



ato-dlo

Verbetering van de afzet en export van Nederlandse aardbeien door toepassing van product-eigen green chemicals

BTOC-project SBC96014

Uitgevoerd in opdracht van 'Stichting Aardbei' waarin vertegenwoordigd:

- The Greenery
- 5 aardbeientelers

Voortgangsrapportage no. 1/8

periode januari 1997 - oktober 1997

VERTROUWELIJK

Agrotechnologisch
Onderzoeks Institute
(ATO-DLO)
Bornseseeg 59
Postbus 17
6700 AA Wageningen
Tel: 0317-475000
Fax: 0317-475347

E.J. Smid
P.P.L.A. de Leeuw
J. Zomer

2252557

Inhoudsopgave

Samenvatting	2
1. Inleiding	3
2. Doelstelling	5
3. Resultaten	6
3.1 <i>In vitro</i> testen van geselecteerde stoffen	6
3.2 <i>In vitro</i> dosis effect relatie van 8 geselecteerde stoffen	7
3.3 <i>In situ</i> activiteit van 8 geselecteerde stoffen	12
3.4 <i>In situ</i> dosis-effect relatie van 8 geselecteerde stoffen	14
4. Planning	17
5. Confrontatie met de fasering	22
6. Literatuur referenties	23

Samenvatting

Dit verslag beschrijft de resultaten van de eerste 10 maanden van het onderzoek dat is uitgevoerd in het kader van BTOC-project SBC96014 in opdracht van de Stichting Aardbei waarin vertegenwoordigd The Greenery (Locatie Breda) en 5 aardbeien telers. In de deze verslagperiode is op basis een uitgebreide screening uit een panel van 21 aardbei-eigen een selectie gemaakt van 8 stoffen met voldoende *in vitro* schimmelgroei-remmende werking. Uit deze groep zijn vervolgens op basis van een *in situ* (op produkt) screening 3 stoffen geselecteerd die bij optimale dosering een minimum aan vruchtschade geven en tegelijkertijd voldoende schimmelgroei-remmende werking vertonen.

1. Inleiding

Voor de export van Nederlandse aardbeien naar verre overzeese bestemmingen (Midden-Oosten, Verre-Oosten) kan een gesloten koelketen om logistieke redenen niet gegarandeerd worden. Onder deze sub-optimale omstandigheden is toepassing van een gewijzigde gas-samenstelling (verlaagd O₂, verhoogd CO₂) onvoldoende om schimmelgroei op de vruchten volledig te onderdrukken. Daarom bestaat er grote behoefte aan een verpakkingsmethodiek die kwaliteitsbehoud van export-aardbeien in de afzetketens voor verre bestemmingen garandeert. Toepassing van een combinatie van aardbei-eigen stoffen met schimmelgroei-remmende werking en een gewijzigde gas-samenstelling kan een verpakkingsconcept opleveren waarmee kwaliteitsbehoud in deze specifieke afzetketens gewaarborgd kan worden.

Aardbeien produceren een zeer groot aantal aromastoffen die samen de specifieke aardbeiensmaak en -geur bepalen. Uit recente publicaties blijkt dat de aardbei arome uit 35 tot 200 verschillende vluchtige verbindingen bestaat. De aroma van rijpe vruchten wordt voor een belangrijk deel bepaald door methyl esters van methyl alcoholen (Perkins-Veazie and Collins, 1995). In een studie van Perez *et al.* (1992) worden 7 vluchtige stoffen aangewezen die direct correleren met de kenmerkende aardbeien aroma. Naast genoemde geurstoffen spelen zuurgraad en suikergehalte een belangrijke rol bij de beoordeling van de aroma.

Recent onderzoek op ATO-DLO heeft aangetoond dat vele verschillende vluchtige plantestoffen afkomstig van diverse plantesoorten, schimmelgroei-remmende eigenschappen bezitten en zodoende gebruikt kunnen worden om schimmelaantasting op land- en tuinbouwgewassen te onderdrukken (Smid *et al.*, 1995; Gorris and Smid, 1995; Smid *et al.*, 1996a; Oosterhaven *et al.*, 1995). Van *trans*-cinnamaldehyde, de belangrijkste component uit cassia olie, is aangetoond dat de stof inwerkt op de membranen van de doelwit micro-organismen (Smid *et al.*, 1996b). Tengevolge van sterke geur- en smaak-eigenschappen van dergelijke stoffen kan smaak-afwijking van behandelde produkten optreden bij toepassing in gesloten verpakkingen.

Van een aantal vluchtige aardbei-stoffen is vastgesteld dat ze schimmelgroei-remmende activiteit bezitten (Pesis and Avissar, 1990; Vaughn *et al.*, 1993). Hoewel deze stoffen door aardbeien geproduceerd worden, bezitten ze niet de typische organoleptische eigenschappen die geassocieerd worden met aardbeien. Recent onderzoek op ATO-DLO heeft aangetoond dat een 4-tal typische natuurlijke aardbei-aroma stoffen de groei van *B. cinerea* en *R. stolonifer* op een aardbei-medium remmen. Deze stoffen combineren de gunstige schimmelgroei-remmende werking met een natuurlijke aardbei-

aroma. Deze laatste eigenschap minimaliseert de kans op het optreden van smaakafwijking bij toepassing van de stof op verpakte aardbeien. Naast de reeds onderzochte stoffen worden een 10-tal ander aardbei-stoffen geassocieerd met de typische aardbei-aroma. Van deze stoffen is bij aanvang van het project onbekend of ze schimmelgroei-remmende eigenschappen bezitten. Op basis van de typische geur karakteristieken kunnen deze verbindingen in combinatie met sterke schimmelgroei-remmende eigenschappen toegepast worden bij MA-verpakte aardbeien.

2. Doelstelling

Het doel van dit project is de ontwikkeling van een verpakkingsmethodiek voor Nederlandse export aardbeien die gebaseerd is op een combinatie van gewijzigde gassamenstelling en toepassing van aardbei-eigen aromastoffen met schimmeligroei-werende activiteit. Het te ontwikkelen verpakkingsconcept moet de afzet van Nederlandse aardbeien op verre markten (Midden-Oosten, Verre-Oosten) faciliteren.

