

**ONDERZOEKACTIVITEITEN “REDUCTIE INWENDIGE
AFWIJKINGEN IN CONFERENCE-PEREN”.**

Periode oktober 1996-januari 1997

Vertrouwelijk

**A.C.R. van Schaik (projectleider)
R.H. Veltman
H.W. Peppelenbos
S.A. Robot**

Onderzoek in opdracht van:

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

Onderzoekuitvoering door:

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

Samenvatting

In het onderzoek naar reductie van hol en bruin in CA-bewaring van Conference-peren in de tweede helft van 1996 zijn peren van dezelfde herkomsten opgeslagen die ook in het vorige seizoen gebruikt zijn. De peren zijn opgeslagen in 0, 0.5 en 3% CO₂ in combinatie met 0.5, 1 en 2 % zuurstof. Maandelijks wordt de hoeveelheid hol en bruin vastgesteld en worden kwaliteitsmetingen uitgevoerd. Het blijkt dat bij 3% CO₂ bruin snel tot ontwikkeling komt gevolgd, door hol. Opvallend was dat hol vooral tijdens de nabewaring in 18°C tot expressie kwam. Verder bleek een duidelijke interactie tussen hoog CO₂ en laag O₂ qua hol en bruinontwikkeling. Namelijk bij zowel laag CO₂ gehalte (0.2 %) als laag O₂ vooral (0.5%) trad ook schade op, wat de mogelijkheden voor bewaring in lagere zuurstofgehalten uitsluit. Het onderzoek sluit aan op het onderzoek op het FPO waar hogere zuurstofgehalten getoetst worden. Met peren van 3 pluktijdstippen werd onderzoek gedaan naar de respiratie en diffusie eigenschappen. Peren van de derde pluk werden in een complete reeks O₂ en CO₂ gehalten bewaard voor een compleet respiratiemodel. Het bleek dat bij lage zuurstofgehalten duidelijk fermentatieve CO₂ productie optrad in tegenstelling met peren die in het vorige onderzoek lang waren bewaard. Verder werd in een vergelijking tussen peren direct in CA en peren die 6 weken in normale luchtomstandigheden waren bewaard geconstateerd dat de diffusieweerstand bij de luchtbewaarde peren veel lager was. Dit verklaart mogelijk de mindere gevoeligheid van deze peren voor de schade. Er was geen duidelijk verschil in ademhaling en diffusie tussen de peren van de 3 pluktijdstippen. Wel bleek de porositeit te verminderen bij latere pluk.

Voor de kleinere experimenten tijdens het seizoen werden peren opgeslagen in niet schadelijke condities. Met deze peren is in al dan niet schadelijke condities onderzoek gestart naar de membraanafbraak van de cellen, het zogenaamde decompartmentalisatie proces. In dit onderzoek wordt uitgebreid de rol van natuurlijke antioxidanten bestudeerd als scavengers voor de vrije radicalen die de membranen aantasten. Er werd een methode ontwikkeld om vitamine C te meten met HPLC. In de schilregio waren de concentraties duidelijk hoger dan in de kern en de cortex. Verder werd bij een inductieexperiment geconstateerd dat vitamine C sterk gereduceerd wordt bij hoog CO₂. Bij afwezigheid van CO₂ in de bewaring vermindert het vitamine C gehalte ook door een lagere zuurstofgehalte. In niet schadelijke omstandigheden blijft het vitamine C gehalte op peil tijdens de bewaring. De rol van de natuurlijke antioxidanten krijgt in het verdere onderzoek een belangrijke nadruk als mogelijke oorzaak van de membraanafbraak.

In samenwerking met de KUN te Nijmegen is een start gemaakt om signaalstoffen te meten met de lasertechnologie die een verband hebben met membranen zoals ethaan en pentaan. Aangetaste peren vertoonden een hogere ethaan productie. Ook andere stoffen zoals malonaldehyde zullen in het vervolgonderzoek gemeten worden.

Verder kunnen met de lasertechnologie via continue detectie fermentatie producten gemeten worden die verband houden met de energiestatus van het produkt. Het tekort aan energie in schadelijk bewaaromstandigheden wordt mede als een oorzaak gezien van de schade. De combinatie van onderzoek naar de energie status (ATP), respiratie, diffusie, componenten in de citroenzuurcyclus en de membraandegradatie biedt mogelijkheden om in de naaste toekomst testmethoden te ontwikkelen voor de gevoeligheid van hol en bruin om peren in niet schadelijk omstandigheden te bewaren.

Inhoudsopgave	blz.
1.0 Inleiding	4
2.0 Produkt en bewaring	5
3.0 Model ontwikkeling hol en bruin bij diverse CA-omstandigheden	5
4.0 Membraanafbraak	8
4.1 Theorie	8
4.2 Antioxidanten	9
4.3 Signaalstoffen in relatie met membraanschade	11
5.0 Ademhaling en diffusie	12
5.1 Onderzoekuitvoering	12
5.2 Resultaten	13
6.0 Conclusies	17
6.1 Model hol-en bruinontwikkeling	17
6.2 Membraanafbraak	17
6.3 Ademhaling en diffusie	18
7.0 Verder onderzoek	18

1. Inleiding.

In het kader van de “Bijdrageregeling kwaliteits-projecten agrarische producten en productieprocessen” van het Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij alsmede de bijdrage van het Produktschap voor de Tuinbouw is het onderzoek “Reductie inwendige afwijkingen in Conference-peren” voortgezet.

Binnen het 3 jarige project wat samen met het FPO wordt uitgevoerd is het ATO-onderzoek officieel gestart op 1 januari 1996. De resultaten van het eerste halfjaar zijn beschreven in het ATO-rapport B251. Belangrijke resultaten waren dat onderzoek naar de biochemie van de bruinverkleuring niet leidde tot een duidelijk inzicht in de oorzaken van het probleem.

In het monitoringonderzoek bleek dat CO₂ waarschijnlijk de hoofdoorzaak van de schade is. Er werd een inductiemethode ontwikkeld voor hol en bruin. Binnen dit onderzoek bleken de opgehoopte fermentatieproducten acetaldehyde en ethanol niet direct de oorzaak voor de schadelijke afwijking.

Verder is met de ontwikkelde methoden voor diffusie- en porositeit vastgesteld dat de diffusie en porositeit verandert bij bewaring/rijping en toepassing van schadelijk bewaarcondities. Ook bleek dat door toepassing van een hoog percentage koolzuurgas de productie van ATP verminderde.

Het onderzoek naar de detectiemogelijkheden van hol en bruin had als resultaat dat met Röntgen betrouwbaar holle peren kunnen worden gedetecteerd. Ook is getracht met een speciale trillingstechniek nondestructief bruine peren te detecteren. De resultaten waren hoopgevend maar niet voldoende voor een betrouwbare methodiek.

In dit rapport worden de activiteiten beschreven vanaf september 1996 tot en met januari 1997.

Belangrijke onderzoekaspecten zijn:

- *Ademhalings- en diffusieonderzoek in relatie met het pluktijdstip*
- *Modelvorming van hol en bruin in lage O₂ en diverse CO₂-gehalten.*
- *Detectie signaalstoffen membraanafbraak*
- *Methodeontwikkeling en meting scavengers*

2. Produkt en bewaring

De Conference-peren die gebruikt zijn voor het onderzoek voor diverse kleinere experimenten gedurende het seizoen waren evenals in het vorige seizoen afkomstig van de twee locaties nl. uit Strijensas (SAS) en uit Zuid Beyerland (VELD). Beide herkomsten peren waren ook opgenomen in het onderzoek op het FPO en zijn geselecteerd op grond van de verschillende gevoeligheid voor inwendige afwijkingen. Peren van de herkomst SAS waren relatief gevoelig, VELD peren relatief ongevoelig. Van beide locaties werden peren geplukt op 3 tijdstippen. Het optimale pluktijdstip (2^e pluk) lag in 1996 op 18 september. De peren van pluk 1 waren van 11 september, de 3^e pluk van 25 september.

