage van membranen. Het proces kan enzymatisch - peroxidase, catalase, superoxide dimutase- dan wel chemisch -antioxidanten- voorkomen worden. Bekende antioxidante zijn vitamine E en C en glutathion.



Afbraak van ascorbate naar dehydroascorbaat, en verder (links). Relaties tussen vitamine C (ascorbaat), vitamine E (α -tocoferol), glutathion (GSH) en het energiemetabolisme van de cel (rechts).

Tussen genoemde antioxidanten bestaan verschillende relaties. Daarbij zijn vitamine C en glutathion in staat direct bruining te voorkomen door gevormde quinonen weer te reduceren tot de overeenkomstige polyfenolen. Beide oxidanten worden bij dit proces geoxideerd.

3.0 Materiaal en methode

3.1 Produkt, onderzoekmateriaal en bewaring standaardomstandigheden.

Om peren met een verschillende gevoeligheid voor Hol en Bruin te kunnen vergelijken, werden vruchten geplukt op twee lokaties en op drie pluktijdstippen. De peren werden geplukt in Strijen Sas (teler 1) en Zuid Beijerland (teler 2), beide in het westen van Nederland. Historisch gezien vertonen de peren uit Strijen sas een grotere gevoeligheid voor Bruin. De peren werden op beide lokaties geplukt op 11 September (pluk 1), 18 September (pluk 2, optimale pluk) en 25 September (pluk 3) 1997. De peren werden opgeslagen in veiling kratten, die geplaatst werden in 600 liter containers met een watersealing bij -1 °C en 2% zuurstof (statisch systeem). Koolstofdioxide werd laag gehouden (<0.5%) m.b.v. een KOH scrubber.

3.2 Bewaring in het doorstroomsysteem

Peren werden tijdens monitoren bewaard in 70 liter containers aangesloten op een

doorstroomsysteem. Een range van CO₂- en O₂-concentraties werd geselecteerd bij een temperatuur van 0 of 5 °C. De temperatuur werd elk kwartier gemeten met een Vaisala thermometer (HMP 31 UT). Het gasmengsel werd eerst door een 500 ml fles met water geleid voordat het de containers binnentrad, om het vochtgehalte op peil te houden (97-99%, nabij verzadigingspunt). Puur N₂, O₂ en CO₂ werd gemixed m.b.v. mass flow controllers (Brooks 5850 TR series). De flowrate bij de experimenten lag tussen de 490 en 510 ml/min.

Eén maal in de drie uur werden de gasconcentraties binnen de containers gecontroleerd m.b.v. een ADC 7000 gasanalyser (Analytical Development Company Limited, Hoddesdon, England).

3.3 Polyfenoloxidase bepalingen

Uit de peer genomen monters werden gevriesdroogd en vermalen in een mortier onder vloeibare stikstof. Een 'enzymoplossing' werd gemaakt door 50 mg van dit vermalen monster te mengen met 1 ml 100 mM NaPi buffer, pH 6.5 (buffer B). Monsters werden voor gebruik gecentrifugeerd om celresten te verwijderen. 0.9 ml Buffer B werd gemengd met L-DOPA (eindconcentratie 16.7 mM), verzadigd met zuurstof en gemixed met 0.1 ml enzymoplossing. Het totale reactievolume is 1 ml. L-DOPA wordt door PPO's omgezet in Dopachroom (een tussenstap). De toename van de absorptie als gevolg van het ontstane Dopachroom werd gemeten op een Perkin Elmer spectrofotometer bij 478 nm. (CSS, Computerized Spectroscopy Software, version 4.3, lambda 2, 11, 15, copyright 1985-1993, the Perkin Elmer Corporation). Aangenomen werd een extinctie-coëfficiënt van 3313/M*cm voor het oxidatie-product. Voor meting van totaal PPO werd SDS (eindconcentratie 0.11 %) aan het reactiemengsel toegevoegd. Voor meting van Laccase alleen werd Tropolone (0.5 mM) toegevoegd. Tropolone remt de activiteit van Tyrosinase specifiek. Voor de berekening van de enzymactiviteiten in µkat. werd de volgende formule gebruikt [formule I]:

$$activity = \frac{\Delta A_{\min^{-1}}}{60\epsilon} * \frac{V_{cuvet}}{V_{sample} * C_{sample}} =$$

$$\frac{\Delta A_{\min^{-1}}}{3313 l/mol * 60 sec.} * \frac{1 ml}{0.1 ml * 10 gr/l} = 5.0307 * \Delta A_{\min^{-1}} [\mu kat./gr]$$

Bij gebruik van 50 gr/l extract werd de constante voor de absorptie-waarde in de formule logischerwijs door vijf gedeeld.

3.4 Vitamine C bepalingen

Het vitamine C gehalte van weefsel is het ascorbaat- plus het dehydroascorbaat gehalte. Beide stoffen zijn meetbaar m.b.v. een HPLC.

Peren werden boven vloeibare stikstof verdeeld in drie compartimenten: de kern, de cortex (vruchtvlees) en de schil. De drie monsters werden direct ingevroren. Ascorbaat is zeer temperatuur en licht gevoelig. Experimenten werden zoveel mogelijk in het donker uitgevoerd.

Bevroren pereweefsel werd vernalen in een keukenmixer. Aan 10 gram pulp werd 10 ml methanol, 10 ml 9.5% oxaalzuur en 70 ml Milli-Q toegevoegd. Dit mengsel werd gedurende 15 seconden op ijs gehomogeniseerd met een Ultra Turrax. Het ontstane homogenaat werd respectievelijk gefiltreerd over een Schleicher und Schül 595 ½ filter, een 0.45 µm steriel filter en een Sep-pak C-18 filter. Het Sep-pak filter werd van tevoren geactiveerd met 5 ml methanol en 10 ml Milli-Q.

Om de hoeveelheid dehydroascorbaat te kunnen berekenen werd het totaal ascorbaat gehalte in de samples bepaald. Dehydroascorbaat in de samples werd gereduceerd middels toevoeging van 0.3 ml Tris (pH 7.0) en 0.5 ml DL-homocysteïne (totaal-volume 1 ml). Monsters stonden 15 minuten in de koelkast voor injectie in de HPLC.

Voor de bepaling van ascorbaat werd gebruik gemaakt van een Symmetry C-18 kolom met een particle size van 5 µm, en een Sentry Guard column C-18. Detectie vond plaats met een UV-Vis detector. Monsters werden met de hand geïnjecteerd, gebruik makend van een 20 µl injection loop. De teruggang van vitamine C in de monsters is te groot om gebruik te kunnen maken van een autosampler. Als standaard voor de meting werden verschillende concentraties ascorbaat gemaakt en doorgemeten. De recovery van de extractie ligt tussen de 96 en 97%.

Het eluens voor het vitamine C assay bestaat uit 2.5 gram tetrabutylammoniumhydrosulfaat (z.s. Merck 818858) en 55 ml methanol (p.a. Merck 6009) aangevuld tot 1 liter met Milli-Q. De flow rate tijdens het meten bedroeg 1 ml/min..

3.5 Laser experimenten

Uitscheiding van bepaalde gassen kan informatie geven over allerlei processen in fruit, in dit geval de peer. De uitstoot van pentaan en vooral ethaan kan een maat zijn voor de peroxidatie van membranen, ethanol en acetaldehyde geven informatie over de fermentatie tijdens ULO bewaring, en ethyleen is een rijpings indicator. Deze gassen kunnen zeer nauwkeurig gemeten worden met een photoacoustische laser. De laser meet niet alleen nauwkeuriger dan een GC, het is tevens mogelijk verschillende gassen tegelijk te meten, en belangrijker, processen kunnen gemonitord worden.

Fotoacoustiek (FA) is gebaseerd op de excitatie van moleculen door middel van infrarood licht. Geëxciteerde moleculen geven energie door, waardoor er een temperatuursverhoging plaats vindt. Met gemoduleerd licht stijgt de temperatuur, en de druk, periodisch, waardoor er een fotoacoustisch effect ontstaat. Als infrarood licht bron

wordt een CO laser gebruikt. Excitatie vindt plaats in fotoacoustische cellen, waarvan er maximaal drie in de laserstraal worden geplaatst. Een onderbreker van de laserstraal zorgt voor de modulatie van het licht, hetgeen het signaal genereert. Dit signaal wordt gedetecteerd met zeer gevoelige microfoontjes. De FA cel is aangesloten op een doorstroomsysteem. Aan het doorstroomsysteem worden cuvetten gekoppeld, waarin de peren gekoeld onder gascondities naar keuze bewaard kunnen worden. De verschillende gasvormige producten, die de peren uitscheiden, worden door de gasstroom van het doorstroomsysteem meegevoerd naar de FA cel. Vóór de FA cel kunnen scrubbers geplaatst worden om koolstofdioxide te verwijderen, of 'cooling traps' om verschillende gassen te scheiden op vluchtigheid. De flow rate door het systeem werd constant op 5 liter/ uur gehouden.

Gas	Detectie limiet	Proces
etheen		rijping, lipide peroxidatie
ethaan	1 ppb	lipide peroxidatie
ethanol	3 ppb	fermentatie
acetaldehyde	0.1 ppb	fermentatie
pentaan	3 ppb	lipide peroxidatie
water	0.1 ppb	(transpiratie)

Tabel 1. Detectie limieten voor enkele gassen gemeten met de FA laser.

3.6 Proefopzet bewaring in lage O₂-gehalten

Om enerzijds de ontwikkeling van hol en bruin gedurende het bewaarseizoen in beeld te brengen en anderzijds de specifieke invloed van lage zuurstofgehalten te testen is een uitgebreid empirisch onderzoek uitgevoerd het bewaarseizoen 1996-1997.

Peren van 2 herkomsten (Veld en Sas) geplukt op het ideale tijdstip voor langdurige bewaring werden opgeslagen in duplo in het statisch container systeem.

De peren werden eerst 1 week gekoeld en daarna onder gascondities gebracht.

De CA-condities in deze proef waren (vierkant schema):

CO ₂ %	O ₂ %
0-0.2	0.5
0.5	1
3	2

Opgemerkt moet worden dat de objecten in 3% CO₂ niet in duplo waren opgeslagen. Duplo wil zeggen dat de gasconcentratie in 2 aparte containers die ook in aparte koelcellen stonden. De 2 herkomsten werden steeds samen in de containers bewaard.

Metingen

Globaal elke maand werd van beide herkomsten in iedere bewaarconditie een monster genomen.

