

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

**Periode januari 1996-September 1996**

**Vertrouwelijk**

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

**Onderzoek in opdracht van:**

- Ministerie van Landbouw, 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

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

Uit het CA-onderzoek blijkt dat CO<sub>2</sub> de hoofdoorzaak is van het ontstaan van hol en bruin. Het pluktijdstip, de zuurstofconcentratie, herkomst en peergrootte zijn aanvullende factoren. Ook is duidelijk geworden dat hol en bruin gekoppelde processen zijn, de oorzaak is hetzelfde. Meestal wordt een peer eerst bruin en daarna hol. De snelheid en/of de grootte van de schade is afhankelijk van de externe factoren.

Met specifieke omstandigheden (hoge CO<sub>2</sub>-en lage O<sub>2</sub> gehalten) is het mogelijk binnen een periode van 6-10 weken bij peren op een geprogrammeerde wijze hol en bruin te induceren. In dit onderzoek is ook geconstateerd dat ophoping van fermentatie producten zoals ethanol en acetaldehyde geen direct verband vertonen met het ontstaan van hol en bruin.

Er zijn methoden ontwikkeld om de diffusie van gassen en de porositeit van het produkt te meten. Belangrijke resultaten waren dat door bewaring en rijping de peer een lagere porositeit krijgt waardoor diffusie van bv. CO<sub>2</sub> wordt verminderd. Ook de toepassing van hoog CO<sub>2</sub> verhoogde de diffusieweerstand en verlaagde de porositeit.

Een verder resultaat was dat hoog CO<sub>2</sub> de ATP-productie verlaagd. Omdat een laag O<sub>2</sub>-gehalte ook de energieproductie verlaagt kan een nog verdere verlaging door hoog CO<sub>2</sub> leiden tot energietekort in de vrucht en dus tot optreden van schade. Dit resultaat steunt de hypothese dat CO<sub>2</sub> een hoofdoorzaak is van het probleem.

Ook het respiratieonderzoek in dit verband gaf verdere steun aan deze constatering. Hoog CO<sub>2</sub> leidde bij alle gemeten O<sub>2</sub> gehalten tot een veel lagere ademhaling. De invloed van zuurstof begint pas bij 6% een duidelijke invloed te krijgen op de ademhaling.

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

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

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

<b>Inhoudsopgave</b>	blz.
<b>1.0 Inleiding</b>	4
<b>2.0 Produkt en bewaring</b>	5
2.1 Afwijkingen in CA-omstandigheden	5
<b>3.0 Inductie inwendige afwijkingen</b>	7
3.1 Resultaten inductie hol en bruin	8
3.2 Anaërobe componenten en bruinverkleuring	9
3.3 Diffusie en porositeit	11
3.4 Ademhalingsmetingen	11
<b>4.0 Biochemie van de bruinverkleuring</b>	14
4.1 Enzymactiviteit in bruine en niet bruine peren	14
4.2 Enzymactiviteit binnen de peer	15
4.3 Bepaling van het totaal polyfenolgehalte	16
<b>5.0 Nondestructieve meetmethoden van bruine en holle peren</b>	18
5.1 Detectie hol	18
5.2 Nondestructieve meting inwendig bruin	19
<b>6.0 Conclusies</b>	23
6.1 Bruinverkleuringsonderzoek	23
6.2 Bewaaronderzoek	23
6.3 Inductie hol en bruin	23
6.4 Anaërobe componenten	23
6.5 Respiratie, diffusie en porositeit	24
6.6 Nondestructieve detectie van hol en bruin	24
<b>7.0 Verder onderzoek</b>	24

## 1. Inleiding.

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

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

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

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

Belangrijke doelen in het eerste halfjaar waren:

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

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

## 2. Produkt en bewaring

De Conference-peren gebruikt voor het onderzoek waren afkomstig van 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<sup>e</sup> pluk) lag in 1995 op 15 september. De peren van pluk 1 waren van 6 september, de 3<sup>e</sup> pluk van 26 september. De peren werden na de pluk gerandomiseerd, direkt ingekoeld en opgeslagen in containers van het statisch CA-bewaarsysteem. De containers met een inhoud van 120 kg zijn aangesloten op een automatisch meet- en regelsysteem. De bewaartemperatuur was -1 °C. Na 1 week werden de CA-condities gerealiseerd: 0.5 en 3% CO<sub>2</sub> in combinatie met 2% O<sub>2</sub> voor alle pluktijdstippen.