De peren werden na de pluk gehomogeniseerd, direkt ingekoeld en opgeslagen in "pallet CA-systeem aangesloten op een automatisch meet- en regelsysteem. De bewaartemperatuur was -1 °C. Na 1 week werden de CA-condities gerealiseerd: 0.5 % CO₂ in combinatie met 2% O₂ voor alle pluktijdstippen.

3.0 Model ontwikkeling hol en bruin bij diverse CA-omstandigheden

Om een betrouwbaar model voor hol en bruin te ontwikkelen en tevens specifiek de invloed van het zuurstofgehalte te toetsen werd een bewaarproef ingezet. Hierbij worden de lagere zuurstofgehalten getoetst op het ATO en de hogere O₂-gehalten op het FPO. Dit gebeurde met peren van beide genoemde locaties geplukt op het optimale pluktijdstip. De peren werden na 1 week inkoeling op CA-conditie gebracht en bewaard in het statische bewaarsysteem.

Proefschaam bewaring lage zuurstofgehalten.

CA-omstandigheden	O ₂	CO ₂
	0.5	0.1
	1	0.5
	2	3 (1 herhaling)

Herhalingen: 2

Controle: maandelijks

Kwaliteitsmetingen: penetrometerwaarde, kleur en visueel (hol en bruin)

Tijdstip: na 1 en 4 dagen nadat peren uit de bewaring gehaald zijn

Conditie nabewaring: 17° C, 70% rv.

Hoeveelheid: 15 peren per experimentele eenheid

De resultaten zijn uitgewerkt tot en met december zodat een voorlopige impressie gegeven kan worden. Vooralsnog zijn alleen de resultaten gegeven van de hol en bruinontwikkeling. Deze zijn samengevat in figuur 1 tot en met 4.

De hol-en bruinindex kan een maximale waarde hebben van 60: dit zijn de gesommeerde stadia.

Duidelijk is dat al in november sprake is van vooral bruinaantasting. De afwijking kwam in 1996 dus ook in meer reguliere bewaaromstandigheden snel tot stand. In december is de bruinaantasting al iets hoger dan in november. Voor hol geldt een ander patroon.

In november is nog nauwelijks sprake van de aantasting, in december echter wel. Opvallend is dat de mate van holheid duidelijk toeneemt als de peren worden nabewaard in de hoge temperatuur 18°C. Het is niet duidelijk wat de oorzaak hiervan is. Kennelijk wordt het bruine gedeelte in de vrucht omgezet in hol, omdat de bruinhoeveelheid iets daalt bij nabewaring.

De belangrijkste vraagstelling is wat de respectievelijke invloed van CO₂ en (laag) O₂ is op hol en bruin. Voor de bruinverkleuring is duidelijk dat hoog 3% CO₂ veel schade veroorzaakt.

Het belangrijkste is echter de interactie van het zuurstof en koolzuur. In respectievelijk 0.2 en 0.5% CO₂ is bij heel laag zuurstof de bruinverkleuring duidelijk iets meer ten opzicht van hogere zuurstofgehaltenterwijl ook de hoeveelheid hol iets toeneemt. Dit geeft aan dat de afwijking toeneemt naarmate het CO₂-gehalte hoger en/of het zuurstofgehalte lager is.

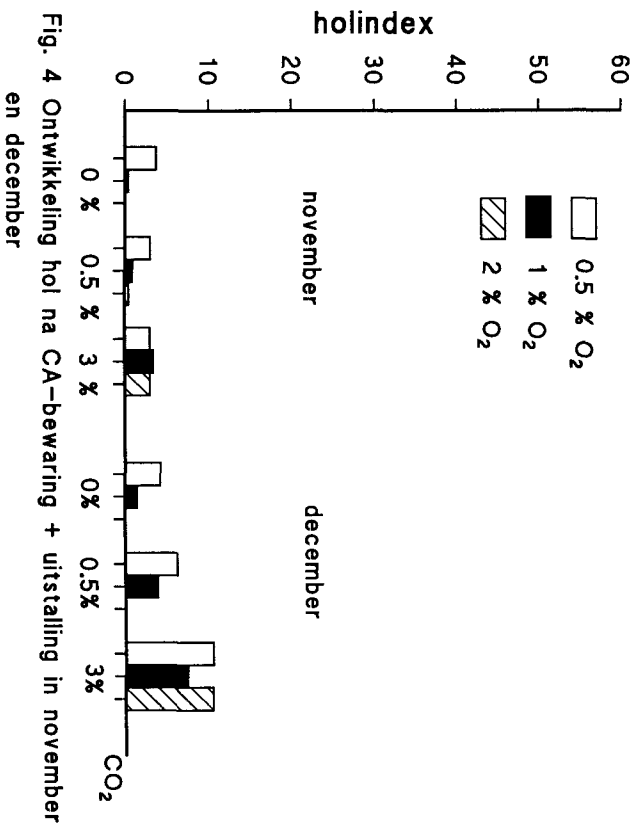
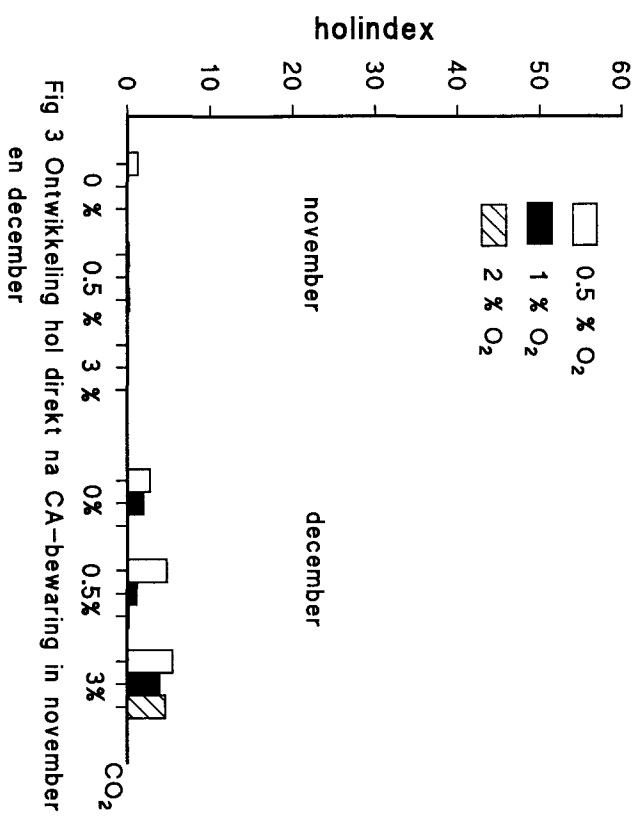
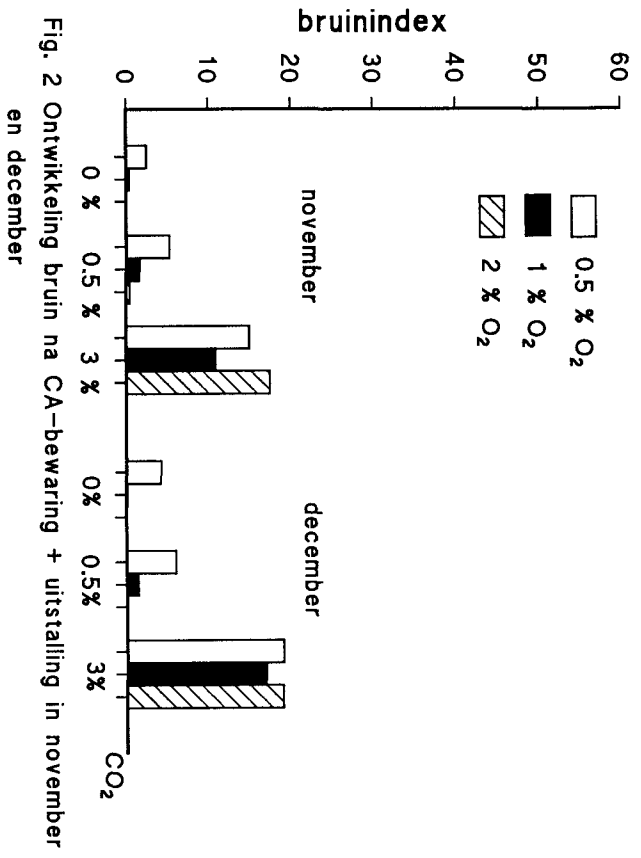
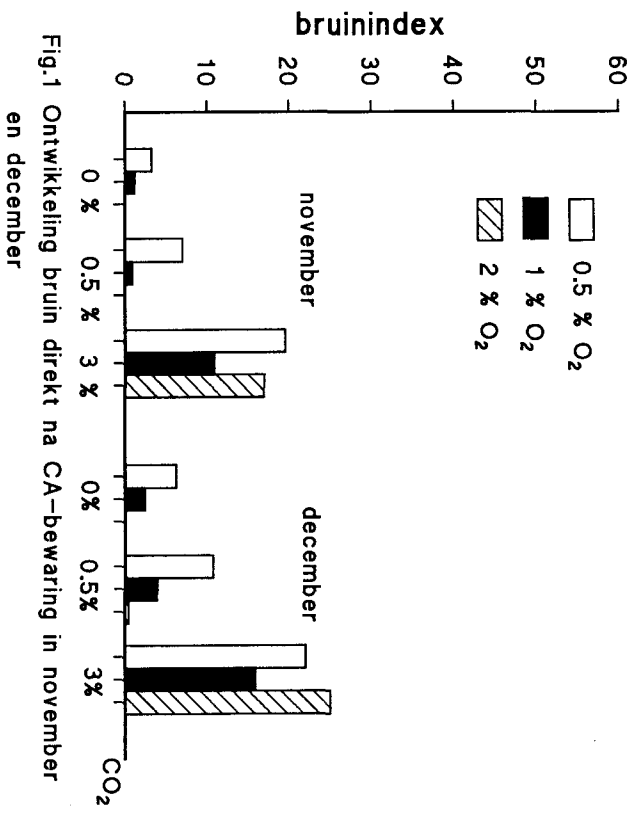
Zelfs bij zeer lage uitwendige CO₂ gehalten (0.2%) komt nog schade voor. Opgemerkt dient te worden dat de exogene concentratie is, endogeen kan de concentratie duidelijk hoger zijn.