3. Resultaten

3.1 *In vitro* testen van geselecteerde stoffen

In de eerste fase moet een selectie gemaakt worden van de meest veelbelovende *green chemicals*. Verder moet onderzoek verricht worden aan een applicatie-techniek van *green chemicals* voor toepassing in kleinverpakkingen. Bij de selectie is gestart met een panel van 21 potentieel interessante vluchtige aardbei-stoffen (zie tabel 1). Stoffen zijn in dit panel opgenomen vanwege een goede algemene anti-schimmel-werking en/of het bezit van typische aardbei-geur-karakteristieken.

Werkwijze

In de eerste serie experimenten is het effect van totaal 21 stoffen (zie tabel 1) getest op de *in vitro* groei van *Botrytis cinerea* A2 en *Rhizopus stolonifer* A1. Beide schimmels zijn geïsoleerd van Nederlandse aardbeien (Elsanta) en geïdentificeerd door het Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS, Baarn).

Mout Extract Agar (MEA) platen zijn beënt met 5 µl sporen suspensie met een dichtheid van 2×10^4 sporen/ml. Op de deksel is een horlogeglas geplaatst waarin 10 µl van de teststof is aangebracht. Na afsluiting met speciale seal-ringen worden de platen geïncubeerd bij een temperatuur van 10°C. Tijdens incubatie is de vertraging van kieming van sporen gemeten door microscopische analyse van de sporen op de voedingbodem. Verder is gedurende 25 dagen de radiale groei van de mycelium matten gemeten. Alle metingen zijn in drie-voud uitgevoerd.

Bespreking van de resultaten

Van alle geteste stoffen (21 in totaal) vertonen 15, in meer of mindere mate, een remmende werking op de kieming van conidia van *B. cinerea* en *R. stolonifer* (zie tabel 1). Dezelfde 15 stoffen veroorzaken een verlenging van de aanloopfase van lineaire groei. Dit laatste is gedefinieerd als de tijd die de schimmel onder de gegeven omstandigheden nodig heeft om na beënting tot lineaire mycelium groei te komen. Ter illustratie wordt in figuur 1 de groei van *B. cinerea* en *R. stolonifer* in aanwezigheid van hexyl-acetaat getoond. Duidelijk is te zien dat bij deze temperatuur (10°C) beide schimmels ongeveer even snel groeien (Fig 1). In aanwezigheid van hexyl-acetaat wordt het moment waarop radiale groei van *R. stolonifer* kan worden waargenomen met 9 dagen uitgesteld. Radiale groei van *B. cinerea* wordt in aanwezigheid

van hexyl-acetaat 12 dagen uitgesteld. Beide schimmels worden dus gedurende enige dagen effectief onderdrukt door damp van hexyl acetaat. De uiteindelijk bereikte lineaire groeisnelheid wordt nauwelijks beïnvloed door de vluchtige stof. Experimenten zoals beschreven zijn uitgevoerd voor in totaal 21 aardbei-eigen vluchtige stoffen. Tabel 1 geeft een overzicht van de resultaten van deze experimenten.

Conclusie

Op basis van deze *in vitro* screening zijn van de 15 stoffen met anti-schimmel activiteit, 8 stoffen geselecteerd die een duidelijke remming geven van de kieming van conidia van *B. cinerea* en *R. stolonifer* en die een verlenging van de aanloopfase van lineaire groei veroorzaken. Deze stoffen zijn: ethyl hexanoate, methyl hexanoate, hexyl acetate, 1-hexanol, E-2-hexenal, Z-3-hexen-1-ol, 2-nonanone, methyl-*trans*-cinnamaat.

3.2 In vitro dosis effect relatie van 8 geselecteerde stoffen

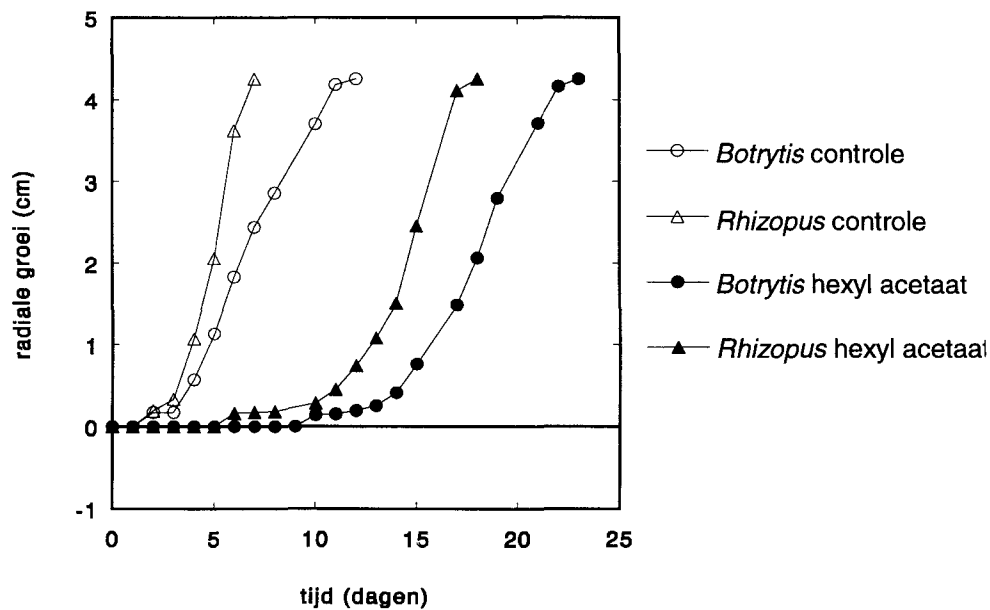
Het effect van de 8 geselecteerde stoffen (ethyl hexanoate, methyl hexanoate, hexyl acetate, 1-hexanol, E-2-hexenal, Z-3-hexen-1-ol, 2-nonanone, methyl-*trans*-cinnamaat) op de *in vitro* groei van *B. cinerea* A2 en *R. stolonifer* A1 is getest bij 5 verschillende doseringen (0.5, 1, 2, 5 en 10 µl per petrischaal) en vergeleken met onbehandelde controles.