Direkt en na 4 dagen nabewaring in 18°C werden 15 peren per monster beoordeeld op inwendige afwijkingen. Hierbij werden een classificatie aangehouden waarbij de peren in 4 klassen werden ingedeeld nl: 0=gezond, 1= lichte aantasting, 2=matige aantasting en 3 zware aantasting. De classificatie werd aangehouden voor zowel hol als bruin.

Vooraf werd steeds de hardheid van de peren gemeten met de penetrometer (grote plunjer) en de grondkleur met de Minolta.

De laatste beoordeling van de monsters vond plaats in juli.

4.0 Resultaten

4.1. Relatie tussen bruin, PPO activiteit en totaal polyfenolgehalte

Peren werden in het statisch systeem bewaard onder 0.5 en 3.0% CO₂. Van individuele peren werd de activiteit gemeten van tyrosinase en laccase, en tevens de tyrosinase activiteit na activering van het latente enzym met SDS. Deze drie enzym activiteiten werden m.b.v. Genstat gerelateerd aan de parameters herkomst, CO₂-concentratie tijdens bewaring, pluktijdstip en grootte (peren zijn voor ze de bewaring in gingen verdeeld in grof en fijn). Van alle correlaties bleken er slechts twee significant (tabel 2 en 3). Er werd een relatie gevonden tussen de laccase activiteit, het pluktijdstip en de bewaarconditie. Ten tweede werd er een relatie gevonden tussen de actieve tyrosinase fractie, het pluktijdstip en de locatie. Beide gevallen kunnen verklaard worden door het inwendig bruin worden van de peren. Inwendig bruining verlaagt de enzymactiviteiten significant. In tabel 2 is dit te zien bij de 3% CO₂ kolom. Peren bewaard onder CO₂ vertonen sneller bruining. In tabel 3 is te zien dat peren van teler 1 bij het late pluktijdstip een significante verlaging van de enzymactiviteit vertonen. Het is bekend uit eerdere experimenten dat peren van teler 1 een grotere gevoeligheid vertonen voor bruin, net als laat geplukte peren. Inderdaad vertoonden de peren meer bruin. Kort gezegd lijkt het er niet op dat een verhoogde enzymactiviteit bruining induceert, maar dat bruining een verlaagde enzymactiviteit teweeg brengt, voor zover deze twee te scheiden zijn.

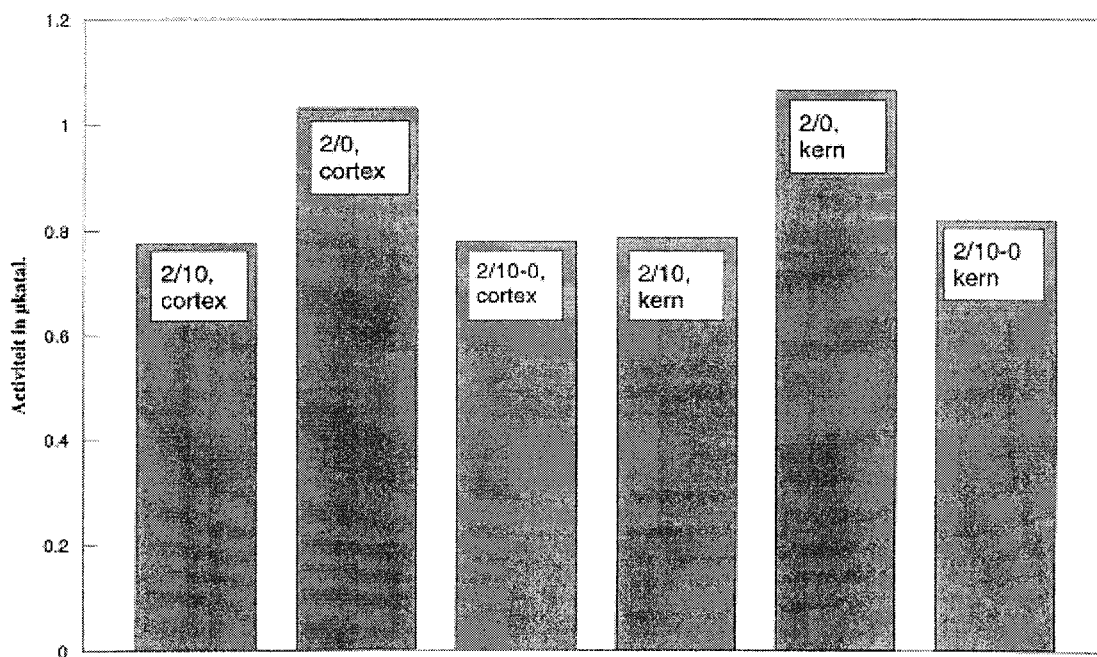
act. tyrosinase (nkat.)		
pluk datum	Locatie	
	te le r 1	te le r 2
1	27.9 (a)	14.8 (ab)
2	17.6 (ab)	14.7 (ab)
3	4.6 (b)	13.8 (ab)

Tabel 2. Relatie tussen de actieve vorm van tyrosinase, de locatie en het pluktijdstip. (a) En (b) geven een significant verschil aan ($p < 0.05$). Alle activiteiten staan weergegeven in nkalat.

laccase (nkat.)		
pluk datum	CO ₂ concentratie	
	0.5	3.0
1	9.5 (a)	8.9 (a)
2	5.4 (ab)	9.4 (a)
3	4.9 (b)	2.3 (b)

Tabel 3. Relatie tussen de laccase activiteit, en de koolstofdioxide concentratie tijdens bewaring en het pluktijdstip. (a) En (b) geven een significant verschil aan ($p < 0.05$). Alle activiteiten staan weergegeven in nkaltaal.

Effect van gasconditie op de totale tyrosinase activiteit.

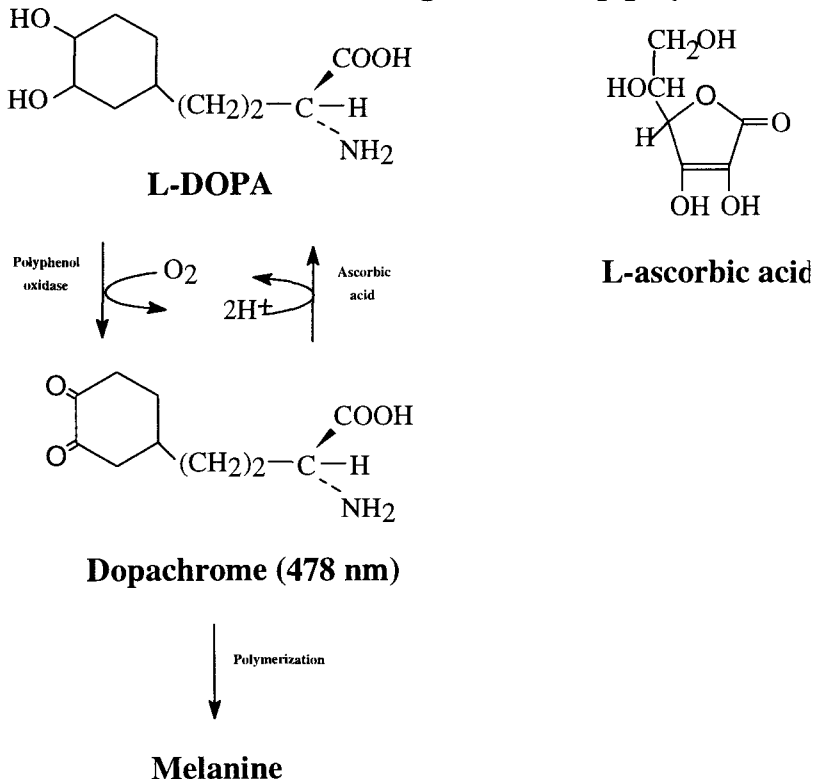


Figuur 1. Activiteits bepaling van het totaal tyrosinase. De activiteit werd gemeten in de cortex (3 staafdiagrammen aan de linker zijde van de figuur) en in de kern (drie rechtse staafdiagrammen). Verklaring legenda: 2/0: bewaring onder 2% zuurstof, 2/10: bewaring onder 2% zuurstof en 10% koolzuur, 2/10-0: na 25 dagen omgeschakelde containers. Elke staaf is het gemiddelde van 20 metingen: Van 5 peren uit twee containers met dezelfde conditie (samen 10 peren) werden metingen in duplo uitgevoerd. Standaard afwijkingen van het gemiddelde waren respectievelijk (van links naar rechts): 0.27, 0.22, 0.29, 0.29, 0.24 en 0.18.

4.2. Effect van gascondities op PPO activiteit.

De resultaten uit paragraaf 3.1. wijzen niet op een relatie tussen PPO activiteit en de gasconditie waaronder de peren bewaard werden. Tijdens een ander experiment werd deze relatie nomaals, nader, onderzocht. Peren werden bewaard onder normale condities (2% zuurstof), en onder 2% zuurstof met daaraan toegevoegd 10% koolzuur. Dit bewaarexperiment werd in duplo uigevoerd. Naast deze standaard bewaarmethode werden tevens 2 containers na 25 dagen omgeschakeld van hoog koolzuur (10%) naar de normale conditie. Van de zes containers werden na 6 weken monsters genomen van elk 5 peren. Van de peren werd de cortex en de kern geïsoleerd, waarna verschillende enzymmetingen gedaan werden. Gemeten werd de tyrosinase activiteit, latent aanwezige tyrosinase, totaal tyrosinase (actief plus latent) en de laccase activiteit. De enzymmetingen aan laccase en tyrosinase vertonen geen relatie met de aangebrachte gascondities. Er is slechts een tendens te vinden bij de metingen aan het totaal tyrosinase (figuur 1). Bij deze metingen zijn de standaard deviaties hoog. Toch levert de tendens inzichten op. Al na drie weken werden 2 van de 6 containers omgeschakeld van hoog koolzuur naar een atmosfeer met slechts 2% zuurstof. Toch blijkt dat de latente fractie van het tyrosinase zich niet herstelt naar het niveau van normaal bewaarde vruchten, maar gelijk blijft op het niveau van peren bwaard onder hoog koolzuur (10%).

