

**ONDERZOEKACTIVITEITEN "INWENDIGE AFWIJINGEN
IN CONFERENCE-PEREN", TECHNISCHE RAPPORTAGE.**

Periode januari 1996-September 1996

Vertrouwelijk

**A.C.R. van Schaik (projectleider)
R.H. Veltman
H.W. Peppelenbos
S.A. Robot
H.C.P.M. van de Valk
M.G. Sanders**

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**

Samenvatting

Het onderzoek op het ATO naar de reductie van hol en bruin in CA-bewaring van Conference-peren in de eerste helft van 1996 heeft een aantal belangrijke resultaten opgeleverd.

Uit het CA-onderzoek blijkt dat CO₂ de hoofdoorzaak is van het ontstaan van hol en bruin. Het pluktijdstip, de zuurstofconcentratie, herkomst en peergrootte zijn aanvullende factoren. Ook is duidelijk geworden dat hol en bruin gekoppelde processen zijn, de oorzaak is hetzelfde. Meestal wordt een peer eerst bruin en daarna hol. De snelheid en/of de grootte van de schade is afhankelijk van de externe factoren.

Met specifieke omstandigheden (hoge CO₂-en lage O₂ gehalten) is het mogelijk binnen een periode van 6-10 weken bij peren op een geprogrammeerde wijze hol en bruin te induceren. In dit onderzoek is ook geconstateerd dat ophoping van fermentatie producten zoals ethanol en acetaldehyde geen direct verband vertonen met het ontstaan van hol en bruin.

Verder zijn er methoden ontwikkeld om de diffusie van gassen en de porositeit van het produkt te meten. Belangrijke resultaten waren dat door bewaring en rijping de peer een lagere porositeit krijgt waardoor diffusie van bv. CO₂ wordt verminderd. Ook de toepassing van hoog CO₂ verhoogde de diffusieweerstand en verlaagde de porositeit. Een verder resultaat was dat hoog CO₂ de ATP-productie verlaagd. Omdat een laag O₂-gehalte ook de energieproductie verlaagd kan een nog verdere verlaging door hoog CO₂ leiden tot energie tekort in de vrucht en dus eventueel schade. Dit resultaat steunt de hypothese dat CO₂ een hoofdoorzaak is van het probleem.

Ook het respiratieonderzoek in dit verband gaf verdere steun aan deze constatering. Hoog CO₂ leidde bij alle gemeten O₂ gehalten tot een veel lagere ademhaling. De invloed van zuurstof begint pas bij 6% een duidelijke invloed te krijgen op de ademhaling.

Uit het bruinverkleuringonderzoek bleek dat er geen duidelijke relatie was tussen de mate van bruinverkleuring (veroorzaakt door schadelijke bewaaromstandigheden) en het totaal polyfenolgehalte en enzymen welke een rol spelen bij de bruinverkleuring. De bruinverkleuring blijkt een zichtbare gevolgreactie van de schade veroorzaakt door een ander proces. Het onderzoek naar de biochemie van de bruinverkleuring is daarom minder relevant geworden en wordt momenteel niet voortgezet.

De nondestructieve meting van hol met Röntgendetectie bleek een zeer betrouwbare meetmethode. De niet destructieve detectie van bruinverkleuring was tot dusverre niet betrouwbaar genoeg voor toepassing. Het discriminerend vermogen tussen bruine en niet bruine peren was te klein. De methode kan verbeterd worden door het ontwikkelen van een specifieke calibratie voor bruin in peren.

Vervolgonderzoek in het project moet gericht zijn op het traject van diffusie, porositeit, ademhaling en energieniveaus in relatie met ontwikkeling van de vrucht en in combinatie met bewaarcondities. Verder wordt het onderzoek gericht op de processen die membraanafbraak veroorzaken. Dit betreft de invloed van schadelijke bewaarcondities op radicaalvorming, antioxidanten, ontwikkeling van signaalstoffen, componenten in de citroenzuurcyclus enz.

Inhoudsopgave	blz.
1.0 Inleiding	4
2.0 Materiaal en methoden	5
2.1 Monitoring hol en bruin	5
2.1.1 Materiaal en proefopzet	5
2.1.2 Afwijkingen tijdens CA-bewaring	5
2.1.3 Monitoring afwijkingen in doorstroomstelsel	5
2.1.4 Anaërobe componenten	7
2.1.5 Respiratie en diffusie meting	7
2.1.6 Membraanlekage	8
2.2 Enzymatisch onderzoek	9
2.2.1 Tyrosinase-assay	9
2.2.2 Pereblots	10
2.2.3 Gehalte aan totaal oplosbare fenolen	10
2.2.4 Blanco's	11
2.3 Nondestructieve detectie van bruine en holle peren	13
2.3.1 Detectie hol	13
2.3.2 Nondestructieve meting inwendig bruin	13
2.3.2.1 Verloop van het trillings signaal tijdens uitstalling	15
2.2.3 Testen van detectie methode op semi-praktijkschaal met peren van het Proefstation Wilhelminadorp	16
3.0 Resultaten	17
3.1 Bruinverkleuring	17
3.1.1 PPO van bruin en niet bruine peren	17
3.1.2 Enzymactiviteiten binnen de peer.	18
3.1.3 Bepaling van het totaal polyfenolgehalte	22
3.1.4 Controles	24
3.1.4.1 Peroxidase	24
3.1.4.2 PPO-activiteiten	25
3.2 Monitoring hol en bruin	27
3.2.1 Afwijkingen in statisch bewaarsysteem	27
3.2.2 Inductie hol en bruin	32
3.2.3 Anaërobe componenten en bruinverkleuring	33
3.2.4 Diffusie en porositeit	38
3.2.5 Ademhalingsmetingen	39
3.3 Resultaten nondestructieve detectie hol en bruin	42
3.3.1 Detectie hol	42
3.3.2 Inventarisatie van de mogelijkheden om met de trillingstechniek bruin in peren niet-destructief te meten.	42
3.3.3 Trillingssignaal gedurende de uitstalling	48

3.4.4 Testen van de detectiemethode met peren van het Proefstation Wilhelminadorp	49
4.0 Conclusies	54
4.1 Bruinverkleuringsonderzoek	54
4.2 Bewaaronderzoek	54
4.3 Inductie hol en bruin	54
4.4 Anaërobe componenten	55
4.5 Respiratie, diffusie en porositeit	55
4.6 Nondestructieve detectie van hol en bruin	55
5.0 Verder onderzoek	56
6.0 Referenties	57

1. Inleiding.

In het kader van de “Bijdrageregeling kwaliteits-projecten agrarische producten en produktieprocessen” van het Ministerie van Landbouw , Natuurbeheer en Visserij alsmede de bijdrage van het Produktschap voor Groenten en Fruit is het onderzoek “Reductie inwendige afwijkingen in Conference-peren” gestart. Dit onderzoek met een looptijd van 3 jaar wordt in nauwe samenwerking uitgevoerd met Proefstation voor de Fruitteelt. Het onderzoek op het FPO heeft betrekking op boomgaardfactoren alsmede pluk- en bewaarcondities.

Het onderzoek op ATO-DLO ten aanzien van de inwendige afwijkingen heeft de navolgende doelen:

- 1 Inzicht in de biochemische en fysiologische processen*
- 2 Ontwikkeling van een snelle test op gevoeligheid voor hol en bruin.*
- 3 Ontwikkeling (CA-)bewaarsystemen met minimale risico's op inwendige afwijkingen*
- 4 Nondestructieve testmethode voor holle en bruine peren.*

In het rapport worden de activiteiten beschreven vanaf januari 1996 tot september 1996. Om gewaarborgd te zijn van betrouwbaar proefmateriaal zijn in september 1995 al Conference-peren opgeslagen bij diverse bewaarcondities. Dit proefmateriaal was de basis voor het onderzoek in 1996.

Belangrijke doelen in het eerste halfjaar waren:

- a) Methodeontwikkeling diffusie en respiratie
- b) Biochemie van de bruinverkleuring
- c) CA-inductiemodel voor hol en bruinontwikkeling
- d) Relatie anaërobe componenten en inwendige afwijkingen
- e) Non-destructieve detectie van hol en bruin.

In dit rapport worden de resultaten hiervan apart en in combinatie beschreven.

2. Materiaal en methode.

2.1. Monitoring.

2.1.1. Gebruikte materiaal en proefopzet.

De Conference-peren gebruikt voor het onderzoek waren afkomstig van twee locaties. De in deze tekst genoemde 'SAS' peren kwamen van een boomgaard in Strijensas. De met 'VELD' aangeduide peren kwamen uit Zuid Beyerland. Beide herkomsten peren waren ook opgenomen in het onderzoek op het FPO. Deze herkomsten zijn geselecteerd op grond van de verschillende gevoeligheid voor inwendige afwijkingen in het verleden. Peren van de herkomst SAS peren waren relatief gevoelig, VELD peren relatief ongevoelig. Van beide locaties werden peren geplukt op 3 tijdstippen. Het optimale pluktijdstip (2^e pluk) lag in 1995 op 15 september. De peren van pluk 1 waren van 6 september, van de 3^e pluk van 26 september. De drie pluktijdstippen waren voor de twee locaties hetzelfde.

De peren werden na de pluk gehomogeniseerd, direkt ingekoeld en opgeslagen in containers van het statisch CA-bewaarsysteem. De containers met een inhoud van 120 kg zijn aangesloten op een automatisch meet- en regelsysteem. De bewaartemperatuur was -1 °C. Na 1 week werden de CA-condities gerealiseerd: 0.5 en 3% CO₂ in combinatie met 2% O₂ voor alle pluktijdstippen. De proef was verder opgebouwd in celherhalingen.

Een extra hoeveelheid peren van ieder pluktijdstip en herkomst werd opgeslagen in een 'veilige' bewaarconditie (2% O₂ en 0.5% CO₂) om als voorraad te dienen voor korte experimenten tijdens het bewaarsiezoen.

2.1.2 Monitoring afwijkingen tijdens CA-bewaring

Tijdens de opslagperiode werden in december, februari en juni van alle combinaties monsters genomen en direkt beoordeeld op het optreden van inwendige afwijkingen. Hierbij werden 20 peren per experimentele eenheid overlangs doorgesneden en visueel beoordeeld op afwijkingen.

2.1.3. Monitoring afwijkingen inductie in doorstroomsysteem.

Eind december is gestart met een inductie proef voor hol en bruin bij zeer uiteenlopende CO₂ en O₂ concentraties. Hieruit bleek dat het mogelijk was om binnen een redelijk korte tijd hol en bruin op te wekken. Op basis van dit onderzoek werd een uitgebreidere proef gestart in de periode mei tot en met juli. Peren werden bewaard in 70 liter containers aangesloten in een doorstroomsysteem. Een range van CO₂- en O₂-concentraties werd toegepast bij een temperatuur van 5 °C (vierkant experiment, fig.1.). 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 [Peppelenbos, 1995]. Eén maal per drie uur werden de gasconcentraties binnen de containers gecontroleerd m.b.v. een ADC 7000 gasanalyser (Analytical Development Company Limited, Hoddesdon, England).

O ₂ → CO ₂ ↓	0.25	1.0	2.0
0.0			
5.0			
10.0			

Tabel 1: Opzet van het monitoringsexperiment. Peren werden bewaard in 9 containers met de in de matrix weergegeven gascombinaties.

In elke container werden 60 peren van locatie 'SAS' (2^e pluk, 0.5% CO₂) en 50 peren van locatie 'VELD' (idem) opgeslagen. Tijdens een bewaarperiode van 10 weken werden de volgende parameters bekeken:

1. Anaërobe componenten.
2. Respiratie.
3. Diffusie.
4. Visuele beoordeling en Computer beeld analyse (CBA).
5. Membraanlekkage.

Gedurende 12 weken werden elke week per herkomst 5 peren uit iedere container, dus uit iedere CO₂- O₂ combinatie genomen. Na het overlans doorsnijden van de peer werd de penetrometerwaarde bepaald met een pluunjer van 1 cm doorsnede. Ook werd met een kurkboor een monster van 5 gram genomen uit het centrum van de peer en aan de buitenkant direkt onder de schil. Deze weefselstukjes werden direkt ingevroren in vloeibare stikstof daarna in cuvetten gedaan en verder bewaard in een vriezer (-80 °C). De procedure omtrent de meting van anaërobe componenten is elders beschreven.

Van de resterende halve peer werd wederom overlans een plak gesneden van 0.5 cm dikte waarin met behulp van CBA de hoeveelheid bruin werd bepaald.

Met een speciaal voor dit doel gemaakte snijplank met dubbel mes werden plakjes longitudinaal uit de peer bemonsterd. Van deze doorsnede werd het oppervlak bepaald. Tevens werd het oppervlak bruin bepaald via berekening van het percentage bruin op de doorsnede. Aan dezelfde plak peer werd via visuele inspectie de mate van hol bepaald. Metingen vonden plaats in een speciaal ontworpen CBA-kast. Gereflecteerd licht van 4 TL-balken (20 watt, kleur 84) belicht via een diffusor het object. Een Feed-back-system

stabiliseert de lichtstroom (middels een fotocel). De lichtinstelling is regelbaar. Het object werd opgenomen door middel van een kleuren KY-F30 3-chip CCD JVC camera. De camera is aangesloten op een beeldbewerkskaart. In deze kaart wordt het videosignaal gedigitaliseerd en met de besturingssoftware verder geanalyseerd. Het beeld heeft 768 bij 512 beeldpunten (pixels), die ieder een Rood-, Groen- en Blauwintensiteit hebben, die mogelijke waardes hebben van 0 (donker) tot 255 (licht). De besturingssoftware is door het ATO-DLO ontwikkeld.

2.1.4. Anaërobe componenten.

De monsters uit diepvries werden 2.5 uur ontdooid in de koelcel. Alle navolgende handelingen werden op ijs uitgevoerd. Eerst monster fijnmalen in de buis daarna uit de buis geschraapt in een 250 ml maatcilinder. Na de bepaling van het versgewicht werd tien ml milliQ toegevoegd (tot ca. 10 gram) waarna 1 ml-interne standaard toegevoegd werd (100 maal verdunde aceton). De maatkolf met interne standaard werd steeds gesloten gehouden i.v.m. verdamping van aceton. Het inspuiten van de standaard werd ook onder de vloeistofspiegel gedaan tegen de verdamping. De maatcilinder werd geplaatst in een bak met ijs onder de ultra-torrax gemalen werd tot alle losse brokstukken verdwenen waren. Uit de suspensie werd 3 maal 1 ml. overgepipetteerd in een epje. De epjes werden op ijs bewaard en gecodeerd. De monsters werden 5 minuten bij maximale snelheid gecentrifugeerd in de koelcel. De epjes werden op ijs gehouden waarbij één epje werd gebruikt voor de meting. De andere twee werden opgeslagen in de -80 °C-vriezer. Flessen (335 ml) werden goed schoongemaakt en gedroogd met stikstof om alle condens te verwijderen. Na droging werd een rubberen stop op de fles aangebracht en afgesloten met bijbehorende dop. Van het supernatant werd 5 microliter in de fles gebracht door dit langzaam langs de wand van de fles te laten sijpelen. Meteen daarna de dop weer op de fles. Per dag werden 15 monsters verwerkt met een blanco (15 ml milliQ met 1 ml interne standaard). De 16 flessen wrden 2.5 minuut in de magnetron geplaatst. Daarna werden de flessen aan de GC gekoppeld en vervolgens het gehalte aan ethanol en acetaldehyde gemeten.

2.1.5. Respiratie en diffusiemeting.

Dit onderzoek werd uitgevoerd tijdens het monitoringsonderzoek (periode van 10 april tot en met 12 juli). De peren werden gedurende deze tijd bewaard bij verschillende gascondities, 0.25, 1 en 2% O₂ gecombineerd met 0, 5 en 10% CO₂ (zie ook tabel 1). Voor de ademhalingsmetingen werden ook de gascondities 21-0, 21-10 en 0-0 (%O₂-%CO₂) meegenomen. Een aantal containers had niet exact de gewenste conditie. De condities 0.25-5, 0.25-10, 2-10 (%O₂-%CO₂) en 21% O₂ waren resp. 0.4-5, 0.5-10, 1.4-10 en 20%. De temperatuur werd constant op 5°C gehouden.

Tabel 2 Overzicht van de gebruikte gascondities			
O ₂ \CO ₂	0	5	10
0	R*		
0.25	CA*	CA	CA
1	CA	CA	CA
2	CA	CA	CA
21	R		R

* CA: gascondities gebruikt bij CA-proef en ademhalingsmetingen

R: alleen gebruikt bij ademhalingsmetingen

Voor de ademhalingsmetingen werden per CA-conditie (container) twee weckflessen aan het doorstroomsysteem aangesloten. Per weckfles (1550 ml) werd één peer van de herkomst SAS met een gemiddeld gewicht van 161 gram geplaatst. Van deze peren werd ook het onderwater gewicht bepaald en werd een controle uitgevoerd op het inwendig hol en/of bruin zijn. Dit gebeurde aan het begin en het eind van het experiment met de Pelegmeter.

Voordat de weckflessen aan het doorstroomsysteem gekoppeld werden, werd eerst een diffusiemeting uitgevoerd. Voor de diffusiemetingen werden de te gebruiken peren in weckflessen gedaan, waarin gewone lucht. Na sluiten werd 7 ml neon aan iedere weckfles toegevoegd. Hierna werd de concentratie gaschromatografisch bepaald. Na \pm 20 uur werd de concentratie nogmaals bepaald, waarna de peer werd overgezet in een andere weckfles (met gewone lucht) en de gasconditie direct bepaald. Na \pm 1 uur werd de concentratie nogmaals gemeten. Na de diffusie-meting werden de weckflessen aangesloten aan het doorstroomsysteem.

De ademhaling werd ongeveer 1 maal per week gemeten met een Chrompack CP2001 gaschromatograaf. Hiervoor werden de weckflessen van het doorstroomsysteem afgekoppeld. De gascondities werden direct na sluiten gemeten en na ongeveer 20 uur (de weckflessen bleven gedurende deze tijd gesloten).

2.1.6. Membraanlekkage.

De meettechniek is gebaseerd op conductiviteit. Op twee plaatsen in de peer werden monsters genomen van standaard grootte (appelboor ϕ 7mm, diepte 10mm): onder de schil, en in de kern. De monsters werden eerst gewogen, voorgespoeld, gedroogd en vervolgens opgenomen in een erlenmeyer met gedemineraliseerd water. De ionlekkage werd 1.5 uur om het kwartier gemeten bij KT. Tijdens het experiment stonden de erlenmeyers op een schudplateau (ca. 50 rpm.) [Simon, 1977; Bir, 1972].

Conductiviteit van het medium werd gemeten met een Conductivity Meter (Radiometer, Copenhagen), bij 25 °C en een conductiviteits-constante van 0.99 cm⁻¹. Metingen vonden plaats in de 20 µS*cm⁻¹ range.

2.2. Enzymatisch onderzoek.

Monsters voor het bruinverkleurings onderzoek werden betrokken uit de voorraad peren die in het statisch bewaarsysteem was opgeslagen. Deze peren van 2 herkomsten, 2 CO₂-gehalten en 3 pluktijdstippen werden alle bemonsterd. Om een goed inzicht te krijgen werden zowel enzymatische bepalingen uitgevoerd alswel een bepaling van het totaal aan polyfenolen. Tevens werd de verdeling van de enzymen binnen de peer bekeken.

2.2.1. Tyrosinase-assay.

Uit de peer genomen monsters 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 afgedraaid om celresten te verwijderen. Buffer B werd gemengd met 16.7 mM L-DOPA, verzadigd met zuurstof en gemixed met 0.4 ml enzymoplossing. 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 0.11 % SDS aan het reactiemengsel toegevoegd. Voor meting van Laccase alleen werd 0.5 mM Tropolone toegevoegd [Wichers, 1984; Gerritsen, 1994]. Tropolone remt de activiteit van Tyrosinase specifiek [Kahn, 1985b]. Voor het hier gebruikte assay werd het reactievolume omgerekend naar 1 ml. Voor de berekening van de enzymactiviteiten in µkat. werd de volgende formule gebruikt [formule I]:

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

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

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

2.2.2. Pereblots.

Monsters worden geprepareerd en geblot volgens de methode van Spruce et al. (1987). Verticale- of dwarsdoorsneden van ca. 2-3 mm dikte worden 5-20 seconden tegen nitrocellulose-membranen gedrukt (B A 28, Schleicher und Schüll, 0.45 µm pore size) (Eventueel nitrocellulosemembranen voorbehandelen met demi/milli-Q). Tyrosinase-activiteit wordt aangetoond door de blots -met de blotzijde naar boven- op 3 mm Whatman filterpapier te leggen, dat ondergedompeld is in 100 mM Fosfaatbuffer (pH 6.0) met daarin 5 mM L-DOPA, en eventueel 100 µl Catalase voor het onderdrukken van Peroxidases. Controle blots worden vooraf behandeld met buffer alleen, buffer met 1.0 mM tropolone, en eventueel 10 mM Diëthylthiocarbamaat. De nitrocellulosemembranen blijven 15 minuten op het filter liggen, vervolgens krijgen de membranen -nadat ze van het Whatman papier afgehaald zijn- 30 minuten de kans om de grijszwarte polymeer te vormen. Daarna worden de membranen gespoeld om overtollig substraat te verwijderen. De blots worden gefotografeerd, en vergeleken met CBA-beelden van bruine peren. [Czaninsky; Kahn, 1985; Kahn, 1985; Moore, 1989; Spruce, 1987; Vaughn].

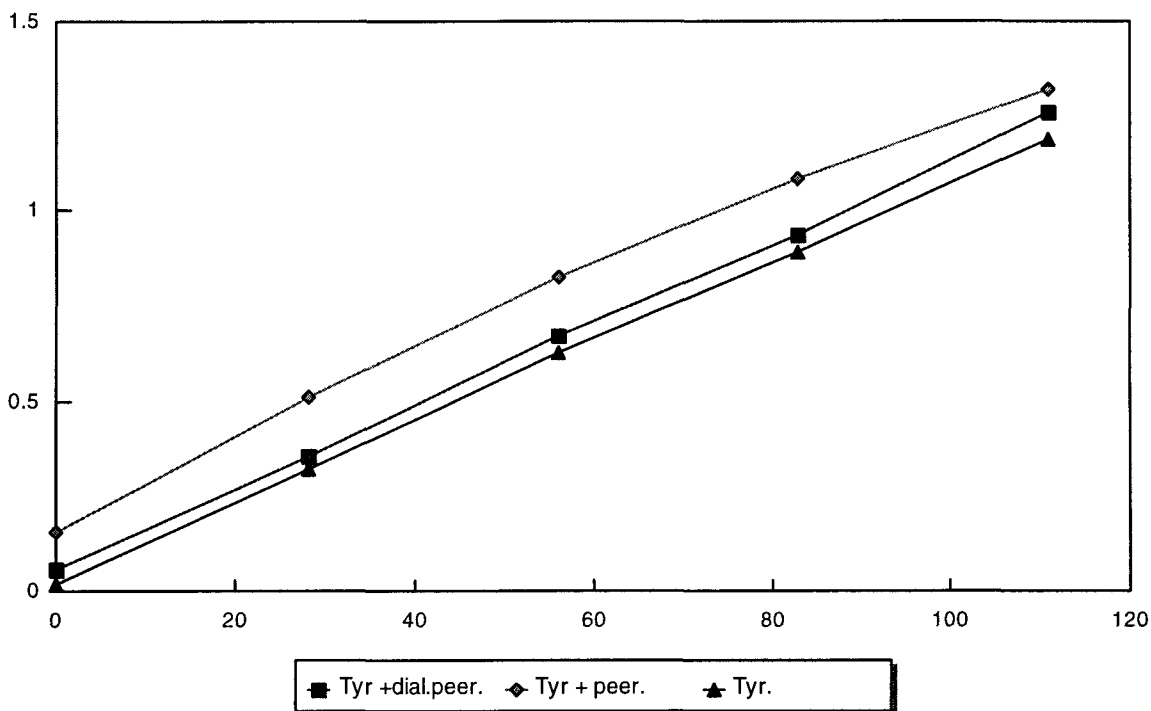
2.2.3. Gehalte aan totaal oplosbare fenolen.