Een extra hoeveelheid peren van ieder pluktijdstip en herkomst werd opgeslagen in een 'veilige' bewaarconditie (2% O<sub>2</sub> en 0.5% CO<sub>2</sub>) om als voorraad te dienen voor andere experimenten tijdens het bewaar seizoen.

Tijdens de opslagperiode werden in december, februari en juni van alle combinaties monsters genomen en direkt beoordeeld op van inwendige afwijkingen.

Hierbij werden 20 peren per experimentele eenheid overlangs doorgesneden en visueel beoordeeld op afwijkingen.

### 2.1 Afwijkingen in CA-omstandigheden

Van alle behandelingen zoals pluktijdstippen, herkomsten en CO<sub>2</sub> is in december, februari en in mei een visuele inwendige controle uitgevoerd. De peren werden zowel voor hol als wel bruin ingedeeld in 4 stadia namelijk: 0=gaaf, 1=lichte aantasting, 2=matige aantasting, 3=zwarte aantasting. Deze indeling is vooral gebaseerd op de oppervlakte hol en bruin en is gestandariseerd bij het ATO en FPO.

Bij de beoordeling bleek dat vooral in pluk 2 en 3 hol en bruin optrad (fig.3 en 4).

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

Uit de resultaten blijkt dat CO<sub>2</sub> de belangrijke factor is voor de afwijking. Een later pluktijdstip en een langere bewaartijd versterken dit.

Ook de herkomst speelt een rol (fig. 5). De herkomst welke vooraf als gevoeliger was bedoeld bleek ook inderdaad gevoeliger (Sas). Over het algemeen waren de grovere peren ook gevoeliger voor de afwijking (fig. 6). Belangrijk is te constateren dat het proefmateriaal voldoende divers was om grote verschillen in hol- en bruinaantasting te realiseren voor de diverse meetdisciplines.

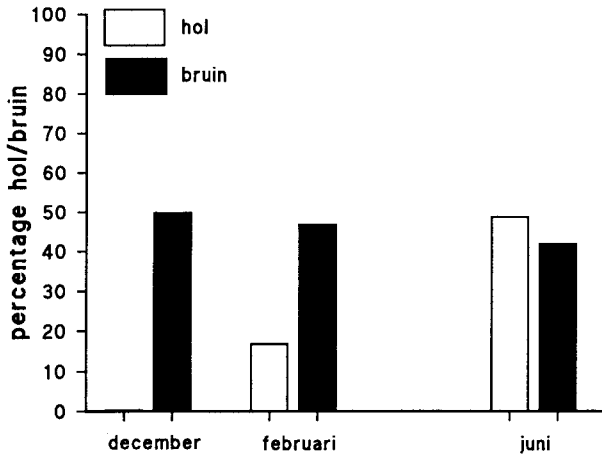


Fig. 1 Ontwikkeling hol en bruin in 3 % CO<sub>2</sub>, gemiddelde herkomsten pluktijdstippen.

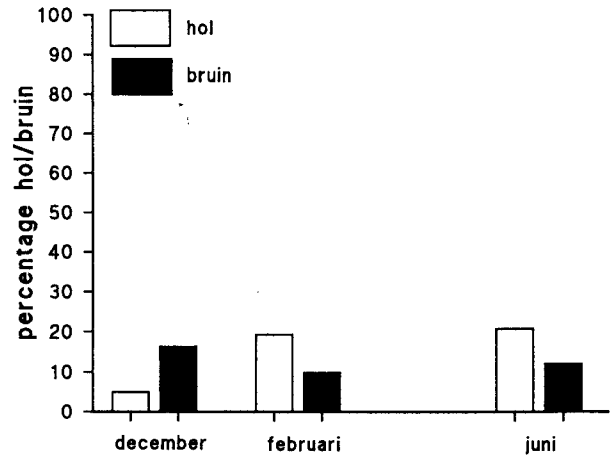


Fig. 2 Ontwikkeling hol en bruin in 0.5 % CO<sub>2</sub>, gemiddelde herkomsten en pluktijdstippen