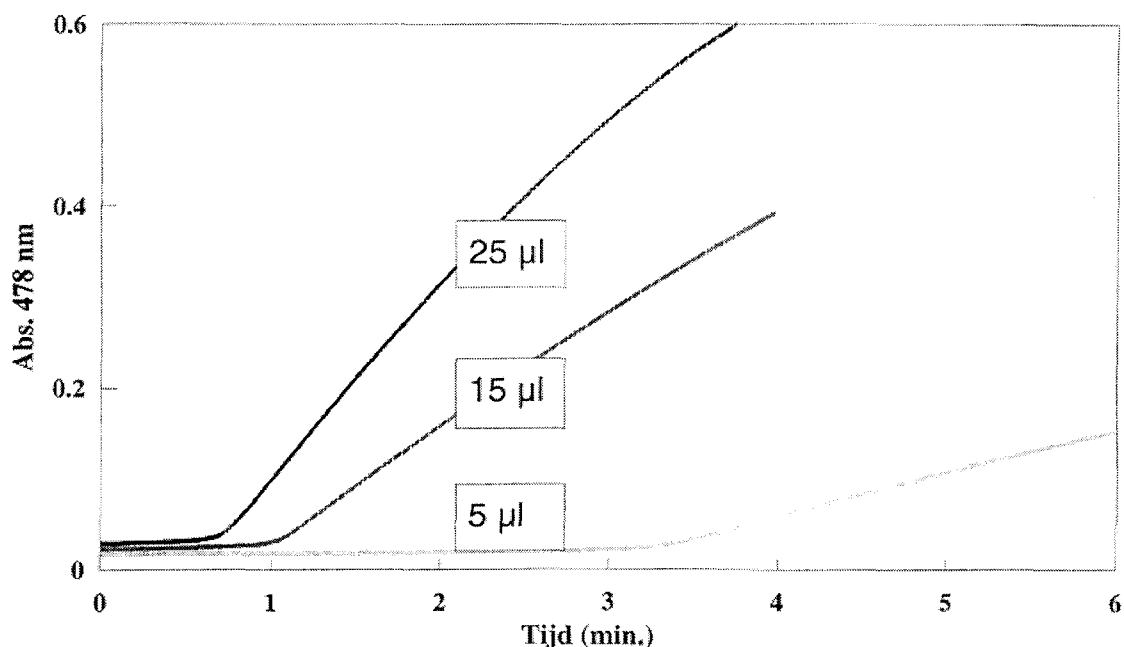
4.3 Effect van ascorbaat en glutathion op polyfenoloxidase



Figuur 2. De reactie gekatalyseerd door polyfenoloxidase (PPO). Het gevormde reactieproduct dopachroom wordt gemeten met de fotospectrometer (478 nm). De reactie wordt waarschijnlijk niet geremd door ascorbaat en glutathion. Wel reduceren deze stoffen het gevormde reactieproduct dopachroom terug naar L-DOPA.

Ascorbaat is in staat bruining direct te voorkomen. Het is een sterke anti-oxidant, en is in staat bepaalde oxidatie reacties te voorkomen. De reactie die gekatalyseerd wordt door polyfenoloxidase (PPO) is zo'n oxidatie reactie. Onze bevinding is dat de reactie *in vitro* inderdaad geremd wordt. Althans, experimenten wijzen erop dat de reactie doorgaat, maar dat het reactieproduct dopachroom gereduceerd wordt door ascorbaat, en ook door glutathion. Bij toevoeging van beide stoffen ontstaat er een 'delay'. Er is geen activiteit van PPO zichtbaar tot het moment dat alle ascorbaat of glutathion geoxideerd is. Pas dan begint dopachroom zich op te hopen. Uit de metingen blijkt tevens dat zuurstof een factor is die snel limiterend wordt. Experimenten werden reciprook uitgevoerd: Verschillende ascorbaat concentraties in het assay (50-250 μM) en verschillende enzym activiteiten bij een vaste ascorbaat concentratie (100 μM).

Remming PPO door glutathion.



Figuur 3. Remming van de PPO reactie door glutathion. Er werd een standaard hoeveelheid glutathion (100 μM eindconcentratie) toegevoegd aan het assay. De hoeveelheid sample (enzym) werd gevarieerd (5, 15 en 25 μl). De absorptie van het gevormde dopachroom werd gemeten bij 478 nm.

Door toevoeging van verschillende hoeveelheden enzym bij een gelijkblijvende hoeveelheid glutathion worden twee dingen zichtbaar. De delay-tijd (de tijd voordat de reactie zichtbaar wordt) verandert lineair en omgekeerd evenredig, en tevens verandert de helling van de ontstane curve lineair met de hoeveelheid enzym. Dit geldt tevens voor de metingen met vitamine C (geen figuur). Bij gebruik van hogere enzym concentraties is er een afbuiging te zien als gevolg van zuurstof tekort in het assay mengsel. Deze afbuiging werd gekwantificeerd door de reactie tevens te monitoren op

een Biological Oxygen Monitoring systeem (BOM). Dit systeem meet zeer nauwkeurig het verbruik van zuurstof tijdens een reactie middels een zuurstofelectrode. Tevens geldt dit systeem als contole. Na te gaan is of de PPO reactie de enige zuurstofverbruiker in het assay mengsel is. De resultaten van de BOM-metingen dienen nog verder uitgewerkt en gemodelleerd te worden.

4.4. Vitamine C metingen aan peren

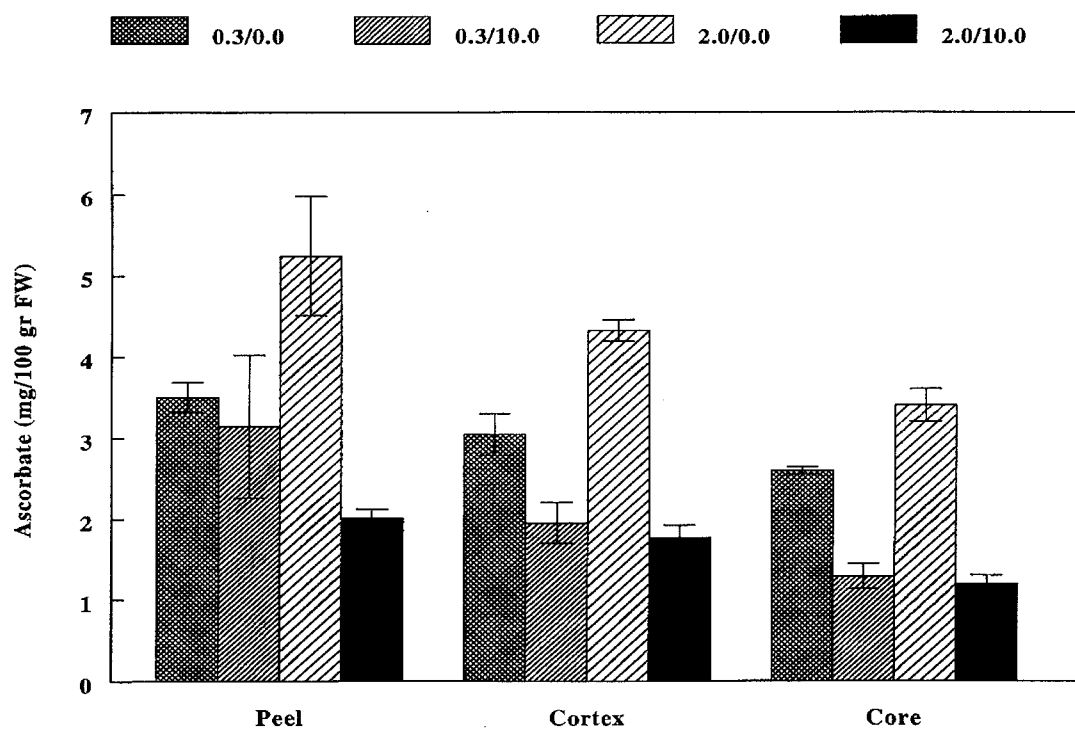
Met het doorstroomsysteem kunnen praktijksituaties gesimuleerd worden. Zo kunnen we bijvoorbeeld Hol en Bruin in peren induceren bij een hoge koolstofdioxideconcentratie (10%) en een verhoogde temperatuur (5 °C). Tijdens de inductie van bruining is het mogelijk experimenten te doen, die meer inzicht geven in het proces dat aan bruining vooraf gaat. Eén van de tijdens bewaring gemeten parameters is het vitamine C gehalte van peren.

Tijdens normale bewaring in bulk opslag (2% zuurstof, koolstofdioxide <0.5%) neemt het vitamine C gehalte (totaal ascorbaat) van peren nauwelijks af (tabel 4).

Vitamine C (mg/100 gr VG)		
	gem.	std.
5 november		
cortex	3.403	0.319
kern	3.387	0.594
14 januari		
cortex	3.285	0.103
kern	3.364	0.101

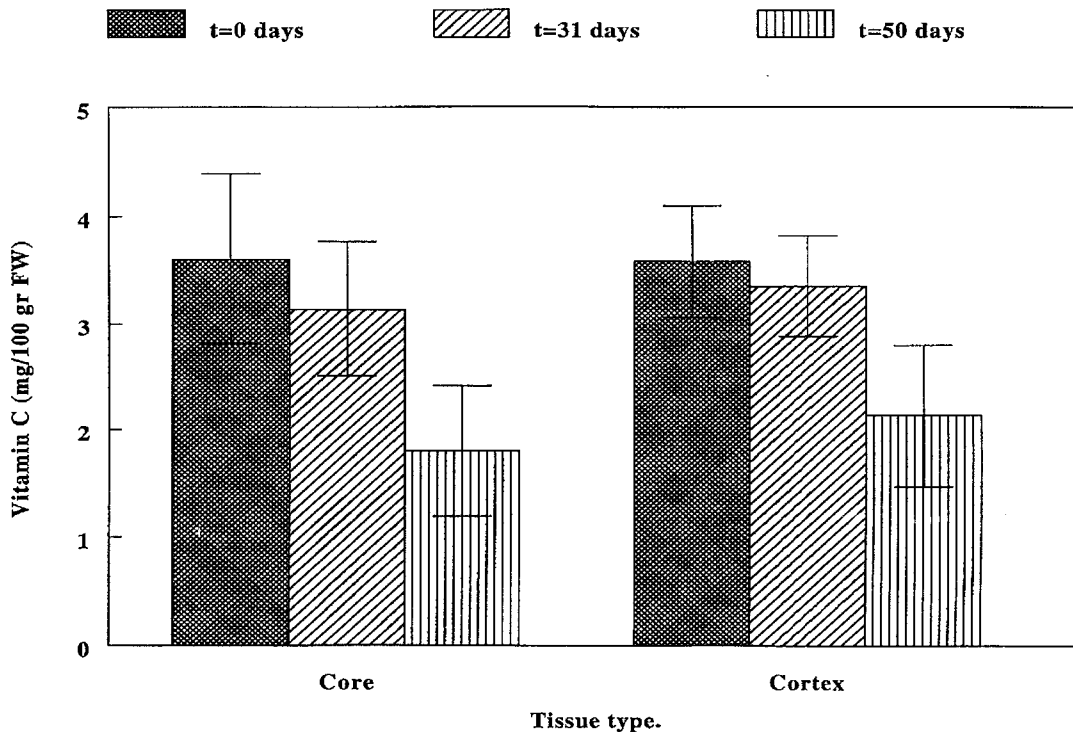
Tabel 4. Vitamine C gehalte van peren bewaard onder normale omstandigheden: 2% zuurstof en koolstofdioxide <0.5% in het statisch systeem (-1 °C). Peren zijn afkomstig van teler 1 (optimale, 2° pluk) De linker kolom toont de gemiddelde gehalten, de rechter de standaard deviaties. Januari: n=8; november n=15. VG staat voor versgewicht.