De methode berust op de reactie tussen het *Folin Ciocalteus*-reagens en gesubstitueerde fenyl-residuen zoals die voorkomen in bijvoorbeeld Tyrosine, Tryptofaan, L-DOPA, Chlorogeenzuur, Koffiezuur, Coumaarzuur, Flavonoïden etc.. Ongesubstitueerde residuen, zoals bijvoorbeeld in fenylalanine, reageren niet.

Tyrosine en Tryptofaan komen tevens in eiwitten voor; deze zullen dus ook een bijdrage leveren aan de kleurreactie. Om de bijdrage van eiwitten te onderscheiden van die van oplosbare fenolen, worden de eiwitten eerst d.m.v. Trichloorazijnzuur (TCA) verwijderd. Weefsel wordt gehomogeniseerd, het liefst in water (aan te bevelen concentratie: ca. 500 mg versgewicht, of 50 mg gevriesdroogd drooggewicht per ml water). Celresten worden verwijderd d.m.v. centrifugatie (15-30 min., 11.000 G, 4 °C, in epjes). Aan 0.5 ml homogenaat wordt(in een epje) 0.5 ml 10% TCA toegevoegd, en goed gemengd m.b.v. vortex. Monsters worden gecentrifugeerd in een eppendorfcentrifuge op maximaal toerental, gedurende 15 min.. In een 3 ml cuvetwordt gemengd: 0.75 ml monster (eventueel verdund; Abs.-waarde moet uitkomen tussen de 0.5 en 1.0), 1.5 ml 1.4 M Na₂CO₃ en 0.45 ml Folin-Ciocalteus reagens (Merck nr. 9001). Inhoud cuvet wordt gemengd door deze af te sluiten met parafilm en te kantelen en de inhoud van de cuvetten word overgebracht naar epjes, die na 30 min. incuberen 15 minuten worden afdraaid in een eppendorfcentrifuge bij maximaal toerental. Extinctie wordt 15 sec. gemeten bij 650 nm, bandbteedte 2 nm. Triplo's werden in één keer gemeten. Ijklijk Tyrosine 0.000-1.000 mM.

Tyrosine ijklijn +gedial. perehomogen..

29 februari 1996.



Figuur 2: Ijklijn voor assay bepaling totaal polyfenolgehalte. Een Tyrosine ijklijn (I) werd gecombineerd met extract (ii) en gedialiseerd extract (iii).

2.2.4. Blanco's.

Ijklijn-assay geeft in het licht en in het donker hetzelfde resultaat. De validiteit van de ijklijn werd getest door de volgende controles: (1) Tyrosinase-reeks ['tyr.'], (2) Tyrosinase-reeks in combinatie met vaste hoeveelheid gevriesdroogd perepoeder

['Tyr+peer'], en (3) Tyrosinase-reeks met vate hoeveelheid gedialyseerd (5 uur) perepoeder ['Tyr + dial.peeer.']. Dialyse was na 5 uur bijna compleet.

Dialyseren: Dialyse-slang in demi werd ca. 10 min. gekookt met een schepje EDTA. De slang werd enkele malen gespoeld met demi. Perehomogenaat werd in slang gebracht, dichtgeknoopt en in ca. 1.5 liter water overnacht gedialyseerd onder zachtjes roeren. Het volume moet nadien gecontroleerd worden.

De helling van de grafiek wordt omschreven door de volgende formule (II):

$$Y=92.72X-2.78$$

Formule I is om te bouwen tot een formule die onafhankelijk is van de gebruikte hoeveelheid materiaal. Formule III:

$$Y=(13.25 * X - 0.40) * (50/Z)$$

X = Abs.^{650 nm}.

Y = μmol Polyfenol per gram gevriesdroogd perenweefsel.

Z = mg gevriesdroogd perepoeder, gebruikt in assay.

2.3. Nondestructieve detectie van bruine en holle peren.

2.3.1. Detectie hol.

Holle peren kunnen zichtbaar gemaakt worden m.b.v. Röntgen apparatuur (Philips, prs236). Holle plekken in de peer konden drie-dimensionaal weergegeven worden door een draaiplateau waarop de vruchten tijdens bestraling rond kunnen draaien. Hierdoor kunnen alle zijden van de peer bekeken worden. Het is alleen mogelijk om per individuele peer een opname te maken en deze ook te bewaren. De opname per peer duurt ongeveer 1 minuut.

Er zijn enkele proeven gedaan om de mogelijkheden van het systeem te onderzoeken. Er is een set van 120 peren getest welke een variatie hadden qua hol en bruin. Deze zijn gemeten met de Röntgenapparatuur en PFT-meter (bruindetectie) en doorgesneden voor visuele inspectie.

2.3.2 Nondestructieve meting inwendig bruin

Achtergronden metingen

In het onderzoek naar de reductie van inwendige afwijkingen tijdens CA-bewaring van Conference-peren wordt onderzoek verricht naar een niet-destructieve detectiemethode voor hol en bruin. Hiertoe wordt in eerste instantie geïnventariseerd wat de mogelijkheden zijn om deze afwijkingen te detecteren met een beschikbare, voor o.a. appels en avocado's ontwikkelde trillingstechniek (Peleg 1994).

Het principe hiervan berust op het meten van specifieke trillingsregimes van in trilling gebrachte objecten. Er is een prototype gebruikt met een aantal specifieke signalen die zijn ontworpen en gecalibreerd om stevigheidsveranderingen in vruchten te beschrijven.

Gezien de beperkte mogelijkheden voor de ontwikkeling van detectiemethoden binnen het project is het niet mogelijk gecalibreerde signalen voor holle en/of bruine peren te ontwerpen, maar worden slechts de ter beschikking zijnde signalen getest.

Met deze signalen worden de eventuele mogelijkheden van het gebruik van de trillingstechniek voor het meten van hol en bruin in peer aangegeven.

(1) In eerste instantie wordt onderzocht of bruine en niet bruine peren met de trillingstechniek van elkaar zijn te onderscheiden. Hierbij wordt gebruik gemaakt van peren die bij het ATO-DLO onder dusdanige condities zijn bewaard, dat peren beschikbaar zijn die het verschijnsel bruin wel en niet vertonen.

(2) Er wordt ook onderzocht of het mogelijk geschikte signaal beïnvloed wordt door het rijpheidsstadium van de peren, m.a.w. of het signaal verloopt tijdens de uitstalfase. Als dit het geval is, is de trillingstechniek in de praktijk moeilijker toe te passen. De peren zouden dan immers slechts op een nauwkeurig vastgesteld moment na de bewaring kunnen worden beoordeeld.

(3) Vervolgens worden bewaarde en beoordeelde peren uit lopende experimenten van

het proefstation met de trillingstechniek gemeten om een grote hoeveelheid data te vergaren en de methode op semi-praktijkschaal te testen.

(4) Tevens wordt het effect van hol in peren op de bruindetectie vastgesteld.

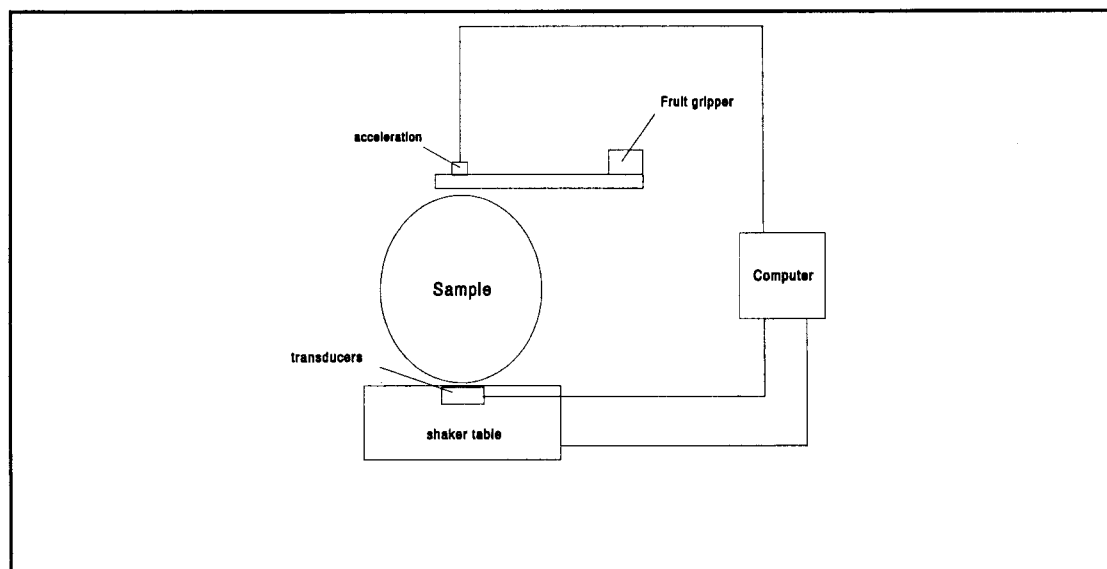
De variatie in hol en bruin is door het Proefstation opgewekt door verschil in pluktijdstip, bewaarconditie, herkomst en uitstalduur.

Materiaal

Peren van het ras Conference werden op drie verschillende pluktijdstippen; vroeg (1e pluk; 6 september 1995), optimaal (2e pluk; 15 september) en laat (3e pluk; 26 september) bij twee verschillende kwekers (SAS en VELD) geoogst. Peren werden in afgesloten containers op het ATO-DLO bewaard bij $-1,0^{\circ}\text{C}$ (95% RV) onder twee verschillende CA condities ($0,5\% \text{CO}_2 + 2,0\% \text{O}_2$ of $3,0\% \text{CO}_2 + 2,0\% \text{O}_2$). Na 4 maanden bewaring werden de peren uitgesteld bij 15°C (80% RV) en beoordeeld na 0, 3 en 6 uitstaldagen. Peren van herkomst Veld werden alleen direct na de bewaring beoordeeld.

Methoden

Peren werden gedurende 2 uur geacclimatiseerd bij kamertemperatuur ($\pm 20^{\circ}\text{C}$). Van iedere peer werd het gewicht bepaald en de maximale diameter gemeten. Vervolgens werden op elke peer vier posities op gelijke afstand ter hoogte van het klokhuis gemarkeerd. Met de trillingsdetector (Figuur 1.) werden op deze posities met drie verschillende calibratiemethoden (C, E en K) trillingsregimes van de peren gemeten. Per peer werd een gemiddelde van de vier trillingssignalen berekend. Dit gemiddelde signaal werd per groep bruine en gawe peren gemiddeld.



Figuur 1. Schematische weergave van trillingstechniek.

Met de Minolta chromameter werd de a*-dimensie op één representatieve positie gemeten. Iedere peer werd ondergedompeld om te bepalen of deze bleef drijven. Vervolgens werd op positie 1 van de trillingsmeting de stevigheid met de penetrometer bepaald (kracht in kg/cm² bij 0,8 cm indrukking). Daarna werd de peer doorgesneden en inwendig beoordeeld op bruin en hol (5 punts-schaal). Per conditie werden 15 peren gemeten.

2.3.2.1 Het verloop van het trillingssignaal gedurende de uitstalling

Materiaal

Peren van het ras Conference werden op het optimale pluktijdstip (2e pluk; 15 september 1995) bij "Sas" geoogst. De peren werden in afgesloten containers bewaard bij -1,0°C (95% RV) onder twee verschillende CA condities (0,5% CO₂ + 2,0% O₂ en 3,0% CO₂ + 2,0% O₂). Na 4 maanden bewaring werden deze peren uitgesteld bij 20°C.

Methoden

Peren werden op vier posities op gelijke afstand ter hoogte van het klokhuis gemarkeerd. Met de trillingsdetector werden op deze posities met drie verschillende calibratiemethoden (C, E en K) trillingssignalen gemeten na respectievelijk 0, 1, 2, 5, en 10 uitstaldagen. Per peer werd een gemiddeld trillingssignaal berekend. Na 10 uitstaldagen werden de peren doorgesneden en inwendig beoordeeld op bruin en hol. Per tijdstip werden 10 peren gemeten.

2.2.3. Testen van detectiemethode op semi-praktijkschaal met peren van het Proefstation Wilhelminadorp (FPO)

Materiaal

Conference peren van drie verschillende herkomsten (telernummers 33, 78 en 139) en vijf verschillende pluktijdstippen (1e, 2e, 3e, 4e en 5e pluk) werden bij het Proefstation bewaard onder verschillende condities en snelheden waarmee deze condities bereikt worden (Tabel 1.).

Tabel 1. Conditie waaronder Conference peren op het FPO gedurende het bewaarperiode 1995/1996 zijn bewaard.

Code conditie	Temperatuur (°C)	O ₂ - concentratie (%)	CO ₂ - concentratie (%)	insteltijd tot bereiken conditie (d)
30	-0,5	21,0	0,0	-
57	-0,5	2,0	1,5	-
58	-0,5	2,0	0,5	-
60	-0,5	2,0	0,5	0
61	-0,5	2,0	0,5	2
63	-0,5	2,0	0,5	10
64	-0,5	2,0	0,5	21
70	-0,5	2,0	3,0	-
124	-0,5	2,0	0,5	slow pull down*

* Bewaring, waarbij 21% O₂ met 1% per dag verlaagd wordt tot uiteindelijk 2%.

Methoden

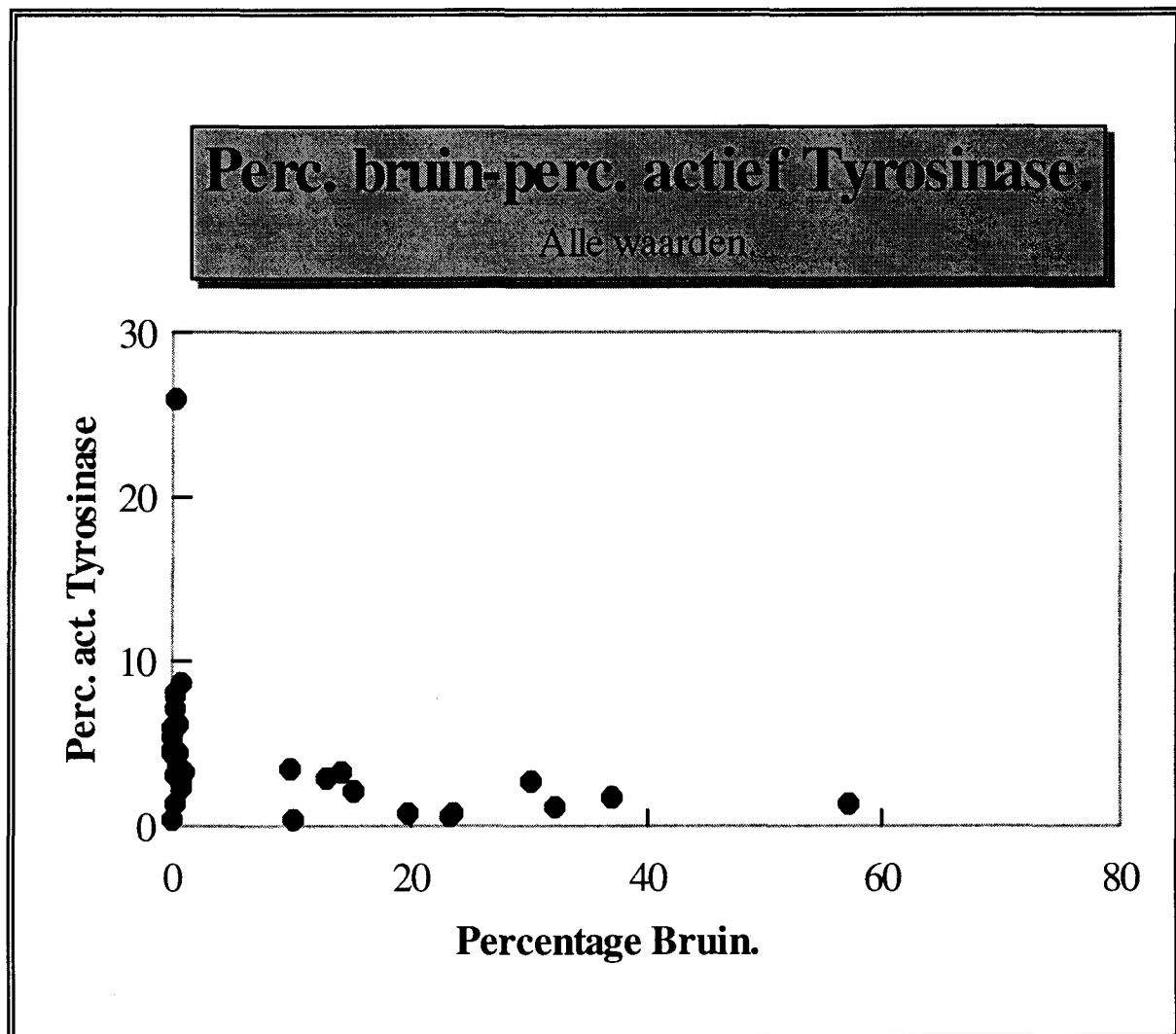
Peren werden op de vier equatoriale posities gemeten met calibratiesignaal E. Tevens werden van ieder peer het gewicht, de kleur, de stevigheid (indrukking m.b.v. de Instron) en de hol- en bruinindex bepaald. Per conditie werden 25 peren gemeten.

3.0 Resultaten

3.1 Bruinverkleuring.

3.1.1 PPO van bruine en niet-bruine peren.

De in het 'statisch systeem' opgeslagen peren waren van twee herkomsten en geplukt op drie tijdstippen. Peren werden bewaard onder twee CO₂-concentraties. Er was dus sprake van 12 'objecten'.



Figuur 1: Percentage bruinverkleuring van de in de lengte doorgesneden peer uitgezet tegen het percentage actief Tyrosinase in het kernweefsel van dezelfde peer. Alle metingen in één grafiek. Er werd dus geen onderscheid gemaakt tussen pluktijdstip, CO₂-concentratie, etc.. Elke meting *an sich* werd in duplo uitgevoerd.

Van deze 12 objecten werd een monster genomen uit de kern. Van gevriesdroogde monsters werd de totale PPO-, Tyrosinase - en Laccase activiteit bepaald. Tevens werd getracht met de Minolta Chromameter de intensiteit van het bruine weefsel te bepalen. De berekende Minolta waarde bij elk object is een gemiddelde van drie metingen. Dit experiment werd uitgevoerd in triplo. De bedoeling was om de activiteiten van de enzymen in verband te brengen met de mate van interne bruining. In de literatuur wordt algemeen aangenomen dat PPO's de veroorzakers zijn van het bruin worden van peren.

Uit figuur 1 blijkt dat er geen relatie bestaat tussen bruinverkleuring en enzymactiviteiten. Hooguit kan opgemerkt worden dat bij bruine peren de Tyrosinase-activiteit gemiddeld lager is, en niet boven de 5 % uitkomt. Factoren als pluktijdstip, CO₂-concentratie en herkomst hebben geen invloed op de activiteit van polyfenoloxidasen in het weefsel. De minolta-waarden (niet weergegeven) gaven een duidelijk onderscheid tussen bruine en niet bruine peren, echter waren niet geschikt om iets te zeggen over de intensiteit van bruin. Dit laatste is te verklaren doordat de meetwaarden sterk afhankelijk zijn van de plaats waar gemeten wordt. Ideaal zou een meetsysteem zijn waarbij niet alleen het oppervlak bruin bepaald werd, maar tevens de intensiteit van de bruinverkleuring. De gevoeligheid van de CBA-apparatuur is voor deze manier van meten echter te gering. In de toekomst zal er gebruik gemaakt worden van onderbelichting bij CBA-metingen, hetgeen meer informatie geeft over het oppervlak bruin. De gering verschillen tussen de PPO-activiteiten van de objecten doet vermoeden dat andere factoren een belangrijke rol spelen bij bruinverkleuring. Mogelijk belangrijk zijn de compartimentalisatie van PPO's en het aanwezigheid van bepaalde anti-oxidanten in het weefsel.