Werkwijze

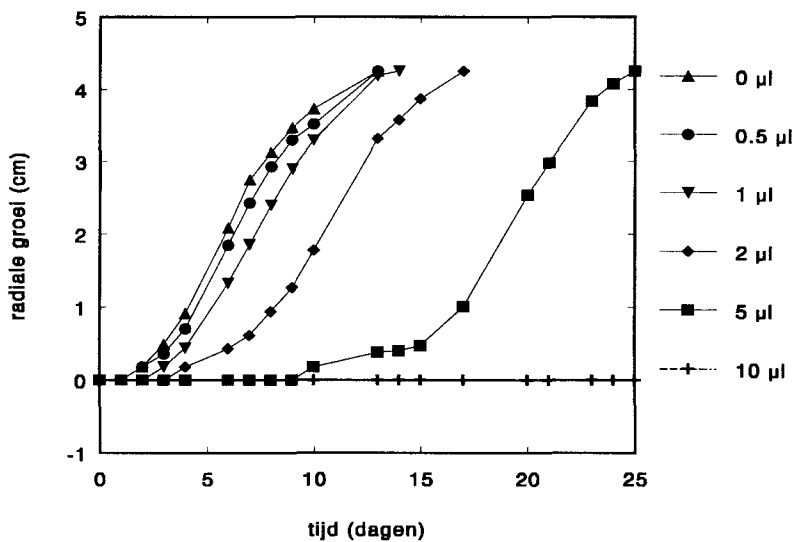
De schimmels zijn op Mout Extract Agar (MEA) geënt door 5 µl van een conidiën suspensie (20000 sporen/ml) midden op de plaat te brengen. De oliën zijn op een horlogeglas aangebracht waarna de schalen zijn gesloten met speciale sealringen. Vervolgens zijn de platen geïncubeerd bij 10°C en is dagelijks de diameter van het schimmel-mycelium opgemeten. De ontkieming van de conidia is gevolgd middels lichtmicroscopische waarneming. Alle experimenten zijn in drie-voud uitgevoerd en de resultaten worden als gemiddelde waarden gepresenteerd.

Bespreking van de resultaten

Het effect van 2-nonanone op de *in vitro* groei van *B. cinerea* A2 bij 10°C wordt getoond in figuur 2.. De hoogste dosering geeft volledige remming van de schimmel. Bij een dosering van 5 µl per plaat wordt de aanloopfase naar lineaire groei 14 dagen uitgesteld. Bij de laagste doseringen (0.5 µl en 1 µl)



Figuur 1. Effect van hexyl acetaat op *in vitro* groei van *Botrytis cinerea* A2 en *Rhizopus stolonifer* A bij 10°C.



Figuur 2. Dosis afhankelijk effect van 2-nonanone op *in vitro* groei van *B. cinerea* A2 bij 10°C.

Tabel 1. Vertraging van de ontkieming en de lineaire groei van *B. cinerea* A2 en *R. stolonifer* A1 t.o.v. de controle bij behandeling met verschillende aardbei-eigen stoffen.

Olie	Ontkieming (dagen)		lineaire groei (dagen)	
	R. stolonifer	B. cinerea	R. stolonifer	B. cinerea
Ethyl hexanoate	4	5	7	8
Methyl hexanoate	4	4	6	6
Hexyl acetate	4	8	9	12
Ethyl propionate	0	0	1	0
Benzaldehyde	>24	>24	>24	>24
1-Hexanol	>24	4	>24	8
E-2-hexenal	>24	>24	>24	>24
Z-3-hexen-1-ol	>24	2	>24	3
2-nonanone	>24	>24	>24	>24
Benzyl benzoate	0	1	1	13
Ethyl-iso-butyrate	0	0	0	1
Ethyl-3-methyl-3-phenylglycidate	0	0	0.5	1
Ethyl(±)-3-phenylglycidate	0	1	0.5	1.5
Methyl- <i>trans</i> -cinnamate	>24	5	>24	a
Methyl-propionate	0	0	0	0.5
Phenethyl butyrate	0	1	2	3
3-Phenylpropyl-iso-valerate	0	0	2	1
Piperonyl acetate	0	0	0.5	0
4-hydroxy-2.5-dimethyl-3(2H)-furanone	0	0	0	0
Hexyl-3-methyl-butanoate	0	0	4.5	3
Maltyl-iso-butyrate	0	0	0	0

a) alleen kieming, geen groei.

Tabel 2. Dosis afhankelijk effect van 8 geselecteerde aardbei-eigen stoffen op de ontkieming en de lineaire groei van *B. cinerea* A2 en *R. stolonifer* A.

Olie	Volume	Ontkieming (dagen)		Lineaire groei (dagen)	
		R. stolonifer	B. cinerea	R. stolonifer	B. cinerea
ethyl hexanoaat	0.5	0	0	0.5	0
	1	0	0	0.5	0
	2	0	0	2	0.5
	5	2	2	7	4
	10	5	5	9	8.5
methyl hexanoaat	0.5	0	0	0.5	0
	1	0	0	1	0
	2	0	0	2	0
	5	5	1	5	1
	10	5	3	10	5.5
hexyl acetaat	0.5	0	0	1	1
	1	1	0	2	1.5
	2	2	1	5	2
	5	5	3	10	5
	10	>20	9	>20	12
methyl-trans-cinnamaat	0.5	1	2	99	8
	1	1	2	5.5	a
	2	3	3	5.5	a
	5	3	3	a	a
	10	>20	5	>20	a

a) alleen kieming, geen groei.

Tabel 2. (vervolg). Dosis afhankelijk effect van 8 geselecteerde aardbei-eigen stoffen op de ontkieming en de lineaire groei van *B. cinerea* A2 en *R. stolonifer* A.