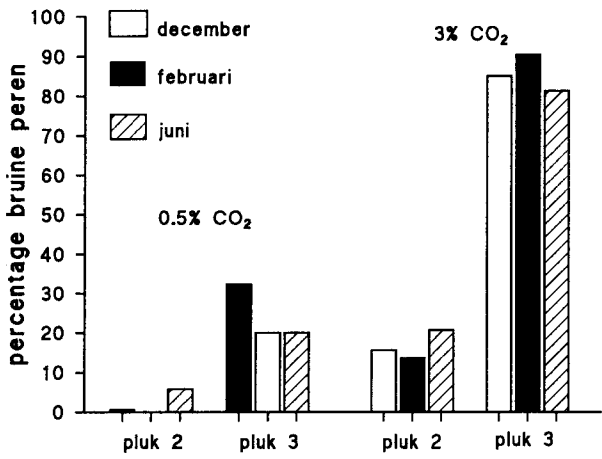


Fig. 3 Ontwikkeling bruine pieren in CA-bewaring bij 2%O<sub>2</sub> en 0.5 en 3% CO<sub>2</sub>

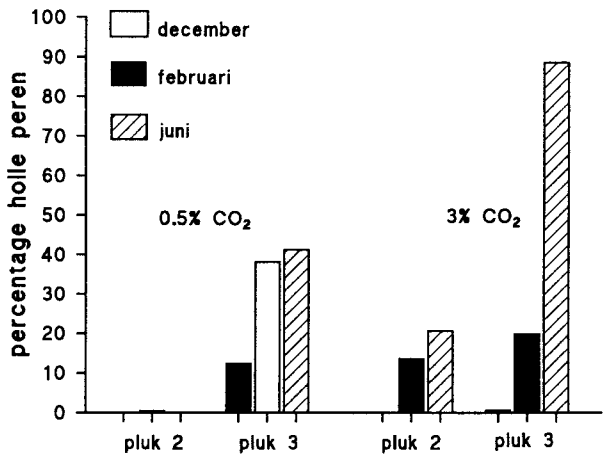


Fig. 4 Ontwikkeling holle pieren in CA-bewaring bij 2%O<sub>2</sub> en 0.5 en 3% CO<sub>2</sub>

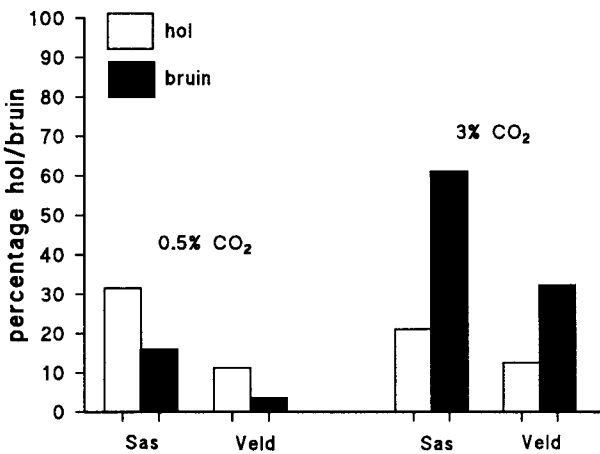


Fig. 5 Ontwikkeling hol en bruin per herkomst (februari)