3.1.2. Enzymactiviteiten binnen de peer.

Uit de gemaakte pereblots bleek dat de PPO-activiteit in de schil en in de kern het hoogst is. De blots waren te onduidelijk om vergaand conclusies te verbinden aan de activiteiten. Tevens werden plakjes peer geïncubeerd in L-DOPA. Hieruit bleek dat het actief Tyrosinase en het Laccase zich vooral bevinden in de kern, rond de pitjes, en rond holle gedeelten in de peer (Er werden foto's gemaakt van L-DOPA kleuringen, met en zonder Tropolon en SDS, niet getoond). Het latente Tyrosinase lijkt min of meer (methode niet geschikt voor kwantitatieve beoordeling) gelijkmatig verdeeld in alle gedeelten van de peer te zitten. In de bruine gedeelten van de peer is geen PPO-activiteit meetbaar. Aan de hand van de *in vivo* met L-DOPA geïncubeerde peren, werd op verschillende plaatsen uit de vrucht in 5-voud weefsel geïsoleerd:

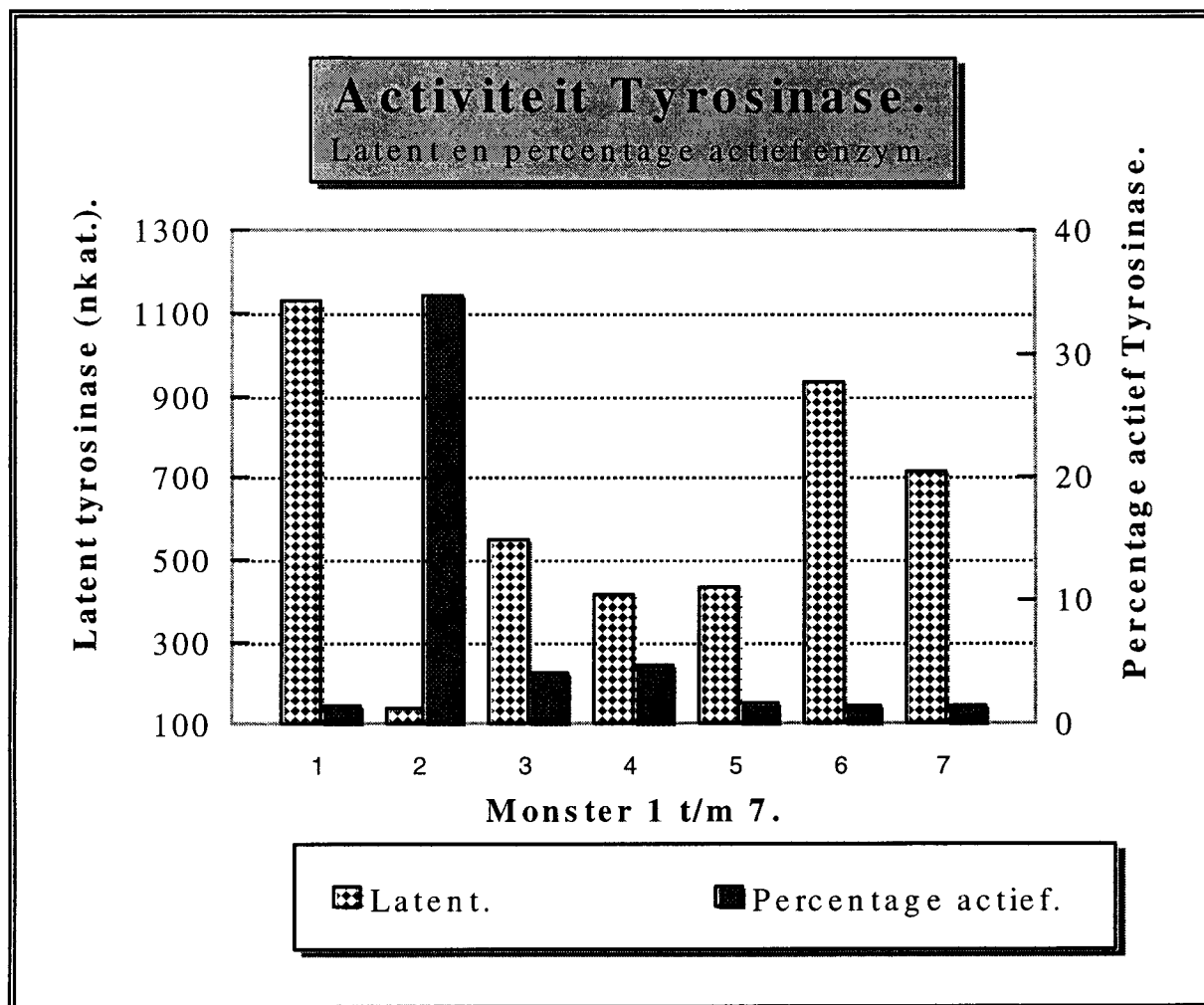
1. De schil.
2. De kern (met pitjes).
3. Gezond weefsel nabij grens bruin-niet bruin.
4. Weefsel op deze grens.
5. Bruin weefsel nabij de grens bruin-niet bruin.

6. 'Ingeklonken' weefsel in een holle plek.

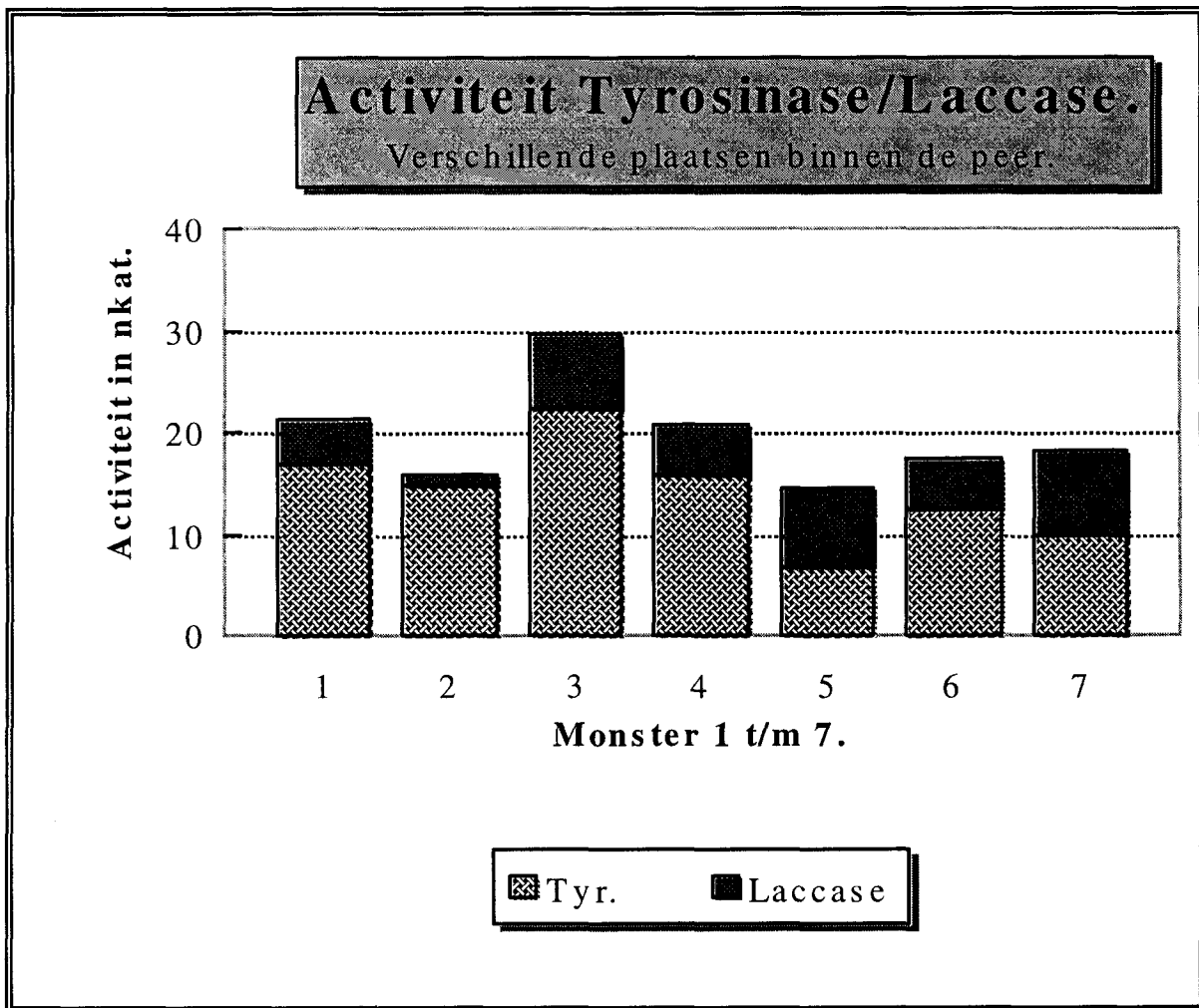
7. Weefsel verder van een holle plek.

Monsters 1 en 2 werden genomen uit VELD peren van de eerste pluk bewaard bij 0.5 % CO₂. De andere monsters (3, 4, 5, 6 en 7) werden genomen uit SAS peren van de derde pluk bewaard bij 3.0 % CO₂. Deze peren bleken vrijwel steeds hol en bruin te zijn. Het was technisch niet mogelijk alle monsters steeds uit dezelfde peer te nemen. Van alle monsters werd de laccase- en de (actieve en latente) Tyrosinase activiteit bepaald.

Het is moeilijk conclusies te trekken uit figuur 2 en 3. De Laccase activiteit is lager dan de Tyrosinase activiteit, dat bleek al uit eerdere experimenten. De waarden in figuur 3 zijn gemiddelden. Er lijken verschillen te bestaan tussen de verschillende monsterplaatsen, de standaard deviaties zijn echter zeer groot. Het is overigens moeilijk te oordelen over een gemiddelde van 5 monsters. De SD's voor Tyrosinase voor monster 1 t/m 7 waren respectievelijk 5.67, 3.44, 7.06, 6.24, 1.50, 4.15 en 2.83. Voor Laccase waren deze activiteiten achtereenvolgens 3.25, 0.64, 3.51, 1.03, 0.29, 0.64 en 1.75. Ook in figuur 2 zijn de standaarddeviaties groot, echter hier zijn wel een aantal dingen in het oog springend. In monsters uit de schil zit opvallend veel meer latent Tyrosinase. In monsters uit de kern van de peer is het percentage actief Tyrosinase relatief zeer hoog, en dit is te wijten aan een relatief zeer laag latent Tyrosinase gehalte, en dus niet aan een hoog actief Tyrosinase gehalte. Opvallend is dat deze hoge waarde bij monster 2 (kern) verklaard wordt door twee van de vijf waarden. Deze twee waarden liggen rond de 70 à 80 % terwijl de andere drie waarden liggen rond de 6 %. Een directe verklaring voor dit fenomeen is niet te geven, maar het is opvallend om aan het toeval te wijten. Ondanks het hogere percentage enzymactiviteit waren de twee peren niet bruin. Meer onderzoek is vereist.

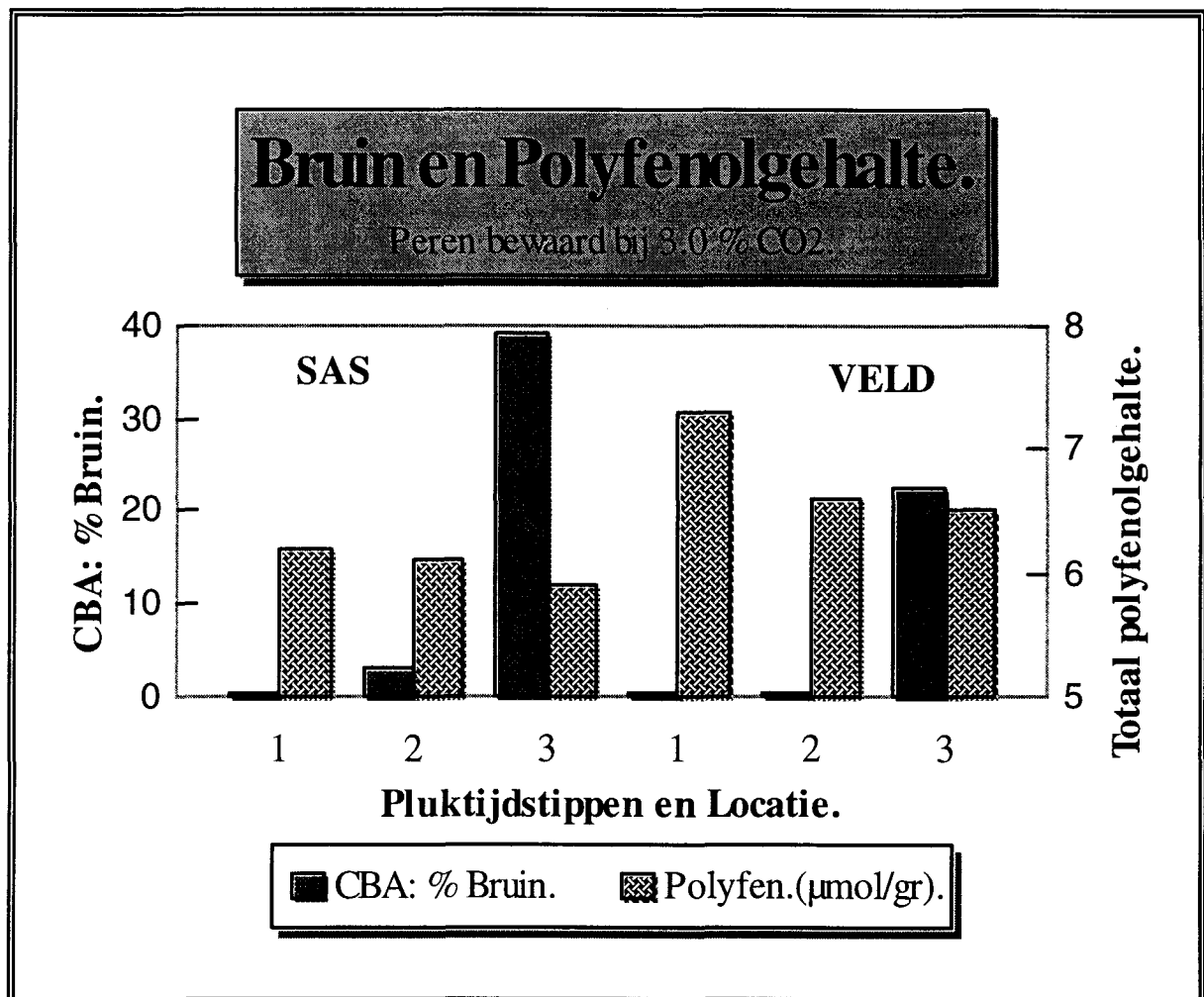


Figuur 2: 'Activiteit' van latent enzym en percentages actief enzym van de verschillende monsters naast elkaar uitgezet. Weergegeven waarden zijn gemiddelden van vijfmonsters. Metingen werden verricht in duplo. De concentratie van het extract was 50 mg/ml.



Figuur 3: Tyrosinase en Laccase activiteiten van weefsel op verschillende plaatsen in de peer (zie tekst). Binnen één balkje: onderste gedeelte, Tyrosinase; bovenste gedeelte Laccase. Weergegeven waarden zijn gemiddelden van vijfmonsters. Metingen werden verricht in duplo. De concentratie van het extract was 50 mg/ml.

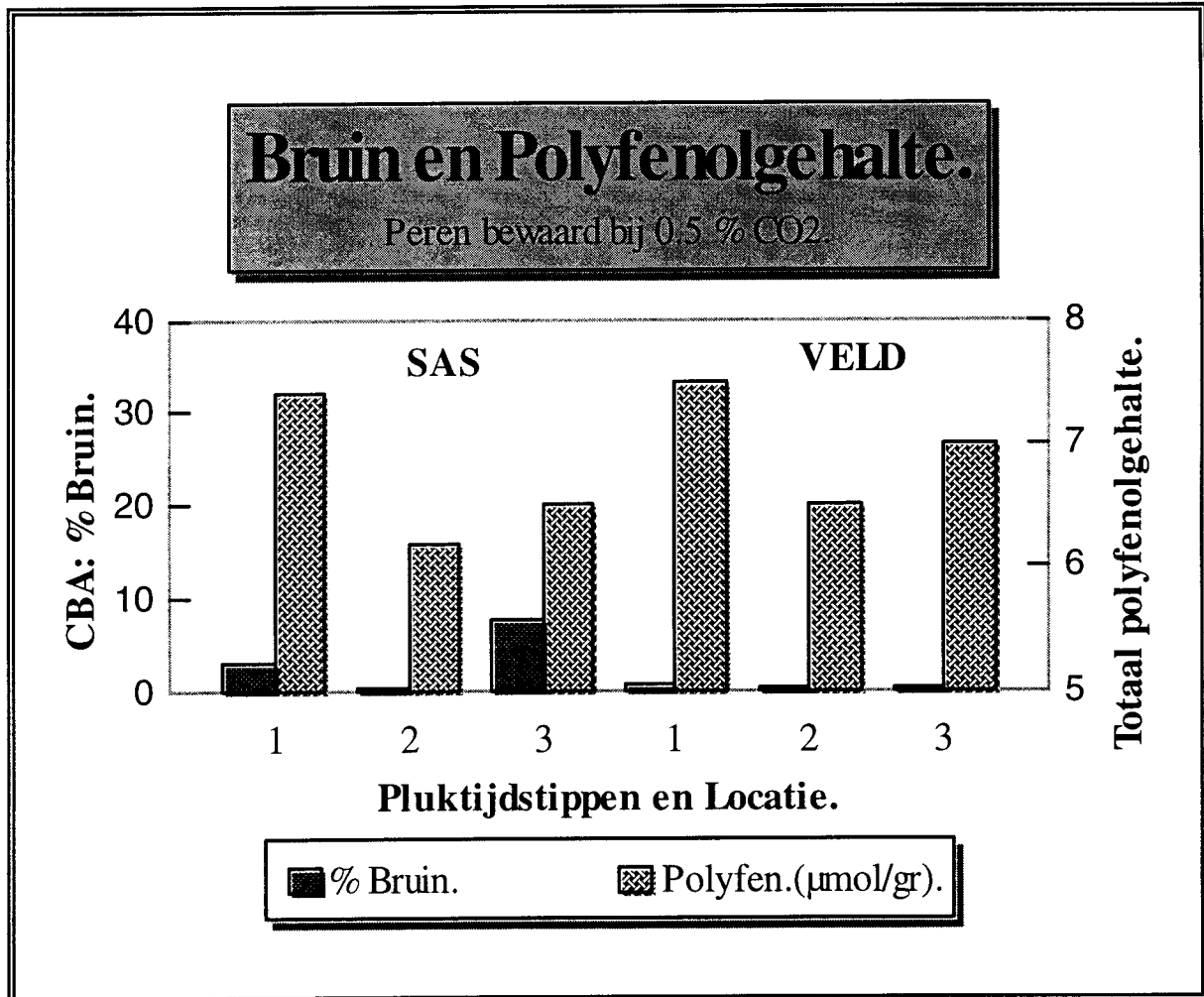
3.1.3. Bepaling van het totaal polyfenolgehalte.



Figuur 4 en 5: grafiek 4: peren bewaard bij 3.0% CO₂, grafiek 5: peren bewaard bij 0.5% CO₂. Op de x-as staan de drie pluktijdstippen weergegeven. De eerste drie waarden (v.l.n.r.) zijn van SAS-peren de drie waarden daarna van VELD-peren. Het linker balkje van elk cluster is de CBA-waarde, het rechter balkje de polyfenol-waarde. Elk balkje is een gemiddelde van zes waarden: alle metingen werden in triplo verricht, grove en fijne peren werden samen genomen. Elke polyfenolmeting werd in triplo uitgevoerd. De 'polyfenolbalkjes' zijn derhalve een gemiddelde van 18 waarden.

Op het eerste gezicht is de invloed van de locatie, de CO₂-concentratie en het pluktijdstip op de bruinverkleuring meteen duidelijk zichtbaar. Later geplukte peren, en peren van locatie SAS worden -zo blijkt wederom- eerder bruin. Anderzijds lijkt het totaal polyfenolgehalte geen relatie te vertonen met pluktijdstip, locatie, CO₂-concentratie of mate van bruining. De meetmethode is geoptimaliseerd, maar niet ideaal. Monsters moeten afgedraaid worden voor meting, omdat er in het

reactiemengsel een troebeling ontstaat. Deze troebeling heeft, zo bleek uit controles, geen invloed op de kleuringsreactie. De waarden binnen de balkjes verschillen sterk van elkaar (grote SD's), echter dit ligt niet aan de methode. Grote vraag blijft of de verhouding in de concentratie van verschillende polyfenolen, kortom de cocktail, verandert. Bepaling van het totaal polyfenolgehalte is een grove meetmethode. In de toekomst zou, mede in verband met het feit dat sommige flavonoïden een anti-oxidantwerking hebben, de concentratie van afzonderlijke polyfenolen bepaald moeten worden.



3.1.4. Controles.

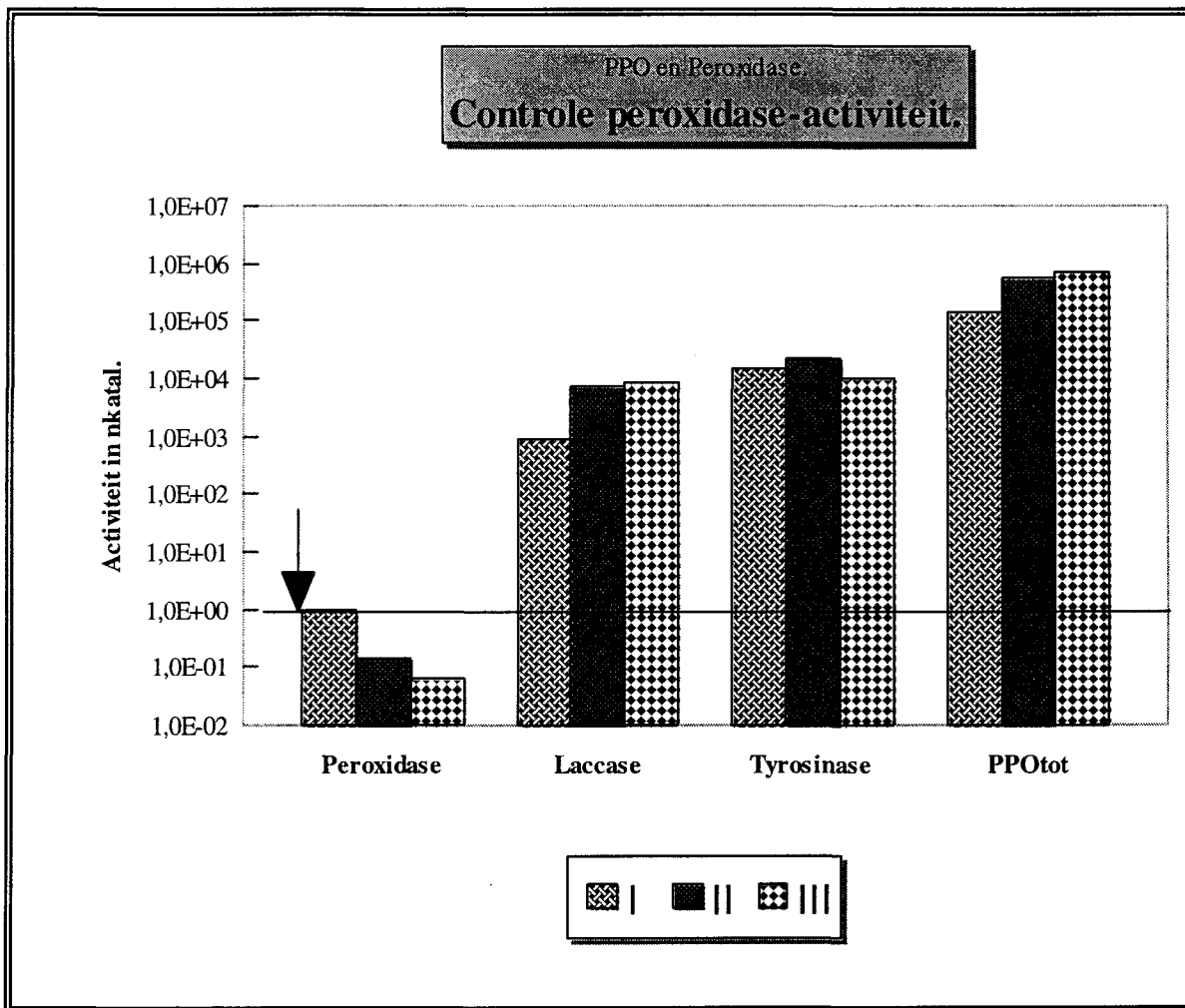
Om de validiteit van de resultaten te controleren werden er twee controles uitgevoerd. Bij een controle werd gekeken of peroxidases deel uitmaken van de gemeten activiteiten. Bij de tweede controle werd gekeken in welke mate de extractconcentratie invloed heeft op de activiteit van PPO.

