

Chlorofylfluorescentie als parameter voor rijpheidbepaling van paprika's



B.T. van der Helm
13 april 2011



WAGENINGEN UNIVERSITY
WAGENINGEN UR

CRO**p**s 
"Clever Robots for Crops"

Rijpheidbepaling van paprika's met behulp van chlorofylfluorescentie

De energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a als parameter voor rijpheidbepaling van paprika's

Naam vak : Bachelorafsluiting Agrotechnologie
Vakcode : FTE-80812
Studiebelasting : 12 ECTS
Datum : 13 april 2011

Student : B.T. (Bob) van der Helm
Registratienummer : 90-04-26-321-080
Studieprogramma : BSc Agrotechnologie (BAT)

Begeleiders : Ir. C.W. Bac
Prof. Dr. Ir. E.J. van Henten
Examinator : Prof. Dr. Ir. P.W.G. Groot Koerkamp
Leerstoelgroep : Agrarische Bedrijfstechnologie
Technotron, Gebouw 118
Bornse Weilanden 9
6708 WG Wageningen
Tel: +31 (317) 48 29 80
Fax: +31 (317) 48 48 19
E-mail: webmaster.fte@wur.nl

Onderzoeksinstituut : Wageningen UR Glastuinbouw
Radix, Gebouw 107
Droevendaalsesteeg 1
6708 PB Wageningen
Tel: +31 (317) 48 60 01
Fax: +31 (317) 41 80 94
E-mail: glastuinbouw@wur.nl

Voorwoord

Bij het zoeken naar een onderwerp voor mijn bachelorafsluiting kreeg ik de kans om aan de slag te gaan bij Wageningen UR Glastuinbouw. Voor de ontwikkeling van een paprikaplukrobot moest onderzoek worden gedaan naar de rijpheidbepaling van paprika's. Wouter Bac, een net afgestuurde technicus, zou mijn begeleider worden. Ik hoefde niet lang na te denken.

Zelf werk ik in de weekenden op het glastuinbouwbedrijf van mijn ouders waar komkommers geteeld worden. Mijn vader is jaren geleden bij de presentatie van de komkommeroogstrobot van Wageningen UR Glastuinbouw geweest. Hier hoorde hij van het bestaan van een technische opleiding in Wageningen. Uiteindelijk ben ik dan ook in Wageningen gaan studeren.

Ik ben ruim twee maanden in het Radix aan het werk geweest waar ik veel mensen heb ontmoet en waar ik veel interessante discussies heb aangehoord. Mijn werkplek was direct naast die van Wouter waardoor ik hem waarschijnlijk vaak van zijn werk heb gehouden met al mijn vragen.

Als eerste wil ik dan ook Wouter bedanken voor al zijn hulp. Daarnaast wil ik nog een aantal mensen bedanken, want zonder hun hulp had ik dit onderzoek niet kunnen doen; Eldert van Henten voor zijn kritische blik op mijn verslag en onderzoek, Henk Jalink voor het gebruiken en de uitleg van de chlorofylfluorescentiesensor, Gerrit Polder voor het gebruiken van de chromameter en natuurlijk ook iedereen die ik vergeten ben op te noemen.

Als laatste wil ik David Koolen succes wensen bij zijn bachelorafsluiting. Zijn verslag zal het vervolg van mijn onderzoek beschrijven. Als allerlaatste wil ik Wouter en de rest van het Crops-team succes wensen bij de verdere ontwikkeling van de paprikaplukrobot. Over een paar jaar kom ik zeker kijken bij de presentatie!

Samenvatting

Deze bachelorafsluiting sluit aan bij het Crops-project waarin Wageningen UR Glastuinbouw een paprikaplukrobot gaat ontwikkelen. Er is een methode benodigd om de rijpheid van paprika's te bepalen. Henk Jalink van Wageningen UR Glastuinbouw heeft een chlorofylfluorescentiesensor ontwikkeld die de rijpheid van de paprika's mogelijk zou kunnen bepalen. In dit onderzoek is onderzocht of de chlorofylfluorescentiesensor geschikt is om de rijpheid van paprika's te kunnen bepalen.

Er vinden vele veranderingen plaats in een paprika tijdens de rijping. De belangrijkste veranderingen zijn op het gebied van smaak, textuur (stevigheid) en kleur. De kleurverandering van een paprika wordt veroorzaakt doordat chlorofyl wordt afgebroken en carotenoïden worden aangemaakt.

Chlorofyl a, chlorofyl b en carotenoïden zijn fotosynthetische pigmenten en deze kunnen lichtenergie absorberen. Chlorofylfluorescentie vindt plaats als de geabsorbeerde lichtenergie van een fotosynthetisch pigment niet gebruikt kan worden in de fotosynthesereactie. Chlorofylfluorescentie kan alleen plaatsvinden bij chlorofyl a. De energie die geabsorbeerd is door chlorofyl b en carotenoïden wordt doorgegeven naar andere fotosynthetische pigmenten.

De energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a is een goede parameter om te bekijken hoe de groeiomstandigheden veranderen. De hoeveelheden van chlorofyl a en chlorofyl b worden namelijk aangepast bij andere groeiomstandigheden. Deze energie-overdracht kan bepaald worden door de hoeveelheid chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b te delen door de hoeveelheid chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl a. Deze ratio zou gekoppeld kunnen worden aan de rijpheid van een paprika.

In dit onderzoek zijn vijf gele bonte paprika's en vijf rode bonte paprika's gebruikt met onbekend ras en land van herkomst. Naast de chlorofylfluorescentiemeting is een kleurmeting uitgevoerd op hetzelfde punt als referentie. Ten eerste is 'hue angle' een betrouwbare parameter om de rijpheid van een paprika te bepalen en ten tweede wordt in de praktijk de rijpheid van een paprika bepaald op kleur. Er wordt geogst bij een verkleuring van ongeveer 70%.

Uit de resultaten blijkt dat de ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a afneemt naarmate de tijd verstrijkt. De energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a neemt dus af naarmate de paprika rijper wordt.

Er is een goede correlatie tussen 'hue angle' en ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a. Aangezien 'hue angle' een betrouwbare parameter is, kan geconcludeerd worden dat de ratio ook een betrouwbare parameter is om de rijpheid van paprika's te bepalen.

De chlorofylconcentraties over de paprika variëren sterk. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de inval van de zon op de paprika. Er zijn daarom meerdere metingen benodigd op zowel de zon- als de schaduwzijde van de paprika. De standaarddeviatie die uit deze metingen kan worden berekend zegt iets over de bontheid, oftewel de distributie van de rijpheid van de paprika. De gemiddelde variatiecoëfficiënt ligt tussen de 15% en 35%.

Als laatste zijn verschillende chlorofylfluorescentieparameters vergeleken met de 'hue angle'. Hier kwam naar voren dat de ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig

van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a een betere parameter is dan de chlorofylfluorescentie die alleen afkomstig is van excitatie van chlorofyl a en ook van de totale chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl a en chlorofyl b. De chlorofylfluorescentiemethode die gebruikt maakt van de ratio is twee keer zo nauwkeurig als de chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl a en de totale chlorofylfluorescentie.

De chlorofylfluorescentiesensor kan gebruikt worden om de rijpheid van paprika's te bepalen, maar er is nog veel onderzoek benodigd om deze methode in praktijk toe te passen.

Inhoudsopgave

Voorwoord	iii
Samenvatting	v
Inhoudsopgave	vii
1 Introductie	1
1.1 Probleemanalyse	2
1.1.1 Huidige situatie	2
1.1.2 Gewenste situatie	2
1.1.3 Probleemdefinitie	3
1.2 Doelen	3
1.3 Onderzoeksvragen	3
1.4 Afbakening	3
2 Literatuur	5
2.1 Fotosynthetische pigmenten	5
2.1.1 Chlorofyl	5
2.1.2 Carotenoïden	6
2.1.3 Chloroplast	7
2.2 Rijping van paprika's	7
2.2.1 Verandering van smaak	8
2.2.2 Verandering van textuur	8
2.2.3 Verandering van kleur	9
2.3 Chlorofylfluorescentie	10
2.3.1 Fotosystemen	10
2.3.2 Absorptie van licht	11
2.3.3 Energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a	12
3 Materialen en Methoden	15
3.1 Paprika's	15
3.2 Chlorofylfluorescentiemeting	16
3.2.1 Meetopstelling	16
3.2.2 Lock-in-versterkers	17
3.2.3 Vergelijking van chlorofylfluorescentieparameters	18
3.3 Kleurmeting	18
3.3.1 Minolta Chroma Meter	18
3.3.2 Kleurruimten	19
3.4 Nauwkeurigheid en precisie	20
4 Resultaten	21
4.1 Chlorofylfluorescentie	21
4.2 Precisie	22
4.3 Relatie kleur en energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a	24
4.4 Vergelijking van chlorofylfluorescentieparameters	26

5 Discussie	29
6 Conclusie	31
7 Aanbevelingen.....	33
Referenties	35
Appendix	37
A Minolta Chroma Meter model CR-221.....	37
A.1 Instellingen	37
A.2 Kalibratie	37
A.3 Meten	37

1 Introductie

Het onderwerp van mijn bachelorafsluiting sluit aan bij het Crops-project (Crops, 2010). Dit is een door de Europese Unie gefinancierd project dat nieuwe techniek voor sensoren, robotarmen, grijpers en intelligentie zal ontwikkelen. Deze techniek moet in verschillende toepassingen in de agrarische sector ingezet worden. Wetenschappelijke instituten en bedrijfsleven werken samen aan een appelpruikrobot, een machine om selectief druiven te plukken voor premiumwijn, precisieapparatuur voor spuiten in appelboomgaarden en een apparaat dat obstakels kan detecteren voor toepassing in de bosbouw. Wageningen UR Glastuinbouw heeft de ontwikkeling van een paprikaplukrobot op zich genomen. In Figuur 1 is hiervan een artiestenimpressie te zien.



Figuur 1 Artiestenimpressie van de paprikaplukrobot (Crops, 2010).

Bij de ontwikkeling van deze paprikaplukrobot moet onderzocht worden hoe de robot kan bepalen wanneer een paprika geoogst moet worden. Henk Jalink (2002) van Wageningen UR Glastuinbouw heeft een chlorofylfluorescentiesensor ontwikkeld, die geschikt zou kunnen zijn voor rijpheidbepaling van paprika's. Deze sensor meet de chlorofylfluorescentie die ontstaat bij de excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a. Na deze meting kan de energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a worden berekend. Deze energie-overdracht zou moeten veranderen tijdens de rijping van paprika's. In dit onderzoek wordt bekeken of de chlorofylfluorescentiesensor gebruikt kan worden om de rijpheid van paprika's te bepalen.

1.1 Probleemanalyse

1.1.1 Huidige situatie

Voor het autonoom oogsten van paprika's is nog geen techniek beschikbaar. Dit komt mede doordat het niet mogelijk is om de rijpheid van een paprika op een snelle, betrouwbare en niet-destructieve manier vast te stellen.

De rijpheid van de paprika's wordt op dit moment door de werknemers bepaald. De rijpheidbepaling is voornamelijk gebaseerd op kleur. Onrijpe paprika's zijn altijd groen en rijpe paprika's kleuren rood, geel of oranje. Daarnaast bestaan er rassen waarvan de vruchten niet verder rijpen en dus groen blijven. Bij rode en gele paprika's wordt gemiddeld een verkleuring van ongeveer 70% bij het oogsten aangehouden. De hoeveelheid verkleuring die benodigd is varieert echter door het jaar heen. In de zomer is een verkleuring van 30% bij het oogsten voldoende om een mooi gekleurde paprika in de winkels te verkrijgen, maar in de winter is bijna 90% verkleuring benodigd. Dit heeft te maken met de temperatuur in en om de paprika. Een hogere temperatuur versnelt het rijpingsproces. Groene onrijpe paprika's worden geoogst als ze stevig en groot genoeg zijn. Om een hoge kwaliteit paprika's te oogsten is de rijpheidbepaling belangrijk. Ervaren arbeidskrachten worden echter steeds schaarser. Daarnaast is arbeid in Nederland relatief duur ten opzichte van het buitenland. Hierdoor ontstaat meer behoefte aan automatisering.

De consument en de detailhandel eisen tegenwoordig een steeds hogere kwaliteit en langere houdbaarheid van verse tuinbouwproducten. Deze aspecten bepalen voor een deel de prijs van het product. Bij paprika's zijn de kwaliteitseisen echter niet goed gedefinieerd. In de 'Verordening (EG) Nr. 1455/1999 van de commissie van 1 juli 1999 tot vaststelling van de handelsnorm voor niet-scherpsmakende pepers (paprika's)' staat welke eisen worden gesteld aan paprika's die binnen Europa worden verhandeld (Fischler, 1999). De voorwaarden met betrekking tot gewicht en toegestane beschadigingen zijn omschreven en waar mogelijk gekwantificeerd. Over rijpheid en kleur wordt alleen vermeld dat deze zoveel mogelijk uniform dienen te zijn. Een fysische maat voor rijpheid bestaat op dit moment niet. Accurate rijpheidbepaling zou een bijdrage kunnen leveren aan de kwaliteit van het product.

1.1.2 Gewenste situatie

Een autonome paprika-plukrobot moet de rijpheid van paprika's kunnen bepalen met behulp van sensoren. Zo weet de plukrobot welke vruchten wel of niet geoogst moeten worden. De rijpheidetectie moet snel en betrouwbaar zijn zonder dat de paprika wordt beschadigd. Daarnaast moet de meetmethode onafhankelijk zijn van kleur, ras, seizoen en teeltwijze.