Olie	Volume	Ontkieming (dagen)		Lineaire groei (dagen)	
		R. stolonifer	B. cinerea	R. stolonifer	B. cinerea
1-hexanol	0.5	0	0	1	0
	1	1	0	1.5	0
	2	1	1	2.5	1
	5	3	2	6	2.5
	10	>20	3	>20	7
<i>trans</i> -2-hexenal	0.5	6	7	6	7.5
	1	>20	>20	>20	>20
	2	>20	>20	>20	>20
	5	>20	>20	>20	>20
	10	>20	>20	>20	>20
2-nonanone	0.5	1	0	1.5	0.5
	1	2	1	2	1
	2	2	2	5	4
	5	9	8	14	12.5
	10	>20	>25	>20	>25
<i>cis</i> -3-hexen-1-ol	0.5	0	0	0.5	0
	1	0	0	0.5	0
	2	1	0	1	0
	5	2	1	2.5	1
	10	3	2	5	2

wordt een gering effect op de lineaire groei van *B. cinerea* waargenomen.

Een overzicht van de resultaten is gegeven in tabel 2. Methyl-*trans*-cinnamaat, *trans*-2-hexenal en 2-nonanone geven bij de laagste dosering (0.5 µl/plaat) nog vertraging van de ontkieming van conidia van *R. stolonifer*. Van deze drie stoffen heeft alleen methyl-*trans*-cinnamaat bij de laagste dosering ook een meetbaar effect op *B. cinerea*. Alle 8 geteste stoffen vertragen al bij de laagste dosering de aanloop naar lineaire groei van *R. stolonifer*. Hexyl-acetaat, methyl-*trans*-cinnamaat, *trans*-2-hexenal, en 2-nonanone hebben bij de laagste dosering een vergelijkbaar effect op *B. cinerea*.

Conclusie

Bij de hoogste dosering hebben alle geteste stoffen een remmende werking op beide schimmels. In alle gevallen is *R. stolonifer* gevoeliger dan *B. cinerea*. De laagste schimmelgroei-remmende activiteit wordt gemeten met *cis*-3-hexenol. Van alle geteste stoffen vertoont *trans*-2-hexenal de hoogste activiteit.

3.3 In situ activiteit van 8 geselecteerde stoffen

In de volgende serie experimenten worden aardbeien van verschillende herkomsten (zie tabel 3) in plastic containers (inhoud 20 liter) geplaatst en bewaard in aan- en afwezigheid van de 8 geselecteerde aardbei-eigen stoffen met anti-schimmelwerking. Per container wordt 1,5 kg product gebruikt. Na het aanbrengen van de bio-actieve stoffen worden de containers gesloten (tape) en geplaatst in bij 10°C. Na 13 dagen worden de containers geopend en wordt de mate van schimmelaantasting op de vruchten en de kroontjes bepaald. Verder wordt vastgesteld of de behandeling schade geeft aan de vruchten (uiterlijk, necrose, stevigheid). Bij het eerste experiment in deze serie is alle teststoffen 300 µl op dragermateriaal in de containers gebracht, verdeeld over porties van 100 µl.

Bespreking van de resultaten

Bij de controle behandeling vinden we na 13 dagen bewaring bij 10°C dat 65% van de vruchten geheel of gedeeltelijk is aangetast door schimmelgroei (zie Fig. 3). Ethyl hexanoaat (eh) en methyl-*trans*-cinnamaat (mtc) geven nauwelijks een verlaging van de schimmelaantasting te zien. Een gedeeltelijk onderdrukking van de schimmelaantasting wordt gevonden met methyl hexanoaat (mh) en hexyl acetaat (ha). Hexanol (h), *trans*-2-hexenal (th), *cis*-3-hexenol en 2-nonanone geven onder deze omstandigheden volledige onderdrukking van schimmelgroei. Vergelijkbare effecten werden

waargenomen op de kroontjes van de vruchten.

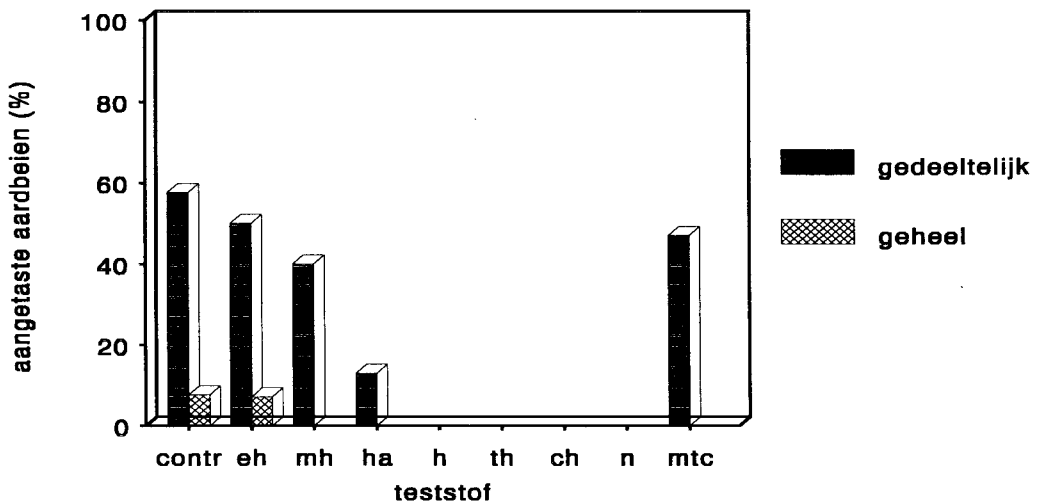
Bij deze (hoge) dosering worden i.a.v. hexyl acetaat, hexanol, *trans*-2-hexenal, *cis*-3-hexenol en 2-nonanone fytoxische effecten op de vruchten waargenomen (verkleuring, slap worden).

Conclusie

Alle geteste stoffen m.u.v. ethyl hexanoaat en methyl-*trans*-cinnamaat vertonen *in situ* schimmelgroei-remmende werking. Bijkomende fytoxische effecten treden op en de dosis afhankelijkheid van deze fytoxische effecten zal in relatie tot de schimmelgroei-remmende werking verder worden uitgezocht.