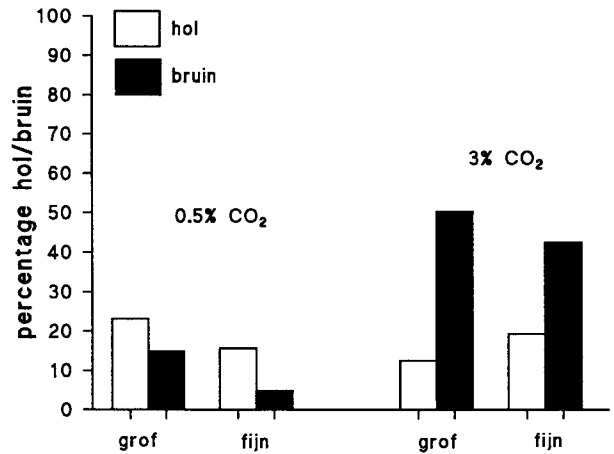


Fig. 6 Ontwikkeling hol en bruin in grove en fijne pieren

### 3.0 Inductie inwendige afwijkingen.

Eind december 1995 is onderzoek gestart om hol en bruin bij zeer uiteenlopende CO<sub>2</sub>- en O<sub>2</sub> concentraties te induceren in het doorstroomsysteem. Hieruit bleek dat het mogelijk was om in korte tijd (6 weken) hol en bruin op te wekken. Op basis hiervan werd uitgebreider onderzoek gestart in de periode mei tot en met juli. Een range van CO<sub>2</sub>- en O<sub>2</sub>-concentraties werd toegepast bij een temperatuur van 5<sup>o</sup>C (Tabel.1)

**Tabel 1:** Proefopzet monitoringsexperiment, bewaring in 9 containers met de in de matrix weergegeven gascombinaties.

O <sub>2</sub> → CO <sub>2</sub> ↓	0.25	1.0	2.0
0.0			
5.0			
10.0			

In elke container werden 60 peren van locatie 'SAS' (2° pluk, 0.5% CO<sub>2</sub>) en 50 peren van locatie 'VELD' (idem) opgeslagen. Tijdens een bewaarperiode van 12 weken werden de volgende parameters bekeken:

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

Gedurende 12 weken werden elke week per herkomst 5 peren uit iedere container, dus 10 uit iedere CO<sub>2</sub> - O<sub>2</sub> combinatie genomen. Na 12 weken werden 15 peren per herkomst gemeten. Na het overlans doorsnijden van de peer werd ook de penetrometerwaarde bepaald. Na respectievelijk 3 en 6 weken bewaring werden monsters genomen uit het centrum van de peer en direkt onder de schil voor de bepaling van acetaldehyde en ethanol. Van de resterende halve peer werd overlans een plak gesneden van 0.5 cm dikte waarin met behulp van Computer Beeld Analyse (CBA) de hoeveelheid bruin werd bepaald. Voor de ademhalingsmetingen werden ook de gascondities 21-0, 21-10 en 0-0 (%O<sub>2</sub>-%CO<sub>2</sub>) meegenomen. De ademhalingsmetingen werden wekelijks uitgevoerd, de diffusie metingen alleen bij de start en het einde van het experiment.

De ademhalingsmetingen werden per CA-conditie (container) gemeten in twee cuvetten aangesloten op het doorstroomsysteem. De ademhaling werd gemeten met een Chrompack CP2001 gaschromatograaf. De cuvetten werden voor de ademhalingsmeting

van het doorstroomsysteem afgekoppeld. Direct en na 20 uur werd de CO<sub>2</sub> ophoping en O<sub>2</sub> consumptie gemeten.

Voor de diffusiemetingen werd bij de peren in de cuvet neon toegevoegd. Na ± 20 uur incuberen werd de peren overgezet naar neonvrije cuvetten. Door de uittreding van Ne te bepalen met de gaschromatograaf kon de diffusieweerstand worden bepaald.

### 3.1 Resultaten inductie hol en bruin

Elke week is gecontroleerd op inwendige afwijkingen. Na ongeveer 6 weken trad bruinverkleuring op in de objecten bij 10% CO<sub>2</sub>, van hol was nog geen sprake. Na de maximale bewaartijd van 12 weken is er een duidelijk overzicht (tabel 2).