Een sensor, die de rijpheid van paprika's effectief kan bepalen, combineert de behoefte van paprikatelers aan verdere automatisering en de behoefte van de consument aan een hogere kwaliteit van paprika's. De detailhandel kan tevens de rijpheid gebruiken om de houdbaarheid van paprika's beter te bepalen. Hiermee wordt voorkomen dat producten onnodig weggegooid worden. De gemiddelde kwaliteit van paprika's verbetert door een accurate rijpheidbepaling.

1.1.3 Probleemdefinitie

Er is nog geen snelle, betrouwbare en niet-destructieve techniek om de rijpheid van paprika's te bepalen.

1.2 Doelen

1. Onderzoeken of de chlorofylfluorescentiesensor geschikt is om de rijpheid van paprika's te bepalen.
2. Onderzoeken welke relatie de ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van chlorofyl b en chlorofyl a en de kleur van paprika's in verschillende rijpheidstadia hebben.

1.3 Onderzoeksvragen

1. Welke relatie hebben de energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a en de kleur van paprika's in verschillende rijpheidstadia?
2. Is de chlorofylfluorescentiesensor geschikt om de rijpheid van paprika's te bepalen?
3. Hoe betrouwbaar is deze meettechniek?
4. Welke chlorofylfluorescentieparameter is het meest betrouwbaar?

1.4 Afbakening

In dit onderzoek zal alleen de rijpheidbepaling van paprika's behandeld worden. De rijpheidetectie van andere vruchten zal niet in dit onderzoek aan de orde komen. In de periode januari en februari is er weinig tot geen productie van paprika's in Nederland. De paprika's die gebruikt worden, zijn dan ook bij de groenteboer gekocht. De sensor wordt alleen getest op geogste paprika's, waarvan het ras en het land van herkomst onbekend is.

Bij de metingen zal alleen gebruik gemaakt worden van de beschikbare chlorofylfluorescentiesensor (Jalink, 2002). Andere chlorofylfluorescentiesensoren zullen buiten beschouwing worden gelaten. Er wordt aangenomen dat andere aspecten van de paprikaplukrobot geen invloed zullen hebben op de metingen van de sensor. De chlorofylfluorescentiemetingen worden vergeleken met kleurmetingen.

2 Literatuur

De paprika is een niet-scherpe peper en de vrucht van bepaalde gekweekte vormen van *Capsicum annuum* L. De Spaanse of scherpe peper behoort tot dezelfde familie. Er is weinig bekend over de precieze veranderingen die optreden tijdens de rijping van paprika's. De biologische variatie tussen verschillende vruchten zorgt vaak voor een grote onnauwkeurigheid. Het is daarom moeilijk te bepalen welke parameters betrouwbaar en geschikt zijn voor de rijpheidetectie van paprika's. De laatste jaren zijn meerdere onderzoeken gedaan naar betrouwbare niet-destructieve methoden voor rijpheidbepaling.

Tadesse et al. (2002) hebben onderzocht welke parameters geschikt zijn om de rijpheid van paprika's te kunnen bepalen. Versgewicht, diameter, lengte, aantal weken na vruchtzetting, TSS (Total Soluble Solids, ofwel hoeveelheid oplosbare stoffen), kleurverandering, stevigheid, interne CO₂- en C₂H₄-concentraties, respiratie en ethyleenproductie werden gevolgd tijdens de rijping. Uit dit onderzoek kwam naar voren dat kleur de meest geschikte parameter is. De kleur, gemeten met een chromameter, wordt in drie waardes weergegeven: 'lightness' (intensiteit), 'chroma' (verzadiging) en 'hue angle' (tint). De verkleuring van een paprika is vooral goed meetbaar door de afname in 'hue angle' en de toename in 'chroma'. Volgens Tadesse et al. (2002) zijn TSS en stevigheid in combinatie met kleur ook bruikbaar als parameters. De hoeveelheid TSS werd bepaald door samengeperst sap van een paprika te analyseren met een refractometer. Deze waarde zou nauw samenhangen met de suikergehaltes in de paprika. Stevigheid wordt gedefinieerd als de kracht die benodigd is om in het product te dringen. Deze indringingsweerstand werd in het onderzoek van Tadesse et al. (2002) bepaald met een penetrometer. De metingen van TSS en stevigheid zijn echter destructieve metingen, waardoor de paprika na de meting niet meer geschikt is voor de handel.

De laatste jaren staat chlorofylfluorescentie in de belangstelling als parameter voor rijpheidbepaling. Chlorofylfluorescentie werd bij de ontdekking in de eerste helft van de twintigste eeuw direct gekoppeld aan de effectiviteit van de fotosynthesereactie door Kautsky (Papageorgiou en Govindjee, 2004). Pas in de laatste decennia blijkt chlorofylfluorescentie veel meer te zeggen over de toestand van planten en vruchten. Zo kan schade door kou voortijdig gedetecteerd worden bij komkommers en paprika's (Kosson, 2003; Tijskens et al., 1994). Chlorofylfluorescentie als parameter voor rijpheidbepaling heeft zich al bewezen bij onder andere guave (Bron et al., 2005), papaja (Bron et al., 2004) en broccoli (Toivonen en Deell, 1998).

Bij de kwaliteitsbepaling van na-rijpende paprika's hebben Zsom et al. (2010) gebruik gemaakt van diverse niet-destructieve methoden, zoals digitale beeldanalyse, textuuranalyse en chlorofylfluorescentie. Hieruit bleek dat de chlorofylfluorescentie sterk veranderde tijdens de rijping. Hieruit volgt dat er mogelijkheden zijn om chlorofylfluorescentie te gebruiken bij de rijpheidbepaling van paprika's.

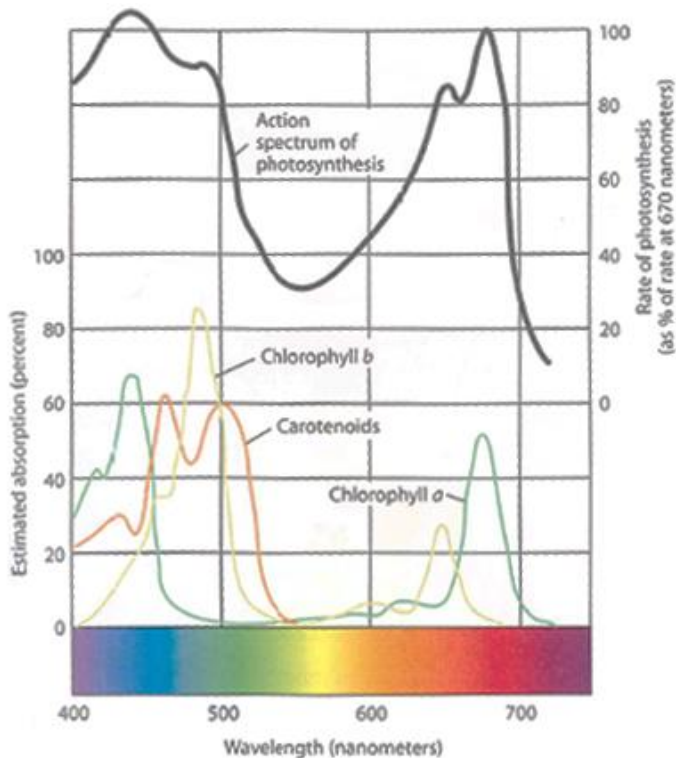
2.1 Fotosynthetische pigmenten

2.1.1 Chlorofyl

Chlorofyl is een fotosynthetisch pigment en is essentieel voor de fotosynthese. Een fotosynthetisch pigment is een stof die licht kan absorberen. Een pigment kan bepaalde

golflengtes van het lichtspectrum absorberen. Dit wordt het absorptiespectrum genoemd. Chlorofyl is een pigment dat blauw, rood en violet licht absorbeert. De groene golflengtes worden gereflecteerd. Hierdoor geeft chlorofyl de plant een groene kleur.

Er zijn verschillende soorten chlorofyl: type a, b, c1, c2 en d. Chlorofyl a komt voor in alle fotosynthetische eukaryoten en in cyanobacteriën. Eukaryoten zijn organismen met cellen die een kern, complexe chromosomen en organellen bevatten, omringd door membranen. Cyanobacteriën worden beschouwd als de evolutionaire voorganger van de eukaryoten. Chlorofyl a en b zijn de meest voorkomende soorten chlorofyl. Chlorofyl c en d komen voor in sommige algen in plaats van chlorofyl b (Raven et al., 2005).



Figuur 2 Absorptie- en actiespectra van fotosynthetische pigmenten (Raven et al., 2005).

In Figuur 2 is te zien dat chlorofyl b een ander absorptiespectrum heeft dan chlorofyl a. In de meeste planten komen deze twee soorten chlorofyl voor met een ratio van ongeveer 2.5-3.5:1 (chlorofyl a tegenover chlorofyl b). Chlorofyl a is blauw-groen en chlorofyl b is geel-groen van kleur. Chlorofyl b is een 'accessory pigment'. Een 'accessory pigment' is een pigment dat niet direct betrokken is bij de fotosynthetische energietransductie, maar het pigment verbreedt het spectrum van het bruikbare licht voor de fotosynthese (zie Figuur 2). Als chlorofyl b licht absorbeert dan wordt de energie hiervan direct naar chlorofyl a getransporteerd (Kays en Paull, 2004).

2.1.2 Carotenoïden

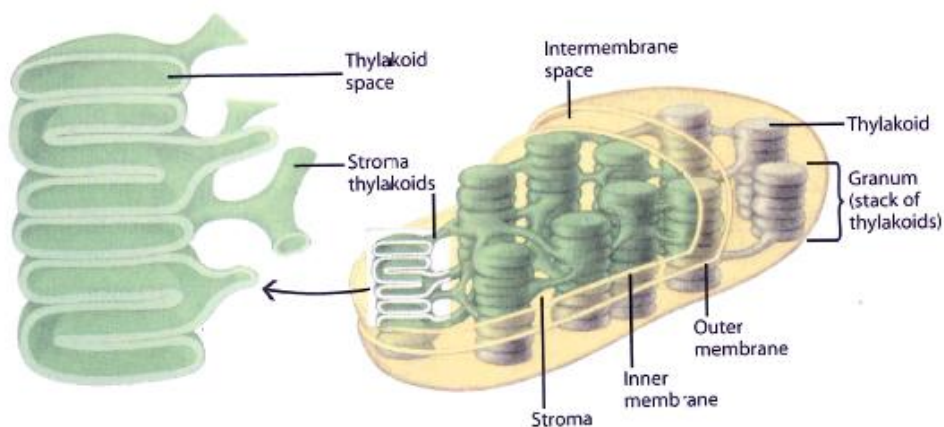
In Figuur 2 is naast chlorofyl b een andere groep 'accessory pigments' te zien: de carotenoïden. De carotenoïden zijn een grote groep pigmenten met voornamelijk rode, gele of oranje kleur en kunnen worden onderverdeeld in caroteen en xanthofyl. De

carotenoïden fungeren als anti-oxidant en beschermen de chloroplasten tegen oxidatieschade (Raven et al., 2005).

2.1.3 Chloroplast

Chlorofyl komt alleen voor in chloroplasten, dus alleen in de chloroplasten kan fotosynthese plaatsvinden. Een chloroplast is een organel en karakteristiek voor plantaardige cellen. Naast chlorofyl komen ook andere pigmenten, zoals carotenoïden, voor in de chloroplast. Als een chloroplast wordt afgebroken, wordt deze omgezet in een chromoplast. Een chromoplast bevat geen chlorofyl, maar wel andere pigmenten zoals carotenoïden.

Chloroplasten kunnen vrij bewegen door de cel om zo, afhankelijk van de hoeveelheid licht, de fotosynthesereactie te beïnvloeden. Bij weinig licht zullen de chloroplasten zoveel mogelijk licht proberen op te vangen, dus dan verspreiden de chloroplasten zich zo, dat er een zo groot mogelijk oppervlak vormen. Bij te veel licht kan er schade optreden, daarom zullen de chloroplasten zich proberen weg te draaien van het scherpe licht.



Figuur 3 Structuur van een chloroplast (Raven et al., 2005).

In Figuur 3 is de structuur van een chloroplast weergegeven. De thylakoïden zijn de belangrijkste onderdelen van een chloroplast. Een stapel thylakoïden wordt een granum genoemd. De grana worden met elkaar verbonden door stromathylakoïden. De vaatholten van de thylakoïden heten lumen. In de membranen van de thylakoïden zit chlorofyl en carotenoïde (Raven et al., 2005).

2.2 Rijping van paprika's

Bij de rijping van vruchten vinden er vele veranderingen plaats met betrekking tot chemische samenstelling en fysische structuur. Grofweg kan er een onderscheid worden gemaakt tussen droge en vlezige vruchten. Bij de droge of sclerenchymatische vruchten zijn vooral de zaden interessant. Het omliggende weefsel is minder belangrijk. Droge vruchten zijn bijvoorbeeld rijst, graan en bonen. Vlezige vruchten, ook wel parenchymatische vruchten genoemd, bestaan uit een volwassen vruchtbeginsel die een of meerdere zaden bevat. Daarnaast kunnen ook bloemgedeeltes onderdeel zijn van een

vrucht. Vlezige vruchten zijn bijvoorbeeld appels, bananen en tomaten. De paprika is ook een vlezige vrucht. (Kays en Paull, 2004)

De vlezige vruchten kunnen in twee subgroepen worden ingedeeld, namelijk in climacterische en niet-climacterische vruchten. Climacterische vruchten kunnen onrijp geogost worden en daarna toch het normale rijpingsproces doorlopen, mits bewaard onder de juiste omstandigheden. Niet-climacterische vruchten kunnen niet narijpen en moeten dus rijp geogost worden. Appels en tomaten zijn bijvoorbeeld climacterische vruchten en druiven en aardbeien niet-climacterische vruchten. Paprika's worden over het algemeen gezien als niet-climacterische vruchten (Kays en Paull, 2004). Hier is echter veel discussie en onduidelijkheid over. Als een paprika voldoende gekleurd is, dan kan deze namelijk onder de juiste omstandigheden narijpen (Tadesse et al., 2002) (Molinari et al., 1999).