Tabel 3. Herkomst aardbei-materiaal voor eerste serie experimenten lopend van maart 1997 tot en met november 1997.

<i>Herkomst</i>	<i>Plaats</i>	<i>Data trials</i>	<i>ras</i>	<i>teelt</i>
H. Donkers	Someren	1-7-'97	Elsanta	VG en Su
W. van Aert	Rijsbergen	17-4-'97 30-9-'97 1-10-'97	Elsanta	Glas
W. van de Broek	Sprundel	23-5-'97	Elsanta	Glas
J. de Regt	Etten-Leur	26-3-'97 4-06-'97	Elsanta	Glas
A. van de Berg	Rijsbergen	volgende seizoen	Elsanta	VG



Figuur 3. Effect van 8 verschillende aardbei-eigen stoffen op schimmel-groei Elsanta (trial d.d. 26-3-1997).

3.4 In situ dosis-effect relatie van 8 geselecteerde stoffen

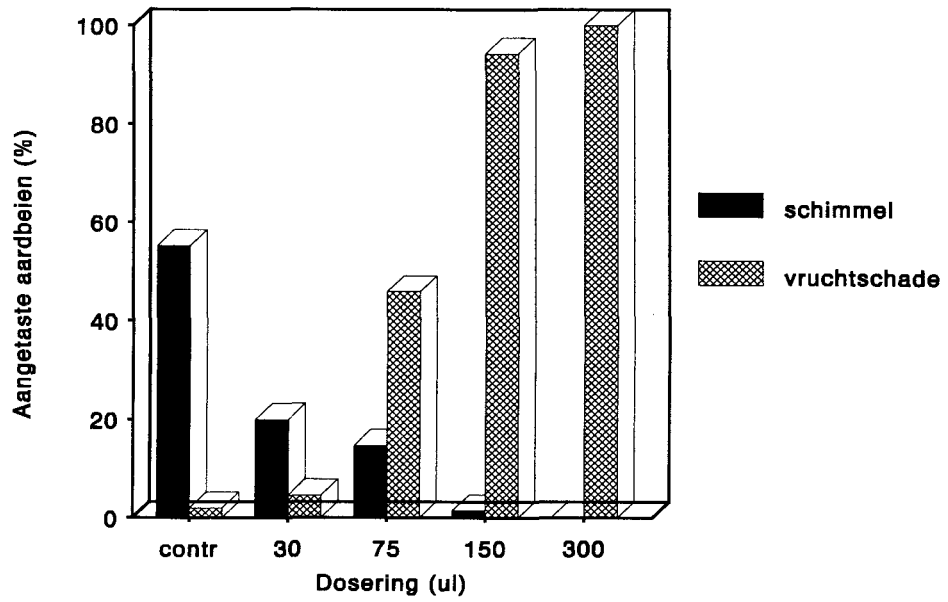
Bij de drie volgende experimenten zijn voor methyl hexanoate, hexyl acetate, 1-hexanol, E-2-hexenal, Z-3-hexen-1-ol en 2-nonanone de volgende doseringen toegepast: 0 µl/bak, 30 µl/bak, 75 µl/bak, 150 µl/bak, 300 µl/bak. Ethyl hexanoate en methyl-*trans*-cinnamaat zijn vanwege op grond van de resultaten beschreven in § 3.3. hoger gedoseerd: 0 µl/bak, 300 µl/bak, 600 µl/bak, 900 µl/bak, 1200 µl/bak. Per container zijn steeds 1.5 kg aardbeien behandeld. Bewaring vond plaats bij 10°C, gedurende 9-12 dagen. De onbehandelde controle is in drie-voud uitgevoerd.

Bespreking van de resultaten

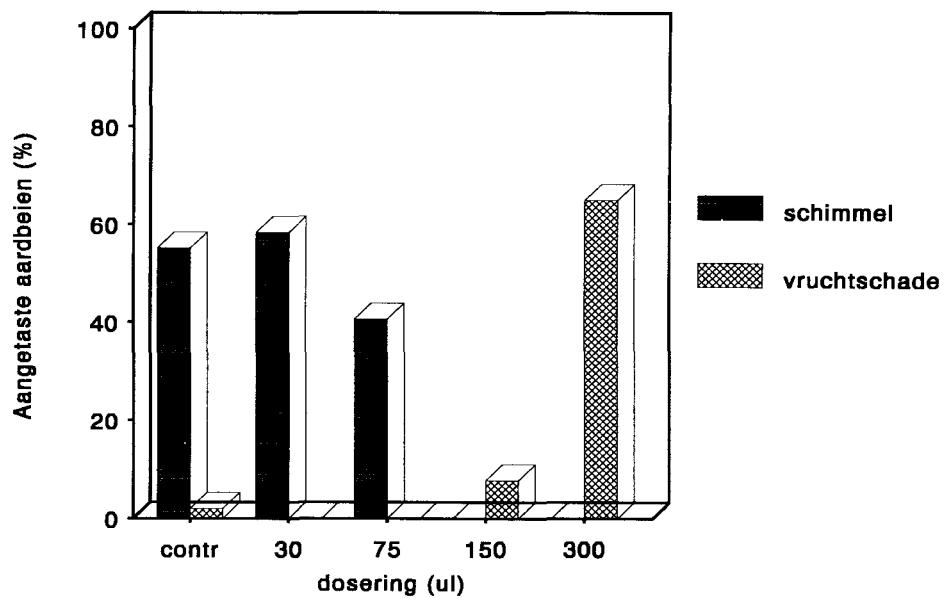
Na 12 dagen incubatie zijn de containers geopend en zijn de vruchten beoordeeld op uiterlijk, vrucht-schade en schimmelgroei. De hoogste doseringen geven in alle gevallen afwijkingen aan het uiterlijk van de vruchten (zie tabel 4). Hexyl acetaat geeft bij 150 µl/20 L een normaal beeld. De grens voor afwijkingen ligt voor 2-nonanone, methyl hexanoaat, 1-hexanol en E-2-hexenal bij 75 µl/20 L. Cis-3-hexenol is alleen bij de laagste dosering niet fytotoxisch. De minder effectieve stoffen voor wat betreft anti-schimmelwerking geven ook minder schade aan de vruchten.