De algemene trend is dat in lage CO<sub>2</sub>-gehalten nauwelijks bruin en hol optreedt onafhankelijk van het zuurstofgehalte. Naarmate een hoger CO<sub>2</sub> gehalte wordt aangehouden neemt het percentage aangetaste peren toe. Dit versterkt het idee dat CO<sub>2</sub> de hoofdoorzaak is van het probleem. Interessant is de waarneming bij 10% CO<sub>2</sub>: in combinatie met 0.25% O<sub>2</sub> worden de peren voornamelijk hol terwijl nauwelijks bruinverkleuring optreedt. In combinatie met 2% O<sub>2</sub> komt voornamelijk bruinverkleuring voor en nauwelijks hol. De oorzaak kan zijn dat het bruinverkleuringsproces door het lage zuurstofgehalte wordt geremd, mogelijk door remming van de enzymen die een rol hebben in het proces. Belangrijk voor het onderzoek is dat op een eenvoudige en geprogrammeerde wijze hol en bruin te induceren zijn. Duidelijke verschillen in mate van hol en bruin tussen beide herkomsten zijn niet aanwezig.

Tabel 2 Bruin en holontwikkeling na 12 weken in doorstroomsysteem

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



De rijpheidsontwikkeling in de peren is gemeten met de stevigheidsmeter. Een duidelijke trend is grotere stevigheid naarmate het CO<sub>2</sub>-gehalte hoger is en het zuurstofgehalte lager is.

### 3.2 Anaërobe componenten en bruinverkleuring

Eén van de hypothesen omtrent de oorzaken van hol- en bruin is dat door CA-bewaring het gehalte aan fermentatieproducten zoals acetaldehyde en ethanol toeneemt en hol en bruin veroorzaken. De meetresultaten zijn samengevat in figuur 7 tot en met 12. Steeds is de hoeveelheid hol en bruin uitgezet tegen de respectievelijke gehalten aan ethanol en acetaldehyde.

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

In het algemeen is de concentratie acetaldehyde juist andersom: in laag zuurstof een lagere concentratie acetaldehyde. In 2% O<sub>2</sub> wordt het meeste acetaldehyde gevormd in 0% CO<sub>2</sub>, in 0.3% zuurstof is er geen duidelijke lijn te ontdekken.

De hogere produktie van ethanol in 0.3% O<sub>2</sub> is logisch, er sprake van meer fermentatie. Acetaldehyde is een precursor voor de vorming van ethanol. Het is niet duidelijk in hoeverre ethanol weer omgezet kan worden in acetaldehyde. In diverse combinaties zuurstof en kooldioxide kan een evenwichtsconcentratie ontstaan.

De twee herkomsten in het onderzoek vertoonden globaal hetzelfde gedrag.

Wordt de bruinverkleuring en holontwikkeling gerelateerd aan de ophoping van acetaldehyde en ethanol dan is er geen sprake van een duidelijk verband. De belangrijkste factor verantwoordelijk voor de afwijking nl. CO<sub>2</sub>, vertoont geen verband met de ethanol- of acetaldehyde concentratie. De correlatiecoëfficiënten tussen bruinverkleuring en respectievelijk de ethanol- en acetaldehydeconcentraties waren laag. Ook was er geen negatieve relatie d.w.z. dat hogere concentraties ethanol en acetaldehyde de hoeveelheid bruin vermindert.

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

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

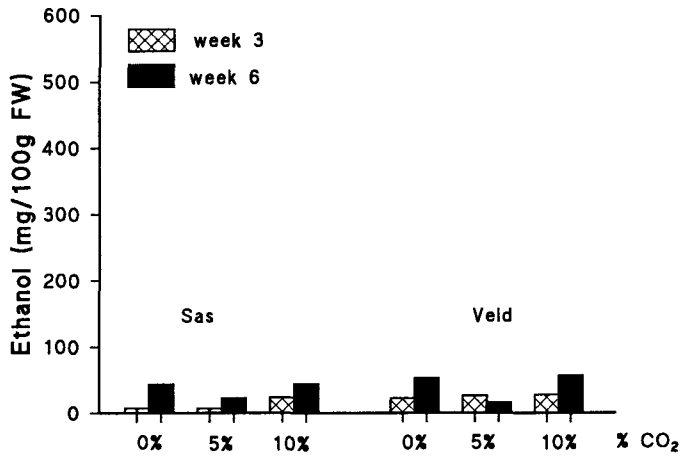


Fig 7 Ethanol concentratie van Conference-peren in 2% O<sub>2</sub> en 0,5 en 10% CO<sub>2</sub> na 3 en 6 weken bewaring