De belangrijkste veranderingen tijdens het rijpingsproces hebben betrekking op kleur, textuur en smaak. De snelheden van chemische en fysische reacties veranderen, waardoor ook de concentraties van verschillende stoffen veranderen (Kays en Paull, 2004).

2.2.1 Verandering van smaak

Smaak is eigenlijk het belangrijkste kwaliteitskenmerk van een voedselproduct, maar aan de buitenkant van het product is vaak niet te zien of de smaak goed is. Na consumptie kan pas worden beoordeeld of de kwaliteit van het product goed was.

De verandering in smaak bij een paprika wordt veroorzaakt door de productie en afbraak van zetmeel en suikers. Nielsen et al. (1991) onderscheiden drie fases tijdens de vruchtontwikkeling van paprika's: (1) een eerste fase met een hoge groeisnelheid en hexose-accumulatie, (2) een fase met een afnemende groei en accumulatie van sucrose en zetmeel en (3) een rijpende fase zonder verdere toename in versgewicht en met accumulatie van hexosen, terwijl sucrose en zetmeel worden afgebroken. De accumulatie van hexosen kan worden vastgesteld door de hoeveelheid TSS (Total Soluble Solids, ofwel totale hoeveelheid oplosbare stoffen) te meten met een refractometer (Molinari et al., 1999; Tadesse et al., 2002). Deze meting is echter destructief, waardoor de paprika onverkoopbaar wordt.

De processen die de smaak beïnvloeden vinden tegelijk plaats met de processen die kleur en textuur beïnvloeden. Deze twee veranderingen zijn echter wel aan de buitenkant te beoordelen. De kwaliteit van een product wordt dan ook vaak op textuur en kleur bepaald.

2.2.2 Verandering van textuur

Bij de textuur van een paprika gaat het vooral om de stevigheid. Paprika's zijn holle vruchten, dus stevigheid is erg belangrijk voor de kwaliteit. De stevigheid van paprika's hangt nauw samen met de opbouw van de vruchtwand: de pericarp. De pericarp wordt dikker naarmate de paprika rijper wordt en de stevigheid neemt hierdoor toe. Als de paprika overrijp wordt, neemt de stevigheid weer af (Tadesse et al., 2002). Als de stevigheid afneemt, dan wordt de paprika zacht en gevoelig voor beschadigingen. Dit leidt tot kwaliteitsafname van de paprika.

2.2.3 Verandering van kleur

Kleur is de opvallendste verandering bij een rijpende vrucht en wordt dan ook vaak als rijpheidparameter gebruikt. De meeste kleurveranderingen bij vruchten worden veroorzaakt doordat chlorofyl wordt afgebroken. Een hoge concentratie van chlorofylmoleculen geeft de paprika een groene kleur. Als een chloroplast geen chlorofyl meer bevat, dan wordt deze getransformeerd in een chromoplast. Andere pigmenten, zoals carotenoïden, worden aangemaakt in de chromoplasten. Carotenoïden geven de paprika een gele, rode of oranje kleur (Kays en Paull, 2004). De afbraak van chlorofyl en de accumulatie van carotenoïden is goed te zien in Tabel 1.

Tabel 1 Versgewicht, droge stofgehalte en de hoeveelheid fotosynthetische pigmenten van paprika's cv. Mazurka in de groene, bonte en rode fase. Gemiddelden van twaalf herhalingen ± standaarddeviatie (Luning et al., 1994).

	groene vruchten	bonte vruchten	rode vruchten
versgewicht (g)	181.2 ± 15.6	199.2 ± 17.0	211.0 ± 26.9
droge stofgehalte (%)	6.1 ± 0.4	7.5 ± 0.2	8.7 ± 0.6
chlorofyl a (g kg dm⁻¹)	1.1 ± 0.4	0.4 ± 0.1	0.04 ± 0.04
carotenoïden (g kg dm⁻¹)	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.2	1.5 ± 0.2

Luning et al. (1994) hebben drie verschillende rijpheidstadia van een paprika geanalyseerd op versgewicht, drooggewicht en concentraties van chlorofyl a en carotenoïden. De vruchten zijn geoogst 6 (groene fase), 8 (bonte fase) en 10 (rode fase) weken na de vruchtzetting. De chlorofyl a-concentratie neemt af naarmate de paprika rijper wordt. De concentratie van carotenoïden neemt toe in een later stadium, omdat de chloroplasten eerst getransformeerd moeten worden in chromoplasten. De bonte kleur van de tussenfase is vooral te verklaren door de afname van chlorofyl. De carotenoïden die eerst niet zichtbaar waren, zijn nu wel waar te nemen.

Pilarski en Kocurek (2005) hebben onderzocht hoeveel fotosynthetische pigmenten aanwezig zijn in de bladeren van een paprikaplant en ook in groene, rode en gele paprika's (zie Tabel 2). Daarnaast hebben zij ook de ratio tussen chlorofyl a en chlorofyl b berekend en de ratio tussen chlorofyl en carotenoïden. Ook in dit onderzoek is te zien dat het chlorofyl wordt afgebroken en dat de hoeveelheid carotenoïden toeneemt naarmate de paprika's rijper worden.

Tabel 2 De hoeveelheid fotosynthetische pigmenten in de bladeren en vruchten van paprikaplanten. Gemiddelden van tien herhalingen ± standaarddeviatie. Aangepast op basis van Pilarski en Kocurek (2005).

	bladeren (mg dm ⁻²)	groene vruchten (mg dm ⁻²)	rode vruchten (mg dm ⁻²)	gele vruchten (mg dm ⁻²)
chlorofyl a	6.09 ± 0.57	3.29 ± 0.47	0.03	0.014
chlorofyl b	2.89 ± 0.19	1.92 ± 0.31	0.05	0.009
chlorofyl a + chlorofyl b	8.97 ± 0.77	5.21 ± 0.37	0.08	0.103
chlorofyl a / chlorofyl b	2.1	1.72	0.18	0.13
carotenoïden	1.14 ± 0.09	0.57 ± 1.11	7.89 ± 1.21	3.62 ± 0.86
chlorofyl / carotenoïden	7.86	9.30	0.005	0.028

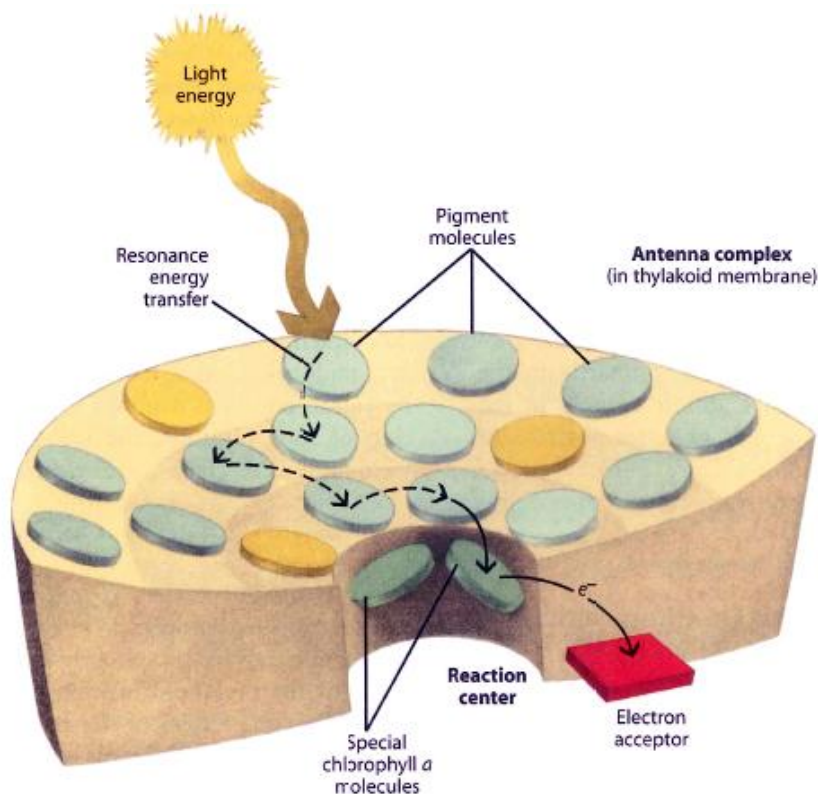
Chlorofyl b wordt eerst in chlorofyl a omgezet voordat het volledig wordt afgebroken (Roca en Mínguez-Mosquera, 2006). Hierdoor zou de concentratie van chlorofyl a hoger

moeten zijn dan de concentratie van chlorofyl b, maar de ratio tussen chlorofyl a en chlorofyl b is bij groene onrijpe vruchten hoger, dan bij rijpe gekleurde vruchten. De concentraties in de rijpe gekleurde vruchten zijn erg klein. Misschien dat de concentraties van chlorofyl weer toenemen nadat de paprika volledig rijp is.

2.3 Chlorofylfluorescentie

2.3.1 Fotosystemen

Een fotosysteem is een integraal eiwitcomplex en omvat de hele membraan van de thylakoïden. Het bestaat uit twee componenten: een reactiecentrum en een antennecomplex. Het antennecomplex bestaat uit pigmentmoleculen, voornamelijk chlorofyl, maar ook carotenoïden. Alle pigmentmoleculen kunnen fotonen absorberen, maar er zijn slechts twee chlorofyl a-moleculen waar de fotosynthese werkelijk plaatsvindt. De andere moleculen geven de opgevangen lichtenergie door aan de speciale chlorofyl a-moleculen die zich in het reactiecentrum bevinden. Het doorgeven van de energie tussen verschillende pigmentmoleculen heet de resonantie van de energie-overdracht (Raven et al., 2005). In Figuur 4 is weergegeven hoe geabsorbeerde lichtenergie binnen een fotosysteem wordt doorgegeven.



Figuur 4 De absorptie en overdracht van lichtenergie door fotosynthetische pigmenten in een fotosysteem (Raven et al., 2005).

Bij de lichtreacties van de fotosynthese zijn twee fotosystemen betrokken: fotosysteem I en II. De fotosystemen zijn genummerd naar hun ontdekking, hoewel fotosysteem II eerder in de fotosynthesereactie voorkomt. Fotosysteem II is verbonden met fotosysteem I door middel van de elektrontransportketen. Fotosysteem II bevindt zich in

de thylakoïden van de grana. Fotosysteem I is vooral gelokaliseerd in de stromathylakoïden en de buitenste randen van de granathylakoïden. De speciale chlorofyl a-moleculen in fotosysteem II worden P_{680} genoemd. Dit pigment heeft namelijk een optimale absorptiepiek bij 680 nm. Bij fotosysteem I hebben de chlorofyl a-moleculen een optimale absorptiepiek bij 700 nm en deze worden dan ook P_{700} genoemd. (Raven et al., 2005).

2.3.2 Absorptie van licht

Als een molecuul licht (foton) absorbeert, dan wordt een elektron tijdelijk naar een hoger energieniveau gebracht. Dit wordt de aangeslagen toestand of de excitatie van een molecuul genoemd. Als de elektron weer naar de grondtoestand, zijn oorspronkelijke lagere energieniveau, gaat, dan zijn er volgens Krause en Weis (1991) vier mogelijkheden om de energie vrij te laten:

1. De energie kan worden geconverteerd in licht. Het licht bestaat dan uit een foton met een lagere energiewaarde dan het foton dat geabsorbeerd is. Dit proces heet fluorescentie. In een fotosysteem wordt de energie geabsorbeerd door de fotosynthetische pigmenten, maar fluorescentie kan alleen bij chlorofyl a-moleculen plaatsvinden. Bij kamertemperatuur wordt de meeste chlorofylfluorescentie uitgestraald door chlorofyl a in fotosysteem II. Slechts een kleine hoeveelheid chlorofylfluorescentie is afkomstig van chlorofyl a in fotosysteem I. Bij chlorofyl b kan geen chlorofylfluorescentie plaatsvinden. Chlorofylfluorescentie verloopt volgens een inductiecurve met een piek waarbij de chlorofylmoleculen zijn verzadigd met energie en de chlorofylfluorescentie maximaal is (Papageorgiou en Govindjee, 2004).
2. Een tweede mogelijkheid is dat de energie door middel van warmte-uitstraling wordt vrijgelaten. Ook dit is een manier om de overbodige energie af te voeren.
3. Een andere mogelijkheid is dat de energie van de elektron wordt overgedragen naar een ander niet-fluorescerend pigment. In dit molecuul wordt een andere elektron aangeslagen en zo kan de energie binnen de cel worden overgedragen. Dit heet de resonantie van de energie-overdracht en vindt plaats in het grootste gedeelte van de chloroplast. Energie van 'accessory pigments', zoals chlorofyl b en carotenoïden, wordt doorgegeven. De opgevangen lichtenergie gaat zo niet verloren en kan later gebruikt worden bij de fotosynthese (mogelijkheid 4).
4. Als laatste kan een aangeslagen elektron in zijn geheel worden overgedragen naar een elektronontvanger, waardoor een 'electron hole' wordt achtergelaten. Dit gebeurt bij de speciale chlorofyl a-moleculen in het reactiecentrum. Dit is onderdeel van de elektrontransportketen en het begin van de fotosynthesereactie. De oxidatie van de chlorofyl a-moleculen wordt tegengegaan door de carotenoïden in de chloroplast. Dit komt doordat de carotenoïden fungeren als anti-oxidant. Zonder carotenoïden zouden de chlorofyl a-moleculen geoxideerd blijven en zou er geen fotosynthese plaats kunnen vinden. Chlorofylfluorescentie (mogelijkheid 1) ontstaat doordat de geabsorbeerde energie niet gebruikt kan worden in de fotosynthese.