Echter bij veranderen van de gascondities, zoals het verder verlagen van de zuurstof concentratie en het verhogen van de koolzuur concentratie, treden er duidelijk veranderingen op in het vitamine C- en ascorbaat gehalte. De atmosferische conditie tijdens bewaring is een cruciale factor, die van invloed is op het vitamine C- en ascorbaat gehalte. Verlaagd zuurstof (0.3%) resulteert in een 30% afname in de cortex en een 24% afname van ascorbaat in de kern van de peer. Met 10% koolzuur vermindert het ascorbaatgehalte met 60% vergeleken met de standaard condities (fig. 4).



Figuur 4. Ascorbaat gehalte van peren na 60 dagen bewaring onder verschillende condities in het doorstroomsysteem (5 °C). Vruchten zijn van teler 1, en van het 2^e pluktijdstip. Waarden zijn het gemiddelde van een duploproef van mengmonsters van 5 peren (n=10) +/- SE. Gascondities binnen elk cluster: 0.3% zuurstof, geen koolzuur; 0.3% zuurstof, 10% koolzuur; 2% zuurstof, geen koolzuur en 2% zuurstof, 10% koolzuur. De clusters representeren respectievelijk de schil, de cortex en de kern van de peer.

In een ander experiment werd het vitamine C gehalte van peren gemonitord. Peren werden in het doorstroomsysteem bewaard onder hoog koolzuur en zonder koolzuur. Het vitamine C gehalte werd per individuele peer bepaald (geen mengmonsters) (figuur 5).



Figuur 5. Vitamine C gehalte van peren bewaard in het doorstroom systeem (5 °C) onder 10% koolzuur en 2% zuurstof. Vruchten zijn van teler 1 en van het 2^e pluktijdstip. Getoonde waarden zijn het gemiddelde van 5 metingen aan individuele peren. Eén staaf is het gemiddelde van twee containers met gelijke gascondities (n=10) +/- SE. Waarden binnen het cluster corresponderen met de verschillende meetdata (t=0, 31 en 50 dagen). De clusters representeren de cortex en de kern fractie van de peer.

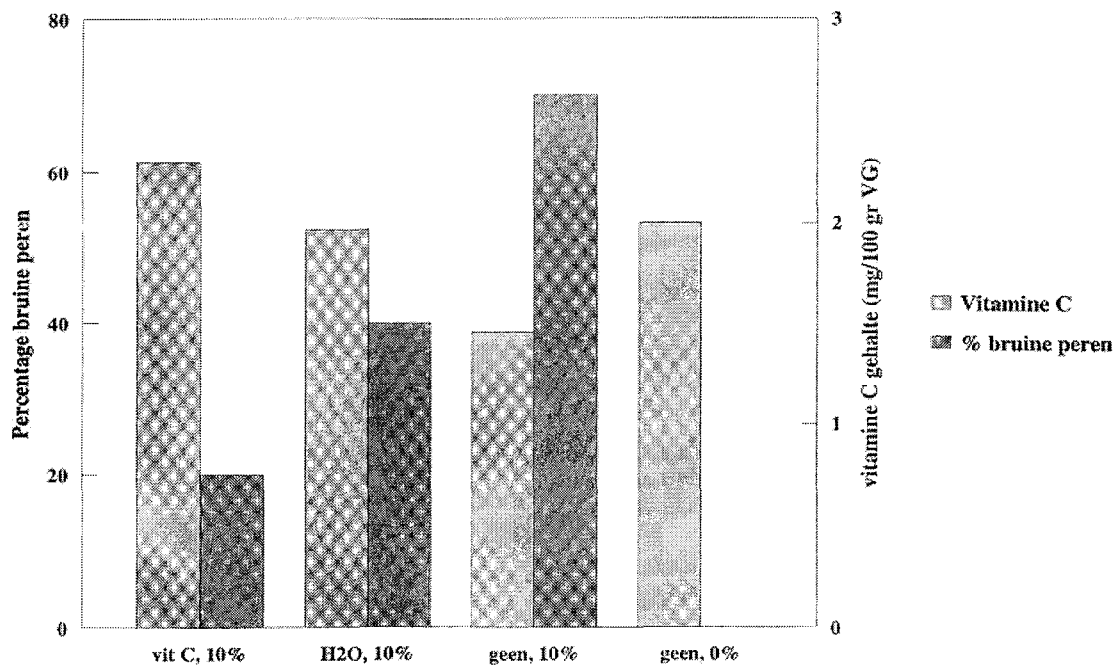
Peren bewaard onder normale condities (2% zuurstof, controle) vertonen de eerste 31 dagen een lichte toename van vitamine C (van 3.60 ± 0.79 mg naar 5.18 ± 0.70 mg), en vervolgens op t=50 een scherpe afname (2.58 ± 0.47 mg). Dit effect wordt toegeschreven aan een rijpingseffect. Tijdens rijping neemt het vitamine C gehalte in peren scherp af (Trautner en Somogyi, 1978). Dit rijpingseffect wordt niet gesignaleerd in onder koolzuur bewaarde peren, omdat koolzuur rijping remt. Onder normale condities nemen penetrometer waarden af van 11.40 ± 0.91 op t=0 tot 5.3 ± 2.0 op t=31. Bij onder koolzuur bewaarde peren blijft de penetrometer waarde op t=31 redelijk stabiel op 10.7 ± 0.80 . Om rijpingseffecten te scheiden van de vitamine C afname als gevolg van bewaring onder hoog koolzuur zal in de toekomst de bewaartemperatuur verlaagd worden naar de normale temperatuur tijdens bewaring (-1 °C).

4.5. Artificeel vitamine C inbrengen in peren

In het afgelopen seizoen is geprobeerd op een artificieele wijze het vitamine C gehalte in peren te verhogen. Met een injectienaald werden aan beide zijden van de buik van de peer twee gaatjes geprikt tot aan het klokhuis. De naald werd vooraf gesteriliseerd met alcohol. Vervolgens werden de peren vacuum geïnfilteerd in een bad met een 1% vitamine C oplossing. Als controle werden de peren tevens met water behandeld. De peren bleken na enige tijd inderdaad meer vitamine C te bevatten. Echter er trad ook

rotting op rond de gaatjes (die na infiltratie met was afgesloten werden). De peren werden bewaard onder 2% zuurstof en 10% koolzuur. Ondanks de rotting was er een redelijk onderscheid te maken tussen rotting en bruin als gevolg van koolzuurschade.

Vitamine C vacuüm infiltratie

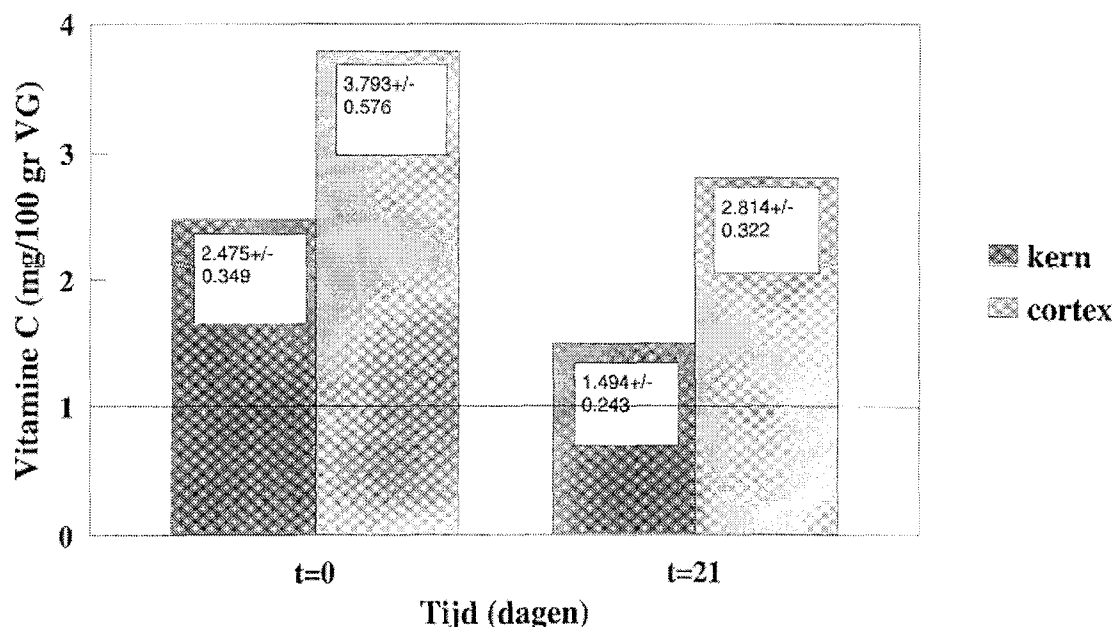


Figuur 6. Peren werden vavuüm geïnfiltreerd met een 1% vitamine C oplossing en water (controle). De peren werden samen met niet behandelde peren bewaard onder 2% zuurstof en 10% CO₂ in het doorstroomsysteem. Als blanco werden peren bewaard onder alleen 2% zuurstof. Onder elk cluster staven staat de behandeling en het koolzuurgehalte tijdens bewaring vermeld. Na 4 weken werd van 10 peren (duplo proef, 5 peren uit beide bewaarcontainers) het vitamine C gehalte bepaald. Standaard deviaties van de vitamine C metingen van links naar rechts respectievelijk: 0.513, 0.036, 0.503 en 0.428. Na 6 weken werden de peren beoordeeld op interne bruining. Aantal gescoorde peren van links naar rechts respectievelijk: 62, 68, 20 en 20.