3.1.4.1. Peroxidase.

Voor de controle werden drie monsters uit peren genomen:

- I: Monster uit de kern (van een gezonde peer).
- II: Monster uit het cortexweefsel.
- III: Monster uit cortexweefsel van een bruine peer.

Monsternamen van I t/m III vond plaats in 5-voud. Voor deze monsters werd totaal PPO, Tyrosinase en Laccase bepaald. De bepalingen werden in duplo uitgevoerd en gemiddeld. Voor de Peroxidasebepaling werden de vijf monsters van I, II en III samengevoegd, gemengd en vervolgens in triplo gemeten (Enkele monsters waren te klein om individueel te meten, vandaar de samenvoeging ervan). De laccase-activiteit in de monsters is bijzonder laag, echter de hoogste Peroxidaseactiviteit die gemeten werd lag een factor 1000 lager dan de laagste Laccase-activiteit die werd bepaald. Peroxidase speelt dus geen rol bij de PPO-metingen. Monster I werd mee genomen omdat er bij *in vivo* metingen gebleken was dat PPO-activiteit in de kern hoog is.



Figuur 6: Peroxidase-controle. Van drie monsters uit de peer (uit de kern en uit bruin en niet-bruin cortexweefsel) werd de totale PPO-, Laccase- en Tyrosinase-activiteit gemeten. De y-as is logaritmisch. De horizontale lijn door de grafiek visualiseert het maximale Peroxidase-niveau.

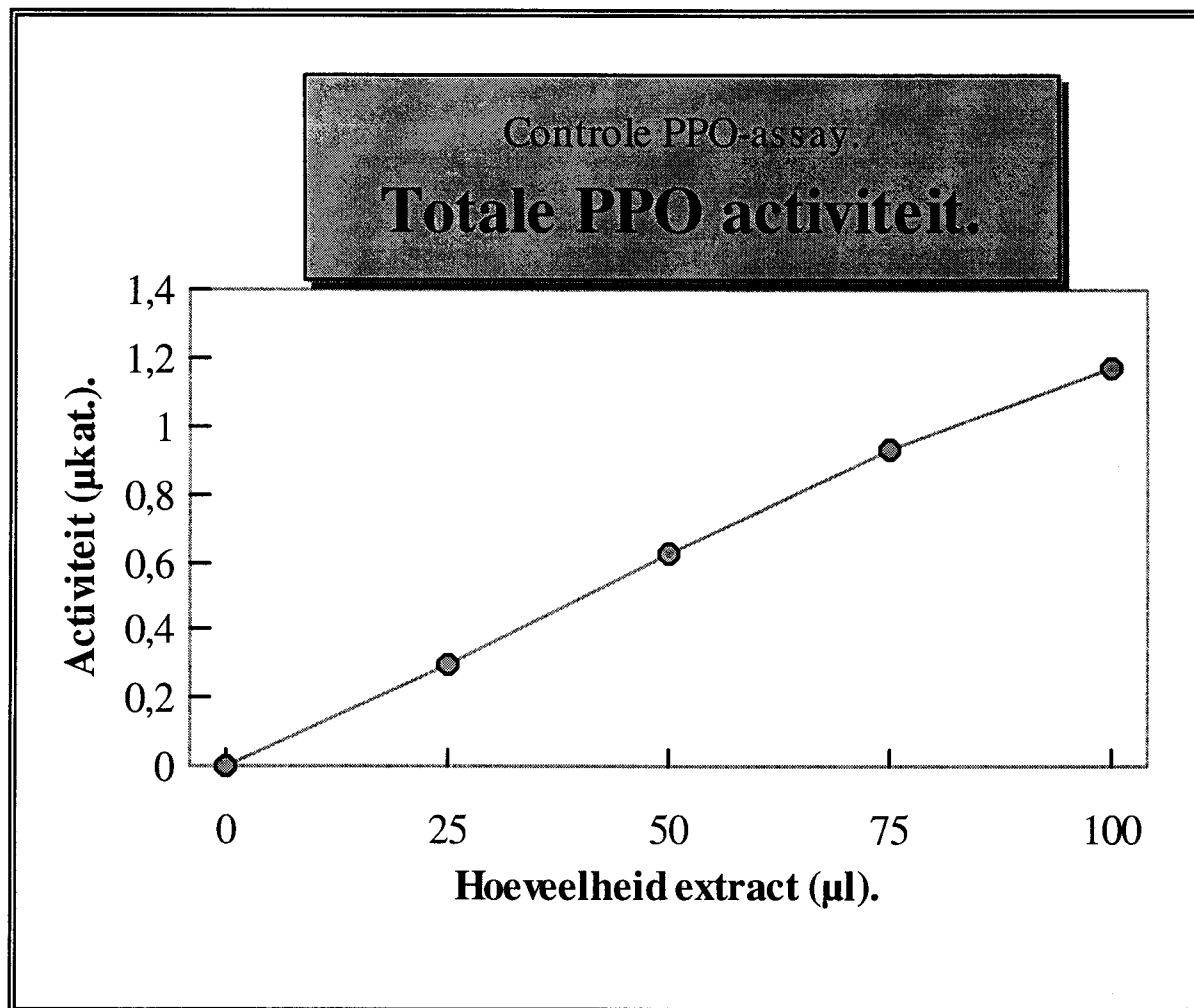
3.1.4.2. PPO-activiteiten.

Er werden voor deze controle drie activiteiten gemeten:

- a: Totale PPO-activiteit.
- b: Actieve fractie PPO.
- c: Laccase.

Voor de metingen werden drie monsters in 5-voud uit de peer gewonnen waarvan bekend was dat de drie activiteiten (a t/m c) hier respectievelijk het hoogst in waren. Voor I was dit een monster van de schil van de peer, voor II een monster uit gezond cortex weefsel, en voor III een monster rond holle plekken in de peer. Voor de metingen werden de vijf monsters gemengd. Metingen werden in triplo uitgevoerd. Er werd steeds 100 µl extract gebruikt in de experimenten. Tussen 75 en 100 µl buigt de

grafiek in figuur 7 iets af. Het is beter in de toekomst minder extract te gebruiken, bijvoorbeeld 75 μ l.



Figuur 7: Totale PPO-activiteit (monster a) bij gebruik van verschillende hoeveelheden extract. Metingen werden in triplo uitgevoerd. Concentratie onverdund extract: 50 mg gevriesdroogd materiaal/ml.

3.2 Monitoring hol en bruin

3.2.1 Afwijkingen in statisch CA-systeem

Van alle behandelingen zoals pluktijdstippen, herkomsten en CO₂ bewaard in het statisch bewaarsysteem is in december, februari en in mei een visuele inwendige inspectie uitgevoerd. De peren werden zowel voor hol als wel bruin ingedeeld in 4 stadia namelijk: 0=gaaf, 1=lichte aantasting, 2= matige aantasting, 3=zware aantasting.

Deze indeling is vooral gebaseerd op de oppervlakte hol en bruin en is gestandariseerd bij het ATO en FPO.

Bij de beoordeling bleek dat vooral in pluk 2 en 3 hol en bruin optrad (fig. 1 en 2). In 3% CO₂ trad meer hol en bruin op dan in 0.5%. Hieruit blijkt dat dat deze processen gekoppeld zijn. Maar de totale hoeveelheid bruin was al in december bepaald, het nam daarna niet meer toe. Wel was er na december nog een duidelijke toename van het percentage holle peren (fig 3 en 4). Tot en met de beoordeling in juni nam dit toe, bruine peren werden hol. Niet weergegeven is dat ook de mate van holheid in deze periode ook nog sterk toenam.

Uit de resultaten blijkt dat CO₂ de belangrijke factor is voor de afwijking. Een later pluktijdstip en een langere bewaartijd versterken dit.

Ook de herkomst speelt een rol (fig. 5). De herkomst welke vooraf als gevoeliger was bedoeld bleek ook inderdaad gevoeliger (Sas). Over het algemeen waren de grovere peren ook gevoeliger voor de afwijking (fig. 6).

De resultaten bevestigen over het algemeen de resultaten en de bevindingen in het verleden. Belangrijk is te constateren dat het proefmateriaal voldoende divers was om grote verschillen in hol- en bruinaantasting te realiseren voor de diverse meetdisciplines.

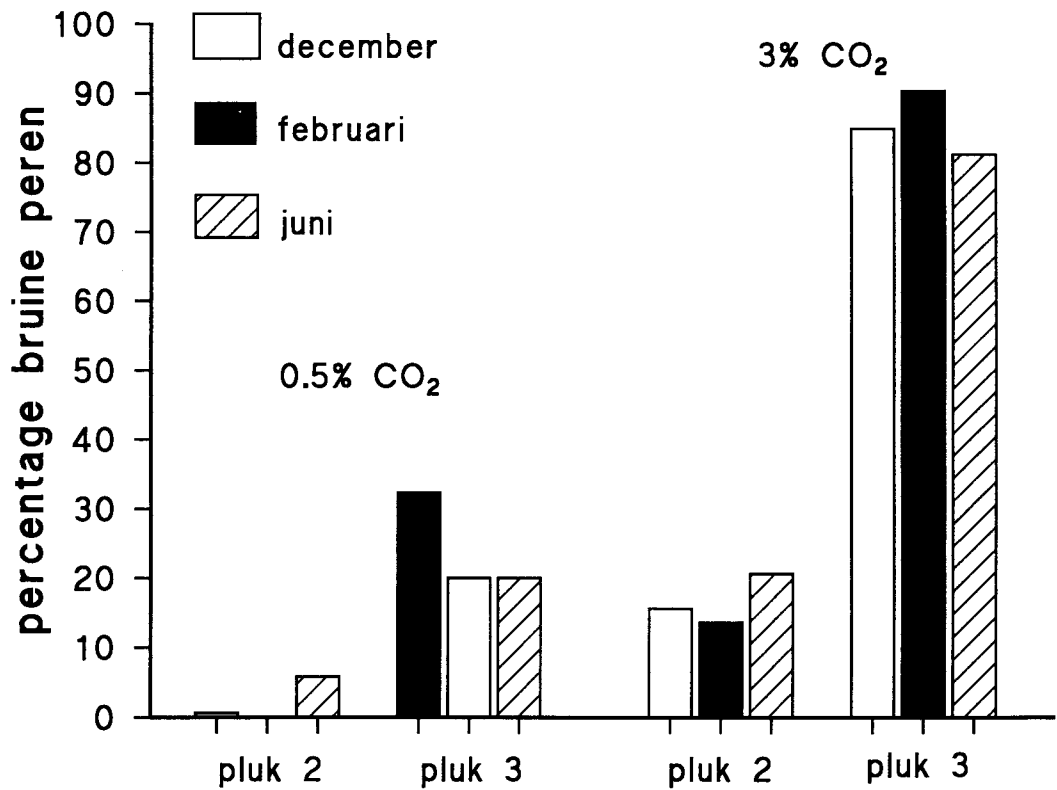


Fig. 1 Ontwikkeling bruine peren in CA-bewaring bij 2%O₂ en 0.5 en 3% CO₂

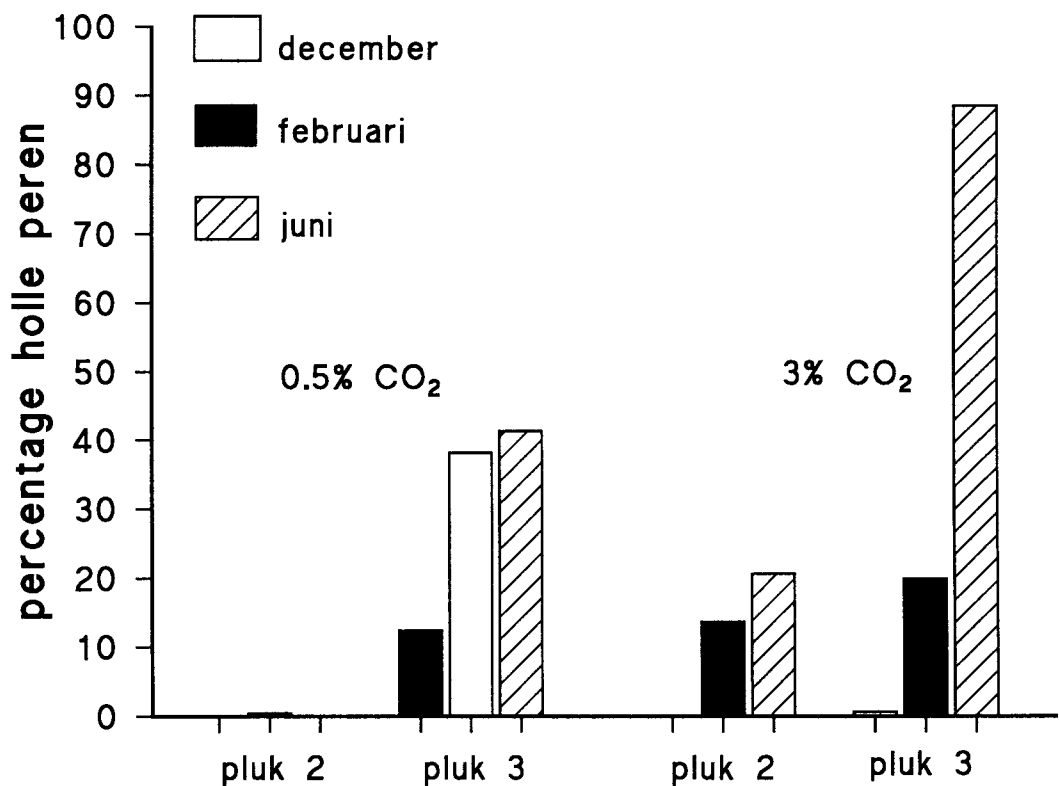


Fig. 2 Ontwikkeling holle peren in CA-bewaring bij 2%O₂ en 0.5 en 3% CO₂

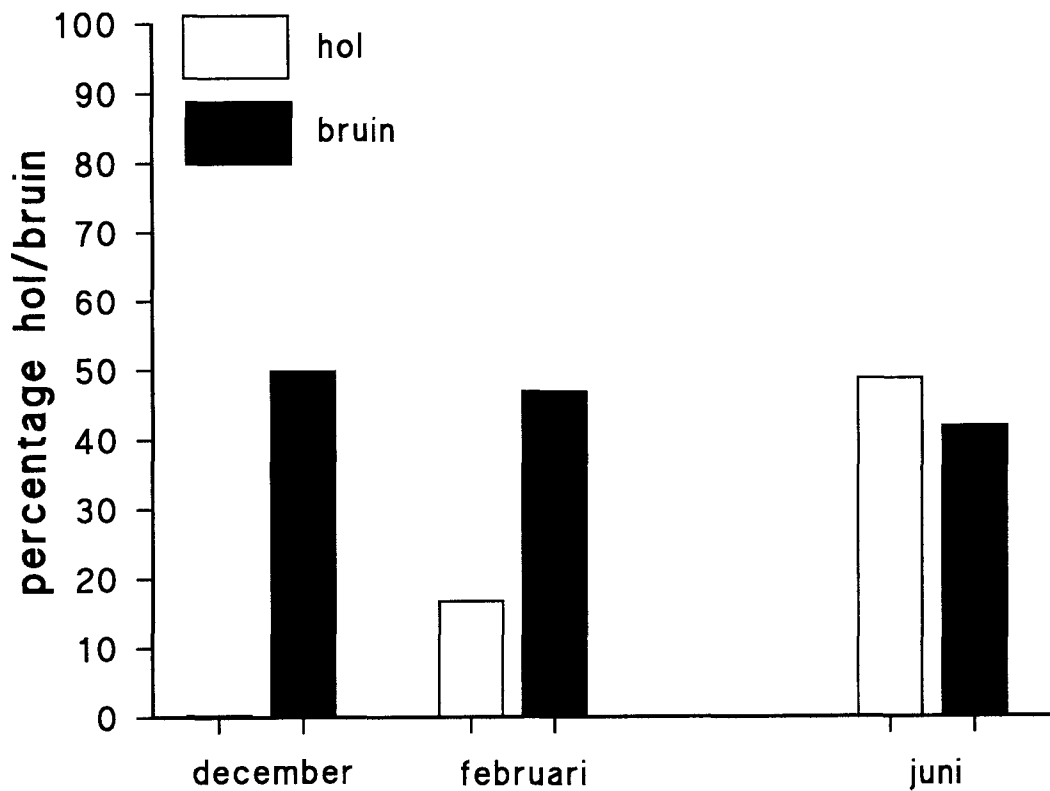


Fig. 3 Ontwikkeling hol en bruin in 3 % CO₂, gemiddelde van herkomsten en pluktijdstippen.

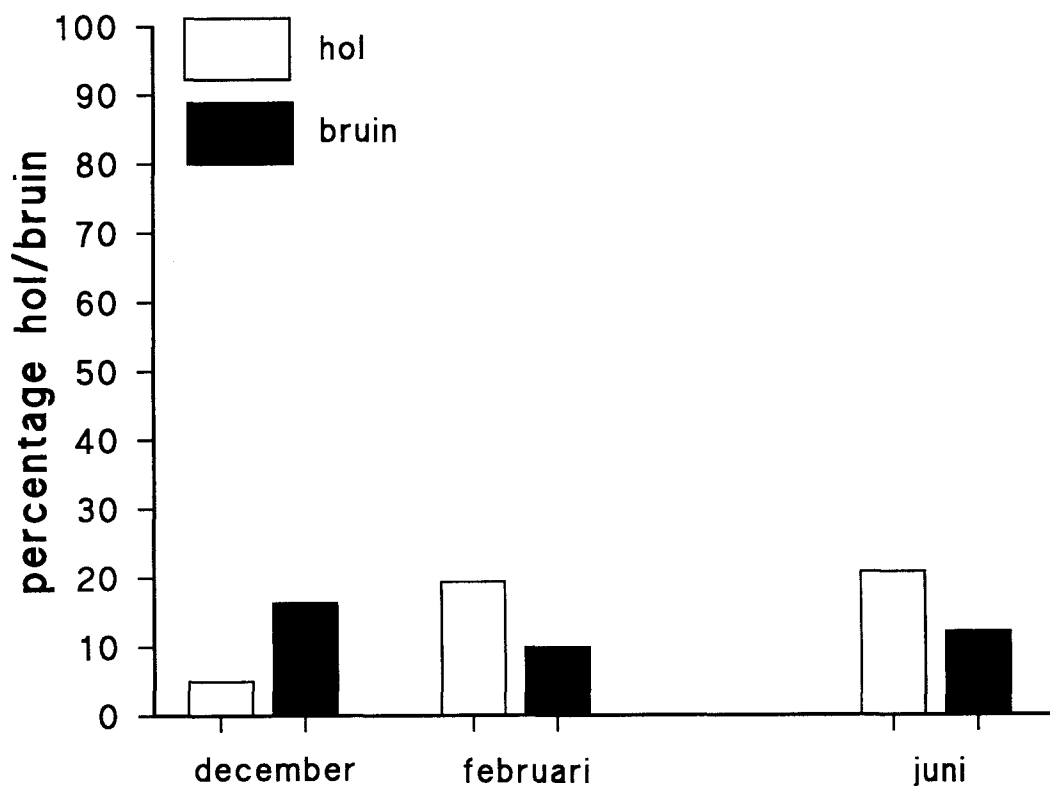


Fig. 4 Ontwikkeling hol en bruin in 0.5 % CO₂, gemiddelde herkomsten en pluktijdstippen

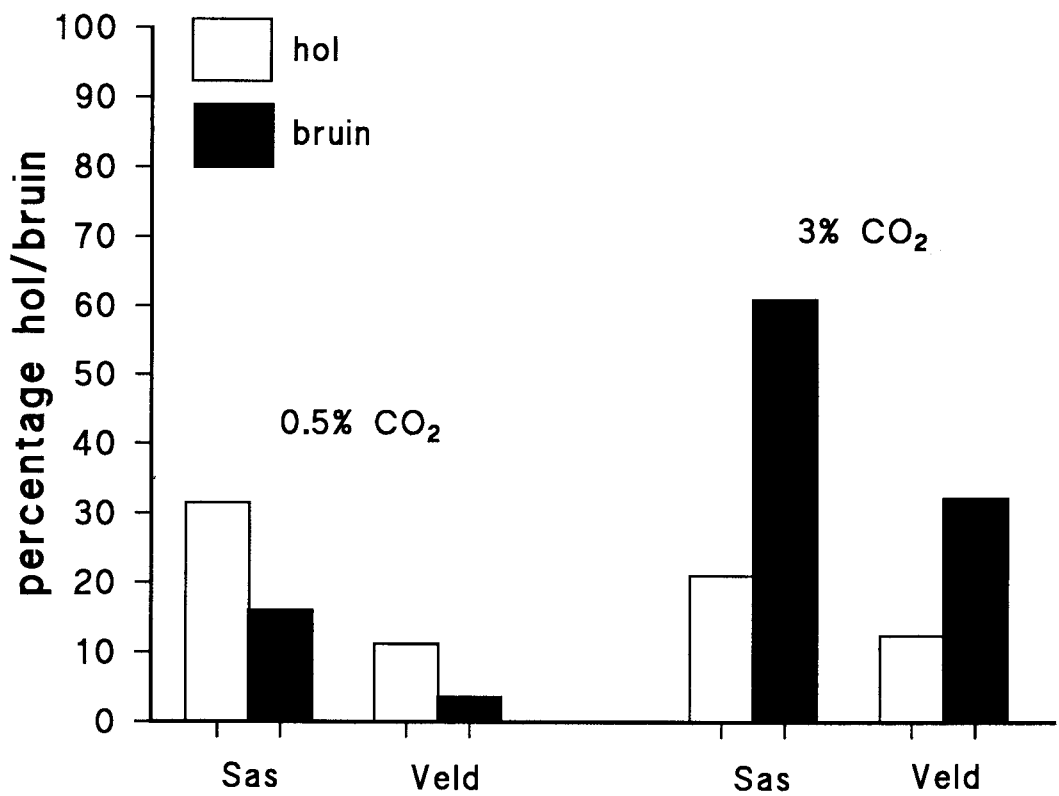


Fig. 5 Ontwikkeling hol en bruin per herkomst (februari)