2.3.3 Energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a

Het reactiecentrum van een fotosysteem bevat veel chlorofyl a en het antennecomplex bevat veel chlorofyl b. Bij weinig licht is er voordeel bij een grote hoeveelheid chlorofyl b, zodat zoveel mogelijk energie kan worden opgevangen. Als er echter veel licht is dan is er meer chlorofyl a nodig om de energie te verwerken. De overdracht van energie van chlorofyl b naar chlorofyl a is cruciaal voor de overlevingsstrategie. Bij stress en andere groeiomstandigheden verandert de energiebehoefte en de plant zal zich aanpassen door de hoeveelheden chlorofyl a en chlorofyl b te laten veranderen (Jalink, 2002).

Bij de rijping van de paprika's verandert de energiebehoefte en daarmee de hoeveelheden chlorofyl a en chlorofyl b. Om dit proces te volgen kan de energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a (ET_{ba}) volgens Jalink (2002) worden bepaald met vergelijking:

$$ET_{ba} = \frac{CF_b \cdot chl\ a}{CF_a \cdot chl\ b} \quad (1)$$

Waarin:

ET_{ba}	[-]	Energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a
CF_b	[μV]	Chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b
CF_a	[μV]	Chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl a
$chl\ b$	[$g\ kg\ dm^{-1}$]	Hoeveelheid chlorofyl b
$chl\ a$	[$g\ kg\ dm^{-1}$]	Hoeveelheid chlorofyl a

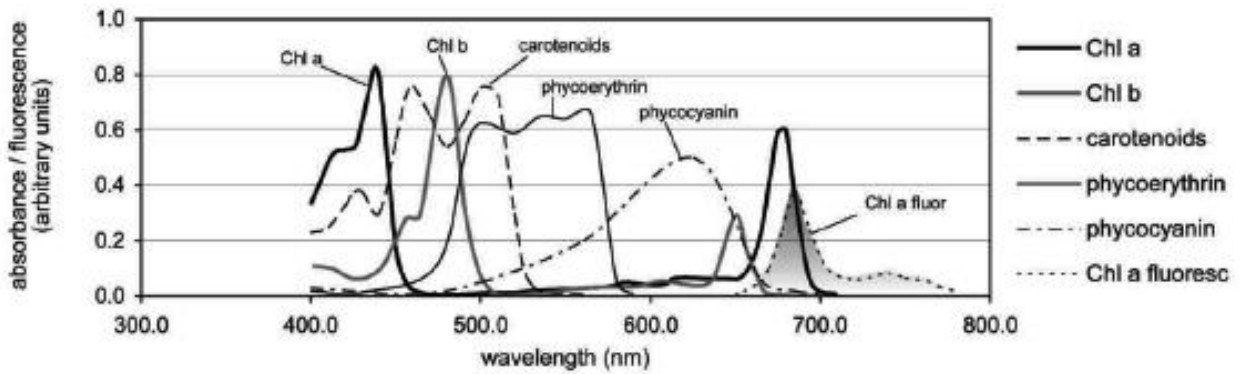
De hoeveelheden chlorofyl a en chlorofyl b moeten worden bepaald met een spectrofotometer. De chlorofylfluorescentie die vrijkomt bij excitatie van chlorofyl b of chlorofyl a moet met een speciale fluorescentiemethode worden gemeten. Henk Jalink (2002) heeft deze methode en een sensor ontwikkeld. Deze chlorofylfluorescentiemethode is een factor duizend gevoeliger dan de meting met de spectrofotometer. De bepaling van de energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a kan daarom vereenvoudigd worden door alleen de chlorofylfluorescentiemeting uit te voeren. In vergelijking 2 is te zien dat nu alleen de ratio tussen de chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a hoeft te worden bepaald. Volgens Jalink (2002) is deze ratio (CF_b / CF_a) recht evenredig met de energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a:

$$ET_{ba} = c \cdot \frac{CF_b}{CF_a} \rightarrow ET_{ba} \sim \frac{CF_b}{CF_a} \quad (2)$$

Waarin:

c	[-]	Vaste waarde voor verhouding tussen chlorofyl a en chlorofyl b
-----	-----	--

Bij deze chlorofylfluorescentiemethode moeten chlorofyl a en chlorofyl b onafhankelijk van elkaar worden geëxciteerd, zodat de chlorofylfluorescentie die ontstaat alleen van chlorofyl a of chlorofyl b afkomstig is. In Figuur 5 is het absorptiespectrum van verschillende fotosynthetische pigmenten te zien. Chlorofyl a en chlorofyl b hebben allebei twee pieken in het absorptiespectrum, maar deze pieken liggen bij verschillende golflengtes. Als alleen de chlorofylfluorescentie, die ontstaat door excitatie van chlorofyl a of chlorofyl b, gemeten moet worden, dan moet een golflengte gekozen worden waar chlorofyl b of chlorofyl a geen absorptie heeft en dus niet geëxciteerd kan worden.



Figuur 5 Absorptiespectra van verschillende fotosynthetische pigmenten van planten, algen en cyanobacteriën en het fluorescentiespectrum van chlorofyl a (Papageorgiou en Govindjee, 2004).

Bij een golflengte van 670 nm is er veel absorptie van chlorofyl a, maar geen absorptie van chlorofyl b. Chlorofyl a wordt bij deze golflengte geëxciteerd, maar chlorofyl b niet. Hierdoor ontstaat chlorofylfluorescentie die alleen afkomstig is van energie-absorptie van chlorofyl a. Bij een golflengte van 635 nm zal chlorofyl b lichtenergie absorberen, terwijl de absorptie van chlorofyl a bij deze golflengte minimaal is. Bij de absorptie van chlorofyl b zal geen chlorofylfluorescentie plaatsvinden, maar de energie wordt overgedragen aan andere pigmenten. Als een chlorofyl a-molecuul deze energie ontvangt, kan er wel chlorofylfluorescentie plaatsvinden. Bij de golflengte van 635 nm zal de chlorofylfluorescentie alleen afkomstig zijn van de energie-absorptie van chlorofyl b (Jalink, 2002).

3 Materialen en Methoden

Op 19 januari 2011 is een vooronderzoek gedaan om vertrouwd te raken met de opstelling van de sensor. Hieruit bleek dat de ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van chlorofyl b en chlorofyl a geschikt zou kunnen zijn als parameter voor rijpheidetectie van paprika's. Om dit te bewijzen moeten de resultaten met een referentiemeting worden vergeleken om zo de betrouwbaarheid vast te stellen. Uiteindelijk is gekozen voor een kleurmeting als referentie, omdat dit ten eerste een redelijk betrouwbare parameter is om de rijpheid te bepalen (Tadesse et al., 2002). Ten tweede wordt in de praktijk de rijpheid ook aan de hand van kleur bepaald.

3.1 Paprika's

In dit onderzoek zijn vijf gele en vijf rode paprika's gebruikt. Alle paprika's waren bont van kleur en hadden groene plekken. De paprika's zijn gekocht bij de plaatselijke groenteboer. Het ras en het land van herkomst van deze paprika's zijn onbekend.

Met een watervaste stift is elke paprika horizontaal in twee delen verdeeld. De bovenste en onderste helften zijn daarna verticaal verdeeld, afhankelijk van de grootte en vorm van de paprika, zodat de paprika's verdeeld zijn in 10 tot 14 stukken. De gele paprika's (n=5) zijn genummerd (G1, G2, G3, G4 en G5) en de rode paprika's (n=5) zijn ook genummerd (R1, R2, R3, R4 en R5). Ook zijn alle vlakken op elke paprika genummerd.

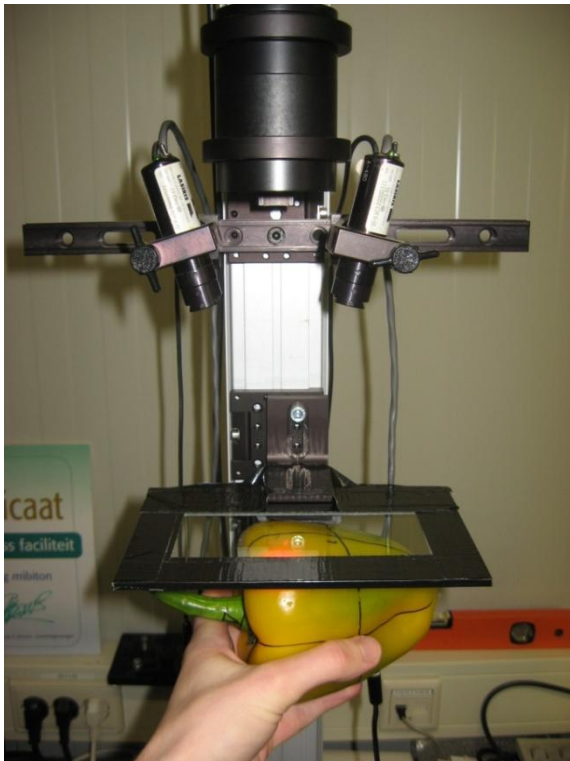
Eerst is de chlorofylfluorescentiemeting in het midden van het vlak uitgevoerd en meteen daarna is een kleurmeting uitgevoerd op hetzelfde punt op dezelfde paprika. Zo zijn alle vlakken van de paprika's gemeten. Daarna is van elk gemeten vlak een foto gemaakt, maar deze foto's worden niet verder geanalyseerd. In Figuur 6 is een foto van een van de gele paprika's te zien.



Figuur 6 De gele paprika G3 is in twaalf vlakken verdeeld.

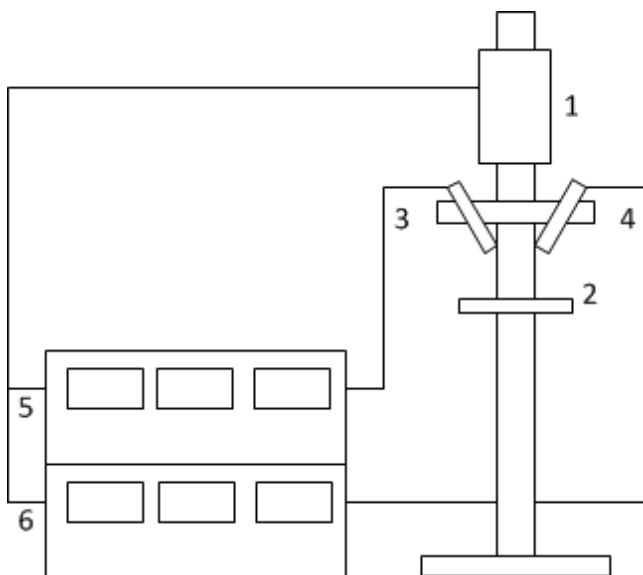
3.2 Chlorofylfluorescentiemeting

De chlorofylfluorescentie wordt met de chlorofylfluorescentiesensor gemeten (zie Figuur 7). Deze sensor is ontwikkeld bij Wageningen UR Glastuinbouw door Henk Jalink (2002). De meetopstelling van deze sensor is te zien in Figuur 8.



Figuur 7 De chlorofylfluorescentiemeting van een gele paprika.

3.2.1 Meetopstelling



Figuur 8 De meetopstelling bestaat uit: (1) een fotodiode, (2) een anti-reflecterende glasplaat, (3) laser b, (4) laser a, (5) lock-in-versterker b en (6) lock-in-versterker a.

Bij de chlorofylfluorescentiemeting wordt een paprika onder de anti-reflecterende glasplaat (2) gehouden, zodat de laserstraal in het midden van het te meten vlak van de paprika is te zien (zie Figuur 7). De lasers a (4) en b (3) zijn zo geplaatst dat ze een streep van 1 mm bij 5 mm vormen op de glasplaat (2).

Laser b (3) exciteert chlorofyl b met een golflengte van 635 nm en laser a (4) exciteert chlorofyl a met een golflengte van 670 nm. De intensiteit van de lasers wordt met een bepaalde frequentie gemoduleerd. De frequentie f_b van laser b (3) wordt ingesteld op lock-in-versterker b (5) en de frequentie f_a van laser a (4) wordt ingesteld op lock-in-versterker a (6). De frequentie f_a van laser a (4) is verschillend ten opzichte van de frequentie f_b van laser b (3). De andere instellingen van beide lock-in-versterkers (5 en 6) zijn hetzelfde.

De chlorofylfluorescentie, die vrijkomt bij het aanslaan van de chlorofylmoleculen, wordt opgevangen door de fotodiode (1). Doordat de lasers (3 en 4) met een verschillende frequentie uitzenden, wordt de chlorofylfluorescentie afkomstig van chlorofyl b en chlorofyl a ook met een andere frequentie uitgezonden. De signalen, die de fotodiode (1) opvangt, worden doorgegeven aan de lock-in-versterkers (5 en 6).