Er komt naar voren dat peren na vacuüm infiltratie minder bruin vertonen. Ook de water geïnfiltreerde peren vertonen minder bruin. Vraag is nu of het tegengaan van bruin veroorzaakt wordt door het inbrengen van vitamine C of door de verbeterde gasuitwisseling door de twee gaatjes (de was sloot op den duur de gaatjes niet, of niet helemaal meer af). Figuur 6 is slechts, dit dient benadrukt te worden, een proefexperiment. Toch zijn er duidelijk tendenzen zichtbaar: na infiltratie van vitamine C is slechts 20 % van de peren in meer of mindere mate bruin (in deze weergave werden de peren uit de drie bruiningsklassen 'licht bruin' 'matig bruin' en 'ernstig bruin' bij elkaar opgeteld). Ook de water geïnfiltreerde peren bevatten minder bruin (40% vergeleken met 70% zonder infiltratie behandeling), deze peren bevatten tevens meer vitamine C. Uitgebreider onderzoek moet de relatie tussen bruining en vitamine C verduidelijken.

Bij het boven genoemde experiment werd nog een vijfde behandeling meegenomen. Peren werden in twee containers (duplo experiment) bewaard onder 2% zuurstof en 10% CO₂. Na 3 weken bewaring was het vitamine C gehalte van de peren gedaald tot beneden 1.5 mg/ 100 gr versgewicht (figuur 7). Uit ervaring beschouwen we 1.0 mg als een kritieke grens. Daarom werd na 25 dagen de gasconditie veranderd naar een atmosfeer met alleen 2% zuurstof. Na 85 dagen bewaring bleek dat minder dan 10% van de peren bruining vertoonde tegenover ca. 70% bruine peren uit containers waar de gasconditie niet geswitched werd (85 dagen 2% zuurstof en 10% CO₂).

Afname vitamine C onder hoog CO₂



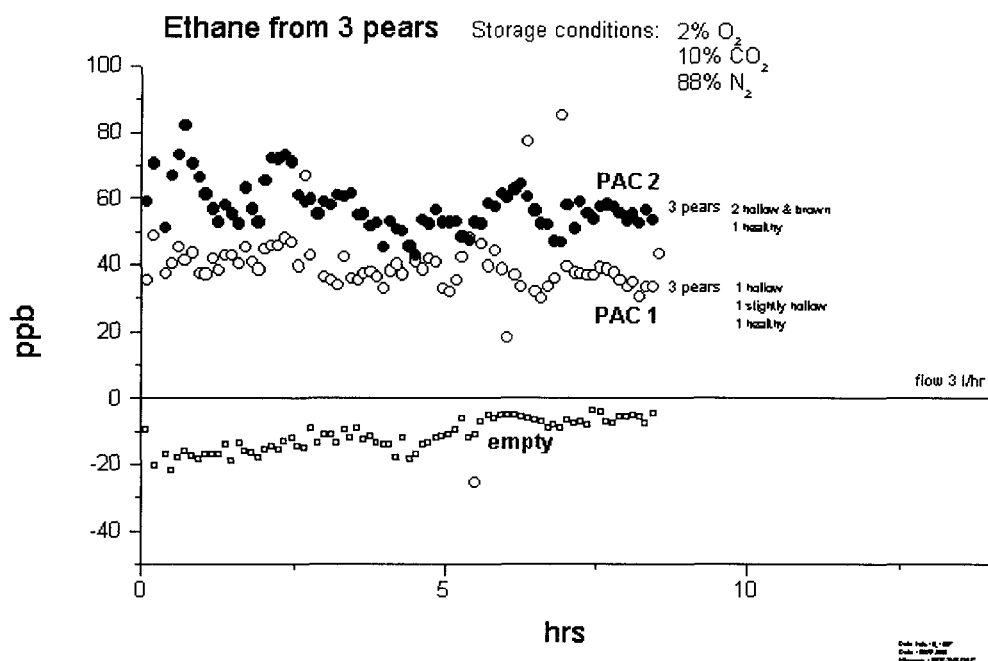
Figuur 7. Peren werden bewaard onder 2% zuurstof en 10% koolzuur. Na 21 dagen bewaring werd het vitamine C gehalte van 10 peren bepaald (duplo proef, 5 peren uit elke container). Zowel het gehalte in de kern als in de cortex werd bepaald. In elke bar staat de bepaalde gemiddelde waarde weergegeven met de standaard fout. De horizontale lijn ter hoogte van 1 mg/ 100 gr vitamine C geeft de in de tekst vermelde hypothetische grenswaarde aan. Onze waarneming is dat onder deze grens peren bruining gaan vertonen.

4.6. Laser experimenten

De fotoacoustische laser (FA) werd gebruikt voor twee doeleinden. Ten eerste werd met de laser de ethaan uitstoot van peren gemeten. Bruine peren blijken ethaan af te geven. Ethaan is een bijproduct van de lipideperoxidatie, ofwel de afbraak van membranen. Ten tweede werd met de FA laser de emissie van ethanol en acetaldehyde gemeten terwijl de peren blootgesteld werden aan verschillende gascondities. Beide stoffen geven een goede indicatie van de mate van fermentatie.

4.6.1. Ethaan metingen.

Ethaan is met de fotoacoustische laser meetbaar tot ca. 1 ppb. Uit metingen aan individuele peren bleek dat ethaan meetbaar is. Om verder boven de detectiegrens te blijven, werd besloten tijdens elk experiment 3 peren tegelijk te meten.

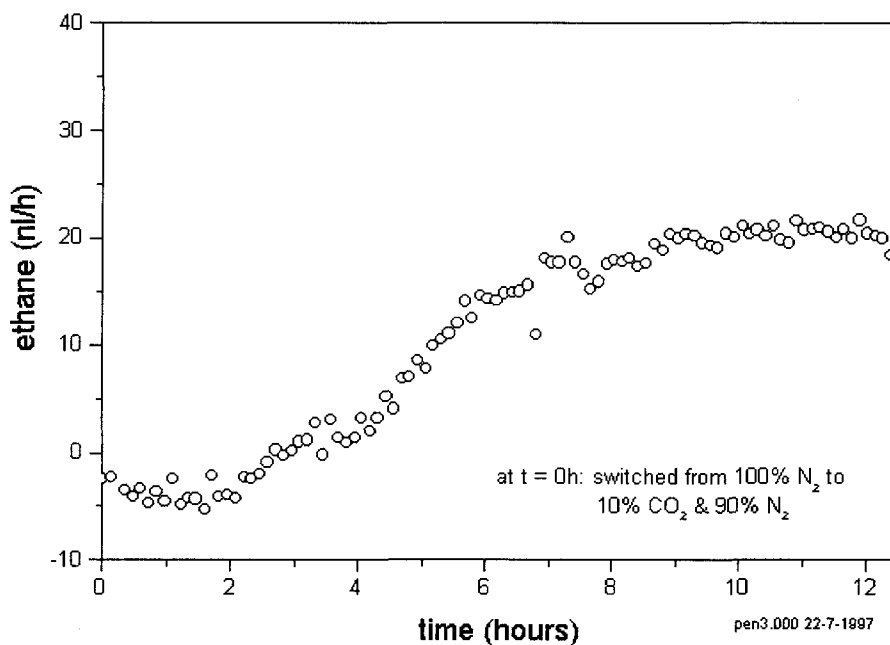


Figuur 8. Ethaan metingen aan peren met de fotoacoustische (FA) laser. Bij de metingen werden 3 peren in een 1½ liter cuvet geplaatst. De cuvet werd aangesloten op het doorstroomsysteem van de laser. Peren stonden tijdens het meten onder een gasstroom met 2% zuurstof en 10% CO₂. Metingen werden uitgevoerd bij 0 °C. (●) Cuvet met 2 Hol en Bruine peren en één gezonde peer. (○) Cuvet met 1 holle, 1 zeer licht holle en een gezonde peer. (□) Controle (lege cuvet). Flow werd constant gehouden op 3 liter/uur. Alle ethaan concentraties in de gasstroom werden uitgedrukt in parts per billion (ppb).

Van de in de gemeten peren was de voorgeschiedenis, d.w.z. de bewaarconditie, teler, pluktijdstip etc., niet bekend. Figuur 8 toont twee voorbeelden van dergelijke metingen. Hieruit blijkt dat er zeer waarschijnlijk een relatie te leggen is tussen de mate van bruining en de emissie van ethaan. De curve met de zwarte, gesloten bolletjes ligt vrij stabiel rond de 70 ppb. De peren van deze meting vertoonden een redelijk ernstige bruinverkleuring (twee peren waren bruin en hol, de derde was gezond). De peren behorende bij de curve met de open bolletjes zagen er veel beter uit (één peer was hol en bruin, één was zeer licht hol en de derde was gezond). De waarden van deze curve lagen rond de 40 ppb. In de toekomst zullen deze experimenten herhaald worden. De bruining in de peer zal dan echter gekwantificeerd worden met computer beeld analyse technieken (CBA). Het kwantificeren van Hol ligt

moeilijker. Hol is slechts visueel te beoordelen, en in klassen in te delen. Na kwantificatie is het beter mogelijk een harde relatie aan te tonen.

Bruine peren geven ethaan af. Echter, gezonde peren die met het doorstroomsysteem van de laser begast worden met een mengsel van 2% zuurstof en 10% CO₂ blijken tevens een verhoogde ethaan afgifte te vertonen (figuur 9). De ethaan emissie van de peren (3 per cuvet) begint na 4 uur begassing op te lopen naar een maximum van rond de 25 nanoliter/uur. De peren worden echter in deze tijd niet bruin. Het kan zijn dat het hier (i) om een tijdelijk effect gaat, (ii) dat de ethaan emissie stabiel blijft rond deze waarde, of (iii) dat het hier om een artefact gaat. Verder onderzoek zal dit moeten uitwijzen.



Figuur 9. Drie peren werden geplaatst in één cuvet. De peren vertoonden geen interne afwijkingen (controle na afloop) Op t=0 werd de gasconditie van het laser-doorstroomsysteem geswitched van 2% zuurstof naar 2% zuurstof plus 10% CO₂ (temperatuur tijdens het experiment werd op 0 °C gehouden). D.m.v. een bypass werd ervoor gezorgd dat tijdens deze omschakeling de totale flow gelijk bleef (totale flow 5 l/uur). Ethaan-emissie is weergegeven in nanoliter per uur.

Etaanmetingen kunnen mogelijk gebruikt worden bij detectie van Hol en Bruin. Het is nog niet duidelijk of peren voordat bruinvorming optreedt al een verhoogde ethaan emissie vertonen. Hier zal het onderzoek zich in de toekomst o.a. op toespitsen. Een belangrijke vraag is dan of door aanpassing van gascondities bruin voorkomen kan worden. In dit geval hebben ethaan metingen niet alleen een waarde voor de detectie maar ook voor de voorspelling van Hol en Bruin. Bij het monitoren van containers met peren is het mogelijk eenvoudiger om monsters met de GC te analyseren.