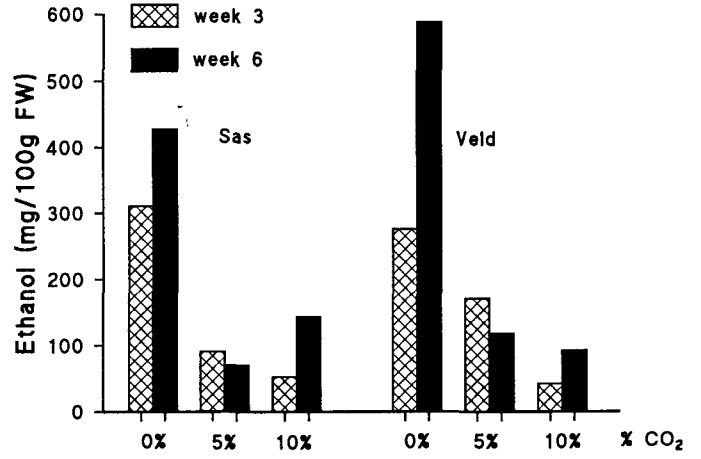


Fig 8 Ethanol concentratie in Conference peren bwaard in 0.3% O<sub>2</sub> en 0, 5 en 10% CO<sub>2</sub> na 3 en 6 weken bewaring

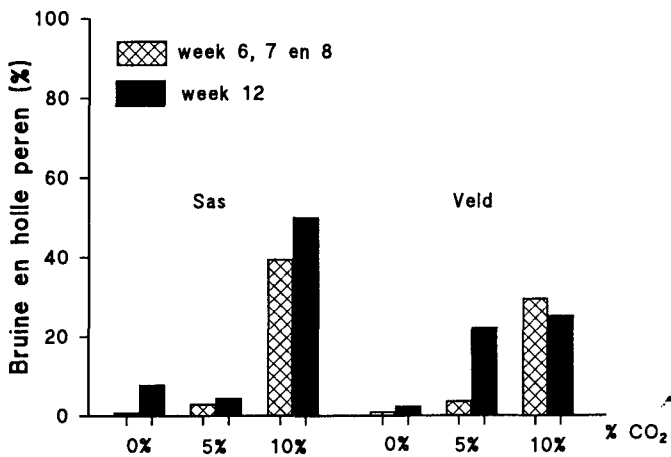


Fig 9 Ontwikkeling holle en bruine peren in 2% O<sub>2</sub> en 0, 5 en 10% CO<sub>2</sub> na gemiddeld 7 en 12 weken bewaring

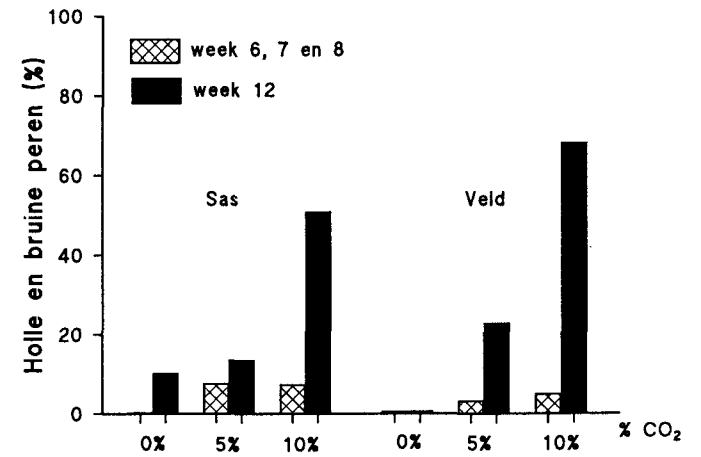


Fig 10 Ontwikkeling van bruine en holle peren in 0.3% O<sub>2</sub> en 0,5 en 10 % CO<sub>2</sub> na gemiddeld 7 en 12 weken bewaring