Lock-in-versterker b (5) kan de signalen, die worden uitgezonden met frequentie f_b , eruit filteren. Lock-in-versterker a (6) kan de signalen, die worden uitgezonden met frequentie f_a , eruit filteren. Het signaal van de chlorofylfluorescentie genereert een bepaalde spanning. Deze wordt gemeten en weergegeven op de betreffende lock-in-versterker. De maximale waarden van de spanning van chlorofyl b en chlorofyl a worden genoteerd. Achteraf is de ratio tussen beide spanningen berekend.

3.2.2 Lock-in-versterkers

De lock-in-versterkers die gebruikt worden zijn van het type SR380 van Stanford Research Systems (Stanford-Research-Systems, 1993). In Figuur 9 zijn de lock-in-versterkers weergegeven. Er zijn drie schermen op de lock-in versterker: Kanaal 1 geeft de spanning van de meting weer. Op kanaal 2 is de faseverschuiving te zien, maar dit kanaal wordt niet gebruikt. Het rechterscherm is het referentiescherm, hierop is de referentiefrequentie in te stellen.



Figuur 9 Lock-in-versterker b (boven) en lock-in-versterker a (onder).

De interne oscillator van de lock-in-versterker wordt ingesteld op een referentiefrequentie. De lasers zenden het licht uit met de ingestelde frequentie. De chlorofylfluorescentie die wordt uitgezonden, zal dezelfde frequentie hebben als de ingestelde frequentie. Een lock-in-versterker kan deze reactie eruit filteren, omdat deze gebruik maakt van fasegevoelige detectie. Deze techniek meet alleen de componenten van het signaal met een specifieke referentiefrequentie. Ruis en andere signalen op andere frequenties dan de referentiefrequentie worden weggefilterd, ook als deze vele malen groter zijn. De meting wordt dus niet door ruis beïnvloed.

Instellen van een lock-in-versterker vereist kennis en vaardigheid, daarom zijn de lock-in versterkers door Henk Jalink ingesteld. Bij het inschakelen van de opstelling worden de laatst gebruikte instellingen geladen.

3.2.3 Vergelijking van chlorofylfluorescentieparameters

Oorspronkelijk maakten chlorofylfluorescentiemethoden gebruik van een verzadigde lichtpuls van het hele spectrum die werd gegeven op een, aan het donker aangepaste, plant of product. Hierdoor absorberen alle pigmenten de energie, waarna ze verzadigd raken. De chlorofylfluorescentie die vrijkomt, is dan ook afkomstig van de energie-absorptie door alle pigmenten. Met deze chlorofylfluorescentie kan de efficiëntie van het fotosynthesesysteem worden bepaald (Schreiber, 1986). Deze methode wordt tegenwoordig nog steeds gebruikt, maar is niet betrouwbaar om rijpheid te bepalen.

Tegenwoordig zijn er meerdere chlorofylfluorescentiemethoden die op verschillende manieren chlorofylfluorescentie laten ontstaan en waarmee verschillende componenten worden gemeten. Force A, partner in het Crops-project, maakt bijvoorbeeld een onderscheid tussen rode fluorescentie (685 nm) en ver-rode fluorescentie (735 nm). De ver-rode fluorescentie is een vrij constante waarde. De ratio tussen rode en ver-rode fluorescentie zou een betrouwbare rijpheidparameter moeten zijn (Cerovic et al., 2002).

Er zal in dit onderzoek worden bekeken of de ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van absorptie door chlorofyl b en chlorofyl a een betere parameter is dan alleen de chlorofylfluorescentie afkomstig van absorptie door chlorofyl a en de totale chlorofylfluorescentie afkomstig van absorptie van chlorofyl a en chlorofyl b. Deze parameters kunnen uit dezelfde chlorofylfluorescentiemetingen worden gehaald. De resultaten van de verschillende parameters worden uitgezet tegenover de resultaten van de kleurmetingen.

3.3 Kleurmeting

3.3.1 Minolta Chroma Meter

Bij de kleurmetingen van de paprika's is gebruik gemaakt van de Minolta Chroma Meter model CR-221 (zie Figuur 10). Deze kleurmeting is net als de chlorofylfluorescentiemeting een puntmeting, maar dan met een diameter van 3 mm. De lichtinvalshoek is 45° en de beeldhoek is 0° (Minolta-Camera-Co., 1988). Voordat de chromameter gebruikt kan worden, moet deze goed ingesteld en gekalibreerd worden. Deze instellingen en kalibratie zijn beschreven in de appendix.



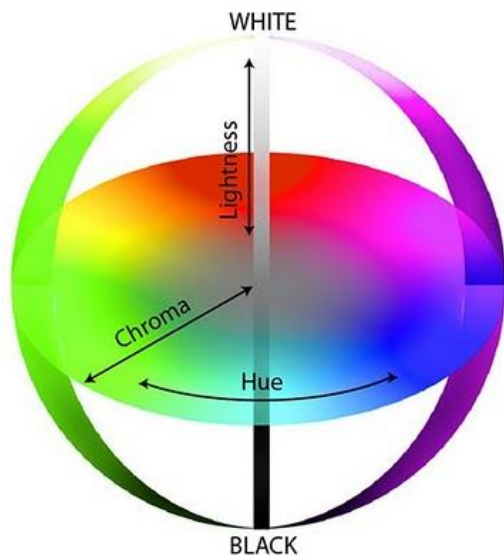
Figuur 10 De chromameter bestaat uit een dataprocessor (links) en een meetkop (rechts).

De metingen zijn gedaan met CIE-lichtbron C, wat overeen komt met het gemiddelde daglicht. In veel onderzoeken wordt deze lichtbron gebruikt (CIE, 2011). Er is bij de metingen gebruik gemaakt van de functie 'multi measure'. De chromameter meet hierbij drie keer achter elkaar de kleur van het object, waarna het gemiddelde van deze metingen wordt weergegeven. Bij deze kleurmeting is ervoor gekozen om de gemeten waarden weer te geven in het CIE $L^*C^*H^\circ$ -kleursysteem. De kleurwaarden van dit systeem zijn gemakkelijk te visualiseren voor mensen. Daarnaast wordt dit systeem ook in andere onderzoeken gebruikt (Bron et al., 2005; Tadesse et al., 2002).

3.3.2 Kleurruimten

Albert Munsell ontwikkelde begin twintigste eeuw het Munsell-kleurensysteem. Hij ontwikkelde een bolvormig stelsel met aan de twee uiterste uiteinden complementerende kleuren die samen een grijze neutrale kleur in het midden vormden. Dit was een van de eerste benaderingen om kleuren wetenschappelijk te beschrijven. Later werd de CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) opgericht (CIE, 2011). Dit is de internationale autoriteit op het gebied van licht, lichtbronnen, kleur en kleurruimten en wordt door de ISO als standaardiseringsgezelschap behandeld. Deze commissie houdt toezicht op en ontwikkelt kleurruimten en lichtbronnen. Een kleurruimte is een model waarin de kleuren op een wetenschappelijke manier zijn te kwantificeren.

Het CIE $L^*C^*H^\circ$ -kleursysteem is gebaseerd op het Munsell-kleurensysteem. $L^*C^*H^\circ$ staat voor 'lightness' (intensiteit), 'chroma' (verzadiging) en 'hue angle' (tint). De waarden in dit systeem zijn voor mensen gemakkelijk te interpreteren en visualiseren in vergelijking met andere kleurruimten. In Figuur 11 is de bolvormige kleurruimte van het CIE $L^*C^*H^\circ$ -kleursysteem te zien. 'Lightness' is verticaal weergegeven en kan waarde 0 (zwart) tot 100 (wit) hebben. 'Chroma' geeft aan hoeveel de kleur verzadigd is. Vanuit het midden hebben grijze neutrale kleuren waarde 0 en verzadigde kleuren aan de rand waarde 100. De 'hue angle' geeft aan welke hoek de kleur maakt. Bij rood is deze hoek 0° , bij groen 120° en blauw 240° (Pritchard, 2010).



Figuur 11 De kleurruimte van het CIE L*C*H°-kleursysteem (Pritchard, 2010).

Het CIE L*a*b*-kleursysteem gebruikt hetzelfde kleurmodel, maar deze kleurruimte meet in cartesiaanse coördinaten en L*C*H° wordt gemeten in poolcoördinaten. De verschillende kleurruimten kunnen in elkaar worden omgerekend door middel van formules en algoritmes (Minolta-Camera-Co., 1988).

3.4 Nauwkeurigheid en precisie

Nauwkeurigheid en precisie zijn belangrijke begrippen om de betrouwbaarheid van meetresultaten te bepalen. De nauwkeurigheid is afhankelijk van het meetinstrument of de methode en geeft de afwijking tussen het gemiddelde meetresultaat en de werkelijke waarde weer. Precisie geeft de spreiding tussen de meetresultaten weer. De precisie van een meting van een paprika hangt nauw samen met de bontheid van de paprika.

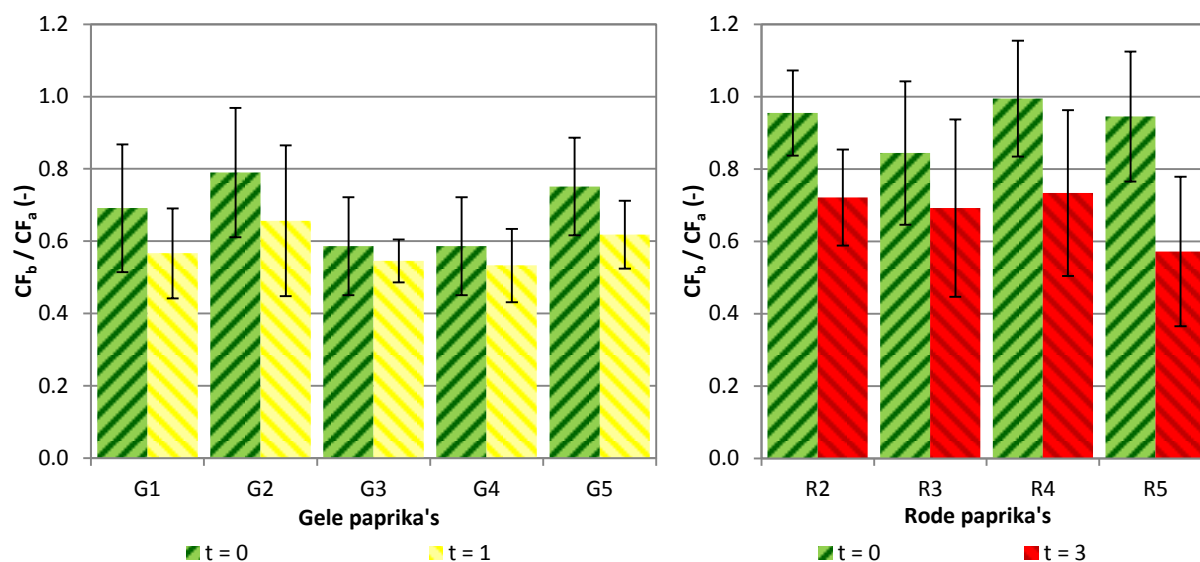
De nauwkeurigheid van de chlorofylfluorescentiesensor is onbekend, omdat er geen referentie is. De sensor is wel zo ontwikkeld dat een laser alleen chlorofyl b of chlorofyl a aanslaat. De chlorofylfluorescentie wordt dan door de lock-in-versterkers eruit gefilterd. De nauwkeurigheid van de lock-in-versterker is $\pm 1\%$ bij een temperatuur tussen de 20° en 30° (Stanford-Research-Systems, 1993). Waarschijnlijk is de biologische variatie groter dan de onnauwkeurigheid van de meting zelf. De precisie van de chlorofylfluorescentiesensor wordt bepaald door meerdere metingen op een punt uit te voeren.

De nauwkeurigheid van de chromameter is afhankelijk van de kalibratie. De precisie hangt vooral af van de eigenschappen van het meetoppervlak. Een gladde ondergrond met een uniforme kleur is gemakkelijk en precies te meten. Een paprika heeft echter een bolvormig oppervlak en de meeste paprika's hebben een bonte, dus niet uniforme, kleur. Een verkoper van chromameters adviseerde om een aantal verschillende punten op een paprika meerdere keren te meten om te kijken of de kleurmeting betrouwbare uitslagen geeft. Door de aanwezigheid van de holle ruimte in de paprika kan de chromameter een andere kleur meten op een plek waar aan de binnenkant een zaadlijster zit.

4 Resultaten

4.1 Chlorofylfluorescentie

Na de chlorofylfluorescentiemetingen is de gemiddelde ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a berekend van elke paprika.



Figuur 12 De gemiddelde ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a met bijbehorende standaarddeviatie per paprika per meting. Elke paprika was verdeeld in tien tot veertien vlakken en elk vlak is twee keer gemeten. Bij de gele paprika's (links, n=5) is de eerste meting gedaan op de eerste dag ($t=0$) en de tweede meting één dag later ($t=1$). Bij de rode paprika's (rechts, n=4) is de eerste meting gedaan op de eerste dag ($t=0$) en de tweede meting drie dagen later ($t=3$).

In Figuur 12 is te zien dat de ratio's tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a afnemen in de loop van de tijd, zowel bij de gele als de rode paprika's. De ratio's van de rode paprika's zijn hoger dan bij de gele paprika's. Dit is conform verwachting, omdat de gele paprika's verder waren in het rijpingsproces. Deze gele paprika's waren al voor een groot deel geel gekleurd, terwijl de rode paprika's nog veel groene plekken hadden.