4.7 Bewaring in lage zuurstofgehalten

4.7.1 Ontwikkeling van hol en bruin is verschillend

Gemiddeld over alle bewaarcondities (figuur 1) is het patroon van hol-en bruinontwikkeling verschillend. Bruinverkleuring treedt het eerst op, wat pas in een later stadium gevolgd wordt door holtes. De bruinverkleuring stijgt na 9 weken tot een maximum waarna de mate van aantasting weer daalt. Dit is het gevolg van de holontwikkeling. Het weefsel wat in eerste instantie bruin was wordt namelijk op een later tijdstip hol. Na ongeveer 20 weken wordt een stabilisatie bereikt van zowel hol als bruin. De stabilisatie geeft aan dat peren tijdens langere CA-bewaring niet gevoeliger worden voor hol- en bruin. Dit was globaal bij alle bewaarcondities het geval. Vooral in 3% CO₂ begint de ontwikkeling heel snel, na 5 weken is maar liefst 60 a 70% van de peren aangetast.

Uit eerder onderzoek en praktijkervaringen blijkt dat het begin van de bewaring van groot belang is. Ook in deze inventarisatie komt naar voren dat vrijwel direct na de realisatie van extreme bewaarcondities het bruinvormingsproces begint. Het praktijkadvies om elke 14 dagen te controleren in de beginperiode van de bewaring is dus volkomen terecht.

Het bruinvormingsproces in de bewaring en na 4 dagen nabewaring (figuur 2) is ook verschillend. In de nabewaring neemt de bruinverkleuring duidelijk af, de peren worden meer hol. Dit komt overeen met de praktijkervaring dat als bruin verkleurde peren enige tijd verder bewaard worden in normale koelcelomstandigheden het bruin overgaat in hol. De belangrijkste reden hiervan is waarschijnlijk de overgang naar normale zuurstofgehalten (21%) Voor sortering van peren met problemen kan dit belangrijk zijn omdat holle peren wel uitgesorteerd kunnen worden via de waterbak en bruine peren niet.

4.7.2 Meer hol en bruin in lage zuurstofgehalten

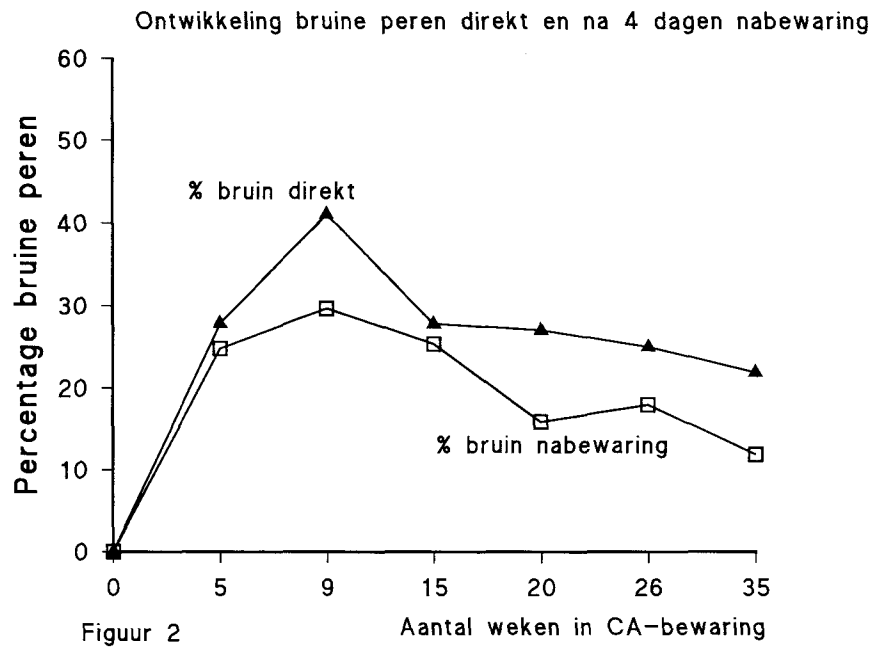
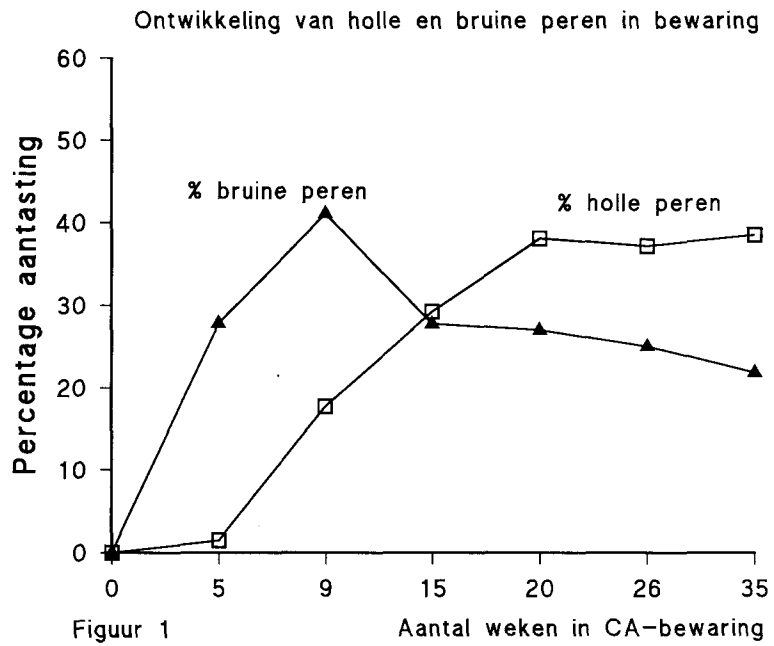
De invloed van het zuurstofgehalte op de ontwikkeling van hol (figuur 3, 4 en 5) blijkt groot te zijn. Gekozen is om alleen de ontwikkeling van hol in beeld te brengen omdat de ontwikkeling tijdens de bewaring een consistent beeld vertoont in tegenstelling tot bruin. De respectievelijke invloed van CO₂ en O₂ is met de holontwikkeling daarom het beste aan te tonen. De resultaten zijn een gemiddelde van de 2 herkomsten, qua niveau van aantasting was er een verschil, echter niet qua ontwikkeling.

Voorals bij 0.5% O₂ is de gevoeligheid van de peren zeer groot, bij 1% al duidelijk minder en bij 2% is er nauwelijks nog sprake van aantasting door hol en bruin. Echter als 3 % CO₂ wordt toegepast (figuur 5) is er weinig verschil meer tussen de respectievelijk zuurstofgehalten. Dit geeft aan dat er duidelijke interactie is qua optreden van hol. Naarmate het zuurstofgehalte lager is en het CO₂ -gehalte hoger, is er meer kans op afwijkingen.

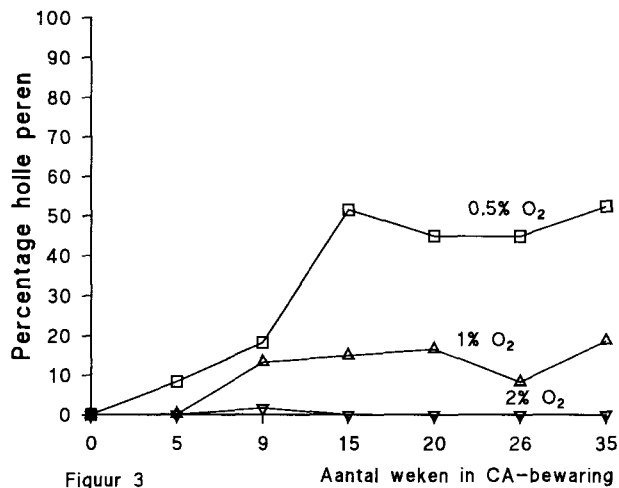
Een belangrijke gevolgtrekking is dat in Conference peren geplukt op het optimale tijdstip ook bij 2%O₂ nog een duidelijke kans is op afwijkingen. De keuze in de

bewaaradvies om peren te bewaren bij hogere zuurstofgehalten (3%) wordt hiermee duidelijk ondersteund.

Bij bewaring in 0.1%CO₂ (figuur 3) in de diverse zuurstofgehalten was er *nauwelijks* een vermindering van het optreden van hol en bruin ten opzichte van 0,5% CO₂, wat verrassend is. De verwachting was namelijk dat er bij dergelijke lage CO₂ concentraties de ontwikkeling van hol en bruin minimaal zou zijn. Hierbij moet worden opgemerkt dat de genoemde 0.1% CO₂ buiten de peer is gemeten. Gezien de dichtheid van het weefsel van peren is te verwachten dat ook dan inwendig toch een bepaalde CO₂-concentratie aanwezig blijft. Gehalten van ongeveer 1% zijn in het verleden herhaaldelijk gemeten. Blijkbaar voldoende om hol en bruin te initiëren.

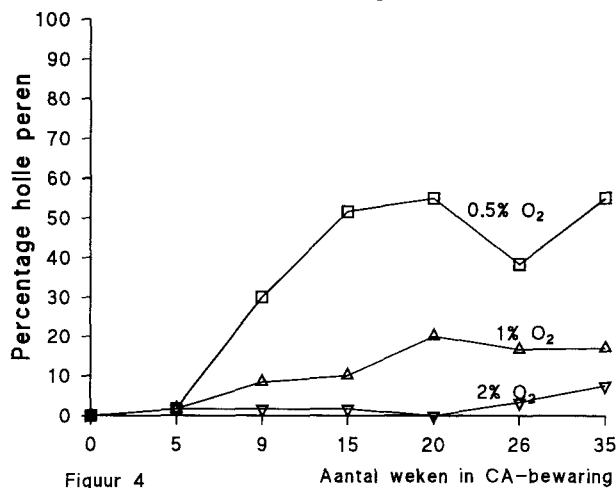


Ontwikkeling holle peren in 0% CO₂ en 0,5, 1 en 2% zuurstof



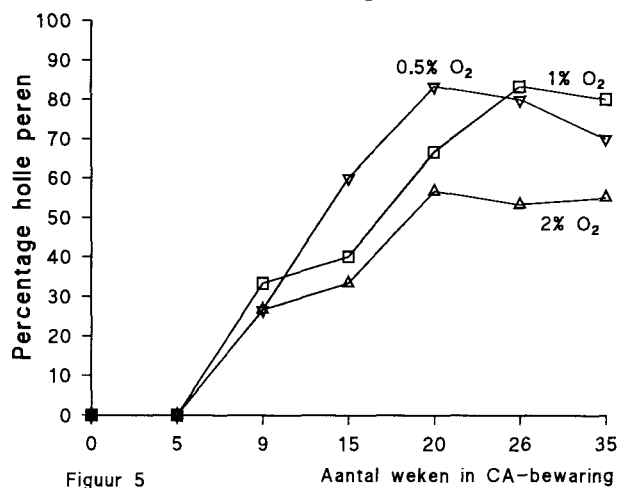
Figuur 3

Ontwikkeling holle peren in 0,5% CO₂ en 0,5, 1 en 2% zuurstof



Figuur 4

Ontwikkeling holle peren in 3% CO₂ en 0,5, 1 en 2% zuurstof



Figuur 5

4.7.3 Stevigheid en kleur

Bij elke beoordeling tijdens het bewaar seizoen is direct na uitslag en nabewaring de stevigheid en kleur gemeten van peren bewaard in 2% O₂ en 0.5% CO₂ (zie tabel). Bij de peren die zijn bewaard in lagere zuurstofgehalten al dan niet in combinatie met hogere CO₂-gehalten veranderd de stevigheid en de kleur nauwelijks tijdens het bewaar seizoen. Alleen in de combinatie 2% O₂ en 0.5% CO₂ die het dichtst de geadviseerde conditie in de praktijk benaderd veranderd de kleur en stevigheid nog wel enigszins.