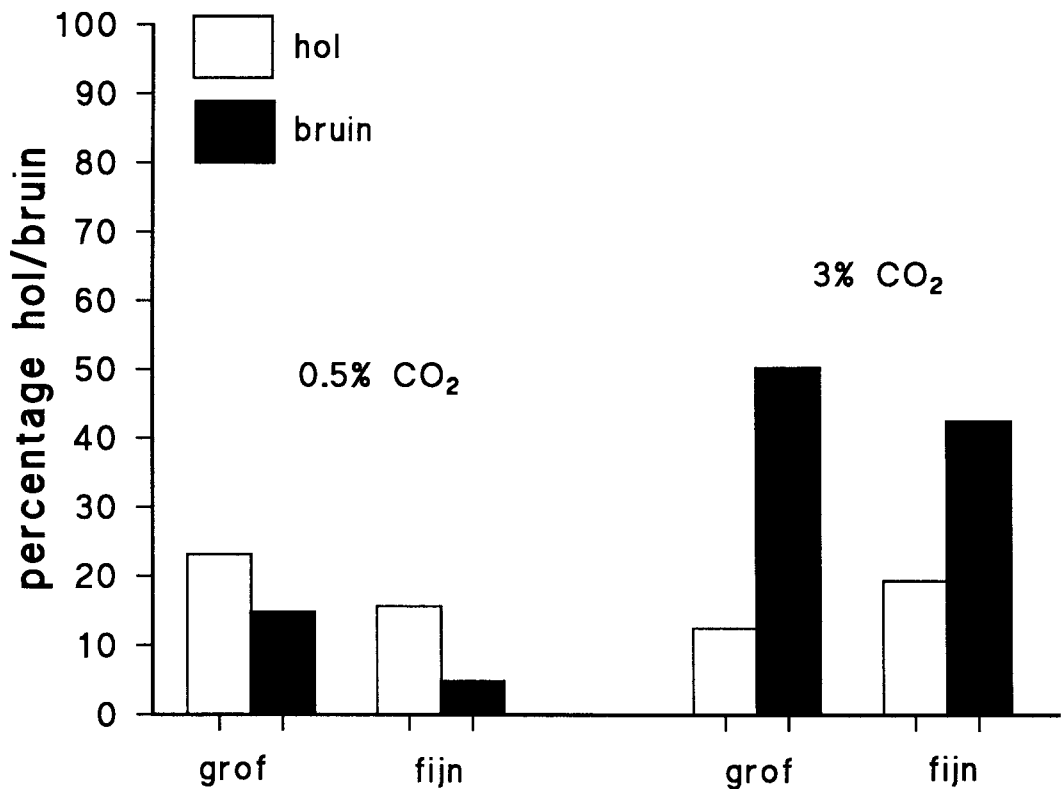


Fig. 6 Ontwikkeling hol en bruin in grove en fijne peren (februari)

3.2.2 Inductie hol en bruin

Gedurende de 12 weken bewaring in het doorstroomsysteem om hol en bruin te induceren bij diverse CO₂- en O₂ gehalten zijn elke week 5 peren per conditie en herkomst beoordeeld op inwendige afwijkingen. Pas na ongeveer 6 weken traden er afwijkingen op. Gezien de geringe monsterhoeveelheid zijn de resultaten van week 6,7 en 8 gemiddeld, de waarnemingen in week 12 zijn individueel weergegeven. (Tabel 3 en 4)

Tabel 3 Gemiddelde bruin- en holontwikkeling na 6, 7 en 8 weken

Zuurstof %	Koolzuurgas %	Opp. Bruin CBA		Percentage hol	
		Sas	Veld	Sas	Veld
0.25	0	0.2	0.4	0	0
1	0	1.7	0.4	0	0
2	0	0.7	0.8	0	0
0.25	5	6.7	1.4	0.7	1.7
1	5	9.6	3.4	0	0.3
2	5	2.5	2.8	0.3	0.7
0.25	10	5.9	2.5	1.3	2.3
1	10	5.6	12.9	0.3	3.0
2	10	38.6	28.4	0.7	1.0

Na gemiddeld 6, 7 en 8 weken bewaring bij 5°C in het doorstroomsysteem (tabel 3) begint duidelijk bruinverkleuring op te treden. Dit is vooral het geval in 10% CO₂ in 5% begint het ook maar is variabel per zuurstofgehalte. Het optreden van holle peren is nog beperkt. Echter dit beeld wordt na 12 weken bewaring duidelijker (tabel 4). De algemene trend is dat in lage CO₂ gehalten nauwelijks bruin en hol optreedt onafhankelijk van het zuurstofgehalte. Naarmate een hoger CO₂ gehalte wordt aangehouden neemt het percentage aangetaste peren toe. Dit versterkt het idee dat CO₂ de hoofdoorzaak is van het probleem. Interessant is de waarneming bij 10% CO₂. Bij 0.25% O₂ worden de peren voornamelijk hol terwijl nauwelijks bruinverkleuring optreedt. Bij 2% O₂ komt voornamelijk bruinverkleuring voor. De oorzaak kan zijn dat het bruinverkleuringsproces door het lage zuurstofgehalte wordt geremd, mogelijk door remming van de enzymen die een rol hebben in het proces. Het is niet duidelijk waarom in de combinatie 0.25% O₂ en 10% CO₂ allen bruinverkleuring optreedt. Uit ander onderzoek is bekend dat zowel hol als bruin toenemen naarmate ook het

zuurstofgehalte lager is.

Belangrijk voor het onderzoek is dat op een eenvoudige en geprogrammeerde wijze hol en bruin te induceren zijn. Duidelijke verschillen in mate van hol en bruin tussen beide herkomsten zijn niet aanwezig.

Tabel 4 Bruin en holontwikkeling na 12 weken

zuurstof %	koolzuur gas %	opp. bruin CBA		percentage hol		penetro- meter- waarde
		Sas	Veld	Sas	Veld	
0.25	0	0.2	0.7	10.0	0	10.5
1	0	11.1	6.4	0	0	1.6
2	0	7.8	2.4	0	0	1.9
0.25	5	4.5	2.8	9.1	20.0	9.3
1	5	10.2	10.3	28.0	15.4	6.3
2	5	4.5	2.1	0	20.0	4.7
0.25	10	5.9	4.6	45.0	63.6	9.4
1	10	9.5	7.6	0	8.3	9.5
2	10	50.0	25.1	0	0.1	7.6

De rijpheidsontwikkeling in de peren is gemeten met de penetrometerwaarde. Een duidelijke trend is de lagere waarde naarmate het CO₂-gehalte hoger is en het zuurstofgehalte lager is. Voor toepassing van Modified Atmosphere is belangrijk te constateren dat pas na 5 a 6 weken bewaring bruinverkleurig ging optreden in de meest extreme conditie. De stevigheid gedurende deze periode bleef goed gehandhaafd.

3.3.3 Anaërobe componenten en bruinverkleuring

Eén van de hypothesen omtrent de oorzaken van hol en bruinontwikkeling is dat door toepassing van CA-bewaring het gehalte aan fermentatieproducten zoals acetaldehyden en ethanol toeneemt en hol en bruin veroorzaken. De meetresultaten zijn samengevat in figuur 7 tot en met 15.

Steeds is de hoeveelheid hol en bruin uitgezet tegen de respectievelijke gehalten aan ethanol en acetaldehyden.

De ethanolontwikkeling is in 0.3% zuurstof duidelijk hoger dan in 2%. In 0.3% O₂ werd na 3 en 6 weken het hoogste gehalte gemeten in 0% CO₂. De verklaring hiervoor is dat in deze combinatie het O₂ gehalte continu bijna 0 is geweest.

In het algemeen is de concentratie acetaldehyde juist andersom: in laag zuurstof een lagere concentratie acetaldehyde. In 2% O₂ wordt het meeste acetaldehyde gevormd in 0% CO₂, in 0.3% zuurstof is er geen duidelijke lijn te ontdekken.

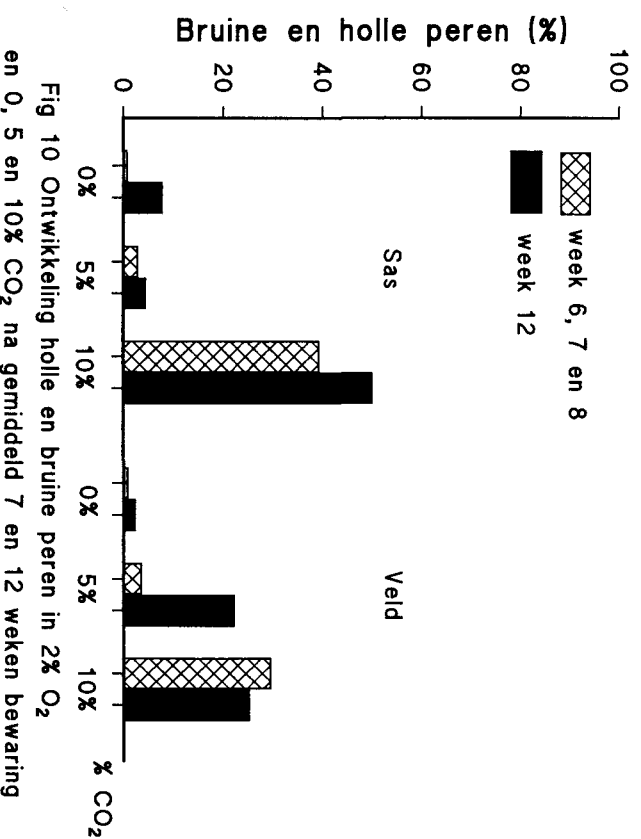
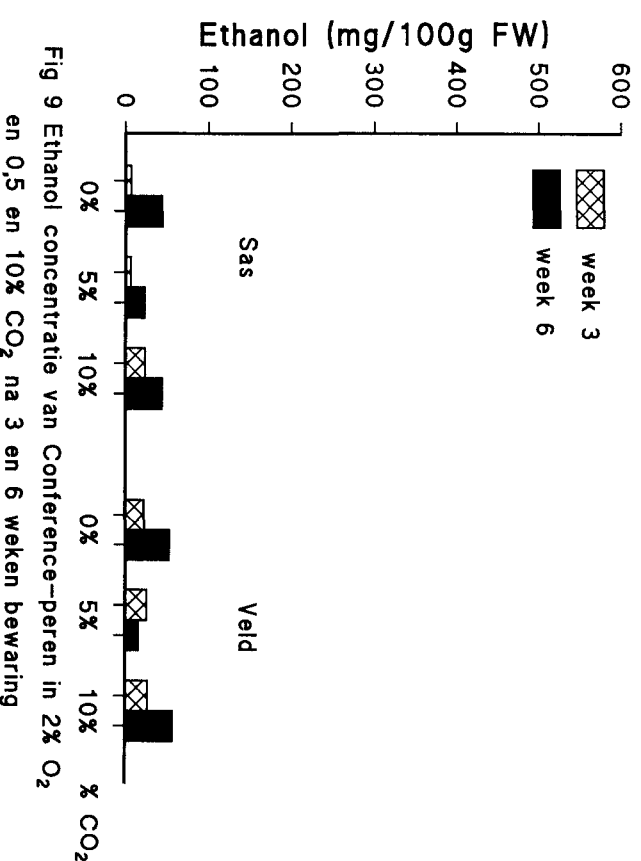
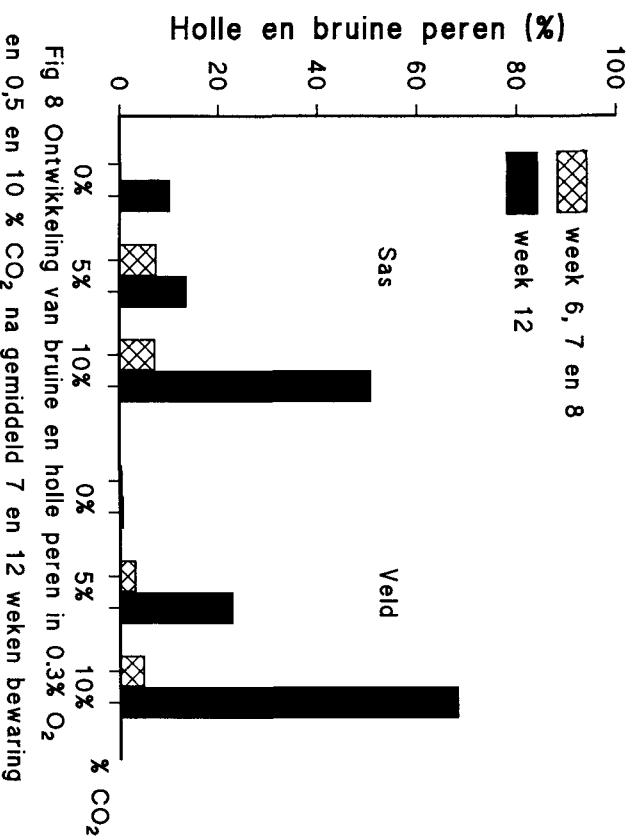
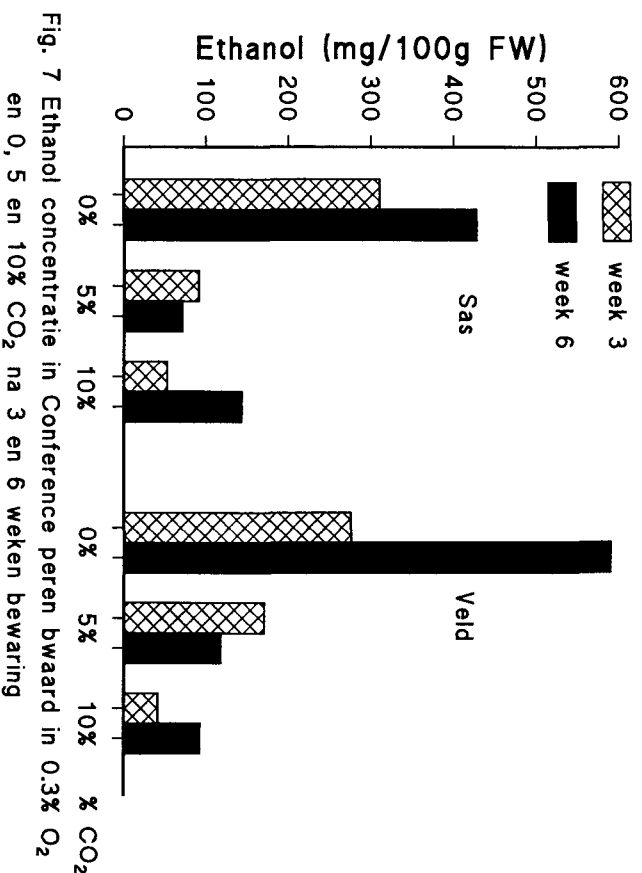
De hogere produktie van ethanol in 0.3% O₂ is logisch, er meer sprake van fermentatie. Acetaldehyde is een precursor voor de vorming van ethanol echter het is niet duidelijk in hoeverre ethanol weer omgezet kan worden in acetaldehyde. In diverse combinatie zuurstof en kooldioxide ontstaat een evenwichtsconcentratie. De twee herkomsten in het onderzoek vertoonden globaal hetzelfde gedrag.

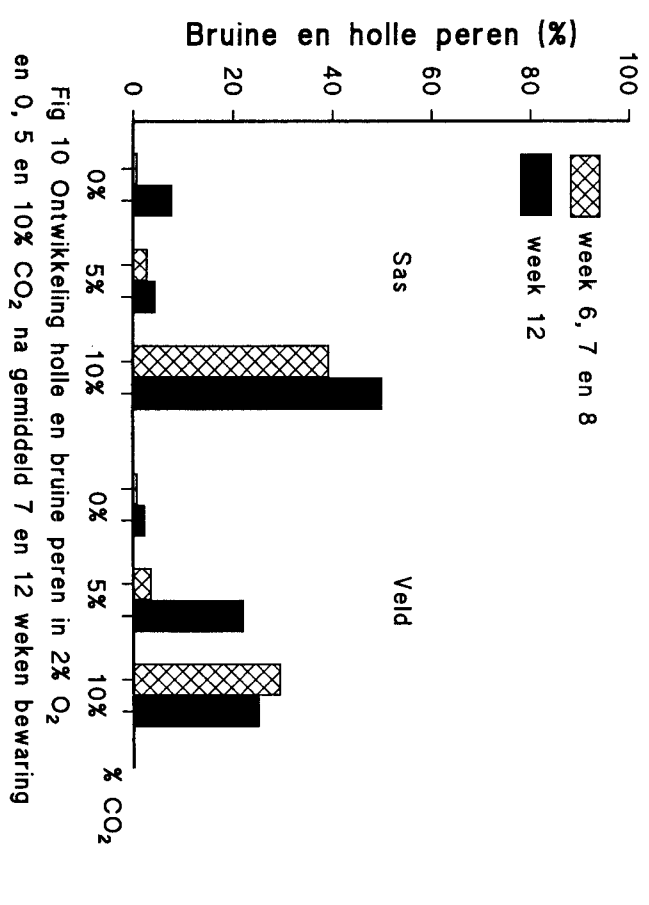
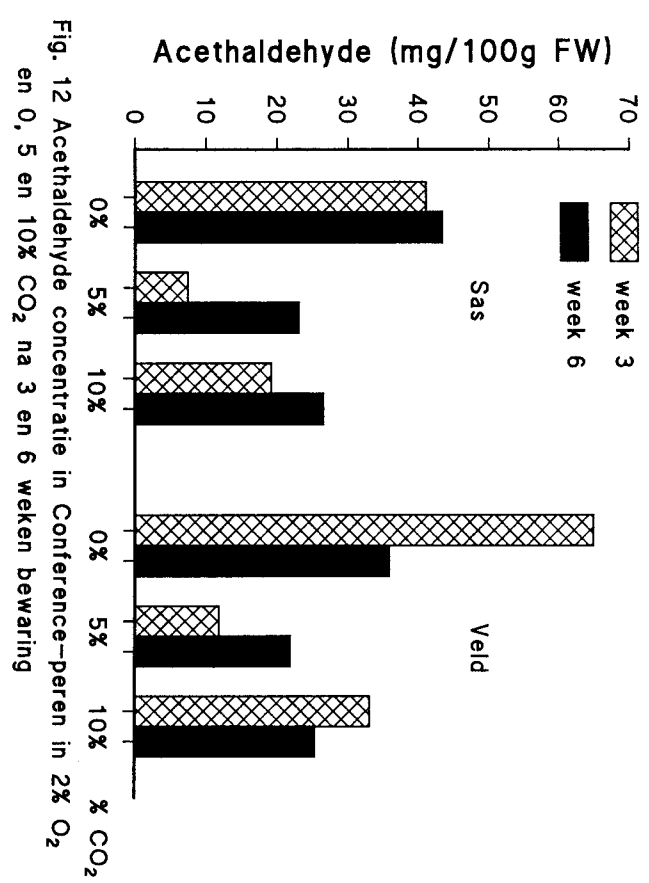
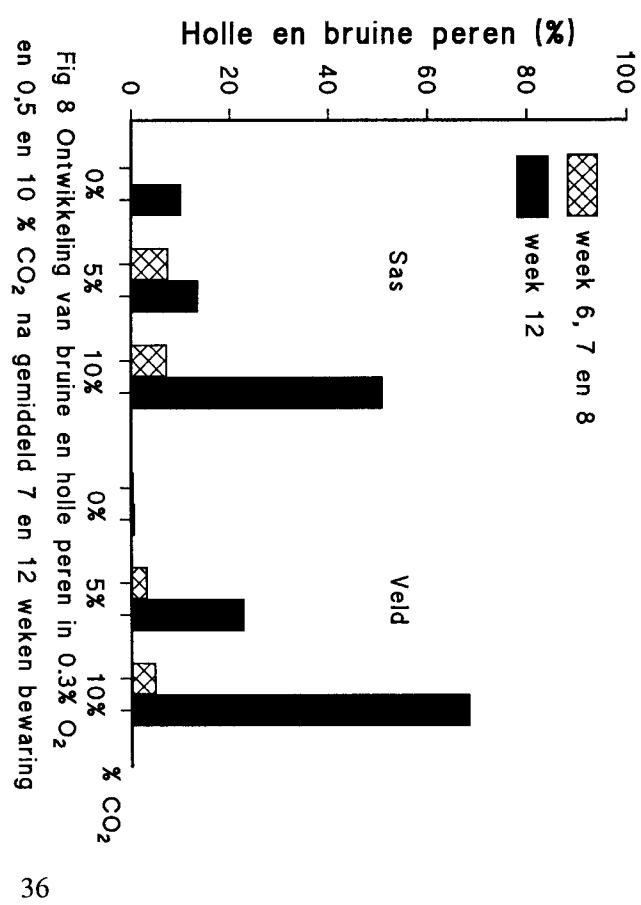
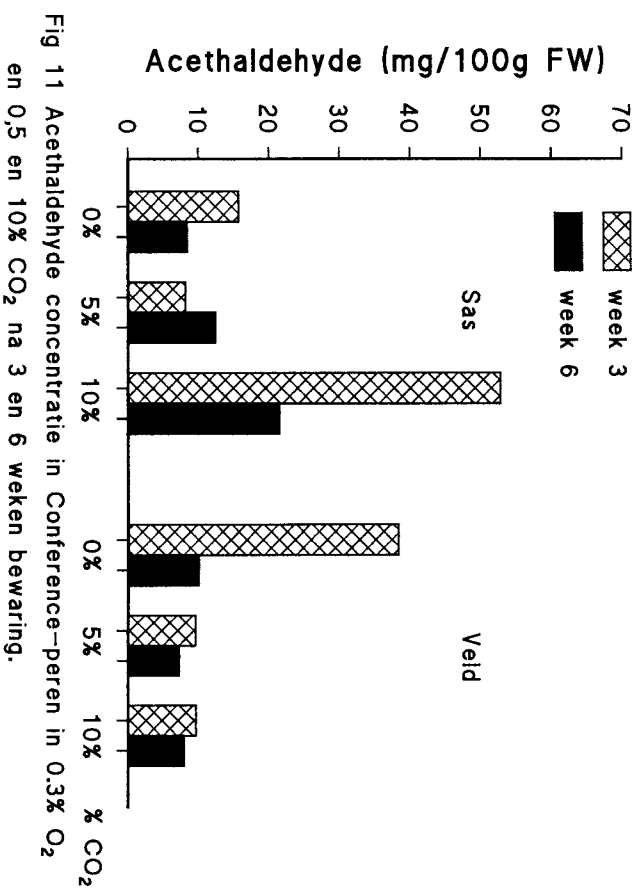
Wordt de bruinverkleuring en holontwikkeling gerelateerd aan de ophoping van acetaldehyde en ethanol dan is er geen sprake van een duidelijk verband. Uit de grafieken 7 tot en met 12 is te concluderen dat hogere ethanol waarden niet samengaan met meer bruin en hol. De belangrijkste factor verantwoordelijk voor de afwijking nl, CO₂ vertoont op generlei wijze een verband met de ethanol of acetaldehyde concentratie. Of de relatie andersom werkt nl. dat hoge gehalten het probleem tegengaan is ook niet duidelijk. Voor acetaldehyde zou dit enigszins denkbaar zijn. Wordt de hoeveelheid bruinverkleuring uitgezet tegen respectievelijk ethanol en acetaldehyde (figuur 13 en 14) dan is er ook geen verband.