Tabel 4. Uiterlijk van aardbeien na behandeling met verschillende dosis aardbei-eigen schimmelgroei-remmende stoffen (trial 17-4-'97). ++ is normaal (helder rood en glans), + is afwijking van normaal, - sterk afwijkend uiterlijk. Duur bewaring: 12 dagen.

Stof	Dosis (µl/20 liter)							
	0	30	75	150	300	600	900	1200
ethyl hexanoaat	++				++	+	-	-
hexyl acetaat	++	++	++	++	+			
2-nonanone	++	++	++	+	-			
m-t-cinnamaat	++				++	++	++	+
methyl hexanoaat	++	++	++	+	-			
1-hexanol	++	++	++	+	+			
E-2-hexenal	++	++	++	+	+			
c-3-hexenol	++	++	+	+	+			



Figuur 4. Effect van 2-nonanone op schimmelaantasting en vruchtschade bij Elsanta, bewaard bij 10°C, gedurende 12 dagen. De dosering is per 20 liter container. Trial 17-4-1997.



Figuur 5. Effect van E-2-hexenal op schimmelaantasting en vruchtschade bij Elsanta, bewaard bij 10°C, gedurende 12 dagen. trail 17-04-97.

Alle geteste stoffen m.u.v. methyl-*trans*-cinnamaat hebben bij de hoogste dosering een schimmelgroei-remmende werking. Figuur 4 laat zien dat 2-nonanone bij 150 µl/20 L de schimmelgroei bijna volledig onderdrukt. Bij deze dosering zien we echter dat bijna alle vruchten schade oplopen tengevolge van de behandeling. Bij de laagste dosering echter is de schade minimaal, terwijl nog steeds een reductie van de schimmelgroei van 65% wordt gehaald. Figuur 5. laat zien dat *trans*-2-hexenal bij een dosering van 150 µl/20 L volledige onderdrukking van de schimmelgroei geeft. Bij deze dosering zien we tevens dat schade aan de vruchten minimaal is.

Dit experiment is in deze opzet gedurende het lopende aardbeien-seizoen 3 keer uitgevoerd (17 april, 23 mei en 4 juni). Bij het tweede experiment is de bewaarduur verkort tot 10 dagen en bij de laatste serie is 9 dagen bewaard. Ten aanzien van het effect van de behandeling op het uiterlijk komt in alle drie herhalingen globaal hetzelfde beeld tevoorschijn. De totale volgorde op basis van het uiterlijk (kleur en glans) met toenemende afwijkingen is: m-t-cinnamaat < ethyl hexanoaat < methyl hexanoaat < hexyl acetaat < 1-hexanol = E-2-hexenal = c-3-hexenol < 2-nonanone. Het minste effect op het uiterlijk heeft methyl-*trans*-cinnamaat. Deze stof heeft *in situ* (op de aardbei) echter geen of nauwelijks schimmelgroei-remmende werking en valt om die reden af voor verder onderzoek. De reden is waarschijnlijk dat deze stof een te lage dampspanning geeft bij 10°C (vaste stof).

Een vergelijking van de *in situ* schimmelgroei-remmende activiteiten van de 8 geselecteerde stoffen levert het volgende beeld op (tabel 7). De stoffen kunnen met een toenemende mate van *in situ* schimmelgroei-remmende activiteit als volgt gerangschikt worden: Methyl-*trans*-cinnamaat < methyl hexanoaat = cis-3-hexenol < ethyl hexanoaat < hexyl acetaat < E-2-hexenal < 2-nonanone. Dit beeld komt sterk overeen met de rangorde van fytotoxiciteit (zie tabel 9). Dat wil zeggen dat stoffen met een sterk fytotoxisch effect in het algemeen ook een sterke schimmelgroei-remmende werking hebben (zie tabel 8).

Conclusie

In bovenstaande analyse is gekeken naar de schimmelgroei-remmende werking en de mate van fytotoxiciteit van een 8-tal aardbei-eigen stoffen bij toepassing tijdens bewaring bij 10°C in gesloten containers. Geen van de geanalyseerde stoffen combineert een hoge schimmelgroei-remmende werking met een lage fytotoxiciteit. Nonanone heeft bijvoorbeeld een zeer sterke schimmelgroei-remmende werking maar is ook de stof met de hoogste fytotoxiciteit. Daarom is het van belang om precies de range van doseringen aan te geven waarbij schimmelgroei-remming en fytotoxiciteit optreden. Tabellen 7 en 8 geven de gemiddelde waarden van de dosis-effect relaties

voor schimmelgroei-remmende werking en fytotoxiciteit van 8 geselecteerde stoffen. Vergelijking van deze tabellen laat zien dat doseringen die gedurende 10 tot 12 dagen onder de gegeven omstandigheden een volledige schimmelgroei-onderdrukkende werking hebben, altijd een zekere mate van vruchtschade zullen veroorzaken. Daarom moeten doseringen worden gevonden die weinig of geen vruchtschade geven en daarbij voldoende (maar dus geen volledige) onderdrukking van de schimmelgroei geven. Figuren 6 en 7 laten zien dat bij lage doseringen van hexyl acetaat en 2-nonanone weinig of geen vruchtschade optreedt terwijl respectievelijk 32% en 97% schimmelonderdrukking optreedt.

Gebaseerd op deze analyse zijn 2-nonanone, hexyl acetaat en methyl hexanoaat geselecteerd voor verder onderzoek.

4. Planning

In de periode november - december 1997 wordt nagegaan of 2-nonanone, hexyl acetaat en methyl hexanoaat, zowel apart als in combinatie, toegepast kunnen worden voor schimmel-groei onderdrukking op aardbeien. Hierbij worden naast de gebruikelijke analyses, de gasfaseconcentraties van de toegepaste stoffen gemeten en vergeleken met hun effect op schimmellgroei. Verder wordt de diffusie van 2-nonanone, hexyl acetaat en methyl hexanoaat door geselecteerde verpakkingsfolies gemeten teneinde na te gaan of deze materialen geschikt zijn voor toepassingen met vluchtige aardbei-eigen stoffen.