In elk geval komt bij laag O₂ en bij hoog CO₂ bruin voor en ook bij de combinatie van laag O₂ en hoog CO₂. Omdat laag O₂ en hoog CO₂ beiden de ademhaling remmen, kan op basis hiervan naar een verklaring gezocht worden. De ademhaling is een bron van ATP (energie) dat verbruikt wordt voor allerlei processen zoals rijping, maar ook onderhoud. Een oorzaak vaaor bruinverkleuring zou kunnen zijn dat door laag O₂ en/of hoog CO₂ de totale energie productie zo laag wordt dat niet alleen de rijping geremd wordt, maar zelfs het onderhoud verstoord wordt. Dit leidt uitendelijk tot celschade en bruin weefsel. Waarom de peer dan enerzijds hol en anderzijds bruin wordt is nog een vraag. Dit geeft aan dat het ook noodzakelijk is om de relatie tussen het actuele O₂/CO₂ en de energieproductie en behoefte verder te ontrafelen.

Het actuele O₂/CO₂ niveau is een resultante van ademhalingssnelheid, diffusie, porositeit en aangelegde bewaaromstandigheden.

De resultaten geven ook aan dat bewaring van peren bij zeer lage zuurstofconcentraties vrijwel onmogelijk is. Het lijkt erop dat de praktische wens om peren nog langer te kunnen bewaren niet eenvoudig gerealiseerd kan worden. Dit zou alleen kunnen met peren die minder gevoelig zijn voor de schade. Dit kunnen vroeg geplukte partijen zijn maar ook partijen die geselecteerd met bepaalde testmethoden die nog ontwikkeld moeten worden binnen dit onderzoek.

Het onderzoek met de lage zuurstofgehalten gebeurt in combinatie met het FPO. Op het ATO worden de effecten van de lage zuurstofgehalten onderzocht op schade en kwaliteit, op het FPO wordt het verband met de hogere zuurstofgehalten nagegaan.



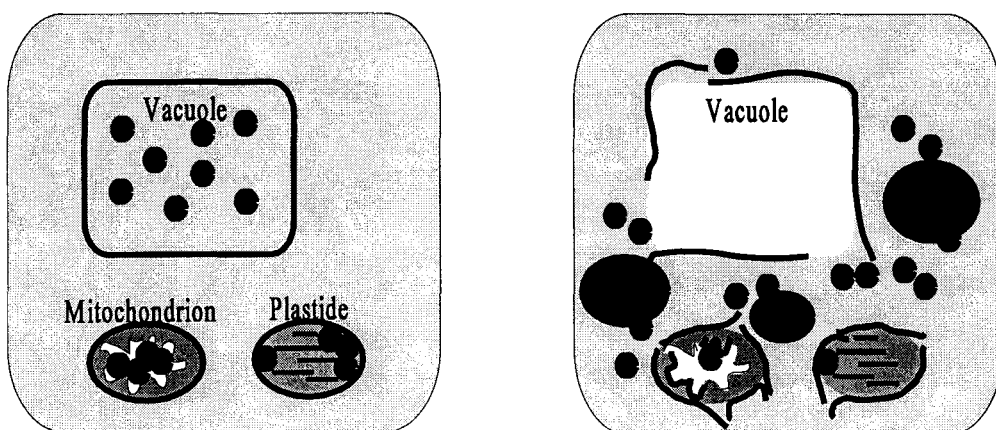
4.0 Membraanafbraak

4.1 Theorie

Zoals beschreven in het onderzoek van de 1^e helft 1996 leverde het biochemische onderzoek inzake bruinverkleuring geen verklaring op waarom de schade optreedt. Er was geen relatie tussen het totaal polyfenolgehalte (substraat) en de verantwoordelijke enzymen enerzijds en de bewaarconditie, herkomst, pluktijdstip anderzijds. Ook was er geen verband tussen polyfenolen/enzymen en de werkelijke bruinverkleuring in de peren. Waarom er geen verband is was niet geheel duidelijk. Belangrijk is waarschijnlijk dat de hoeveelheid enzymen en substraat enzymen niet limiterend zijn voor de mate van bruinverkleuring.

Belangrijker is het feit dat enzymen en polyfenolen in verschillende celorganellen zitten. Gaan deze kapot door membraanafbraak dan zal bruinverkleuring optreden. We noemen dit proces van het teloorgaan van celorganellen decompartmentalisatie.