Ook de relatie tussen ethanol en acetaldehyde (figuur 15) vertoont geen verband. Dit hangt waarschijnlijk samen met de evenwichtsconcentraties die ontstaan bij de respectievelijke bewaarcondities.

Duidelijk is dat voor het ontstaan van hol en bruin in Conference-peren de oorzaak niet gezocht moet worden in de schadelijkheid van de anaërobe componenten.

In het verdere onderzoek is het daarom niet meer van belang deze verder nog te meten.





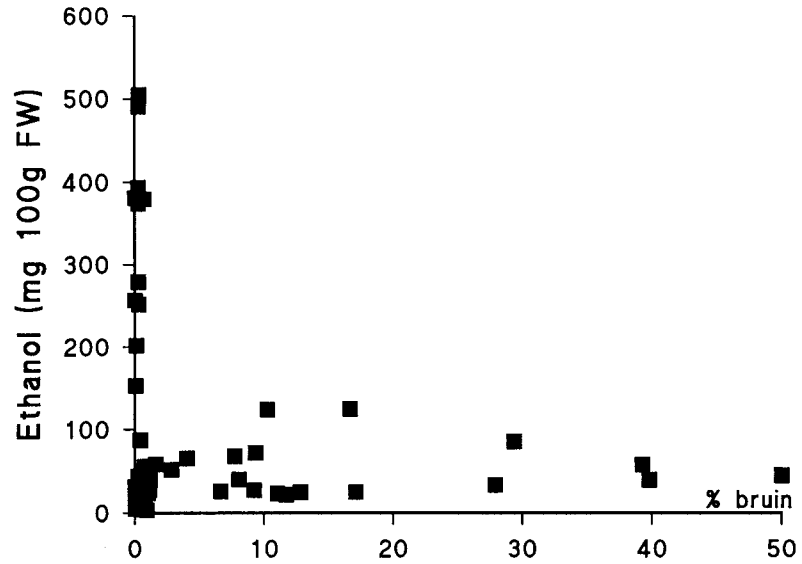


Fig 13 Relatie tussen bruinverkleuring en ethanolgehalte na 6 weken bewaring in diverse CA-omstandigheden

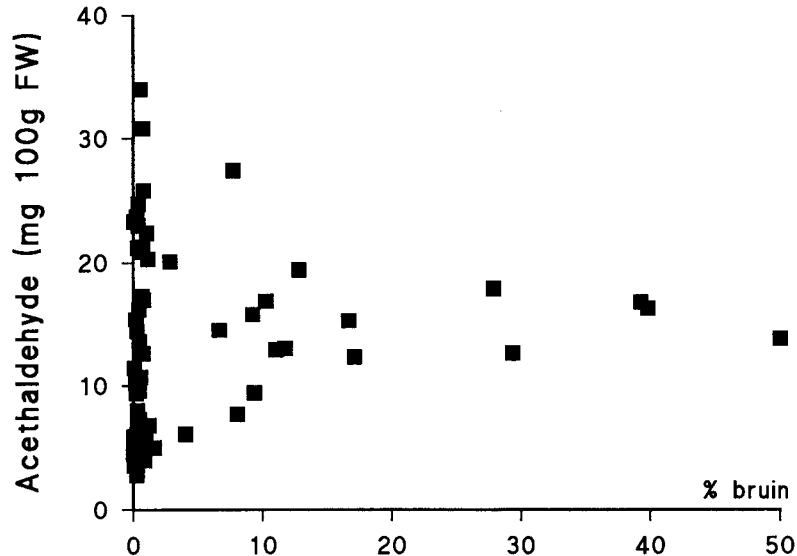


Fig 14 Relatie tussen bruinverkleuring en acetaldehyde na 6 weken bewaring in diverse CA-omstandigheden

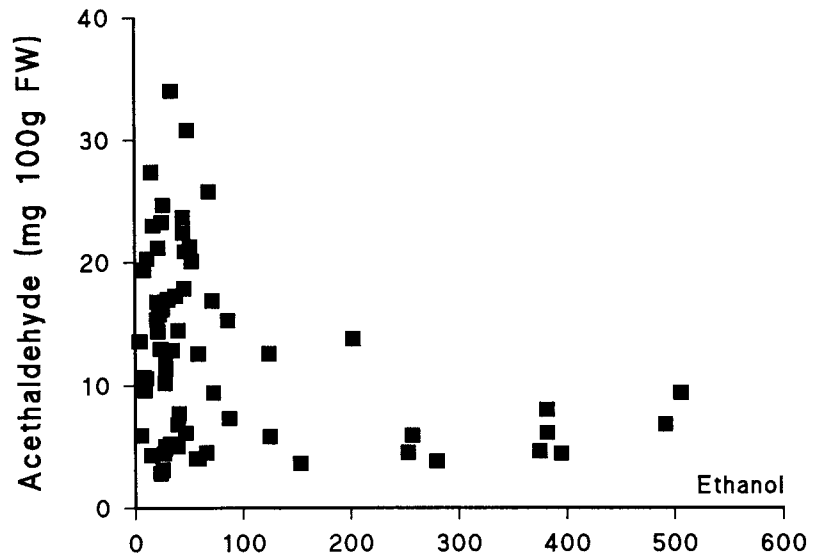


Fig 15 Relatie tussen ethanol- en acetaldehydeconcentratie na 6 weken bewaring in diverse CA-omstandigheden

3.2.4 Diffusie en porositeit

Aan het begin en het eind van het experiment zijn diffusiemetingen gedaan. De resultaten van gascondities 0.25, 1, 2 en 21% O₂ in combinatie met 0 of 10% CO₂ zijn statistisch verwerkt. In tabel 2 worden de belangrijkste resultaten weergegeven.

Tabel 2 Resultaat diffusiemetingen aan peer		
	diffusie weerstand (*10 ³ s.cm ⁻¹)	n (aantal herhalingen)
meting 1 *	9.31	16
meting 2	13.11	
CO ₂ 0%	10.00	16
CO ₂ 10%	12.42	
meting 1 CO ₂ 0%	9.61	8
meting 1 CO ₂ 10%	9.02	
meting 2 CO ₂ 0%	10.39	
meting 2 CO ₂ 10%	15.83	

* meting 1: aan het begin van het experiment (April 1996)
 meting 2: aan het eind van het experiment (Juli 1996)

Hieruit blijkt dat er tussen de eerste meting (aan begin experiment) en de tweede meting (aan eind experiment) er een significant verschil is tussen de twee diffusieweerstanden (R). De diffusieweerstand gemeten aan het begin van het experiment is lager ten opzichte van de tweede meting. Dit wil zeggen dat de diffusie van gas in de peren aan het eind van het experiment moeilijker is. Dit kan veroorzaakt worden doordat de intercellulaire holtes vol vocht komen door (afbraak) van cellen. De CO₂-concentratie heeft ook invloed op de diffusieweerstand. Aan het eind van het experiment is de diffusieweerstand van peren bewaard bij een CO₂-concentratie van 10 % significant hoger dan de diffusieweerstand van peren bewaard bij 0% CO₂.

Aan de hand van onder andere het onderwater gewicht kan de porositeit van de peren bepaald worden, in tabel 3 worden de belangrijkste resultaten weergegeven. Tevens dient de dichtheid van perensap bekend te zijn. Bij dit onderzoek is deze waarde niet bepaald en is een aanname gedaan. Het kan zijn dat de dichtheid per meettijd stip verschillend is. Het is belangrijk om bij volgend onderzoek de dichtheid van perensap wel te bepalen. Na statistische verwerking is gebleken dat de porositeit afneemt in de tijd. Net als bij de diffusieweerstand geeft de combinatie hoog CO₂ en tweede meting een lagere waarde. Dit wil zeggen dat de peer minder poreus is en de diffusie dus moeilijker wordt.

Tabel 3 De porositeit van de verschillende peren		
	porositeit (%)	n (aantal herhalingen)
meting 1 *	8.42	16
meting 2	2.37	
CO ₂ 0%	6.86	16
CO ₂ 10%	3.93	
meting 1 CO ₂ 0%	10.92	8
meting 1 CO ₂ 10%	5.92	
meting 2 CO ₂ 0%	2.8	
meting 2 CO ₂ 10%	1.94	

* meting 1: aan het begin van het experiment (April 1996)

meting 2: aan het eind van het experiment (Juli 1996)

3.2.5 Ademhalingsmetingen

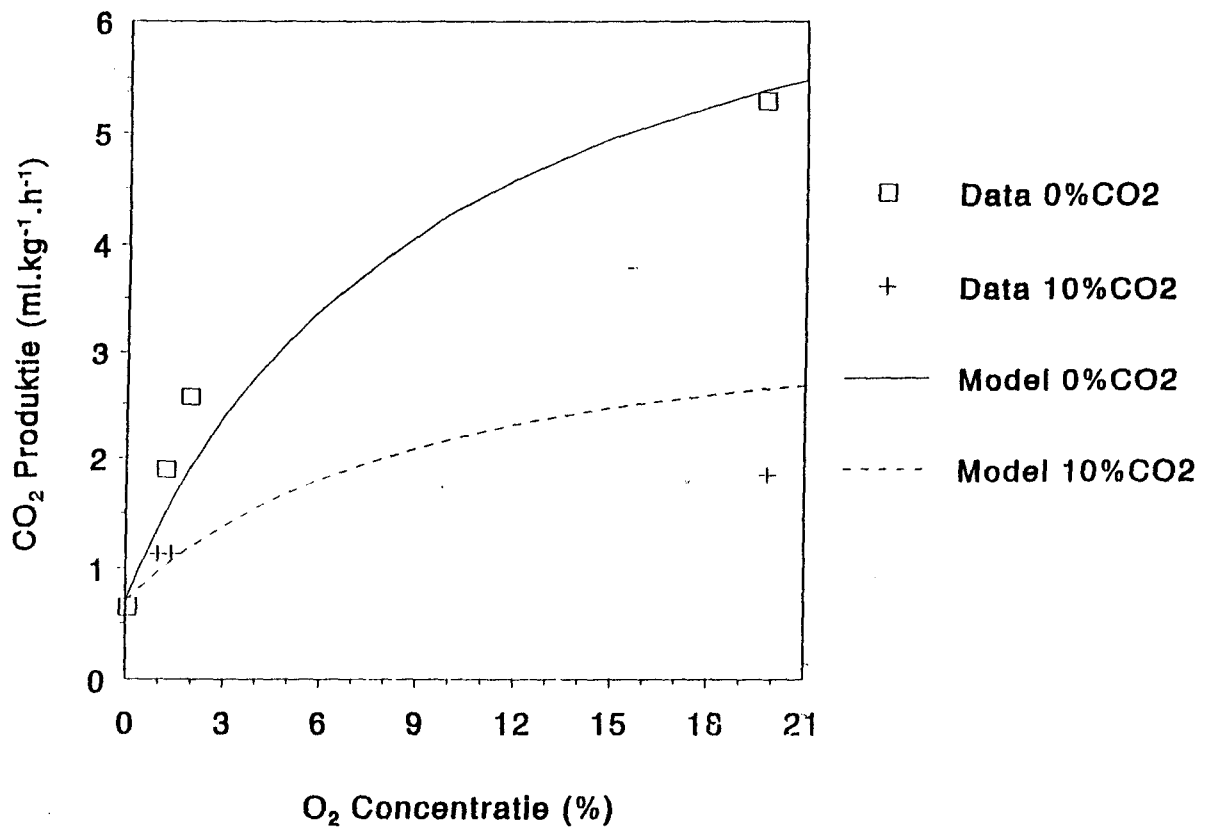
In figuur 1 en 2 wordt de gasuitwisseling van peren weergegeven. Hierbij zijn de resultaten van dag 40 en 48 (na inzetten proef) gemiddeld. In figuur 1 wordt de O₂ opname weergegeven, hierbij worden de datagegevens en de ademhalingsmodellen weergegeven voor peren bewaard bij verschillende O₂- concentraties en bij 0 of 10% CO₂. In figuur 2 wordt de CO₂- productie weergegeven. Hieruit blijkt dat de CO₂-concentratie een groot effect heeft op de gasuitwisseling. Bij 21% O₂ is het verschil in O₂- opname tussen peren bewaard bij 0 en 10% CO₂ ongeveer 3 ml.kg⁻¹.h⁻¹. De ademhaling van peren bewaard bij 10% kooldioxide is maximaal 2.5 ml.kg⁻¹.h⁻¹, terwijl de ademhaling voor peren bewaard bij 0% CO₂ maximaal 6 ml.kg⁻¹.h⁻¹ is. Een ander punt wat uit deze grafieken blijkt, is dat de fermentatie erg laag is. Dit is waar te nemen doordat bij lage zuurstofconcentraties de kooldioxideproductie laag is en af blijft nemen.

Uit deze grafieken is niet duidelijk waar te nemen bij welke zuurstofconcentratie de zuurstofopname en kooldioxideproductie begint af te nemen. Dit komt omdat er geen meetpunten zijn bij zuurstofconcentraties rond de 6%. Het is verstandig om dit bij vervolg onderzoek wel mee te nemen.

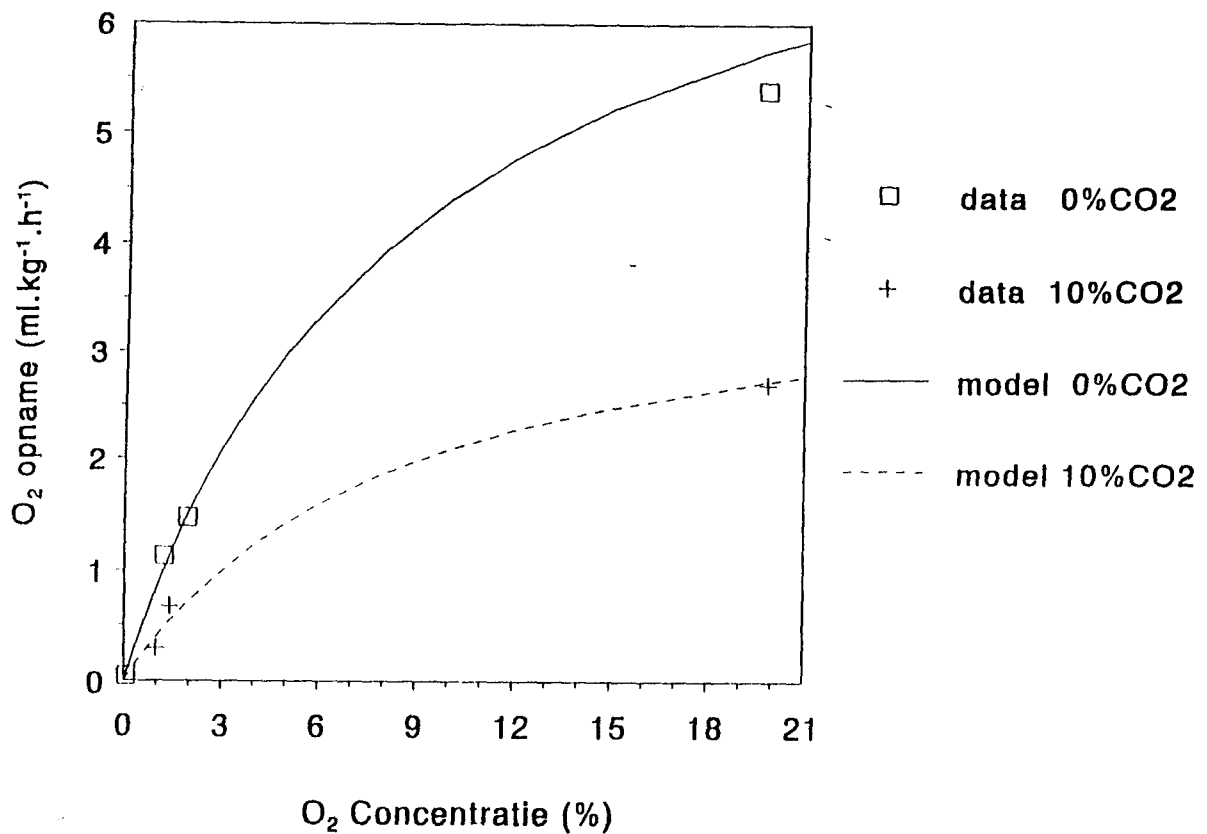
In figuur 3 wordt de Respiratiecoëfficiënt (RQ) weergegeven. De RQ is de verhouding tussen de kooldioxydeproductie en de zuurstofopname. Hieruit blijkt dat bij een lage O₂- concentratie de RQ erg hoog is. In figuur 4 wordt de energiehuishouding weergegeven. Uit deze figuur blijkt dat er een groot verschil is tussen de ATP-productie in peren bewaard bij een hoge CO₂- concentratie, dit is namelijk een stuk lager dan de ATP-productie in peren bewaard bij laag kooldioxide. Hieruit blijkt ook dat, als er gekeken wordt naar de hoeveelheid ATP die nodig is voor onderhoud (hier gesteld op

0.2 μmol.kg⁻¹.h⁻¹), bij bewaring bij hoog CO₂ de concentratie O₂ ook hoger moet zijn dan bij bewaring bij laag CO₂ om de benodigde hoeveelheid ATP te krijgen die

Gasuitwisseling peer



Gasuitwisseling peer



noodzakelijk is voor onderhoud.

Opmerkingen over de methodieken

Een hoog kooldioxideconcentratie heeft een remmend effect op de ademhaling.

Er zijn twee methoden om de diffusie (weerstand) te berekenen (Banks, 1985); een lineaire en een exponentiele. Om beide methoden te kunnen vergelijken, moet er bij de uitvoering van de metingen met het volgende rekening gehouden worden:

- Meting vlak voor overzetten in tweede weckfles is belangrijk (interne concentratie bij lineaire methode)
- Voor de exponentiële functie is belangrijk dat er na overzetten in de tweede weckfles 3 metingen worden uitgevoerd.
- Voor berekening van het interne volume is de dichtheid van perensap nodig, bij deze berekeningen is een aanname gedaan uitgaande van de dichtheid van appelsap. Bij een volgend experiment aan het begin en het eind van de bewaarperiode enkele peren tot sap maken en wegen.

3.3 Resultaten nondestructieve detectie hol en bruin

3.3.1 Detectie hol

Met de Röntgen apparatuur zijn 120 peren die een variabele aantasting qua hol vertoonden (gerealiseerd via de bewaaromstandigheden) gemeten en vergeleken met de visuele controle.

Tabel 1 Aantasting door hol gemeten met Röntgendetectie en visuele controle van peren bewaard in 2% O₂ en variabele CO₂ concentraties

Bewaring/pluk	% hol vastgesteld via visuele controle	% hol gemeten met Röntgendetectie
0.5% CO ₂ , pluk 1	0	0
0.5% CO ₂ , pluk 2	10	15
0.5% CO ₂ , pluk 3	75	80
3% CO ₂ , pluk 1	15	15
3% CO ₂ , pluk 2	25	30
3% CO ₂ , pluk 3	20	30

Via de diverse bewaaromstandigheden en pluktijdstoppen is de diversiteit in holheid voldoende om de mogelijkheden van nondestructieve detectie te vergelijken met de visuele controle. Bij de visuele controle is het percentage aantasting zelfs lager dan gemeten via de Röntgendetectie. De oorzaak hiervan is dat via Röntgendetectie elke holle plek in het weefsel zichtbaar gemaakt kan worden wat met de standaard visuele inspectie niet mogelijk is. Een andere opmerking is dat de weefselstructuur met de potentie om hol te worden via Röntgen al wel zichtbaar is maar via visuele controle niet. Gesteld kan worden dat met deze nondestructieve meetmethode zeer goed de mate van holheid gedetecteerd kan worden.

3.3.2 Inventarisatie van de mogelijkheden om met de trillingstechniek bruinverkleuring in peren niet-destructief te meten.

Holindex en bruinindex

Peren van herkomst Sas zijn gevoeliger voor bruinverkleuring dan de peren van herkomst Veld. De twee herkomsten zijn slechts gebruikt om er zeker van te zijn dat er bruine en niet-bruine peren zouden zijn. Bij de presentatie zijn de peren van de twee herkomsten niet gesplitst. Bruin treedt vooral op bij peren die laat worden geogst. De

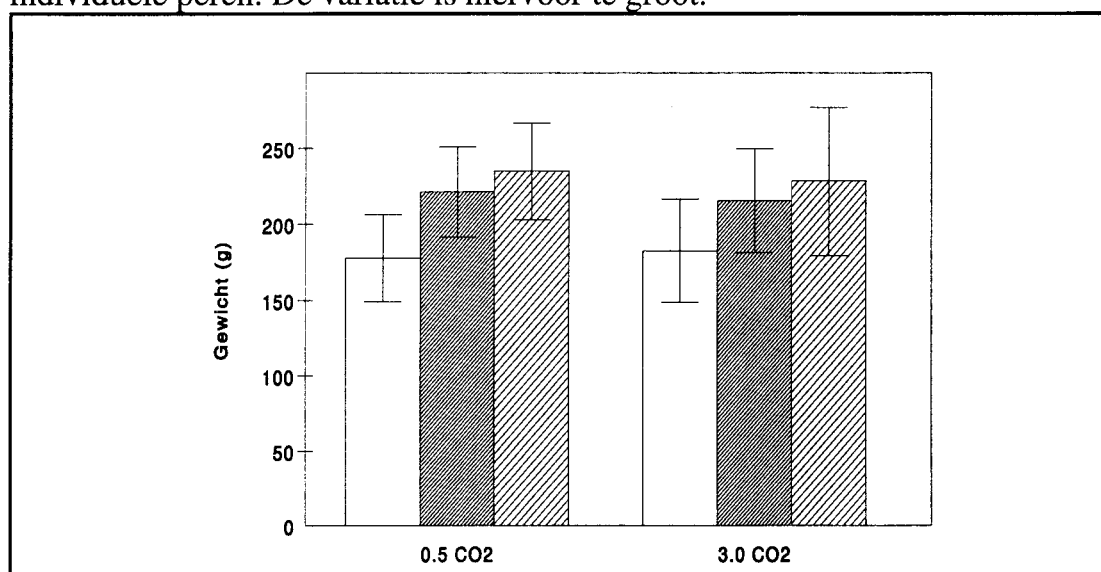
vroeggeplukte peren vertonen nauwelijkelijk bruin. Bewaring bij 3,0% CO₂ verhoogt het aantal bruine peren (Tabel 2). Dit vindt plaats bij peren van alle pluktijdstoppen. Het aantal peren met het probleem hol was relatief gering. Zij zijn vooral aangetroffen bij de laat geplukte peren, die zijn bewaard bij 0,5% CO₂-concentratie.