De standaarddeviatie zegt iets over de distributie van de rijpheid over de paprika, oftewel de bontheid. Met de variatiecoëfficiënt, de procentuele afwijking tussen de standaarddeviatie en het gemiddelde, kunnen de resultaten onderling beter worden vergeleken. De gemiddelde variatiecoëfficiënten van de paprika's liggen tussen de 15% en de 35%.

In Figuur 13 is te zien dat de rode paprika R5 is verkleurd tussen de twee meetdagen.

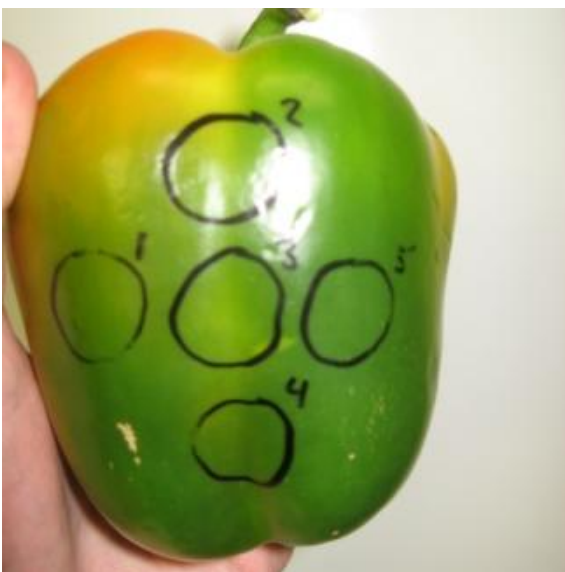


Figuur 13 Foto's van de rode paprika R5 op de eerste dag (links, $t=0$) en drie dagen later (rechts, $t=3$).

De ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a is in dezelfde tijd ook afgenomen. De standaarddeviatie over de hele paprika is bij de tweede meting groter dan bij de eerste meting. In Figuur 13 lijkt het echter dat de paprika bij de tweede meting een egalere rode kleur heeft gekregen. De verdeling van de kleur zegt blijkbaar niet alles over de verdeling van de energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a. Waarschijnlijk heeft dit te maken met de accumulatie van carotenoïden die de rode kleur goed zichtbaar maken, terwijl het chlorofyl nog niet volledig is afgebroken.

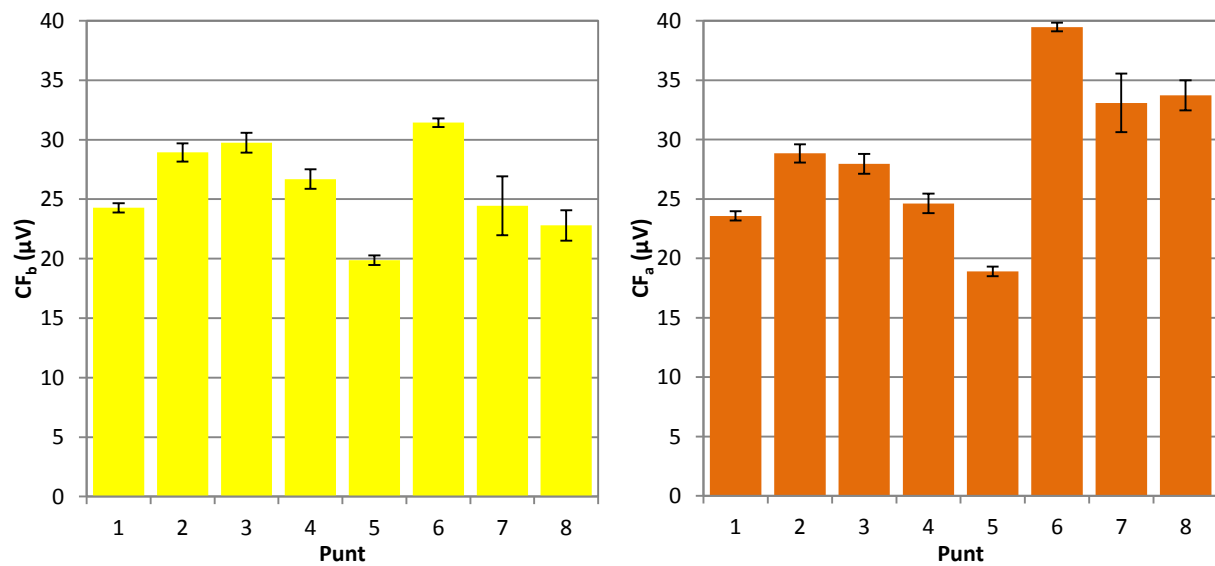
4.2 Precisie

De rode paprika R1 is gebruikt om de precisie van de metingen te testen. In Figuur 14 is te zien welke punten op de paprika zijn gemeten.



Figuur 14 Bij de rode paprika R1 zijn vijf onrijpe punten (links) en drie rijpe punten (rechts) gemeten.

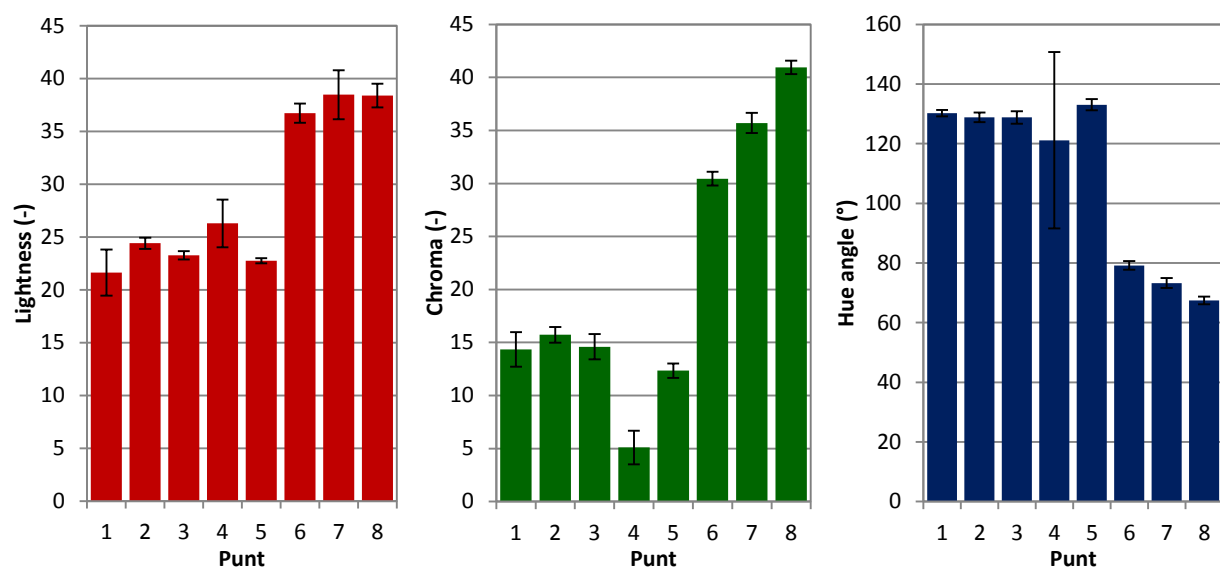
De chlorofylfluorescentiemetingen van de acht punten op de rode paprika R1 zijn in Figuur 15 weergegeven.



Figuur 15 De gemiddelde chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b (links) en chlorofyl a (rechts) met bijbehorende standaarddeviatie op acht punten van de rode paprika R1. Op elk punt zijn achtereenvolgens vijf metingen gedaan.

In Figuur 15 is te zien dat de chlorofylfluorescentiemetingen redelijk betrouwbaar zijn. De gemiddelde afwijking van vijf metingen per punt bedraagt 3.5%.

Wat opvalt is dat bij de onrijpe punten (1-5) de gemiddelde chlorofylfluorescentie lager is dan bij de rijpe punten (6-8). De ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a is echter hoger op de onrijpe punten in vergelijking met de rijpe punten. Dit komt doordat de hoeveelheid chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b bij de onrijpe punten hoger is. Waardoor dit verschil wordt veroorzaakt is onbekend.



Figuur 16 De gemiddelde waarden van de kleurmeting weergegeven in 'lightness' (links), 'chroma' (midden) en 'hue angle' (rechts) met bijbehorende standaarddeviatie op acht punten van de rode paprika R1. Op elk punt zijn achtereenvolgens vijf metingen gedaan.

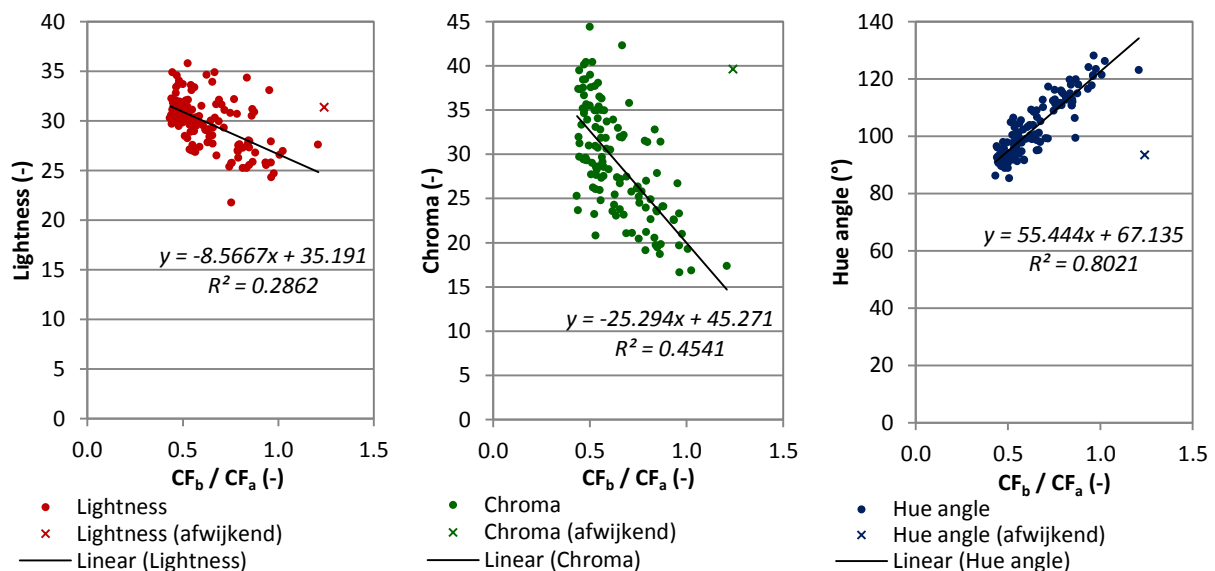
In Figuur 16 valt op dat punt 4 een erg grote standaarddeviatie van 'hue angle' heeft. Dit is te wijten aan een diepe inkeping van de paprika, waardoor het punt moeilijk te meten was. De andere vlakken op de paprika zijn goed te meten. Het meetpunt van de meetkop sluit juist goed af als een gebold oppervlak gemeten wordt.

De gemiddelde afwijking van de kleurmetingen is ook 3.5%. De resultaten van de meting van punt 4 zijn bij dit gemiddelde buiten beschouwing gelaten.

Deze precisiemeting is mede uitgevoerd naar aanleiding van het advies van de verkoper van chromameters. De holle ruimte in de paprika lijkt echter geen invloed te hebben op de resultaten. De punten waar een zaadlijster achter zou kunnen zitten, geven geen grote(re) afwijking van de kleur.

4.3 Relatie kleur en energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a

De relatie tussen kleur en de energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a bij de gele paprika's is in Figuur 17 weergegeven:

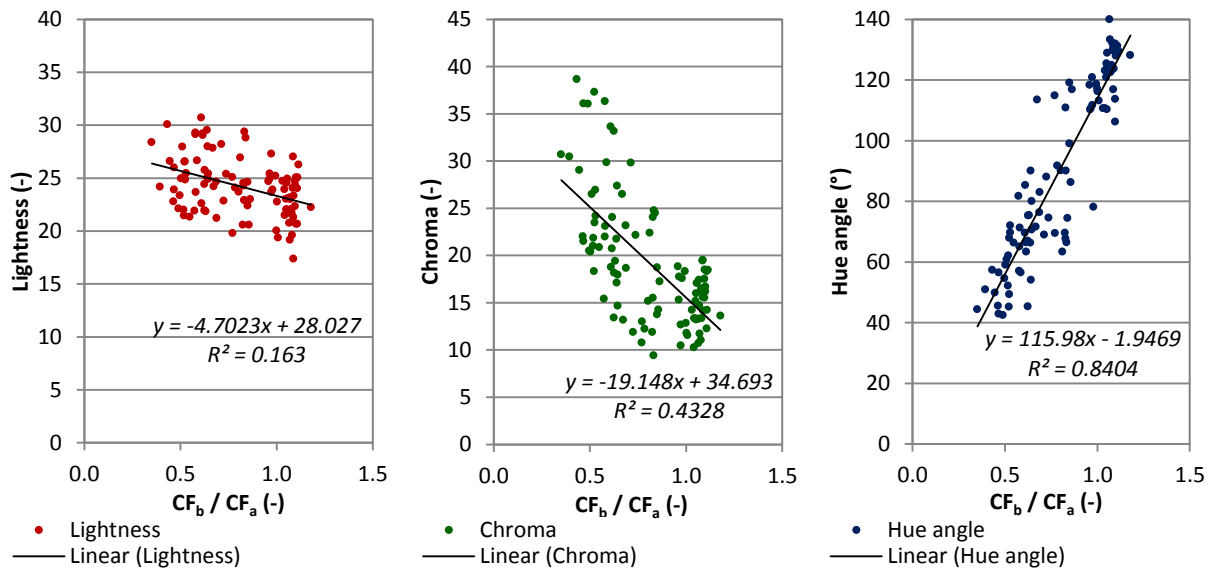


Figuur 17 Alle waarden van de metingen aan de gele paprika's (n=5) van beide meetdagen (t=0 en t=1) weergegeven in 'lightness' (links), 'chroma' (midden) en 'hue angle' (rechts) en uitgezet tegen de ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a. De correlatiecoëfficiënt (R^2) is gebaseerd op een lineaire regressielijn.