De oorzaak voor decompartmentalisatie lijkt gezocht te moeten worden in factoren die membraanschade stimuleren. Vrije radicalen zijn stoffen die meestal geproduceerd worden bij stressomstandigheden waaraan het produkt is blootgesteld en tasten het weefsel aan en met name de membranen van de cel. De stoffen krijgen bij veroudering van weefsel meer en meer de kans schade aan te richten. De werking van vrije radicalen kan enzymatisch (Superoxidedismutase, Catalase en Peroxidase) dan wel non-enzymatisch (anti-oxidanten: vitamine C & E, glutathione) gestopt worden. Echter regeneratie en aanmaak van anti-oxidanten kost energie, die slechts beperkt voor handen is bij bewaring onder CA-condities. Het onderzoek aan membranen richt zich vooral op energiehuishouding, schade aan membranen en voorkoming hiervan. Het doel hierbij is het bruinwordingsproces te kunnen beschrijven vanuit CO_2/O_2 tijdens de bewaring tot en met decompartmentalisatie en 'hol en bruin' vorming. Hieruit kan in samenhang met de diffusie karakteristieken een nondestructieve voorspellings- en detectie methode voor hol en bruin gerealiseerd worden.



Figuur 5: Links, gezonde cel. Polyfenoloxidasen zijn gecompartmentaliseerd in de plastiden en mogelijk in de mitochondria. Polyfenolen zijn gecompartmentaliseerd in de vacuole. Rechts: decompartmentalisatie. Polyfenoloxidasen zetten polyfenolen om in verbindingen, die polymeriseren tot melanine (donker-grijze vlekken).

4.2 Antioxidanten

Lipide peroxidatie is het proces waarbij zuurstof wordt geïncorporeerd in onverzadigde vetzuren die een belangrijk bestanddeel van de membranen vormen. Tijdens dit proces, dat in gang gezet wordt door een radicaal -de initiator-, worden lipide hydroperoxides gevormd. Het 'wegvangen' (scavengen) van deze radicalen kan schade aan membranen van cellen voorkomen. Anti-oxidanten kunnen optreden als scavengers van radicalen. Bekende voorbeelden van belangrijke anti-oxidanten zijn vitamine C, vitamine E en glutathion.

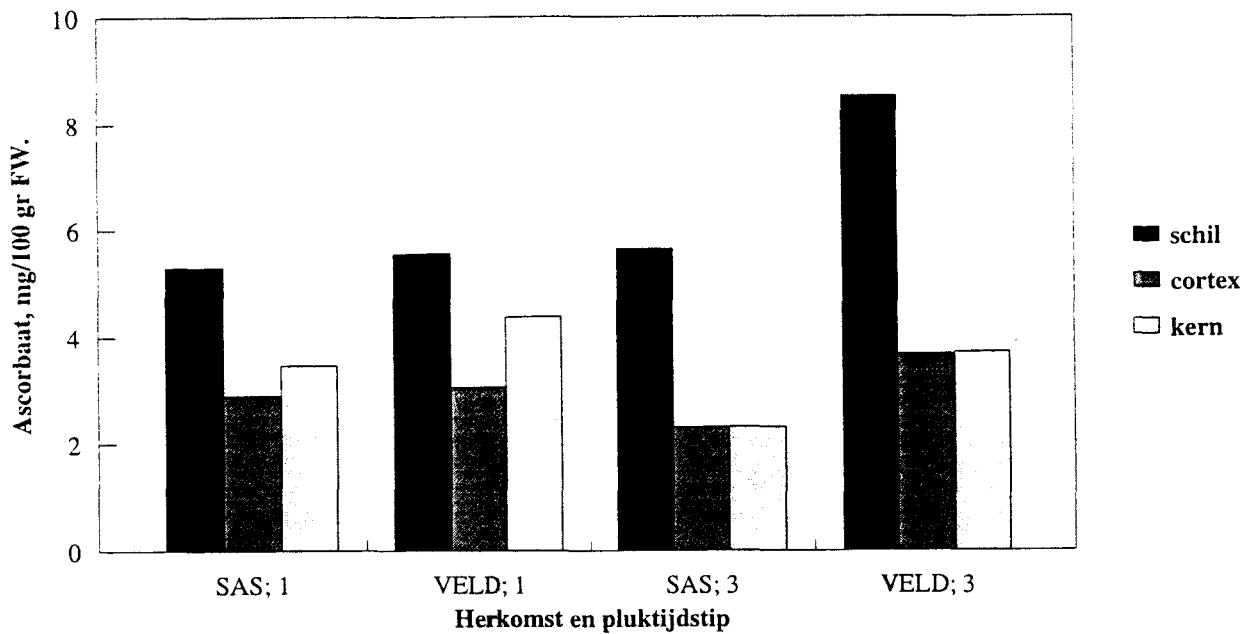
Vitamine C kan op 3 manieren betrokken zijn bij het tegengaan van de schade:

1. Ascorbaat (vitamine C) kan het tocopherol-radicaal (vitamine E-radicaal) non-enzymatisch reduceren. Dit wordt de regeneratie van vitamine E genoemd.
2. Vitamine C kan tevens zelf lipide radicalen wegnemen.
3. Vitamine C bruining van het weefsel direct voorkomen. Op deze wijze wordt geen melanine gevormd en treedt dus geen bruining op.

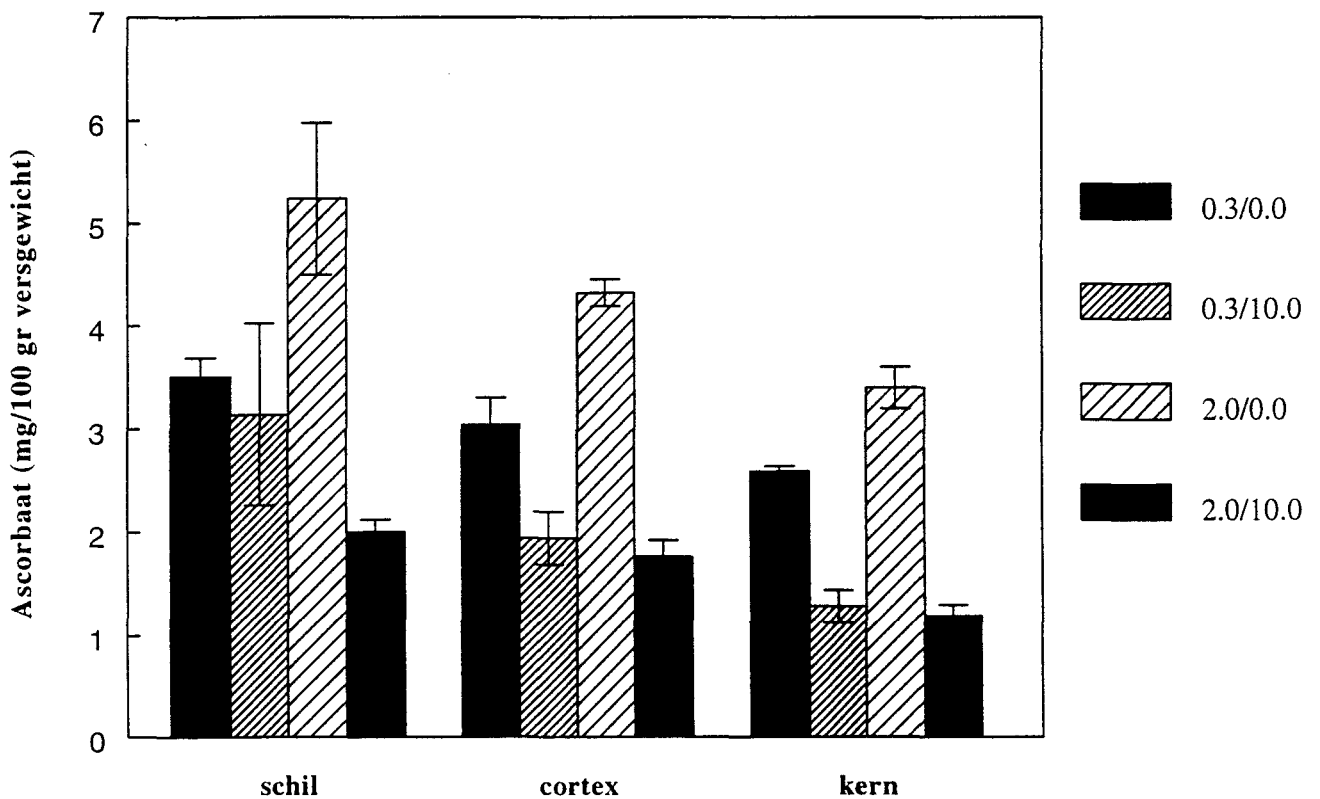
Omdat vitamine C mogelijk een interessante factor is bij het voorkomen van membraanbeschadigingen en ter voorkoming van weefselschade wordt onderzocht wat de invloed is van bewaartijd, herkomst, plaats in het weefsel, pluktijdstip en de bewaarconditie. Vitamine C wordt gemeten op een HPLC. Het is mogelijk op de genoemde apparatuur zowel de gereduceerde als de geoxideerde vorm van vitamine C te meten. Het vitamine C gehalte is bepaald van peren van twee herkomsten (SAS en VELD) en drie pluktijdstippen (1, 2 en 3). Tevens is gekeken naar de verdeling van de verbinding binnen de peer.