Tabel 2. Aantal bruine- en (holle) peren van verschillende plukken, bewaard bij -1,0°C en 0,5 en 3,0% CO₂ en beoordeeld na 0, 3 en 6 uitstaldagen.

Pluk	0,5% CO ₂			3,0% CO ₂		
	0d	3d	6d	0d	3d	6d
1e	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2)	1 (1)
2e	1 (2)	1 (5)	2 (3)	6 (2)	5 (3)	4 (2)
3e	9 (5)	11 (6)	11 (8)	15 (0)	14 (1)	14 (1)

Gewicht

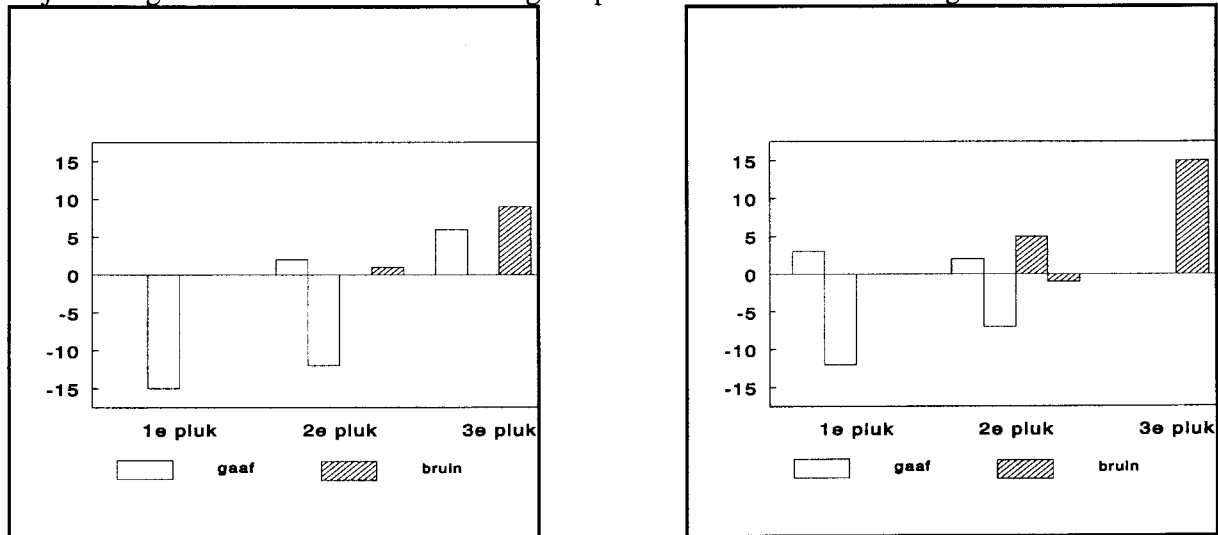
Het gemiddelde gewicht neemt toe wanneer peren later worden geplukt. De verschillende bewaarcondities (0,5% CO₂ en 3,0% CO₂) hebben geen effect op het gewicht (Figuur 2). Het gewicht is niet bruikbaar als maat voor bruinverkleuring van individuele peren. De variatie is hiervoor te groot.



Figuur 2. Het gemiddelde gewicht van peren uit pluk 1, 2 en 3 na 4 maanden bewaring bij -1,0°C en 0,5% CO₂ of 3,0% CO₂.

Drijfvermogen

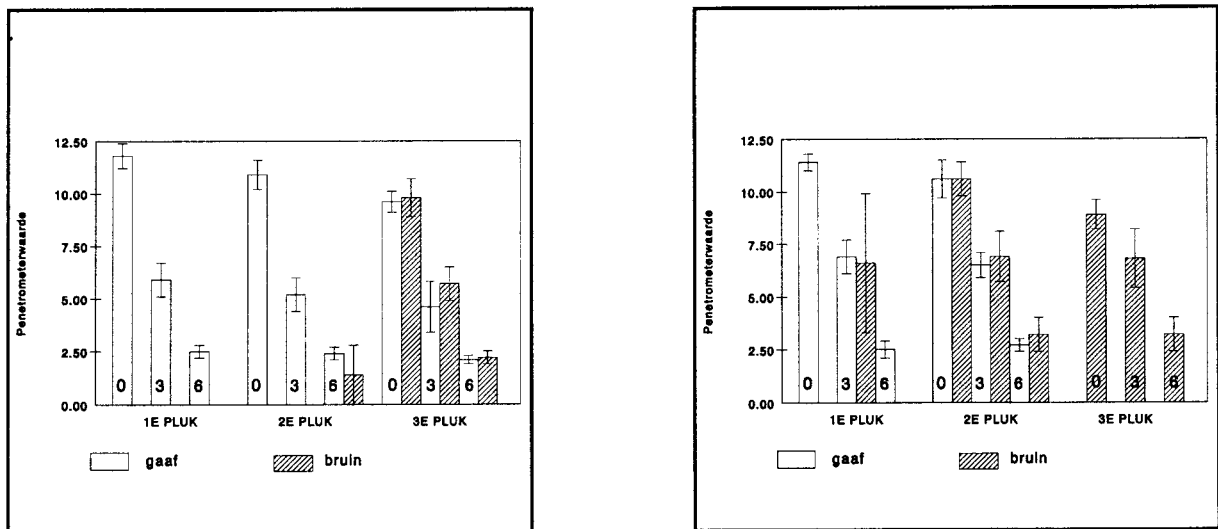
Bruine peren drijven vrijwel altijd. Van de populatie gave peren zinkt 2/3. Selectie door drijfvermogen leidt ertoe dat 1/3 van de gave peren ten onrechte wordt afgekeurd.



Figuur 3. Het drijfvermogen van gave en bruine peren van diverse pluktijdstippen, bewaard bij $-1,0^{\circ}\text{C}$ en $0,5\%$ CO_2 (links) of $3,0\%$ CO_2 (rechts).

Stevigheid

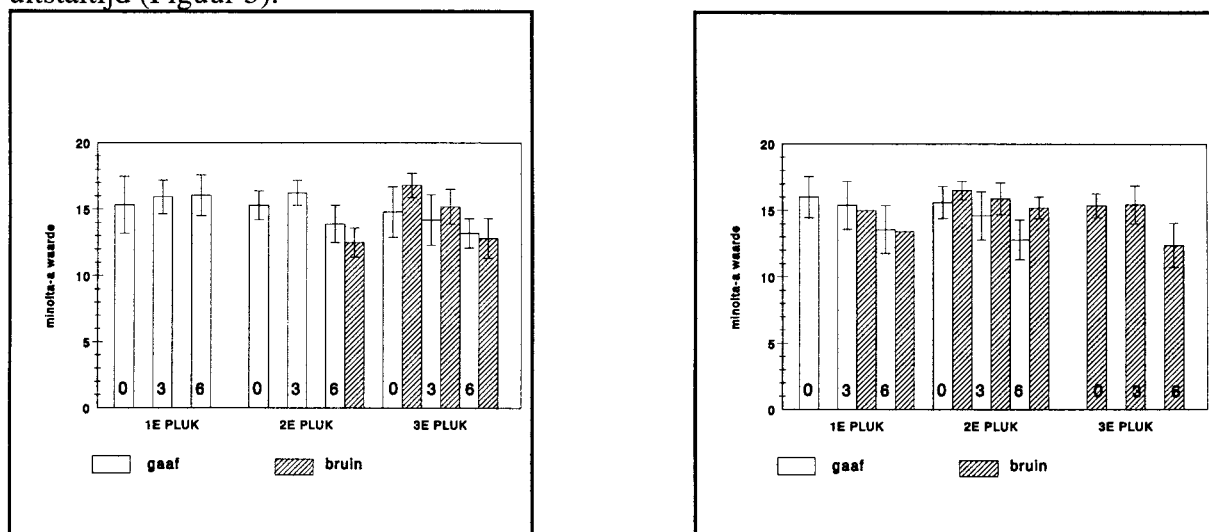
De gemiddelde penetrometerwaarde neemt af bij latere pluk. Laat-geplukte peren zijn zachter dan vroeg-geplukte (Figuur 4). Tijdens de 6 dagen uitstalling neemt de stevigheid sterk af. De penetrometerwaarden van bruine en gave peren verschillen niet significant



Figuur 4. Gemiddelde penetrometerwaarden van peren uit pluk 1, 2 en 3 bewaard bij $-1,0^{\circ}\text{C}$ en $0,5\%$ CO_2 (links) of $3,0\%$ CO_2 (rechts) en uitgesteld gedurende 0, 3 en 6 dagen.

Kleur

De waarden van de Minolta a^* -dimensie zijn voor de diverse plukstadia en de bewaarcondities niet significant verschillend. De waarden nemen enigszins af tijdens de uitsteltijd (Figuur 5).

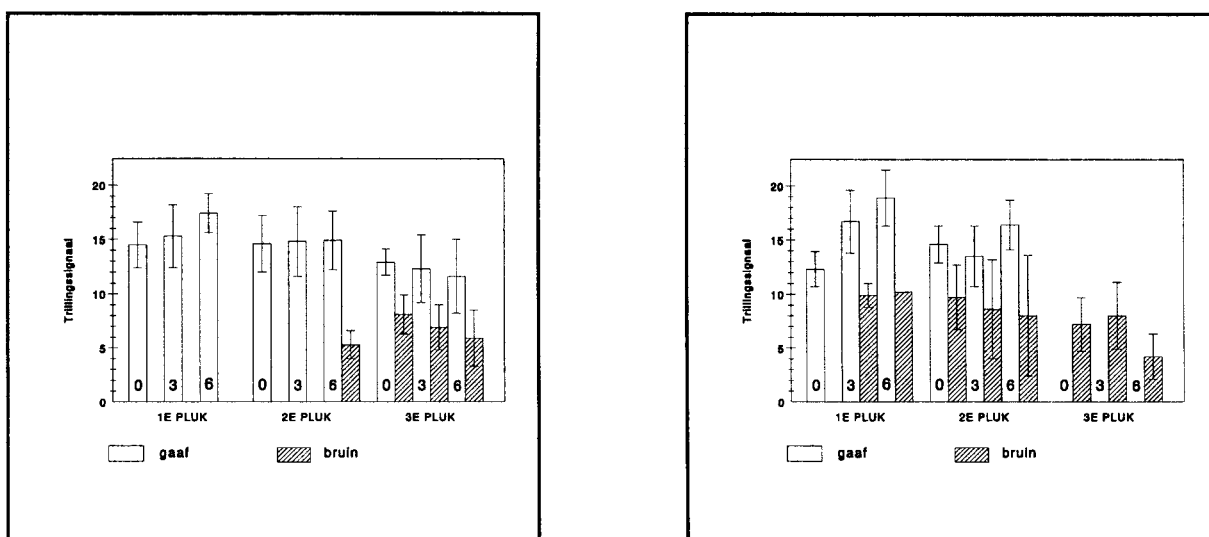


Figuur 5. Gemiddelde Minolta a^* -waarden van peren, bewaard bij $-1,0^{\circ}\text{C}$ en $0,5\%$ CO_2 (links) of $3,0\%$ CO_2 (rechts) en 0, 3 of 6 dagen uitgesteld.

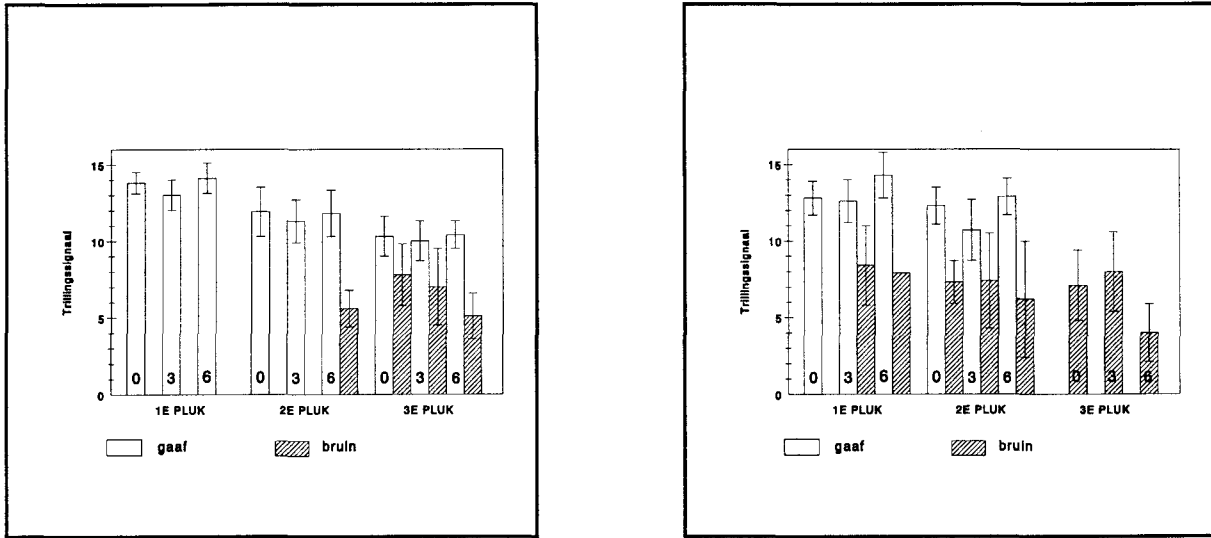
Trillingswaarden

De waarden van de signalen van calibratiemethode C (Figuur 6) vertonen veel overeenkomsten met de waarden van methode E (Figuur 7). De gemiddelde waarden van de methode C zijn hoger, maar de standaardafwijking voor met name de niet-bruine peren is groter. Methode E lijkt voor het detecteren van bruin in peren daarom het meest geschikt en kan de basis zijn voor veredere, peer-specifieke calibraties.

Bruine peren hebben met beide calibratiemethoden een significant lager signaal dan gave peren. De trillingswaarden nemen af bij latere plukstadia. Met het trillingssignaal kan mogelijk onderscheid worden gemaakt tussen de vroege en late pluk.

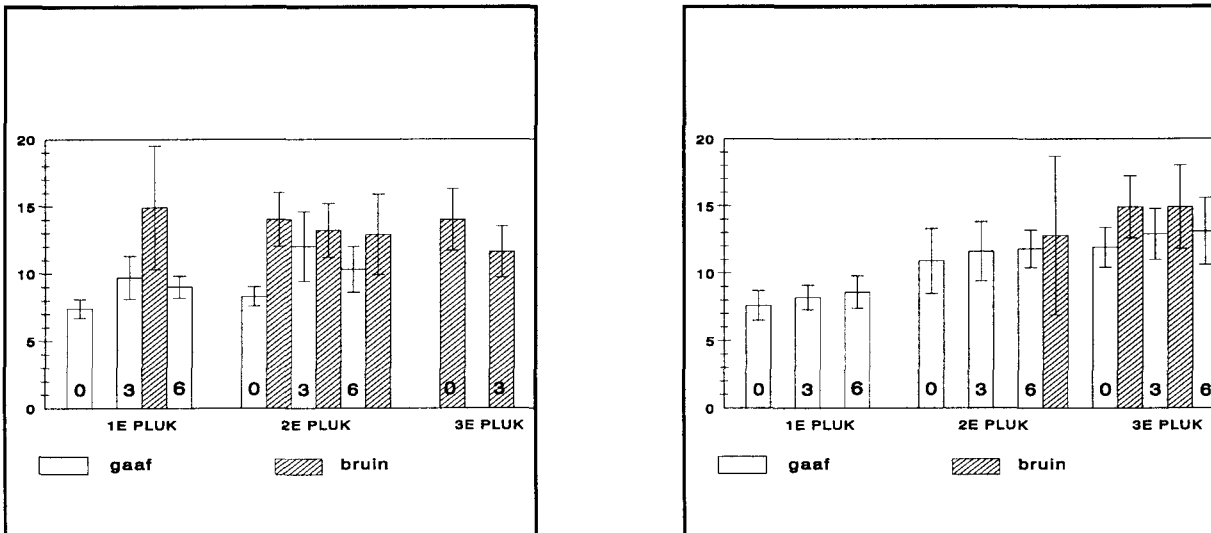


Figuur 6. Calibratiesignaal C van gave en bruine peren, bewaard bij 0,5% CO₂ (links) en 3,0% CO₂ (rechts) en 0, 3 of 6 dagen uitgesteld.



Figuur 7. Calibratiesignaal E van gave en bruine peren, bewaard bij 0,5% CO₂ (links) of 3,0% CO₂ (rechts) en 0, 3 of 6 dagen uitgesteld.

Calibratiesignaal K vertoont juist een hoge waarde voor bruine peren en een relatief lage voor gave peren (Figuur 8). Gave en bruine peren kunnen echter onvoldoende van elkaar worden onderscheiden.



Figuur 8. Calibratiesignaal K van gave en bruine peren, bewaard bij 0,5% CO₂ (links) of 3,0% CO₂ (rechts) en 0, 3 of 6 dagen uitgesteld.

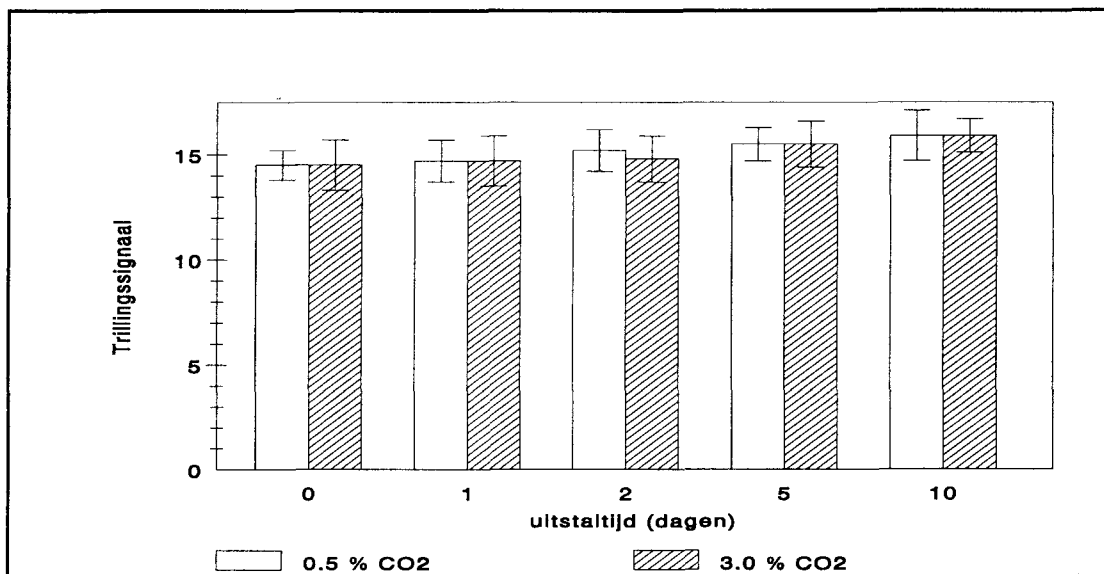
3.3.3 Trillingssignaal gedurende de uitstalling

Trillingswaarden

De trillingswaarden (van calibratiemethoden C en E) van gave peren veranderen niet gedurende de uitstalperiode van 10 dagen (Figuur 9). Er zijn geen verschillen in signaalwaarden tussen de gave peren bewaard onder 0,5 CO₂ en 3,0% CO₂.

Met andere woorden: Het trillingsgedrag van gave peren verandert niet door het narijpen.

De methode kan dus gedurende de uitstalfase worden gebruikt en een eventueel lagere waarde van het signaal wordt niet veroorzaakt door het afrijpen van de peer.



Figuur 9. Het calibratiesignaal E van gave peren van herkomst "SAS", bewaard bij 0,5 (open) en 3% CO₂ (gearceerd) en uitgesteld gedurende 10 dagen.

3.3.4 Testen van detectiemethode met peren van het Proefstation Wilhelminadorp

Van de herkomsten 33 en 78 zijn niet alle peren gemeten. De dataset van herkomst 139 is wel compleet.

Holindex en bruinindex

De gemiddelde bruinindex onder de diverse condities zijn weergegeven in Tabel 3. In de eerste en tweede pluk komen nauwelijks bruine peren voor ongeacht de bewaar-methode. Lichte bruinverkleuring treedt op in peren van de 3e en 4e pluk bij alle bewaarmethoden (m.u.v. 21 dagen). De 5e pluk bevat relatief veel bruine peren.

In afwezigheid van CO₂ worden bij alle plukken nauwelijks bruine peren gevonden. Ook de conditie, waarbij de 2% O₂ gedurende 21 dagen is bereikt heeft opvallend weinig bruine peren. Van alle bruine peren (n=229) zijn slechts enkele peren (n=8) niet hol.

Tabel 3. Gemiddelde bruinindex (n=25; 5-puntsschaal) per pluk, bewaard onder 4 CO₂-concentraties (alle 2,0% O₂) en verschillende tijden tot het bereiken van de 2,0% O₂ (bij 0,5% CO₂).

	1e pluk	2e pluk	3e pluk	4e pluk	5e pluk
CO ₂					
0	0	0	0	0	0,2
0,5	0	0	0,1	0,2	1,3
1,5	0,1	0	0,4	0,7	2,0
3,0	0,1	0	0,4	1,3	2,4
dagen					
0	0	0	0,4	0,5	1,5
2	0	0	0	0,3	1,3
10	0	0	0,2	0,4	1,1
21	0	-	0,1	0,1	0,1
slow pull down	0	0	0,3	0,6	0,7

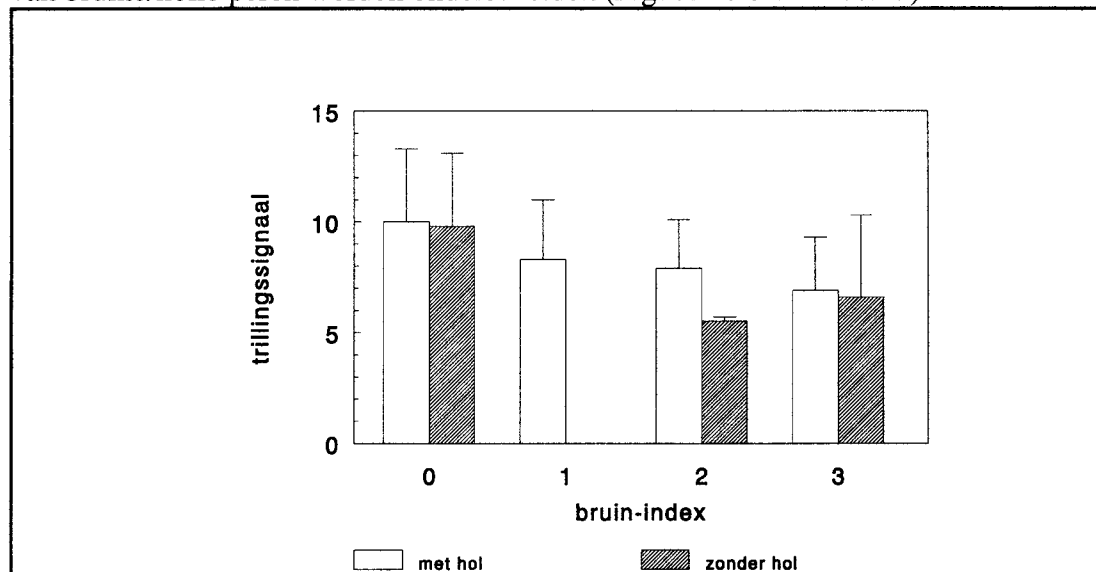
In Tabel 4. is de gemiddelde holindex van de bewaarde peren vermeld. Bij de 1e en 2e pluk komt duidelijk veel minder hol voor dan bij later geplukte peren. Toenemende CO₂ concentraties bij latere pluk leiden tot verhoogde incidentie van hol. Opmerkelijk is het geringe percentage hol in peren die op conditie zijn gebracht in de loop van 21 dagen.