Na een lineaire regressie-analyse te hebben uitgevoerd, geeft alleen de 'hue angle' een betrouwbare correlatiecoëfficiënt van 0.80. Er is een positief verband tussen 'hue angle' en de ratio. 'Lightness' en 'chroma' geven een klein negatief verband met de ratio, maar de correlatiecoëfficiënten zijn te klein om een betrouwbare voorspelling voor deze parameters te kunnen doen.

Eén meting (paprika G4, t=1, bovenste helft, vlak 6) week erg van de andere resultaten. De correlatiecoëfficiënt voor 'hue angle' was inclusief dit meetpunt 0.68, maar na verwijdering is de correlatiecoëfficiënt 0.80. Deze meting wordt daarom als te sterk afwijkend beschouwd. Dit is waarschijnlijk het gevolg van een afleesfout op de lock-in-versterkers. De ratio van deze meting was 1.24, terwijl omliggende vlakken slechts een

ratio van 0.50 hadden. Door de sterke afwijking is dit meetpunt verwijderd uit de verwerking van de gegevens.

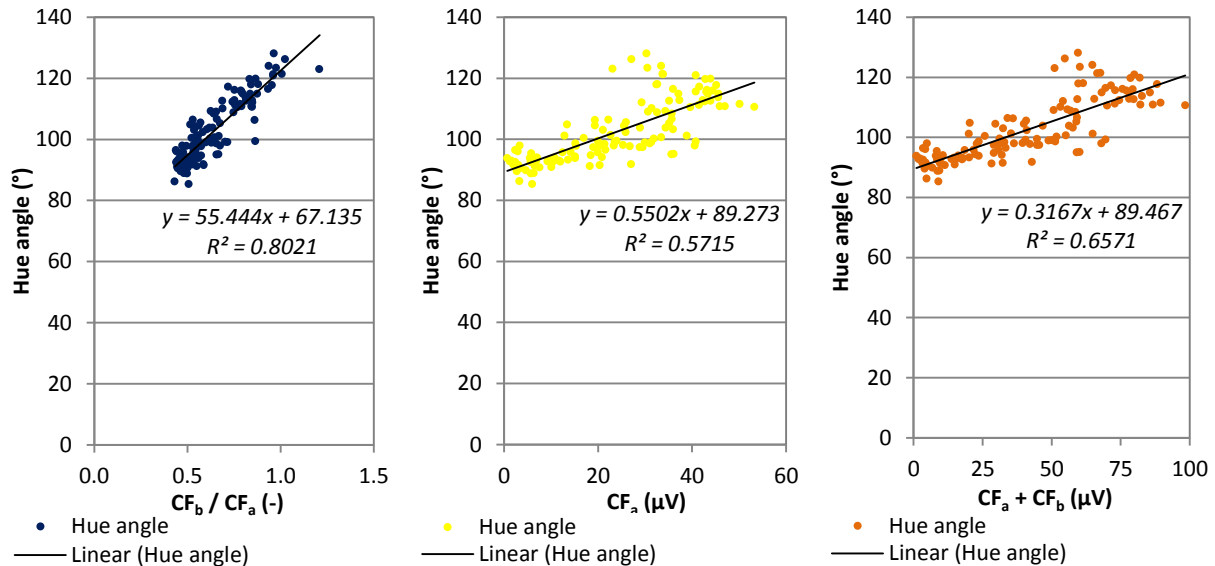


Figuur 18 Alle waarden van de metingen aan de rode paprika's (n=4) van beide meetdagen (t=0 en t=3) weergegeven in 'lightness' (links), 'chroma' (midden) en 'hue angle' (rechts) en uitgezet tegen de ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a. De correlatiecoëfficiënt (R^2) is gebaseerd op een lineaire regressielijn.

Ook voor de rode paprika's is de relatie tussen kleur en ratio weergegeven in Figuur 18. De lijnen vertonen dezelfde verbanden als bij de gele paprika's in Figuur 17. 'Lightness' en 'chroma' hebben weer een kleine negatieve relatie met de ratio, maar ook nu zijn de correlatiecoëfficiënten te klein om voorspellingen te doen. De grafiek van de 'hue angle' geeft, net als bij de gele paprika's, een positief lineair verband met de ratio weer. Daarnaast is er een hoge correlatiecoëfficiënt ($R^2 = 0,84$).

4.4 Vergelijking van chlorofylfluorescentieparameters

De chlorofylfluorescentieparameters zijn met elkaar vergeleken door de parameter uit te zetten tegen de 'hue angle'. 'Hue angle' geeft de beste correlatie met de ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a. In Figuur 19 zijn de relaties tussen 'hue angle' en de chlorofylfluorescentieparameters weergegeven.



Figuur 19 Van de metingen aan de gele paprika's (n=5) van beide meetdagen (t=0 en t=1) is de 'hue angle' uitgezet tegen verschillende chlorofylfluorescentieparameters: de ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a (links, CF_b/CF_a), chlorofylfluorescentie alleen afkomstig van excitatie van chlorofyl a (midden, CF_a) en chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van zowel chlorofyl a als chlorofyl b (rechts, CF_a+CF_b). De correlatiecoëfficiënt (R²) is gebaseerd op een lineaire regressielijn.

Alle relaties tussen de chlorofylfluorescentieparameters en de 'hue angle' zijn positief. De grafiek van de ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a is ook al weergegeven in hoofdstuk 4.3. Chlorofylfluorescentie die alleen afkomstig is van excitatie van chlorofyl a geeft een redelijke correlatie met een correlatiecoëfficiënt van 0.57. De totale chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van zowel chlorofyl a als chlorofyl b geeft een betere correlatie, want hier is de correlatiecoëfficiënt 0.66. De ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a heeft de hoogste correlatie; de correlatiecoëfficiënt is daar namelijk 0.80.

Deze vergelijking van de chlorofylfluorescentieparameters is alleen voor de gele paprika's weergegeven. Bij de rode paprika's zijn dezelfde verbanden en correlaties gevonden.

De verschillende chlorofylfluorescentieparameters zijn ook per paprika per meting vergeleken. De resultaten staan in Tabel 3 en zijn afkomstig van alle metingen, zowel aan de gele als de rode paprika's.

Tabel 3 Gemiddelde (μ) met bijbehorende standaarddeviatie (std) van de verschillende chlorofylfluorescentieparameters: de ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a (links, CF_b/CF_a), chlorofylfluorescentie alleen afkomstig van excitatie van chlorofyl a (midden, CF_a) en chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van zowel chlorofyl a als chlorofyl b (rechts, CF_a+CF_b). De gemiddelden zijn berekend per paprika per meetmoment voor de gele paprika's (G1, G2, G3, G4 en G5) op beide meetdagen (t=0 en t=1) en voor de rode paprika's (R2, R3, R4 en R5) op beide meetdagen (t=0 en t=3). De gemiddelde variatiecoëfficiënt is berekend over alle metingen voor elke chlorofylfluorescentieparameter.

t	paprika	$CF_b / CF_a (-)$		$CF_a (\mu V)$		$CF_a + CF_b (\mu V)$	
		μ	std	μ	std	μ	std
0	G1	0.69	0.18	28.46	18.00	50.60	33.46
1	G1	0.57	0.12	18.70	12.53	30.70	22.03
0	G2	0.79	0.18	33.32	10.70	60.41	21.18
1	G2	0.66	0.21	23.19	10.99	39.78	20.87
0	G3	0.59	0.14	34.08	16.51	35.56	29.84
1	G3	0.55	0.06	18.25	9.41	28.73	15.61
0	G4	0.59	0.14	21.06	16.51	35.56	29.84
1	G4	0.53	0.10	10.29	6.92	16.18	11.43
0	G5	0.75	0.14	33.02	9.12	58.53	18.32
1	G5	0.62	0.09	25.20	8.61	41.31	15.50
0	R2	0.96	0.12	23.65	1.24	46.18	2.93
3	R2	0.72	0.13	14.20	3.56	24.76	7.57
0	R3	0.84	0.20	23.10	5.90	43.03	12.60
3	R3	0.69	0.25	11.78	6.63	21.40	14.46
0	R4	0.99	0.16	28.68	6.09	57.11	11.94
3	R4	0.73	0.23	14.88	7.73	27.07	15.83
0	R5	0.95	0.18	28.20	5.68	55.23	13.29
3	R5	0.57	0.21	13.96	7.22	22.97	13.55
gemiddelde variatiecoëfficiënt (%)		22.42		43.02		49.07	

De gemiddelde variatiecoëfficiënt geeft het beste weer wat de precisie is van de verschillende parameters. Bij de chlorofylfluorescentie die alleen afkomstig is van excitatie van chlorofyl a is de variatiecoëfficiënt 43% en bij de totale chlorofylfluorescentie is de variatiecoëfficiënt zelfs 49%. Deze grote afwijkingen worden veroorzaakt door een ongelijkmatige distributie van chlorofyl over de paprika.

De ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a geeft een veel betrouwbaardere verdeling. Hier is de gemiddelde variatiecoëfficiënt slechts 22%. Sommige vlakken op de paprika bevatten meer chlorofyl, omdat de groeiomstandigheden hier om vragen. Aan de schaduwkant van de paprika zal bijvoorbeeld meer chlorofyl zijn om zo de lichtabsorptie te maximaliseren. Door een ratio te nemen tussen chlorofyl b en chlorofyl a worden plekken die gemiddeld meer chlorofyl bevatten, niet zwaarder meegerekend in de distributie van de rijpheid over een paprika.

5 Discussie

De resultaten van de chlorofylfluorescentiemetingen lijken betrouwbaar. De standaarddeviaties van de gemeten vlakken vertonen geen grote afwijkingen. Bij de kleurmetingen moet opgelet worden hoe de chromameter geplaatst wordt. Een punt op een onregelmatig oppervlak kan beter niet gekozen worden. Een bolling is echter geen probleem. De holle ruimte in de paprika lijkt geen invloed te hebben op de gemeten kleurwaardes.

De lasers van de chlorofylfluorescentiesensor meten over een streep van 1 mm bij 5 mm. Bij de chromameter is de diameter van het meetoppervlak 3 mm. Door het verschil in meetoppervlak kunnen de meetresultaten afwijken van de werkelijke waarden. Waarschijnlijk zal de afwijking minimaal zijn, omdat het omliggende oppervlak bijna dezelfde eigenschappen zal hebben als het gemeten punt. De fout die gemaakt wordt bij het plaatsen van de meetinstrumenten zal groter zijn, dan de onnauwkeurigheid die ontstaat door het verschil in diameters van de meetoppervlakken. Ook bij het aflezen van de lock-in-versterkers kunnen fouten ontstaan. Deze laatste fout is echter makkelijk te voorkomen door gebruik te maken van een computer.

In dit onderzoek is ervoor gekozen om de paprika, afhankelijk van de grootte en vorm, in tien tot veertien stukken te verdelen. Het aantal meetpunten kan verminderd worden door de verdeling van deze meetpunten te optimaliseren. De paprika hangt meestal voor de helft in de zon. Deze kant zal eerder verkleuren dan de schaduwzijde. Het viel op dat de verkleuring start rondom de stengel en langs de verticale sleuven tussen de gebolde oppervlakken. Deze verkleuring is niet goed vastgelegd, omdat nu alleen de bolle vlakken zijn gemeten. De bolle vlakken verkleuren meestal als laatste, maar deze vertegenwoordigen wel het grootste deel van de oppervlakte van de paprika.

Rijpheid is niet gelijk gedistribueerd over de hele paprika, daarom variëren de resultaten van de kleur- en chlorofylfluorescentiemetingen tussen de verschillende vlakken. Daarom zijn ook bij de chlorofylfluorescentiemeting meerdere metingen nodig om tot een betrouwbaar resultaat te komen. Het belangrijkste voordeel ten opzichte van kleurmetingen is dat het omgevingslicht geen invloed heeft tijdens de meting. Daarnaast is de chlorofylfluorescentiemethode mogelijk onafhankelijk van kleur, dus de resultaten voor gele, rode en oranje paprika's zouden hetzelfde moeten zijn.

Als laatste kan een discussie worden gevoerd over wanneer een paprika rijp is. Bij een volledige verkleuring zou de paprika op zijn lekkerst moeten zijn, maar dit is niet bewezen. De verkleuring wordt wel bij het oogsten aangehouden als criterium. Dit discussiepunt zal vooral voor de praktijktoepassing van de sensor gelden en nog niet voor dit verkenningsonderzoek.