Uit het onderzoek blijkt (Figuur 6 en 7) dat er een fors verschil bestaat in de diverse weefseltypen. In de schilregio is de vitamine C concentratie duidelijk hoger dan in de cortex (vruchtvlees) en de kern van de vrucht. Er waren geen duidelijke verschillen tussen de herkomsten. In figuur 7 zijn de resultaten gegeven van peren uit verschillende bewaarcondities. De bewaarcondities lijken dezelfde invloed te hebben op de verdeling van vitamine C in de peer. Belangrijker is echter het resultaat dat hoog CO₂ tijdens bewaring een forse vermindering te zien geeft van het vitamine C gehalte. Zowel in 0.3 als 2% zuurstof halveert de concentratie. Dit betekent dat kennelijk door toepassing van hogere CO₂ concentraties in de bewaring vitamine C wordt gereduceerd. Hoe dit komt is tot dusverre onduidelijk. Met de wetenschap dat peren in deze conditie ook snel bruinverkleuring vertonen is dit een belangrijk resultaat.

Mogelijkerwijs ontstaat de bruinverkleuring in deze conditie doordat vitamine C versneld wordt afgebroken of gebruikt wordt als scavenger. De invloed van zuurstof is alleen duidelijk in de bewaring bij 0% CO₂. In 0.3% O₂ is het vitamine C gehalte ook aantoonbaar lager dan in 2% O₂. De laatste conditie blijft het hoogste vitamine C gehalte vertonen. Bekend is dat dit ook een conditie is waarin bruin en hol nauwelijks optreden. Voor het onderzoek naar de achtergronden van hol en bruin is het belangrijk dat er een aanwijzing is gevonden die de oplossing dichterbij brengt en misschien ook een rol kan spelen als testmethode.



Figuur 6: Het ascorbaat (gereduceerd vitamine C)-gehalte van peren van twee herkomsten (SAS en VELD). De getallen op de x-as geven de drie pluktijdstippen weer. Ascorbaat werd gemeten op drie plaatsen in de peer: de schil, het vruchtvlees (cortex) en de kern.



Figuur 7: Vitamine C-gehalte (ascorbate) van peren tijdens bewaring onder verschillende condities (in mg/100 gr versgewicht). Condities; voor de slash de zuurstofconcentratie, achter de slash de koolstofdioxide concentratie, beide in procenten. De drie clusters vertegenwoordigen de drie monsterplaatsen in de peer: de schil, het vruchtvlees (cortex) en de kern. Monsters werden genomen na 60 dagen bewaring in het doorstroomsysteem.

4.3 Signaalstoffen in relatie met membraanschade

Tijdens het membraanafbraak, waarbij lipiden afgebroken worden, kunnen een aantal afvalstoffen vrijkomen. Voorbeelden hiervan zijn ethaan, pentaan en malondialdehyde (MDA). Deze stoffen zijn op verschillende manieren te meten, waardoor een idee te verkrijgen is van de membraanschade in weefsel. Ethaan, dat door de vrucht naar buiten diffundeert, kan gemeten worden met een gaschromatograaf. Echter, omdat slechts kleine hoeveelheden ethaan vrij komen, levert deze methode problemen op. Op de afdeling Molekuul- en Laser Fysica van de Katholieke Universiteit Nijmegen worden met behulp van foto-akoestische lasers gassen gemeten. Ethaan en Acetaldehyde zijn de belangrijkste factoren tijdens het laser-experiment. Acetaldehyde-concentraties geven informatie over de mate van fermentatie onder extreme CA-omstandigheden, hetgeen iets zegt over de energiehuishouding in de vrucht. Ethaan is belangrijk omdat het mogelijk non-destructief informatie kan geven over het ontstaan van de schade.

De laser is in staat 1 ppb ethaan te meten in een gasstroom. Acetaldehyde kan nog gevoeliger gemeten worden. Naast deze gassen kunnen tevens ethanol, pentaan en ethyleen bepaald worden.

De kracht van de laser zit in het feit dat verschillende parameters tegelijk 'gemonitord' kunnen worden. Tijdens het meten worden de gascondities waaronder bewaard wordt veranderd, en wordt bekeken wat de invloed is op de verschillende parameters.

Er is nog geen informatie over de ethaan-emissie van peren die op het punt staan bruin te worden. Mogelijk is ethaan te meten voordat peren bruin worden. Het gas zou in dat geval een te detecteren parameter zijn voor schade. De vraag is of deze schade reversibel is. Dit laatste is echter nog in de speculatieve fase.

De eerste metingen zijn inmiddels verricht bij peren die duidelijk wel en geen schade vertoonden. Peren met inwendige bruinverkleuring vertoonden een hogere ethaanemissie wat aangeeft dat er mogelijkheden zijn in dit verband.

Metingen in de komende periode met de lasertechnologie.

In de komende periode zal het onderzoek zich richten op de volgende hoofdpunten:

- Inzicht krijgen in de energie-status van peren onder verschillende gascondities.
- Het meten van ethanol en acetaldehyde op de laser. Beide verbindingen geven informatie over de mate van fermentatie, en over de energie-generatie.
- Meting van in relatie met schadeontwikkeling

5.0 Ademhaling en diffusie

Via de praktijk is bekend dat de gevoeligheid voor bruin en hol toeneemt bij een later pluktijdstip. Een tweede belangrijke observatie, gedaan door Frans Roelofs (FPO), was dat peren die voordat ze in CA condities werden gebracht een lange periode (4 weken) in lucht bewaard werden, veel minder bruin en hol vertoonden dan peren die direct na oogst in CA condities werden gebracht. Dit duidt op een verandering van de structuur in de peren.

Mogelijke verklaringen, gerelateerd aan gasuitwisseling, zijn:

- een toename in de difussieweerstand, waardoor O_2 concentraties in de peren al lager zijn bij de latere pluktijdstippen;
- een verandering van de totale energieproductie in het perenweefsel, waardoor bij latere pluktijdstippen de energieproductie in CA condities onvoldoende is voor onderhoud (om het perenweefsel in leven te houden).