Tabel 4. Gemiddelde hol-index van 25 peren (5-puntsschaal) per pluk, bewaard onder 4 CO₂-concentraties (alle 2,0% O₂) en na verschillende tijden tot het bereiken van de 2,0% O₂ (bij 0,5% CO₂).

	1e pluk	2e pluk	3e pluk	4e pluk	5e pluk
CO ₂					
0	0	0	0	0,1	0,4
0,5	0,2	0,1	0,4	0,8	2,5
1,5	0,4	0	1,3	1,7	2,6
3,0	0,3	0,1	1,4	1,8	1,7
dagen					
0	0	0	1,6	1,0	2,3
2	0	0,1	0,3	0,6	2,2
10	0	0	1,3	1,2	2,2
21	0	-	0,4	0,4	0,9
slow pull down	0	0	1,0	1,1	1,4

Trillingswaarden

In Figuur 10 staan de trillingswaarden (calibratie E) van peren met verschillende bruinindex uitgezet. Gave peren (bruinindex 0) hebben een trillingswaarde van 10 ± 3 . Bruine peren, met index 2 en 3 hebben lagere gemiddelde trillingswaarden (6-7). Holle peren kunnen niet van gave peren worden onderscheiden (Figuur 10 bruinindex 0). Bruine peren kunnen ook niet van bruine/holle peren worden onderscheiden (Figuur 10 bruinindex 3).



Figuur 10. Gemiddeld trillings signaal E van alle peren met verschillende bruinindex en gesplitst in wel of niet hol.

Het gemiddelde trillingssignaal van de gave peren van de gemeten herkomsten (33, 78 en 139) is in vergelijking met het eerste (inventarisatie) experiment laag. De waarden voor de gave peren (bruinindex 0) ligt 3-4 eenheden lager dan in het inventarisatie experiment (zie figuur 7). Hierdoor is het onderscheidend vermogen van de signalen voor gave en bruine peren dus ook lager.

Er zijn geen aanwijzingen dat de waarden van de signalen beïnvloed worden door het al of niet hol zijn van de peren.

In tabel 5 en 6 zijn de gemiddelde trillingssignalen van bruine en niet-bruine/holle peren per conditie weergegeven. Deze trillingswaarden zijn uitgezet tegen de gemiddelde bruinindex per conditie (zie Tabel 3). Dit verband is weergegeven in Figuur 12.

Populaties peren met een hoge gemiddelde bruinindex (vooral de vijfde pluk) vertonen weliswaar consequent lage gemiddelde trillingswaarden, maar de methode is niet geschikt om partijen peren met veel bruin op grond van het gemiddeld trillingssignaal te classificeren.

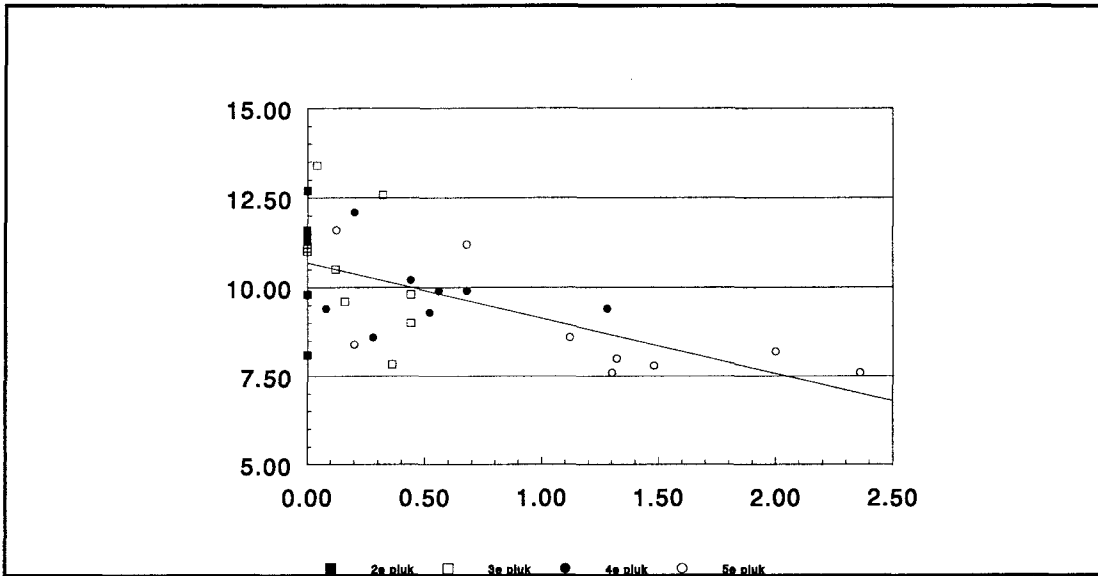
Tabel 5. Het gemiddelde trillingssignaal per pluk (n=25), bewaard bij $-0,5^{\circ}\text{C}$ onder 4 CO_2 -concentraties (alle 2,0% O_2) en na verschillende tijden tot het bereiken van de 2,0% O_2 (bij 0,5% CO_2).

CO_2 (%)	1e pluk	2e pluk	3e pluk	4e pluk	5e pluk
0*	$11,7 \pm 2,6$	$9,8 \pm 3,4$	$11,1 \pm 2,9$	$6,0 \pm 1,4$	$7,9 \pm 1,9$
0,5	$5,3 \pm 2,1$	$11,3 \pm 2,1$	$13,4 \pm 2,2$	$12,1 \pm 2,2$	$7,7 \pm 2,6$
1,5	$7,6 \pm 3,2$	$11,5 \pm 2,0$	$9,0 \pm 2,7$	$9,9 \pm 2,2$	$8,2 \pm 2,9$
3,0	$7,6 \pm 2,2$	$9,7 \pm 2,4$	$7,8 \pm 2,6$	$9,3 \pm 2,7$	$7,8 \pm 3,0$

* 0% CO_2 en 21% O_2

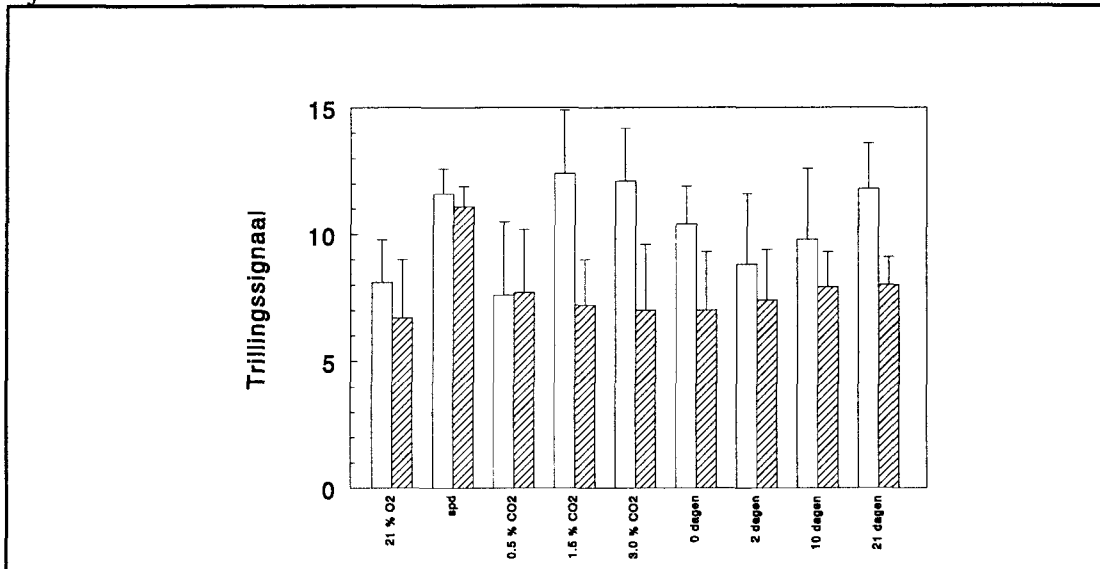
Tabel 6. Het gemiddelde trillingssignaal per pluk, bewaard bij $-0,5^{\circ}\text{C}$ en na verschillende tijden tot het bereiken van de 2,0% O_2 (bij 0,5% CO_2).

dagen	1e pluk	2e pluk	3e pluk	4e pluk	5e pluk
0	$7,9 \pm 3,2$	$8,1 \pm 2,5$	$9,8 \pm 3,2$	$9,3 \pm 3,0$	$7,8 \pm 2,6$
2	$12,0 \pm 2,7$	$6,0 \pm 2,0$	$11,0 \pm 1,7$	$8,6 \pm 2,9$	$8,1 \pm 2,3$
10	$7,0 \pm 2,7$	$12,7 \pm 2,1$	$9,6 \pm 2,7$	$10,2 \pm 2,8$	$8,6 \pm 2,2$
21	$10,3 \pm 4,0$	-	$10,5 \pm 2,6$	$9,4 \pm 2,4$	$11,6 \pm 1,9$
slow pull down	$11,5 \pm 2,4$	$11,6 \pm 3,1$	$12,5 \pm 3,2$	$10,2 \pm 3,1$	$11,2 \pm 1,1$



Figuur 12. Gemiddeld trillingssignaal E van partijen peren (diverse pluktijdstippen en bewaarcondities) uitgezet tegen de gemiddelde bruinindex van de partij.

In Figuur 13 zijn de trillingssignalen van alle gave en bruine peren van de vijfde pluk weergegeven. Hieruit blijkt dat gave en bruine peren op individuele basis redelijk van elkaar zijn te onderscheiden.



Figuur 13 Het gemiddelde trillingssignaal E van gave en bruine peren van de 5e pluk, bewaard onder diverse condities.

4.0 Conclusies

4.1 Conclusies bruinverkleuringsonderzoek

- Het totaal polyfenolgehalte (substraat) lijkt geen relatie te vertonen met pluktijdstip, locatie CO₂-gehalte of de mate van bruinverkleuring.
- Er is geen duidelijk verband tussen de enzymactiviteit (Tyrosinase en Laccase) en de bruinverkleuring in de peren.
- De reden waarom er geen verband is tussen polyfenolen/enzymen en de bruinverkleuring is niet duidelijk.
Mogelijkheden kunnen zijn :
 - korte periode enzymactiviteit
 - interactie met antioxidanten
 - polyfenolen/enzymen niet limiterend voor bruinverkleuring
 - aanwezigheid meerdere polyfenolen.

4.2 Conclusies bewaaronderzoek

- Bij een later pluktijdstip treedt meer hol en bruin op
- Bewaring en 3%CO₂ veroorzaakte meer hol en bruin, in 0.5% CO₂ ontstaat procentueel meer hol.
- Het percentage bruine peren was al na 3 maanden bepaald, het percentage holle peren neemt daarna nog duidelijk toe. Het ontstaan van hol en bruin lijkt dezelfde oorzaken te hebben.
- Grove peren lijken gevoeliger voor hol en bruin

4.3 Conclusies inductie hol en bruin

- Het is mogelijk om in een periode van maximaal 12 weken geprogrammeerd hol en bruin in peren te induceren bij hoge CO₂-gehalten (10%)
- In 10% CO₂ en 0.25% O₂ treedt voornamelijk hol op, in 2% zuurstof treedt voornamelijk bruin op.
- In 0% CO₂ komt nauwelijks hol en bruin voor onafhankelijk van het O₂-gehalte.
- CO₂ lijkt de hoofdoorzaak van de afwijkingen te zijn.
- Omdat pas na 5 a 6 weken de eerste symptomen van bruin zichtbaar zijn er zeer

goede mogelijkheden voor MA-toepassing.

4.4 Conclusies anaërobe componenten.

- In 0.3% O₂ is het ethanolgehalte hoger en het acetaldehyde gehalte lager dan bewaring in 2% zuurstof.
- Er is nauwelijks een verband tussen respectievelijk ethanol/acetaldehyde-gehalte en anderzijds het CO₂ gehalte.
- Er is geen aantoonbaar verband tussen ethanol/acetaldehyde gehalte en de bruinverkleuring.
- De hypothese dat fermentatieproducten verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van hol en bruin is niet juist.

4.5 Conclusies respiratie, diffusie en porositeit

- Vooral het CO₂-gehalte is bepalend voor de respiratie
- Tot 2 a 3% is de invloed van zuurstof op de respiratie beperkt
- Bij bewaring in 10% CO₂ ontstaat een hogere diffusie weerstand.
- een hoger CO₂-gehalte veroorzaakt een lagere porositeit
- Bij rijpere peren neemt de porositeit af

4.6 Conclusies niet destructieve detectie van hol en bruin

- Met Röntgendetectie kunnen op een betrouwbare manier holle peren worden gemeten.
- De resultaten met deze methode zijn nog beter dan de visuele inspectie
- Het gewicht, de kleur en de stevigheid van de peer is geen maat voor de inwendige bruinverkleuring. Bruine peren drijven vrijwel altijd. Echter, ook ongeveer 30% van de niet-bruine peren drijft. Dit leidt tot een onacceptabel grote onterechte deklassering indien het drijven van de peer als maat voor inwendig bruin wordt gehanteerd.
- Met de trillingstechniek is in principe onderscheid te maken tussen individuele gave en bruine peren. De betrouwbaarheid en gevoeligheid dienen te worden opgevoerd.

- Hoewel de techniek niet-invasief is en voor andere vruchten niet-destructief is gebleken, dient dit laatste nog voor peer te worden aangetoond.
- Er zijn geen aanwijzingen dat hol in peren de bruin-detecterende signalen beïnvloedt. De voor bruindetectie gebruikte signalen zijn niet geschikt om hol in peren te detecteren. Voor hol-detectie zal een specifieke calibratie dienen plaats te vinden.
- Er is een redelijk geschikt calibratiesignaal voorhanden dat voor peren van de vroege en late pluk significant verschillende waarden vertoont. De waarde van dit signaal wordt bovendien niet beïnvloed door het rijpen van de peer tijdens de uitstalfase. De methode kan dus gedurende de uitstalfase worden toegepast en verandering in de hoogte van de waarden wordt niet veroorzaakt door het rijpheidsstadium van de peer.

De hoogte van de waarden van het trillingssignaal bleken bij peren van verschillende herkomst en gemeten op verschillende tijden tijdens de bewaring te verschillen. De reden hiervan dient nader onderzocht te worden. Het is mogelijk dat langdurig bewaarde peren een ander calibratie-signaal behoeven als relatief kort bewaarde peren.

5.0 Verder onderzoek

In het onderzoek naar de achtergronden van hol en bruin kunnen een aantal onderzoekdisciplines geschapt worden. De biochemie van de bruinverkleuring van de vrucht geeft geen concrete aanwijzingen over de oorzaken van de afwijking. De resultaten zijn echter wel belangrijk voor inpassing in het model van bruinontwikkeling. De bruinverkleuring is een gevolgreactie op eerdere processen die tot de weefselschade geleid hebben.

Ook het onderzoek naar de relatie tussen fermentatie producten zoals ethanol en acetaldehyden biedt geen perspectief op een oorzakelijk verband. Wel kan er een relatie zijn met de energiehuishouding in de vrucht.

Belangrijk zijn twee hoofdlijnen in het onderzoek. Ten eerste is dit het diffusie- en ademhalingsgedrag van de peren. Vooral de diffusie van CO₂ en O₂ in de vrucht is van groot belang. Hierbij is de methodiekontwikkeling van de diffusie ook van groot belang. Met de Ne methode kunnen complete peren worden onderzocht echter het is dan nog niet bekend waar er precies diffusiebarrières in de peer zijn. Eén mogelijkheid is om weefselschijfjes uit de peer te nemen en hiervan de diffusie te meten. Verder is een O₂/CO₂ sensor van groot belang om interne concentraties te meten.

Ook het respiratiegedrag blijft van belang. Het is noodzakelijk om in relatie met de diffusie metingen goede modellen te ontwikkelen van het ademhalingsgedrag in tijdens pluk en bewaaromstandigheden. Hierbij moet ook de noodzakelijke minimale energiebehoefte van het produkt betrokken worden (ATP/ADP)

Een tweede belangrijke discipline is het onderzoek naar de oorzaak van de schade.

De factoren die van belang zijn bij de degradatie van membranen van celorganellen moeten ruime aandacht krijgen. De rol van CO₂ in dit verband is primair in combinatie met antioxidanten, membraanafbraak, TCA cyclus en microscopisch onderzoek.

Verder moet de modelontwikkeling van hol en bruin worden voortgezet. Een belangrijke vraag hierbij is de specifieke invloed van zuurstof en koolzuurgas op hol en bruin.

Het onderzoek naar nondestructieve meetmethoden moet voorlopig gestopt worden. Voor de holdetectie is een goede methode voorhanden, voor bruine peren is dit nog discutabel.

De trillingstechniek is in principe geschikt om bruine peren van gave peren te onderscheiden. Voor het verhogen van de gevoeligheid en de betrouwbaarheid kan een - inwendig bruin - specifiek signaal worden gecalibreerd. De trillingstechniek kan worden geleverd in een draagbare vorm en is in te bouwen in sorteermachines en kan opereren met een snelheid van tientallen peren per minuut per sensor.

6.0 Referenties.

Amiot, M.J., Tacchini, M., Aubert, S.Y., Oleszek, W., "Influence of cultivar, maturity stage and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits", J.Agric.Food Chem. (1995) **43**, 1132-1137.

Bir, R.E., Bramlage, W.J., "Assessing ion leakage from apple fruit tissue", Hort. Sci. (1972) **8**, 175-176.

Chen, P.M., Borgic, D.M., Sugar, D., Mellenthin, W.M., "Influence of fruit maturity and growing district on Brown-core disorder in 'Bosc' pears" Hortscience (1986) **21.5**, 1172-1173.

Czaninski, Y., Catesson, W.H., "Electron microscopy of enzymes. Principles and methods. Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 66-77.

Ellis, B.E., Kuroki, G.W., Stafford, H.A., "Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism", Proceedings of the Thirty-third Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America, Pacific Grove, California, June-July, 1993. Plenum Press, New York and London.

Gerritsen, Y.A.M., Chapelon, C.G.J., Wichers, H.J., "The low-isoelectric point tyrosinase of *Agaricus bisporus* may be a glycoprotein", Phytochemistry (1994) **35.3**, 573-577.

- Halim, D.H., Montgomery, M.W., "Phenol oxidase of d'Anjou pears (*Pyrus communis* L.)", *J.Food Sci.* (1978) **43**, 603-608.
- Hansen, E., Mellenthin, W.M., "Factors influencing susceptibility of pears to carbon dioxide injury", *Am.Soc.Hort.Sci.* (1962) **80**, 146-155.
- Kahn, V., "Tropolone - a compound that can aid in differentiating between tyrosinase and peroxidase", *Phytochemistry* (1985a) **24**, 915-920.
- Kahn, V., Andrawis, A., "Inhibition of mushroom Tyrosinase by tropolone", *Phytochemistry* (1985b) **24**, 905-908.
- Ke, D., van Gorsel, H., Kader, A.A., "Physiological and quality responses of 'Bartlett' pears to reduced O₂ and enhanced CO₂ levels and storage temperature", *J.Amer.Soc.Sci.* (1990) **115.3**, 435-439.
- Kerbel, E.L., Kader, A.A., Romani, R.J., "Effects of elevated CO₂ concentrations on glycolysis in intact 'Bartlett' pear fruit", *Plant Pysiol.* (1988) **86**, 1205-1209.
- Lowry et al., *J. Biol. Chem.* (1951) **73**, p.265.
[*Methods in Enzymology* III, pp. 467-468; Lowry, 1951]
- Mathew, A.G., Parpia, H.A.B., "Food browning as a polyphenol reaction", Central Food technological Research institute, Mysore, India.
- Mayer, A.M., "Polyphenol Oxidases in Plants-recent Progress", *Phytochemistry* (1987) **26.1**, 11-20.
- Mayer, A.M., Harel, E., "Phenol Oxidases in Plants", *Phytochemistry* (1979) **18**, 193-215.
- Moore, B.M., Kang, B., Flurkey, W.H., "Histochemical localization of mushroom Tyrosinase in whole tissue sections on nitrocellulose", *Histochemistry* (1989) **90**, 379-381.
- Peppelenbos, H.W., van 't Leven, J., "Evaluation of four types of inhibition for modelling the influence of carbon dioxide on oxygen consumption of fruits and vegetables", *Postharvest Biology and Technology* (1996) **7**, 27-40.
- Peppelenbos, H.W., Jeksrud, W.K., "A method ofr the simultaneous measurement of gas exchange and diffusion resistance under various gas conditions"
- van Schaik, A., Roelofs, F., "Risico's holle peren zijn te verminderen", *Groente + Fruit/Hard- en zachtfruit* 11 augustus 1995, week **32**, 10-11.

Scot, K.J., Wills, R.B.H., "Reduction of Brownheart in pears by absorption of ethylene from the storage atmosphere", Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry (1974) **14**, 266-268.

Diddiq, M., Cash, J.N., Sinha, N.K., "Characterization and inhibition of polyphenol oxidase from pears (*Pyrus communis* L. CV. Bosc and Red)", Journal of Food Biochemistry (1994) **17**, 327-337.

Simon E.W, " Leakage from fruit cells in water", Journal of Experimental Botany (1977) **28**, 1147-1152.

Spruce, J., Mayer, A.M., Osborne, D.J., "A simple histochemical method for locating enzymes in plant tissues using nitrocellulose blotting", Phytochemistry (1987) **26**, 2901-2903.

Vaughn, K.C., CRC handbook for plant cytochemistry. Cytochemical localization of enzymes, vol. 1, CRC press, Boca Raton, Florida, pp. 159-162.

Wichers, H.J., Peetsma, G.J., Nichols, R., Planta (1984) **162**, p. 334.

Zhou, H., Feng, X., " Polyphenol oxidase of Yali pears (*Pyrus bretschneideri*)", J.Sci.Foof Agric. (1991) **57**, 307-313.

Peleg, K. 1994. A new sensor for non-destructive measurement of fruit firmness. International Agrophysics 8: 431-437.-