6 Conclusie

De ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a voor de onrijpe groene gedeeltes van de paprika's waren hoog. Op de rijpere gedeeltes van zowel de gele als de rode paprika's waren de ratio's aanzienlijk lager. Deze ratio's zijn rechtsevenredig met de energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a. De resultaten uit dit onderzoek laten zien dat de ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a een sterke positieve correlatie heeft met 'hue angle'. De negatieve correlatie met 'chroma' en 'lightness' is niet sterk aanwezig. In literatuur werd beschreven dat 'hue angle' en 'chroma' bruikbaar zijn als parameter voor de kleurverandering tijdens de rijping van paprika's, maar uit dit onderzoek blijkt dat alleen 'hue angle' hiervoor geschikt is. De positieve lineaire regressie tussen ratio en 'hue angle' is zowel bij de gele als de rode paprika's aanwezig. Bij beide kleuren is de correlatiecoëfficiënt groter dan 0.8. De grafiek voor de rode paprika's is echter steiler, omdat de kleur rood een lagere 'hue angle' heeft.

De chlorofylfluorescentiesensor kan gebruikt worden om de rijpheid van rijpe paprika's te bepalen, maar er is meer onderzoek benodigd om deze methode in praktijk toe te passen. Uit de resultaten blijkt dat de ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a afneemt in de tijd. Uitgegaan van het feit dat een paprika verder afrijpt als deze voldoende verkleurd is, dan kan geconcludeerd worden dat de energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a afneemt naarmate de paprika rijper wordt. Dit wordt bevestigd door de sterke relatie tussen 'hue angle' en de ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a, want in literatuur werd 'hue angle' als een goede rijpheidsparemeter voor paprika's gezien. De meetmethode lijkt voor rijpe paprika's onafhankelijk te zijn van kleur. De relatie tussen energie-overdracht van chlorofyl b naar chlorofyl a en 'hue angle' is zowel bij de gele als bij de rode paprika's aanwezig. Of deze chlorofylfluorescentiemethode ook bruikbaar is voor onrijpe groene paprika's is nog niet duidelijk.

De betrouwbaarheid van deze meettechniek is moeilijk vast te stellen. Theoretisch gezien is de betrouwbaarheid van de chlorofylfluorescentiesensor hoog, maar door de sensor verkeerd te plaatsen en/of af te lezen kan de betrouwbaarheid afnemen. Ook de biologische variatie over de paprika speelt een rol. De variatiecoëfficiënten van de metingen liggen tussen de 15% en 35%. De rijpheid is dus niet gelijk verdeeld over de paprika's. Ook als de paprika's volledig verkleurd zijn, zijn er nog verschillen in rijpheid zichtbaar. Bij vervolgonderzoeken moet rekening worden gehouden met deze bontheid.

Als laatste zijn in dit onderzoek verschillende chlorofylfluorescentieparameters vergeleken. De ratio tussen chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl b en chlorofyl a is een betere parameter dan de chlorofylfluorescentie die alleen afkomstig is van excitatie van chlorofyl a en ook van de totale chlorofylfluorescentie afkomstig van excitatie van chlorofyl a en chlorofyl b. Deze chlorofylfluorescentiemethode geeft een twee keer zo hoge precisie.

7 Aanbevelingen

In dit onderzoek is gekeken naar de mogelijkheid om rijpheid van paprika's te bepalen met een chlorofylfluorescentiesensor. Er is meer onderzoek benodigd om deze methode op de paprikaplukrobot toe te passen.

Als eerste moet onderzoek worden gedaan naar de verandering van chlorofylfluorescentie tijdens de groei van een paprika aan een plant. Daarna kan pas worden geconcludeerd of deze chlorofylfluorescentiemethode geschikt is om het ideale moment van oogsten te bepalen. Uit dit vervolgonderzoek zal ook moeten blijken of de methode bruikbaar is voor groene paprika's. In groene paprika's wordt chlorofyl nog niet afgebroken, daardoor zijn de chlorofylconcentraties hoog en de energie-overdracht ook. Misschien verandert de energie-overdracht tijdens de groei waardoor deze methode wel toepasbaar is voor groene paprika's.

Ten tweede moet de methode, voor zo ver mogelijk is, onafhankelijk zijn van kleur, ras, klimaat en seizoen. De chlorofylconcentraties zouden verschillend kunnen zijn door één of een combinatie van deze factoren. Deze onafhankelijkheid is belangrijk, omdat de sensor breed toepasbaar moet zijn.

Ook moet er een vertaalslag worden gemaakt naar de praktijk. Dit betekent vooral hoe de sensor op de robot moet worden geplaatst en hoeveel metingen op welke plaatsen gedaan moeten worden. Dit laatste punt is vooral belangrijk. Er moet goed onderzocht worden welke plaatsen op de paprika gemeten moeten worden om betrouwbaar en snel een conclusie te geven of de paprika wel of niet geoogst moet worden.

Deze chlorofylfluorescentiemethode kan waarschijnlijk breder worden toegepast dan alleen rijpheidbepaling. Als de chlorofylfluorescentie werkelijk iets zegt over de rijpheid van paprika's, dan zouden kwaliteitseisen hier misschien aan kunnen worden gekoppeld. Een uniforme rijpheid is met deze chlorofylfluorescentiemethode vast te stellen. Ook zouden er kwantitatieve waarden aan de kwaliteitseisen worden gekoppeld. Deze methode biedt ook mogelijkheden voor de bepaling van houdbaarheid. Dit is echter onzeker, omdat een volledig verkleurde paprika geen of weinig chlorofyl bevat en er waarschijnlijk geen chlorofylfluorescentie kan worden gemeten.

Referenties

- Bron, I.U., Ribeiro, R.V., Azzolini, M., Jacomino, A.P. en MacHado, E.C. 2004. Chlorophyll fluorescence as a tool to evaluate the ripening of 'Golden' papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology* 33(2):163-173.
- Bron, I.U., Ribeiro, R.V., Azzolini, M., Machado, E.C. en Jacomino, A.P. 2005. Chlorophyll fluorescence emission and its relation to skin color and firmness during ripening of guava fruit. *Fruits* 60(1):25-32.
- Cerovic, Z.G., Ounis, A., Cartelat, A., Latouche, G., Goulas, Y., Meyer, S. en Moya, I. 2002. The use of chlorophyll fluorescence excitation spectra for the non-destructive in situ assessment of UV-absorbing compounds in leaves. *Plant, Cell & Environment* 25(12):1663-1676.
- CIE. 2011. CIE: International Commission on Illumination. Laatst gewijzigd op 31-03-2011. Verkregen op 04-04-2011 van <http://www.cie.co.at/>.
- Crops. 2010. Crops homepage. Laatst gewijzigd op 20-12-2010. Verkregen op 17-02-2011 van <http://www.crops-robots.eu>.
- Fischler, F. 1999. Verordening (EG) Nr. 1455/1999 van de commissie van 1 juli 1999 tot vaststelling van de handelsnorm voor niet-scherpsmakende pepers (paprika's). *Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen*.
- Jalink, H. 2002. Werkwijze voor het bepalen van de kwaliteit van plantaardig materiaal en inrichting voor het scheiden van plantaardig materiaal.
- Kays, S.J. en Paull, R.E. 2004. *Postharvest biology*. Athens, GA: Exon Press.
- Kosson, R. 2003. Chlorophyll fluorescence and chilling injury of green pepper as affected by storage conditions. *Issues and Advances in Postharvest Horticulture*(628):379-385.
- Krause, G.H. en Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42(1):313-349.
- Luning, P.A., De Rijk, T., Wichers, H.J. en Roozen, J.P. 1994. Gas chromatography, mass spectrometry, and sniffing port analyses of volatile compounds of fresh bell peppers (*Capsicum annuum*) at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42(4):977-983.
- Minolta-Camera-Co. 1988. Chroma Meter CR-200/CR-210/CR-221/CR-231. Osaka.
- Molinari, A.F., Castro, L.R., Antoniali, S., Pornchaloempong, P., Fox, A.J. en Sargent, S.A. 1999. The potential for bell pepper harvest prior to full color development. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 112:143-146.
- Nielsen, T.H., Skjærbæ, H.C. en Karlsen, P. 1991. Carbohydrate metabolism during fruit development in sweet pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Physiologia Plantarum* 82(2):311-319.
- Papageorgiou, G.C. en Govindjee. 2004. Chlorophyll a Fluorescence: A Bit of Basics and History. In *Chlorophyll a Fluorescence*, 1-41. Govindjee, ed: Springer Netherlands.
- Pilarski, J. en Kocurek, M. 2005. The content of photosynthetic pigments and the light conditions in the fruits and leaves of sweet pepper. *Acta Physiologiae Plantarum* 27(2):173-182.

Poynton, C. 2008. ColorChecker ("Macbeth") Chart. Laatst gewijzigd op 11-09-2008. Verkregen op 15-02-2011 van <http://www.poynton.com/notes/color/GretagMacbeth-ColorChecker.html>.

Pritchard, G. 2010. Quality In Print: Tolerancing color in presswork - CIE L*a*b* and DeltaE. Laatst gewijzigd op 21-04-2010. Verkregen op 22-02-2011 van <http://qualityinprint.blogspot.com/2010/04/tolerancing-color-in-presswork-cie-lab.html>.

Raven, P.H., Evert, R.F. en Eichhorn, S.E. 2005. *Biology of plants*. New York, NY: Freeman.

Roca, M. en Mínguez-Mosquera, M.I. 2006. Chlorophyll Catabolism Pathway in Fruits of *Capsicum annuum* (L.): Stay-Green versus Red Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(11):4035-4040.

Schreiber, U. 1986. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *Photosynthesis Research* 9(1-2):261-272.

Stanford-Research-Systems. 1993. DSP Lock-In Amplifier Model SR830 Sunnyvale.

Tadesse, T., Hewett, E.W., Nichols, M.A. en Fisher, K.J. 2002. Changes in physicochemical attributes of sweet pepper cv. Domino during fruit growth and development. *Scientia Horticulturae* 93(2):91-103.

Tijskens, L.M.M., Otma, E.C. en Kooten, O. 1994. Photosystem II quantum yield as a measure of radical scavengers in chilling injury in cucumber fruits and bell peppers. *Planta* 194(4):478-486.

Toivonen, P.M.A. en Deell, J.R. 1998. Differences in chlorophyll fluorescence and chlorophyll content of broccoli associated with maturity and sampling section. *Postharvest Biology and Technology* 14(1):61-64.

Zsom, T., Zsom-Muha, V., Baranyai, L., Herppich, W.B., Felföldi, J. en Balla, C. 2010. Non-destructive determination of post-harvest ripening of *Capsicum × annuum* 'Kárpia'. *Acta Horticulturae* 858:407-412.

Appendix

A Minolta Chroma Meter model CR-221

Voordat de Minolta Chroma Meter model CR-221 (Minolta-Camera-Co., 1988) gebruikt kan worden, moet deze ingesteld en gekalibreerd worden. De originele kalibratietegels ontbraken bij deze chromameter, daarom is de kalibratie gedaan met een ColorChecker Color Rendition Chart van X-Rite. De kalibratie is hieronder beschreven.

A.1 Instellingen

- Druk op 'INDEX SET' om de instellingen te wijzigen. De volgende instellingen zijn gebruikt:
 - Print: N.
 - Color Space: N.
 - Data Protect: N.
 - Multi Measure: Y.
 - Auto Select: Y.
 - Light Source: C.

A.2 Kalibratie

- Druk op 'CALIBRATE' om een kleur van de ColorChecker te kalibreren:
 - Kalibratiekanaal ch.. kiezen.
 - Chromatische Yxy-coördinaten uit Tabel 4 invoeren.
 - Druk op 'MEASURE' of de knop op de meetkop om de ingestelde kleur te kalibreren.

A.3 Meten

- Na het opstarten van de chromameter moet het kalibratiekanaal ch00 opnieuw gekalibreerd worden met het witte vlak (kleurnummer 19) van de ColorChecker.
- Druk op 'MEASURE' of de knop op de meetkop om de meting te starten.
- De gemeten waarden kunnen worden afgelezen van het scherm van de dataprocessor.
- Druk op 'COLOR SPACE SELECT' om de gemeten waarden in een andere kleurruimte weer te geven.

Tabel 4 Colorimetrische data van de ColorChecker Color Rendition Chart van X-Rite. De chromatische Yxy-coördinaten zijn gebaseerd op CIE-lichtbron C. De laatste kolom geeft het gebruikte kalibratiekanaal (ch..) op de chromameter weer. Aangepast op basis van Poynton (2008).

kleurnummer	kleurnaam	CIE (1931)			ch..
		Y	x	y	
1	dark skin	10.1	0.400	0.350	01
2	light skin	35.8	0.377	0.345	02
3	blue sky	19.3	0.247	0.251	03
4	foliage	13.3	0.337	0.422	04
5	blue flower	24.3	0.265	0.240	05
6	bluish green	43.1	0.261	0.343	06
7	orange	30.1	0.506	0.407	07
8	purplish blue	12.0	0.211	0.175	08
9	moderate red	19.8	0.453	0.306	09
10	purple	6.6	0.285	0.202	10
11	yellow green	44.3	0.380	0.489	11
12	orange yellow	43.1	0.473	0.438	12
13	blue	6.1	0.187	0.129	13
14	green	23.4	0.305	0.478	14
15	red	12.0	0.539	0.313	15
16	yellow	59.1	0.448	0.470	16
17	magenta	19.8	0.364	0.233	17
18	cyan	19.8	0.196	0.252	18
19	white	90.0	0.310	0.316	00
20	neutral 8	59.1	0.310	0.316	--
21	neutral 6.5	36.2	0.310	0.316	--
22	neutral 5	19.8	0.310	0.316	--
23	neutral 3.5	9.0	0.310	0.316	--
24	black	3.1	0.310	0.316	19