Om nu een idee te krijgen van het verloop van de ademhaling, werd de ademhaling gemeten van peren direct na pluk. Hiervoor werden peren op 3 tijdstippen geplukt en werd er een ademhalingsreeks ingezet. Tevens werd ook de porositeit en de diffusiesnelheid bepaald.

Daarnaast werden uitgebreide gasuitwisselingsmetingen gedaan aan peren direct na oogst, en na 6 weken bewaren in lucht of in CA condities.

Het doel van dit onderzoek is de relatie aan te geven tussen het pluktijdstip en de ademhaling (en fermentatie) van en diffusie in peren.

5.1 Onderzoekuitvoering

Het onderzoek werd uitgevoerd in de periode van september tot en met november 1996. Op woensdag 11, 18 en 25 september werden de peren geplukt (teler SAS, resp. PLUK I, II en III). Op maandag 16, 23 en 30 september is het 'droog-' en onderwatergewicht bepaald en zijn de diffusiemetingen gestart. Op dinsdag 17 en 24 september en op 1 oktober zijn de diffusiemetingen afgerond. Hierbij werd gebruik gemaakt van het inerte gas neon. Vervolgens werden de cuvetten aangesloten aan het doorstroomsysteem voor de ademhalingsmetingen. De temperatuur in de cel was 1°C . Voor peren van pluk 3 werd een reeks gascondities aangelegd: 0,1,2,5,8 en 21% O_2 in combinatie met 0.4 of 5% CO_2 . Bij de twee ander plukken werd 'gewone' lucht (21% O_2 , 0.04% CO_2) en één CA- conditie (2% O_2 , 0.4% CO_2) gebruikt.

Bij peren van pluk 3 werd ook gekeken wat het effect van CA en lucht bewaren op de gasuitwisseling van de peren was. Hiervoor werden peren direct na oogst 6 weken bewaard bij een optimale CA conditie (2% O_2 , 0.4% CO_2) en bij gewone omgevingsucht (21% O_2 , 0.04% CO_2). Na deze 6 weken (5-11-96) werd de ademhaling opnieuw gemeten. Voor de CA bewaarde peren werd een reeks ingezet zoals hierboven beschreven voor pluk 3 direct na oogst. Voor lucht bewaarde peren is alleen een zuurstofreeks in combinatie met 0.4 % CO_2 ingezet i.v.m. de beschikbare hoeveelheid peren.

5.2 Resultaten

Voor een vergelijking van de parameters bepaald bij de verschillende plukken (1,2 en 3), is er gekeken naar de resultaten gevonden bij peren bewaard bij 21%O₂ en 2%O₂ in combinatie met 0.4% CO₂, omdat deze condities bij alle drie de plukken gebruikt zijn (tabel 2). Hieruit blijkt dat bij bewaring bij hoge zuurstofconcentratie (20.0%) de O₂-opname en de CO₂-productie hoger is dan bij lage zuurstofconcentratie. De O₂-opname en de CO₂-productie is bij pluk 2, bewaard bij 20.0 % O₂, lager dan pluk 1 en 3. Wanneer er gekeken wordt naar de porositeit dan blijkt deze in de tijd af te nemen, maar er is geen significant verschil tussen de plukken. Dit geldt ook voor de dichtheid van het perensap. Uit deze gegevens is geen duidelijke verklaring te vinden voor het toenemende optreden van hol en bruin bij latere plukken.

Tabel 2 Vergelijking verschillende parameters per pluktijdstip

	O ₂ (%)	Oogsttijdstip		
		1	2	3
O ₂ - opname	1.9	0.63	0.61	0.81
	20.0	1.57	0.97	1.53
CO ₂ - productie	1.9	0.50	0.45	0.70
	20.0	1.02	0.88	1.11
Porositeit (%)		7.84	7.71	7.11
Diffusieweerstand (*10 ⁴ s.cm ⁻¹)		14.76	6.80	10.17
Dichtheid sap (g/l)		1038	1039	1038

Tabel 3 geeft de resultaten weer van pluk 3. Hierbij zijn de parameters bepaald direct na oogst, na CA- en na luchtbeparing. Wat opvalt is dat de diffusieweerstand van lucht bewaarde peren veel lager ligt dan de diffusieweerstand van peren direct na oogst en na CA bewaring. Dit gegeven is mogelijk de verklaring voor het feit dat peren die eerst in normale koelcelomstandigheden worden bewaard en later pas op CA-gebracht minder gevoelig zijn voor hol en bruin. Deze methode wordt momenteel in de praktijk ook geadviseerd en toegepast.

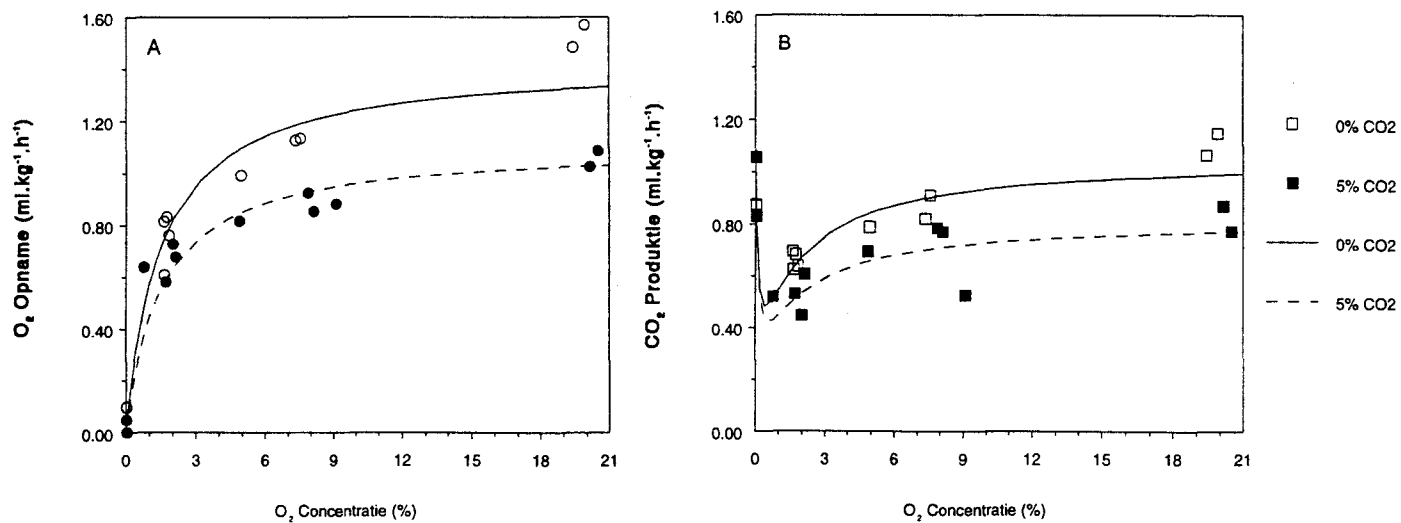
Verder is het opvallend dat het proces van CA-bewaring een duidelijk hogere diffusie weerstand laat zien in vergelijking met bewaring in koelcelomstandigheden. Voor deze waarneming is geen duidelijke verklaring. Deze waarnemingen tonen aan dat porositeit en diffusie deels een verklaring kunnen geven voor het ontstaan van de schade.

Bij CA bewaarde peren valt verder op dat de dichtheid van het sap veel hoger is dan de twee andere waarden. Ook de porositeit is hoger. Verder is opvallend dat de fermentatiesnelheid bij de in lucht bewaarde peren veel groter is (CO₂ productie ten opzichte van O₂ opname bij 1.9% O₂).