De stevigheid van de peren veranderd tijdens bewaring nauwelijks, alleen na 35 weken beginnen de peren wat zachter te worden. Tijdens de nabewaring van 4 dagen in 18° C worden de peren heel snel zacht, waarbij er nauwelijks verschillen te constateren zijn tussen de beoordelingstijdstippen.

De kleur van de peren, voor de kwaliteit van essentieel belang, begint na 26 weken iets terug te lopen. Opvallend is dat tijdens de nabewaring van 4 dagen de kleur maar weinig verandert. Ook na 26 weken beginnen de peren wat geler te worden.

Lagere zuurstofgehalten (0.5 en 1%) en hoger CO₂ (3%) hadden nauwelijks een merkbare invloed op het stevigheidsbehoud. De vergelijking aan het einde van de bewaring werd wel geremd door lager zuurstof en/of hoger CO₂, zowel direct gemeten als in de nabewaring.

Tabel 1. Kleur- en stevigheidsverloop bij peren bewaard in 2% O₂ en 0.5% CO₂

Aantal weken bewaring	Penetrometerwaarde		Kleur a-waarde	
	direct	nabewaring	direct	nabewaring
0	11.9	3.10	19.0	16.90
5	11.37	3.01	18.98	16.51
9	11.98	3.39	18.48	16.32
15	11.48	3.1	18.38	16.48
20	11.08	3.51	17.45	16.59
26	11.27	3.54	17.37	15.46
35	9.89	3.43	14.83	13.43

4.7.4 Conclusies bewaring in lage zuurstofgehalten

- ★ De eerste symptomen van zowel bruin als hol zijn al na 5 weken in CA zichtbaar.
- ★ In het proces van hol- en bruinontwikkeling worden de peren in eerste instantie bruin,
het proces van holte vorming start later.
- ★ Doordat het bruine weefsel overgaat in holtevorming wordt de bruinverkleuring na ongeveer 9 weken weer minder.
- ★ Na ongeveer 20 weken treedt er een stabilisatie op in bruin en holontwikkeling, onafhankelijk van de bewaarconditie. Blijkbaar worden peren tijdens langere bewaring dus niet gevoeliger.
- ★ In nabewaring, bij hogere temperaturen, wordt het bruin in de peren versneld omgezet in hol.
- ★ De gevoeligheid voor hol en bruin wordt in lagere zuurstofgehalten (<2%) duidelijk hoger.
- ★ In lage O₂-gehalten was bij zowel 0.1 als 0.5% CO₂ de aantasting door hol en/of bruin identiek
- ★ Ook bewaring van peren in 2% zuurstof kan nog steeds schade veroorzaken.
- ★ Bewaarcondities extremer dan nu in de praktijk toegepast leveren geen voordeel op voor de stevigheid.
- ★ In de bewaarconditie 2%O₂ - 0.5% CO₂ begint de begint de grondkleur na 26 weken terug te lopen. In de huidige bewaarconditie 3%O₂ in combinatie met uitstel van CA met 20 dagen kan dit al eerder zijn.

5.0. Verder onderzoek

Het onderzoek in het laatste jaar van het project zal zich voor een groot gedeelte concentreren op de detectie- en voorspellings kant van Hol en Bruin. Het onderzoek tot nu toe heeft een aantal aanknopingspunten opgeleverd, die aan de detectie en de voorspelling een belangrijke bijdrage kunnen leveren. Twee van deze aanknopingspunten zijn de ethaanemissie van peren gemeten met de FA laser, een ander is het monitoren van het ascorbaat niveau in peren tijdens bewaring. Het onderzoek kan onderscheiden worden enerzijds naar de achtergronden van de problematiek en anderzijds naar praktische toepassingen.

5.1. Toepassingsgericht onderzoek

5.1.1. Lasermetingen

Eerdere experimenten met de laser (vakgroep molecule- en laserfysica, KUN) hebben aangetoond dat holle en bruine peren ethaan uitstoten. Het was zelfs mogelijk om aan de hand van de ethaanafgifte een voorspelling te doen over de staat van de peer (lees: de mate van Hol en Bruin). In het laatste jaar zullen peren onder verschillende condities bewaard worden zodat we voor onderzoek peren in alle stadia van Hol en Bruin bij de hand hebben. Tevens zal naast de meting van ethaan de mate van Bruin vastgesteld worden met CBA technieken. Het kwantificeren van de mate van Hol ligt moeilijker. In dit geval is het slechts mogelijk de peren visueel te beoordelen, en in te delen in klassen.

Het ziet er naar uit dat bruine peren met de laser te detecteren zijn. Een ander item is dat we zullen onderzoeken of peren die nog niet bruin zijn, maar die wel bruining zullen gaan vertonen doordat ze bewaard zijn onder een atmosfeer met hoog koolzuur, al ethaan uitstoten. Is dit het geval, dan zou ethaan naast een detectie parameter tevens een voorspellende parameter zijn. Het wordt dan interessant om gascondities aan te passen om te onderzoeken of bruining in dit stadium nog te voorkomen is.

We hebben tijdens enkele experimenten gevonden dat bij een omschakeling van een atmosfeer zonder koolzuur naar een koolzuurhoudende atmosfeer (10%) er een verhoogde ethaan emissie te constateren is. De vraag is of deze emissie (i) van tijdelijke aard is (peren worden niet binnen enkele uren bruin), (ii) op dit niveau blijft en zich verder verhoogt als bruining begint op te treden, (iii) of dat het hier om een artefact gaat.

5.1.2. Vitamine C

Tijdens meerdere monitoring experimenten is aangetoond dat het vitamine C gehalte

van peren bewaard onder een hoge koolzuuratmosfeer daalt in verloop van de tijd. Deze daling zet door tot een niveau van rond de 1 mg/100 gr VG, waarna de peren Bruin gaan vertonen. Uit het onderzoek blijkt wel dat vitamine C niet de enige factor is. Er zijn zeker meerdere factoren, en meerdere antioxidaten, die in dit proces een rol spelen. Bruine peren, bijvoorbeeld, bevatten vaak nog steeds vitamine C. Het gaat er echter om of vitamine C als indicator gebruikt kan worden.

Het assay om vitamine C te meten in peren is inmiddels uitontwikkeld en geschikt. Met verse peren van de nieuwe oogst zullen experimenten herhaald worden. Daarnaast zal gekeken worden hoe de relatie ligt tussen vitamine C en rijping van peren. Bekend is dat de peer een van de weinige vruchten is waarbij het vitamine C gehalte tijdens rijping dramatisch afneemt. Om vitamine C afname door rijping en door toedoen van koolzuur in de atmosfeer te scheiden zal dit punt aandacht krijgen.

In het afgelopen seizoen is geprobeerd op een artificiële wijze het vitamine C gehalte in peren te verhogen. Na enige tijd bevatten de peren inderdaad meer vitamine C, en het lijkt erop dat bruining ten dele voorkomen werd. Er trad echter ook meer rotting van peren op. Echter, de peren waren relatief oud, en de proef was kleinschalig opgezet. Een goed opgezette herhaling verteld waarschijnlijk meer over de werkzaamheid van vitamine C *in situ*. Tevens moet onderzocht worden of het vitamine C niet op een andere manier in te brengen is, zodat rotting beter voorkomen kan worden.

Mocht vitamine C een indicator zijn in de strijd tegen Hol en Bruin, het blijft ondoenlijk vitamine C in praktijksituaties te bepalen met een HPLC. Er zijn echter snelle detectiemethoden voor vitamine C voor 'in het veld'. Onderzoek zal moeten uitwijzen of deze bepalingen methoden een precies beeld geven van de vitamine C concentratie in peren, net zo precies als een HPLC.

5.1.3 Ontwikkeling toetsmethode voor hol en bruin.

Uit het meer achtergrondgerichte onderzoek zijn een aantal potentiële methoden ondeckt en/of ontwikkeld die voor een praktische oplossing geschikt lijken om de gevoeligheid voor hol en bruin te voorspellen. Dit zijn ademhaling, diffusie/porositeit en vitamine C concentratie.

Momenteel loopt een onderzoek waarbij monsters van twee gevoelige boomgaarden wekelijks geplukt en gemeten zijn vanaf eind augustus tot begin oktober.

Een gedeelte van de monsters werd bij standaardcondities en bij extremere CA-condities bewaard om de ontwikkeling van hol en bruin te initiëren. De opzet van het onderzoek is om een eventueel verband te leggen met de gemeten waarden direct na de oogst en de mate van hol-en bruinontwikkeling in de bewaring

Meetmethoden.

Alternatief

- NIRS (Near Infra Red Spectroscopy)
- Vitamine C concentratie
- Begassing met 50 % CO₂
- Ademhalingsintensiteit
- Diffusie weerstand peren
- Porositeit peren
- Uittredend vocht bij compressie

Regulier

- Stevigheid
- Zetmeelwaarde
- Suikergehalte

Na ongeveer 3 en eventueel 5 maanden worden de peren beoordeeld op de ontwikkeling van inwendige afwijkingen

5.1.4. Adaptatie onderzoek.

Uit het onderzoek o.a op het FPO is gebleken dat de periode direkt na inzet in de koeling heel belangrijk is. Met name de tijdstermijn voordat de peren op CA-conditie worden gebracht. Het resultaat was dat bij direkt op CA-conditie brengen van de peren er een veel grotere kans is op ontwikkeling van hol en bruin. Als er een wachttijd van ongeveer 20 dagen aangehouden wordt is er weinig kans meer op afwijkingen. In de praktijk wordt dit momenteel al toegepast.