Voor een optimaal schimmelgroei-remmende werking zullen de aardbei-eigen *green-chemicals* uiteindelijk worden toegepast in combinatie met een gewijzigde gassamenstelling (zie ATO-rapport B259). Daarom zal in de volgende verslagperiode een begin worden gemaakt met gas-analyses van de bewaaratmosfeer.

Tabel 5. Uiterlijk van aardbeien na behandeling met verschillende dosis aardbei-eigen schimmelgroei-remmende stoffen (trial 23-5-'97). ++ is normaal (helder rood en glans). + is afwijking van normaal, - sterk afwijkend uiterlijk. Duur bewaring: 10 dagen.

Stof	Dosis (μ l/20 liter)							
	0	30	75	150	300	600	900	1200
ethyl hexanoaat	++				++	-	-	-
hexyl acetaat	++	++	++	++	-			
2-nonanone	++	++	+	-	-			
m-t-cinnamaat	++				++	++	++	++
methyl hexanoaat	++	++	++	++	++			
1-hexanol	++	++	++	-	-			
E-2-hexenal	++	++	++	-	-			
c-3-hexenol	++	++	++	++	-			

Tabel 6. Uiterlijk van aardbeien na behandeling met verschillende dosis aardbei-eigen schimmelgroei-remmende stoffen (trial 4-6-'97). ++ is normaal (helder rood en glans). + is afwijking van normaal, - sterk afwijkend uiterlijk. Duur bewaring: 9 dagen.

Stof	Dosis (μ l/20 liter)							
	0	30	75	150	300	600	900	1200
ethyl hexanoaat	++				++	+	-	-
hexyl acetaat	++	++	++	+	-			
2-nonanone	++	++	++	+	-			
m-t-cinnamaat	++				++	++	++	+
methyl hexanoaat	++	++	++	++	+			
1-hexanol	++	++	++	+	-			
E-2-hexenal	++	++	++	+	-			
c-3-hexenol	++	++	++	+	-			

Tabel 7. Dosis-effect relatie voor de schimmelgroei-remmende werking van 8 geselecteerde aardbei-eigen stoffen. Samenvatting trials op 17-4-1997, 23-5-1997 en 4-6-1997. De getallen geven de minimale dosering per container (20L) met volledige onderdrukking van schimmelgroei.

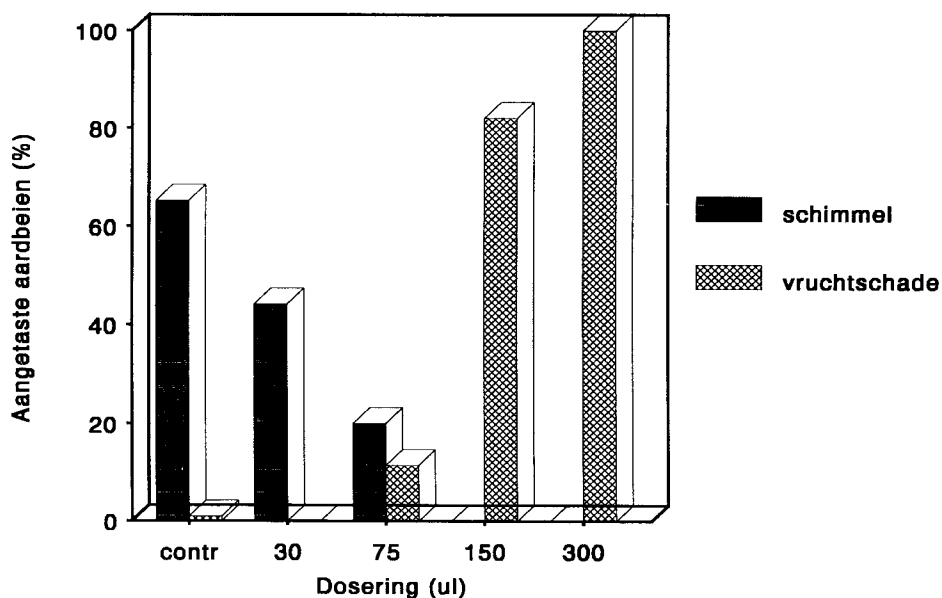
Stof	Trial datum			Gemiddelde
	17 april	23 mei	4 juni	
ethyl hexanoaat	600	900	600	700
hexyl acetaat	300	300	150	250
2-nonanone	150	150	30	110
m-t-cinnamaat	>1200	>1200	>1200	>1200
methyl hexanoaat	>300	>300	300	>300
1-hexanol	150	150	150	150
E-2-hexenal	150	300	75	175
c-3-hexenol	>300	>300	300	>300

Tabel 8. Dosis-effect relatie voor de fytoxiciteit van 8 geselecteerde aardbei-eigen stoffen. Samenvatting trials op 17-4-1997, 23-5-1997 en 4-6-1997. De getallen geven de laagste dosering per container (20L) waarbij juist geen vruchtschade optreedt die hoger is dan bij de controle behandeling.