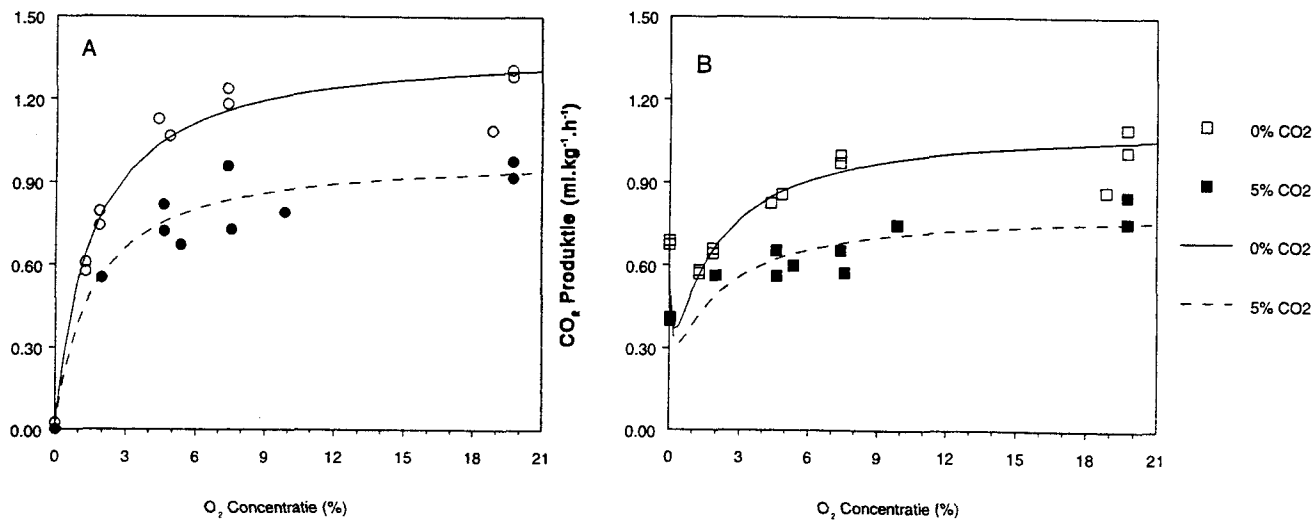
Tabel 3 Vergelijking verschillende parameters pluktijdstip 3, direct en na CA en lucht bewaring

	Pluktijdstip 3			
	O ₂	direct	CA	lucht
O ₂ - opname	1.9	0.81	0.77	0.54
	20.0	1.53	1.30	1.96
CO ₂ - productie	1.9	0.70	0.65	1.00
	20.0	1.11	1.06	1.45
Porositeit (%)		7.11	9.13	6.89
Diffusieweerstand (*10 ⁴ s.cm ⁻¹)		10.17	13.41	5.20
Dichtheid sap (g/l)		1038	1060	1037

De gasuitwisseling is grafisch weergegeven in figuren 8 t/m 11. In de figuren wordt de gasuitwisseling van peren van pluk 3 weergegeven. In figuur 8a wordt de O₂- opname direct na oogst weergegeven, in figuur 8b wordt de CO₂- opname direct na oogst weergegeven. In de figuur 9 wordt hetzelfde weergegeven, maar dan voor peren van pluk 3 na CA bewaring.



Figuur 8: Gasuitwisseling van Conference peren direct na de oogst (pluk 3) bij een reeks van gascondities. 1a: O₂ opname, 1b: CO₂ afgifte.



Figuur 9: Gasuitwisseling van Conference peren na 6 weken CA bewaring (pluk 3) bij een reeks van gascondities. 9a: O₂ opname, 9b: CO₂ afgifte.

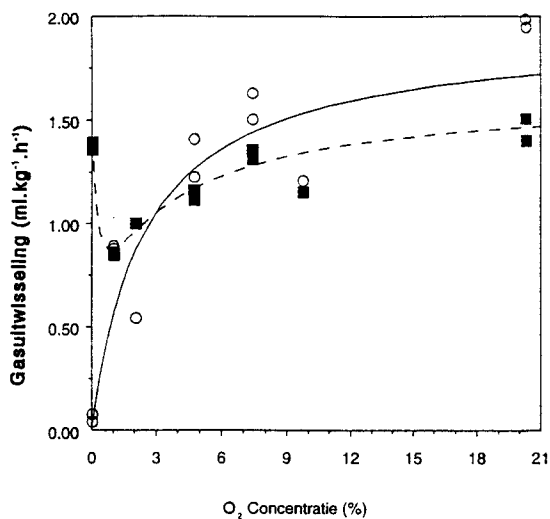


Fig. 10: Gasuitwisseling van Conference peren na 6 weken luchtbeparing (pluk 3) bij een reeks van gascondities

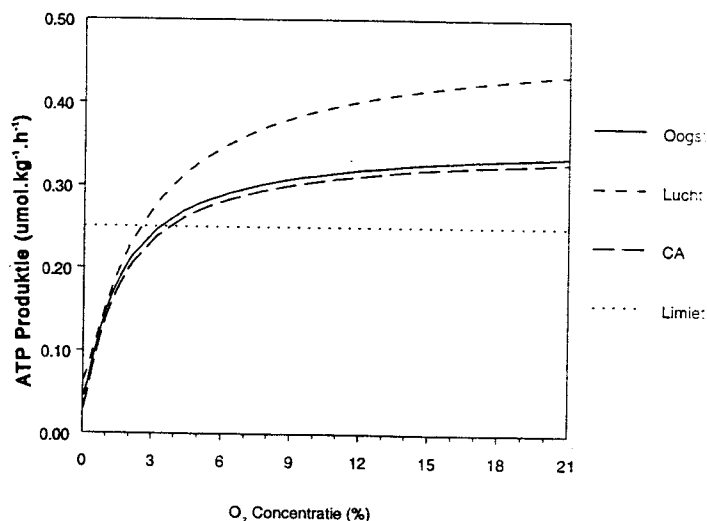


Fig. 11: Berekende energieproductie van Conference peren, waarbij gegevens van figuur 1, 2 en 3 gecombineerd zijn.

Uit de figuren blijkt de sterke invloed van CO_2 op de ademhaling. Bij een CO_2 concentratie van 5%, wordt de ademhaling al sterk geremd (figuren 8 en 9). Ook lijkt CO_2 de fermentatiesnelheid te remmen (figuur 9b).

Het is opmerkelijk dat de CO_2 productie sterk toeneemt bij zeer lage O_2 concentraties (figuur 8a en 9a). Deze toename, toe te schrijven aan een toename van de fermentatie, werd in het afgelopen seizoen niet gevonden bij peren die al geruime tijd in CA bewaard waren. De fermentatiesnelheid verandert dus mogelijk ook tijdens het bewaarstadium. Dit werd al eerder gevonden voor appels. Wat de invloed van deze verandering is op het ontstaan van hol en bruin is echter nog niet aan te geven.

Als de gasuitwisselingsgegevens van pluk 3 omgerekend worden naar energieproductie, blijkt dat die veel hoger is bij de in lucht bewaarde peren. Dit lijkt vooral belangrijk bij 2% O_2 , de O_2 concentratie waarbij de peren doorgaans bewaard worden en de hol en bruin problemen kunnen optreden. Deze meetgegevens lijken dus een relatie tussen energiehuishouding en de kans op schade te bevestigen.

Aanvullende metingen, bijvoorbeeld op het niveau van ATP metingen, zijn echter noodzakelijk om een echte uitspraak te kunnen doen. Toch lijkt het er nu al op dat vrij eenvoudige gasuitwisselingsmetingen een rol kunnen gaan spelen bij het voorspellen van hol en bruin.