Echter binnen deze periode van 20 dagen was er nog steeds een sterke fluctuatie van bruinontwikkeling afhankelijk van de tijd van realisatie van de CA-condities.

Omdat de tijdsintervallen binnen de 20 dagen periode vrij groot waren in het vorige onderzoek is het beter de invloed nauwkeuriger te volgen. Dit met de bedoeling om dit proces beter te begrijpen alsmede een beter concept voor de praktijk te ontwikkelen.

In het nieuwe onderzoek werden peren die laat geplukt zijn (begin oktober) en dus gevoelig zijn voor bruinverkleuring steeds met een tijdsinterval van 2 dagen in de CA (0.7% CO₂-2.5% O₂) geplaatst. Na deze periode van 20 dagen werd dit verder elke week gedaan tot aan een maximale adaptatieperiode van 55 dagen.

5.2.0. Fundamenteel onderzoek

Het onderzoek naar detectie- en voorspellingsmethoden is in volle gang. Het is echter nog steeds niet duidelijk wat de bruining (en de vorming van Hol) in peren nu exact veroorzaakt. Tussen het koolzuur en de vorming van Bruin gaapt een gat. Dit gat is meer dan 20 jaar min of meer onderzocht, echter duidelijkheid is er niet. Toch is het zo dat bruining een algemeen voorkomend verschijnsel is in de groente en fruit wereld, en dat de verschillende inductie mechanismen bij de verschillende produkten hoogstwaarschijnlijk, in ieder geval ten dele, overeenkomsten vertonen.

Een aantal factoren spelen waarschijnlijk een belangrijke rol in het inductie proces. Twee van deze factoren zijn de energiehuishouding van de peer onder verschillende condities, en de staat van interne membraanstructuren onder deze condities. Belangrijk is ook hoe deze factoren door de tijd veranderen.

5.2.1. MDA

We werken op het ogenblik aan een nieuwe HPLC-methode waar mee in weefsel een aantal belangrijke stoffen te meten zijn. We zijn geïnteresseerd in de afbraak van interne membraanstructuren binnen de cel. Deze afbraak zou tijdens bewaring onder ongunstige condities of tijdens zeer lange bewaring het decompartmentatieproces in gang kunnen zetten. Behalve ethaan is er nog een substantie die vrij komt bij de afbraak van membranen: malondialdehyde (MDA). Met deze methode is deze stof meetbaar, maar daarnaast zijn in één meting nog een aantal andere stoffen te bepalen: glutathion, vitamine C en een aantal energie-dragers waaronder ATP, ADP, AMP, NADH en NADPH. Naast inzicht in de energiehuishouding van het weefsel geeft de MDA bepaling inzicht in de mate van membraanperoxidatie. De HPLC- methode staat echter nog in de kinderschoenen, en moet geoptimaliseerd worden.

5.2.2. PPO en substraten voor PPO

Activiteit van PPO in het weefsel van de peer vertoont geen relatie met de gasconditie tijdens bewaring, de herkomst van de peren of het pluktijdstip. Alles wijst erop dat de activiteit van het enzym of de beschikbaarheid van het substraat voor het enzym niet dé factoren zijn bij de inductie van bruining.

Toch is het onderzoek naar PPO niet onbelangrijk. Er bevinden zich een aantal polyfenolen in het weefsel van de peer. Niet duidelijk is welke van deze polyfenolen als substraat dienen voor het PPO. Daarbij komt nog eens dat een aantal polyfenolen als antioxidant op kunnen treden. Meer onderzoek op dit gebied verschaft meer inzicht in reactiemechanismen. Tevens is het onderzoek naar de remming van de PPO-reactie door antioxidanten als glutathion en vitamine C inzicht-verschaffend.

5.2.3. Vacuoles

Inmiddels bestaat er -mede door literatuuronderzoek- een redelijk beeld van hoe bruining in peren ontstaat. Door membraanschade aan de 'compartimenten' van de cel kunnen (decompartimentatie) enzym en substraat elkaar vinden, zo is de hypothese. Bewijs voor deze hypothese is er echter nog niet. Het bewijs is belangrijk voor het verdere onderzoek, in de zin dat er dan gerichter naar oplossingen gezocht kan worden.

Het idee is dat de vacuoles in de cel een cruciale rol spelen in het bruiningsproces. Vrijwel 100% van alle polyfenolen in de cel zijn gelocaliseerd in de vacuole. Schade aan de membraan van de vacuole (tonoplast) is waarschijnlijk een belangrijke veroorzaker van problemen. Om *in vitro* experimenten te kunnen doen is het van belang vacuoles op te zuiveren. Met opgezuiverde vacuoles kunnen allerlei experimenten gedaan worden, die het proces van decompartimentatie *in vivo* zoveel mogelijk benaderen.

Ontwikkeling Hol en Bruin bij diverse CA-conditions

%Hol direkt na uitslag		CA-conditie O2-CO2		gem % hol direkt	
Bewaartijd in weken					
5	8.3	1.66	0	1.66	0
9	18.3	8.33	26.6	1.66	26.6
15	51.6	10	33.3	1.66	60
20	45.0	55.0	20	0	83.3
26	35.0	38.3	16.66	0	80
35	52.5	55	8.25	3.3	70
gem	21.78	24.41	10.81	2.63	53.31

%Bruin direkt na uitslag		CA-conditie O2-CO2		gem % bruin direkt	
tijd					
5	18.3	6.66	39.1	3.33	76.6
9	36.6	20	63.3	1.66	93.3
15	31.6	33.3	8.41	2	80
20	23.3	33.3	1.66	0	73.3
26	8.3	38.3	6.66	0	80
35	22.5	25	3.3	0	30
gem	23.43	34.69	7.78	0.61	72.2

%Hol nabewaring		CA-conditie O2-CO2		gem % hol nabewaring	
tijd					
5	23.3	6.66	20	3.3	20
9	20	5.75	18.3	0	50
15	55	36.6	20	0	70
20	30.1	43.3	6.66	0	80
26	26.6	47.5	15	0	70
35	30	50	16.25	0	82.9
gem	30.83	31.63	13.8	1.05	62.15

%Bruin nabewaring		CA-conditie O2-CO2		gem % bruin nabewaring	
tijd					
5	11.66	20	46.6	3.3	73.3
9	50	3.75	53.3	0	73.3
15	33.3	20	43.3	0	73.3
20	0	21.66	26.6	0	30
26	13.3	28.3	5	0	46.6
35	6.25	11.25	1.25	3.75	38.2
gem	19.08	17.49	5.47	0.27	55.78

Penetrometerwaarde en kleurmetingen (a-waarde)

Stevigheid direct na uitslag

Bewaartijd in weken	0.5...0	0.5...0.5	0.5...3	1...0	CA-conditie O2-CO2 1...0.5	1...3	2...0	2...0.5	2...3	Stevigheid direct
5	11.77	11.6	11.25	11.51	11.55	11.75	11.7	11.37	11.28	11.53
9	11.52	11.69	11.52	11.37	11.42	11.68	11.1	11.98	11.27	11.51
15	11.39	11.51	11.43	11.49	11.52	11.22	11.14	11.48	10.52	11.3
20	11.42	11.25	10.91	11.4	11.31	10.56	10.85	11.08	10.32	11.01
26	10.99	10.81	11.6	11.15	11.29	11.13	10.75	11.27	10.76	11.08
35	10.58	10.2	10.23	9.95	10.32	10.28	9.34	9.89	10.69	10.16
gem	11.27	11.17	11.15	11.14	11.23	11.1	10.81	11.17	10.8	

Kleur direct na uitslag

tijd	0.5...0	0.5...0.5	0.5...3	1...0	CA-conditie O2-CO2 1...0.5	1...3	2...0	2...0.5	2...3	Kleur direct
5	17.56	17.48	18.16	18	18.2	18.32	18.27	18.98	18.22	18.13222
9	18.43	18.34	18.36	18.34	18.15	18.58	18.27	18.48	18.46	18.37889
15	17.84	18.01	18.44	18.4	18.11	18.22	17.51	18.38	18.06	18.10778
20	17.83	18.23	18.09	18.19	18.18	18.38	17.54	17.45	17.91	17.97778
26	17.62	17.71	17.61	17.67	17.47	17.93	17.02	17.37	18.2	17.62222
35	16.05	16.51	16.26	15.65	15.58	17.71	14.4	14.83	17.28	16.03
gem	17.55	17.71	17.82	17.7	17.61	18.19	17.16	17.58	18.02	

stevigheid nabewaring

tijd	0.5...0	0.5...0.5	0.5...3	1...0	CA-conditie O2-CO2 1...0.5	1...3	2...0	2...0.5	2...3	Stevigheid nabewaring
5	4	5.75	5.8	6.78	3.54	3.87	3	3.03	3.82	4.39
9	3.9	3.89	4.25	3.15	3.075	3.81	3.05	3.01	3.87	3.55
15	7.01	6.13	7.03	4.34	4.38	7.6	4.1	3.39	6.04	5.55
20	4.33	4.08	4.33	3.12	3.09	4.51	3.2	3.1	3.85	3.76
26	3.3	3.14	3.75	2.98	2.81	3.57	2.76	4.51	2.95	3.3
35	4.21	4.35	4.31	4.02	4.02	4.18	2.91	3.54	4.34	3.98
gem	4.45	4.55	4.91	4.06	3.48	4.59	3.17	3.43	4.14	

Kleur nabewaring

tijd	0.5...0	0.5...0.5	0.5...3	1...0	CA-conditie O2-CO2 1...0.5	1...3	2...0	2...0.5	2...3	Kleur nabewaring
5	17.86	16.83	18.35	16.67	16.68	16.76	17.5	16.75	16.51	17.1
9	16.98	16.35	17.47	16.91	16.23	17.85	15.15	16.24	16.32	16.61
15	17.44	17.14	17.55	16.71	16.89	17.13	16.28	15.36	16.48	16.77
20	17.05	16.07	15.95	15.5	15.38	15.48	14.66	14.8	16.59	15.72
26	14.5	15.38	16.87	14.03	13.79	15.48	13.96	12.96	15.46	14.71
35	12.18	14.32	15.72	15.04	13.33	17	12.8	13.3	13.53	14.13
gem	16.01	16.02	16.98	15.81	15.38	16.61	15.05	14.9	15.81	