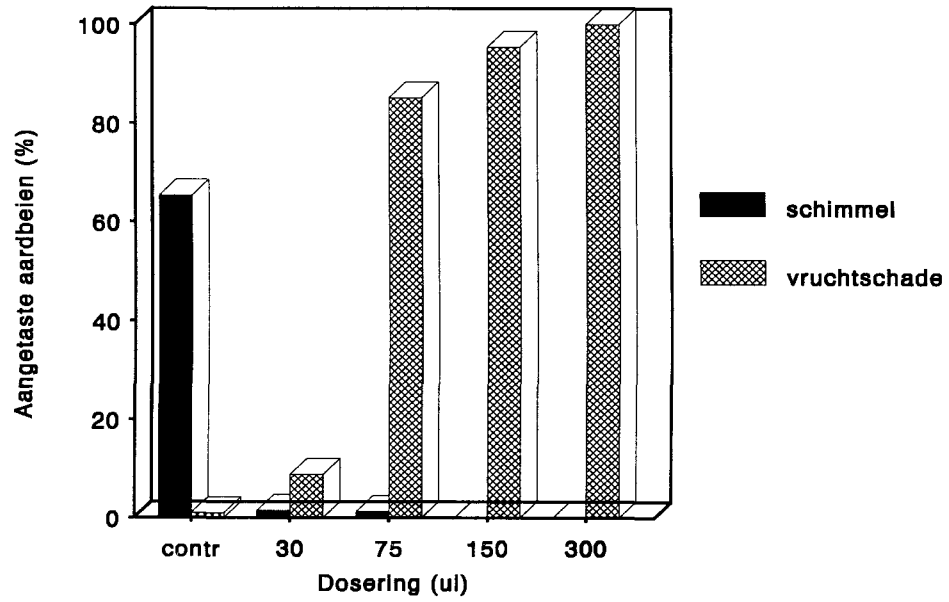
Stof	Trial datum			Gemiddelde
	17 april	23 mei	4 juni	
ethyl hexanoaat	<300	300	300	150-300
hexyl acetaat	75	75	30	60
2-nonanone	30	30	30	30
m-t-cinnamaat	>1200	>1200	>1200	>1200
methyl hexanoaat	150	150	150	150
1-hexanol	75	30	30	45
E-2-hexenal	75	75	30	60
c-3-hexenol	75	75	30	60

Tabel 9. Vergelijking rangorde ten aanzien van schimmelgroei-remmende werking en fytoxiciteit van 8 geselecteerde aardbei-eigen stoffen. Samenvatting trials op 17-4-1997, 23-5-1997 en 4-6-1997. Des te hoger het getal, des te hoger de anti-schimmelwerking of fytoxiciteit.

Stof	Rangorde nummer	
	anti-schimmel	fytoxiciteit
2-nonanone	8	8
1-hexanol	7	7
E-2-hexenal	6	4-6
hexyl acetaat	5	4-6
ethyl hexanoaat	4	2
methyl hexanoaat	2-3	3
c-3-hexenol	2-3	4-6
m-t-cinnamaat	1	1



Figuur 6. Effect van hexyl acetaat op schimmelaantasting en vruchtschade bij Elsanta. Bewaring bij 10°C. De doserig is gegeven per container (20 L). Trial 4-6-1997.



Figuur 7. Effect van 2-nonanone op schimmelaantasting en vruchtschade bij Elsanta. Bewaring bij 10°C. De dosering is gegeven per container (20 L). Trial 4-6-1997.

5. Confrontatie met de fasering

De uitvoering van het project loopt geheel volgens planning. Het werk in de eerste fase is voor een groot deel afgerond (taken 1, 2, 3, 4). Een ander deel wordt aan gewerkt en zal in januari 1998 gerapporteerd worden (taken 5, 6, 7, 8 en 9). Bij alle nu uitgevoerde testen is gebruik gemaakt van een drager materiaal op papierbasis. Testen met materialen op zetmeel basis zullen in de eerste helft van 1998 worden uitgevoerd. De verkregen proefresultaten maken het mogelijk om in januari 1998 een duidelijke keuze te maken voor 1-3 actieve aardbei-eigen stoffen (*green chemicals*) met schimmelgroei-remmende werking die bij de laagste effectieve dosis geen negatieve bijwerkingen hebben op smaak, geur en stevigheid. Verder is het gebruikte dragermateriaal geschikt voor de applicatie van de geselecteerde aardbei-eigen stoffen. In de volgende fase worden andere dragermaterialen getest en vergeleken met het materiaal op papier-basis.

Tabel 10. Overzicht van de fasering van de taken beschreven in § 4.4.5. van het projectvoorstel. Arcering van de blokken geeft aan dat taken zijn uitgevoerd of dat er aan gewerkt wordt.

Fase	Taak	1997		1998		1999	
		1° helft	2° helft	1° helft	2° helft	1° helft	2° helft
1	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
2	8						
	9						
	10						
	11						
	12						
3	13						
	14						
	15						
	16						
	17						

6. Literatuur referenties

Gorris, L.G.M. and Smid, E.J. 1995. Crop protection using natural antifungal compounds. *Pesticide Outlook*, 6: 20-24.

Oosterhaven, K., Poolman, B. and Smid, E.J. 1995. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteriostatic compound. *Ind. Crops and Prod.* 4: 23-31.

Peréz, A.G., Rios, J.R., Sanz, C. and Olfas, J.M. 1992. Aroma components and free amino acids in strawberry variety Chandler during ripening. *J. Agr. Food Chem.* 40: 2232-2235.

Perkins-Veazie, P. and Collins, J.K. 1995. Strawberry fruit quality and its maintenance in postharvest environments. *Advances in Strawberry Research*, 14: 1-8.

Pesis, E. and Avissar, I. 1990. Effect of postharvest application of acetaldehyde vapour on strawberry decay, taste and certain volatiles. *J. Sci. Food Agric.* 52: 377-385.

Smid, E.J., De Witte, Y. and Gorris, L.G.M. 1995. Secondary plant metabolites as control agents of postharvest *Penicillium* rot on tulip bulbs. *Postharvest Biol. Technol.* 6: 303-312.

Smid, E.J., Hendriks, L., Boerrigter, H.A.M. and Gorris, L.G.M. 1996a. Surface disinfection of tomatoes using the natural plant compound *trans*-cinnamaldehyde. *Postharvest Biol. Technol.* 9: 343-350

Smid, E.J., Koeken, J.P.G. and Gorris, L.G.M. (1996b) Fungicidal and fungistatic action of the secondary plant metabolites cinnamaldehyde and carvone. In: H. Lyr, P.E. Russell and H.D. Sisler (Editors) *Modern fungicides and antifungal compounds*, Intercept Ltd. Andover, Hants, UK, pp. 173-181.

Vaughn, S.F., Spencer, G.F. and Shasha, B.S. 1993. Volatile compounds from raspberry and strawberry fruit inhibit postharvest decay fungi. *J. Food Sci.* 58: 793-796.