6.0 Conclusies

6.1 Conclusies model hol-en bruinontwikkeling

- Bruinverkleuring bij schadelijke condities begint al in november terwijl holvorming later optreedt.
- Holheid komt vooral tot expressie tijdens de nabewaring van de peren.
- Voor hol en bruin is er een interactie tussen het CO₂ en O₂-gehalte. De afwijking neemt toe naarmate het CO₂-gehalte hoger is en het O₂-gehalte lager is.
- Bij zeer (uitwendig) lage CO₂ concentraties (0.2%) komt nog schade voor in een laag O₂-gehalte.
- Bewaring van Conference-peren bij een lagere O₂ concentratie dan 2% lijkt onmogelijk.
- Alleen als er een betrouwbare testmethode voor gevoeligheid van hol-en bruin is ontwikkeld kunnen eventueel bewaaromstandigheden aangepast worden.

6.2 Conclusies membraanafbraak

- Vrijwel zeker wordt hol en bruin veroorzaakt doordat membranen van celorganellen kapot gaan waardoor enzymen en substraat samengevoegd worden en bruinverkleuring ontstaat door melaninevorming. Dit proces wordt decompartmentalisatie genoemd.
- De membranen gaan kapot door de werking van vrije radicalen.
- Deze werking van de radicalen wordt tegengegaan met natuurlijke antioxidanten zoals vitamine C en vitamine E.
- Door een hoog CO₂-gehalte tijdens bewaring treedt een sterke reductie op van het vitamine C-gehalte.
- Bij afwezigheid van CO₂ vermindert het vitamine C-gehalte door bewaring in een laag zuurstofgehalte.
- In de bewaarconditie met het minste risico op hol en bruin (0%CO₂ en 2%O₂) blijft het vitamine C gehalte het hoogst.
- De resultaten van de vitamine C metingen zijn een belangrijke aanwijzing dat essentiële onderdelen van het schademechanisme meetbaar zijn.

- Met behulp van de lasertechnologie is het mogelijk om een aantal signaalstoffen te meten die een verband hebben met membraanafbraak.
- Aangetaste peren vertoonden een hogere ethaanproductie.
- tevens is het mogelijk om de stoffen die een verband hebben met de energiestatus van het produkt (Acetaldehyde en ethanol) continu te monitoren met de lasertechnologie

6.3 Conclusies ademhaling en diffusie

- Gasuitwisselings- en diffusiemetingen geven nog geen directe duidelijkheid omtrent de verschillen tussen pluktijdstoppen.
- De porositeit van later geplukte peren wordt minder.
- Er lijkt een verklaring te zijn voor de observatie dat uitstel van CA bewaring de kans op hol en bruin verkleind doordat de diffusieweerstand duidelijk lager wordt.
- Mogelijk dat gasuitwisselingsmetingen, in combinatie met modellen, in de toekomst kunnen helpen bij het voorspellen van de kans op het optreden van hol en bruin
- De koppeling van de energiestatus in de vrucht enerzijds en ademhaling en diffusie anderzijds zijn hierbij belangrijke factoren.

7.0 Verder onderzoek

Zoals vermeld in de eerdere rapportage kan een verklaring van het fenomeen hol en bruin verlopen via 2 belangrijke hoofdlijnen in het onderzoek;

1 Het diffusie- en ademhalingsgedrag van de peren.

Via het diffusie en ademhalingsgedrag van de peren moet een methode worden gevonden die de CO_2/O_2 concentratie kan voorspellen in combinatie met de actuele aangelegde bewaaromstandigheden. Om het proces van diffusie en respiratie beter te kunnen meten worden een aantal methoden verder ontwikkeld. Naast de bestaande Neon methode bestaat binnen korte tijd de mogelijkheid om met een elektronische O_2 en CO_2 sensor de actuele concentraties te meten in een speciale unit waarin ook verschillende CA-condities gerealiseerd kunnen worden.

Tevens wordt een systeem ontwikkeld om weefselschijfjes te meten qua diffusie karakteristiek. Hiermee kan worden nagegaan waar in de vrucht specifieke barrières optreden voor zuurstof en koolzuur.

Met de beschreven methoden kan een compleet model worden gemaakt om de zuurstof en koolzuurverhoudingen in relatie met bewaaromstandigheden in de vrucht te voorspellen. Hiermee kan de invloed van diverse factoren tijdens pluk en bewaring nader worden verklaard. Belangrijk kan zijn dat hieruit ook een testmethode ontwikkeld kan worden om interactief tot een juiste keuze te komen van de bewaaromstandigheden.

2 Membraanafbraak

Een tweede belangrijke hoofdlijn in het onderzoek is de beschrijving van het schadeproces aan de hand van membraanafbraak welke decompartmentalisatie tot gevolg heeft.

Ten eerste wordt het onderzoek voortgezet naar de rol van de natuurlijke antioxidanten

zoals vitamine C. Er zijn al duidelijke verbanden aangetoond tussen de bewaaromstandigheden en het gehalte aan vitamine C. Uit de literatuur is bekend dat antioxidanten een belangrijke rol vervullen bij de scavanging van vrije radicalen. Deze radicalen maken de celmembranen kapot waardoor mogelijk bruinverkleuring en mogelijk holvorming tot stand komen.

Bij diverse schadelijke en niet schadelijk bewaaromstandigheden wordt vitamine C en eventuele andere natuurlijke antioxidanten gemeten.

Daarnaast wordt met de lasertechnologie op de Universiteit in Nijmegen getracht de signaalstoffen die verband houden met membraanafbraak continu te meten in al dan niet schadelijke bewaaromstandigheden. Voorbeelden hiervan zijn ethaan en pentaan. Ook de bepaling aan het Malondialdehyde-gehalte (MDA) in het weefsel kan verder inzicht verschaffen. De schadelijke invloed van CO₂ kan ook verder nagegaan worden door het meten van enzymen en componenten in de citroenzuurcycles.

Ook geeft de lasertechnologie verder de mogelijkheid om de fermentatiestoffen acetaldehyde en ethanol te meten die ook een koppeling geven met de energiestatus van het produkt.

De energiestatus van het produkt is ook een belangrijke lijn in het onderzoek en vormt de koppeling tussen enerzijds membraan afbraak en anderzijds de benodigde energie die via de respiratie en fermentatie gegenereerd kan worden. Door de minimale energiebehoefte vast te stellen die noodzakelijk is om de peer nog *normaal* te laten functioneren bij specifieke bewaaromstandigheden kan inzicht verkregen worden over de schadegrens. De respiratiemodellen en fermentatie worden daarbij gebruikt om de energieproductie te schatten. In combinatie met metingen van energiestatus kan de behoefte worden vastgesteld.

Het bepalen van de Adenylate Energy Charge (AEC) van pereweefsel. $AEC = \frac{ATP+0.5ADP}{ATP+ADP+AMP}$ geeft informatie over de energie-status van het product.

Uiteindelijk moet het onderzoek leiden tot uiteraard duidelijke inzichten in het proces, maar belangrijker, tot middelen die de praktijk in staat stellen om schade te voorkomen. Dit kan een test methode zijn om van individuele partijen te kunnen voorspellen wat de gevoeligheid is voor het ontstaan van de schade. Beter nog testmethode die kan aangeven bij welke bewaaromstandigheden wenselijk zijn. De laatste methode verdient de voorkeur vanwege het interactieve element.

Een ander onderzoeksitem is de modellering van hol en bruin in al dan niet schadelijke bewaaromstandigheden. Dit wordt samen met het FPO uitgevoerd. Op het ATO wordt maandelijks de hol en bruinscore vastgesteld bij bewaring van peren in lage zuurstofwaarden. Op het FPO wordt aan hetzelfde product (herkomsten) de kwaliteit in hogere zuurstofgehalten vastgesteld.