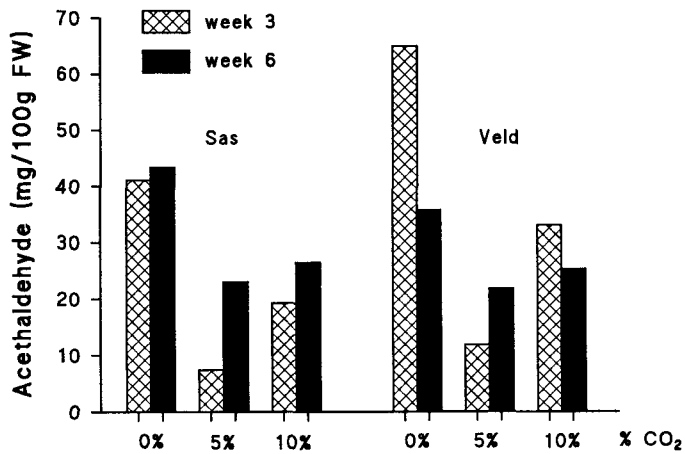


Fig 11 Acetaldehyde concentratie in Conference-peren in 2% O<sub>2</sub> en 0, 5 en 10% CO<sub>2</sub> na 3 en 6 weken bewaring

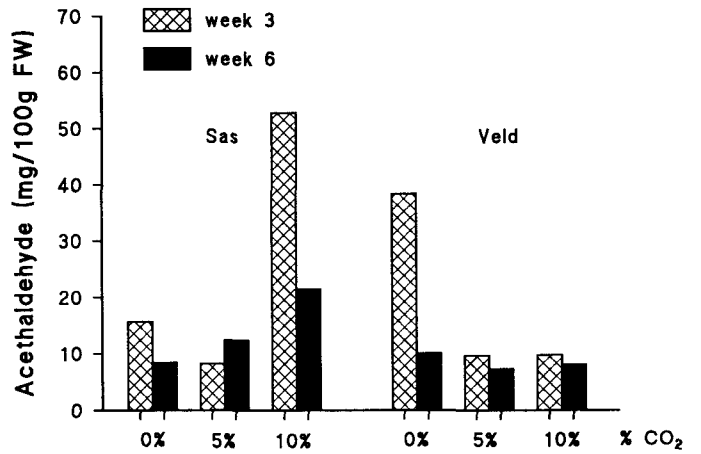


Fig 12 Acetaldehyde concentratie in Conference-peren in 0.3% O<sub>2</sub> en 0,5 en 10% CO<sub>2</sub> na 3 en 6 weken bewaring.

### 3.3 Diffusie en porositeit

Aan het begin en het eind van het experiment zijn diffusiemetingen gedaan. De resultaten van de gascondities 0.25,1,2 en 21% O<sub>2</sub> in combinatie met 0 of 10% CO<sub>2</sub> zijn statistisch verwerkt. In tabel 3 worden de belangrijkste resultaten weergegeven.

<b>Tabel 3 Resultaat diffusiemetingen aan peer</b>		
	diffusie weerstand (*10 <sup>3</sup> s.cm <sup>-1</sup> )	porositeit (%)
meting 1 *	9.31	8.42
meting 2	13.11	2.37
CO <sub>2</sub> 0%	10.00	6.86
CO <sub>2</sub> 10%	12.42	3.93
meting 1 CO <sub>2</sub> 0%	9.61	10.92
meting 1 CO <sub>2</sub> 10%	9.02	5.92
meting 2 CO <sub>2</sub> 0%	10.39	2.8
meting 2 CO <sub>2</sub> 10%	<b>15.83</b>	1.94

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

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

Het blijkt dat tussen de eerste meting (aan begin experiment) en de tweede meting (aan eind experiment) er een significant verschil is qua diffusieweerstand (R). De diffusieweerstand bij het begin van het experiment is lager dan na 12 weken. Dit kan veroorzaakt worden door de rijping (penetrometerwaarde daalt sterk). De CO<sub>2</sub>-concentratie heeft ook invloed op de diffusieweerstand. Na 12 weken is de diffusieweerstand van de peren bewaard bij een CO<sub>2</sub>-gehalte van 10 % significant hoger dan de diffusieweerstand van peren bewaard bij 0% CO<sub>2</sub>.

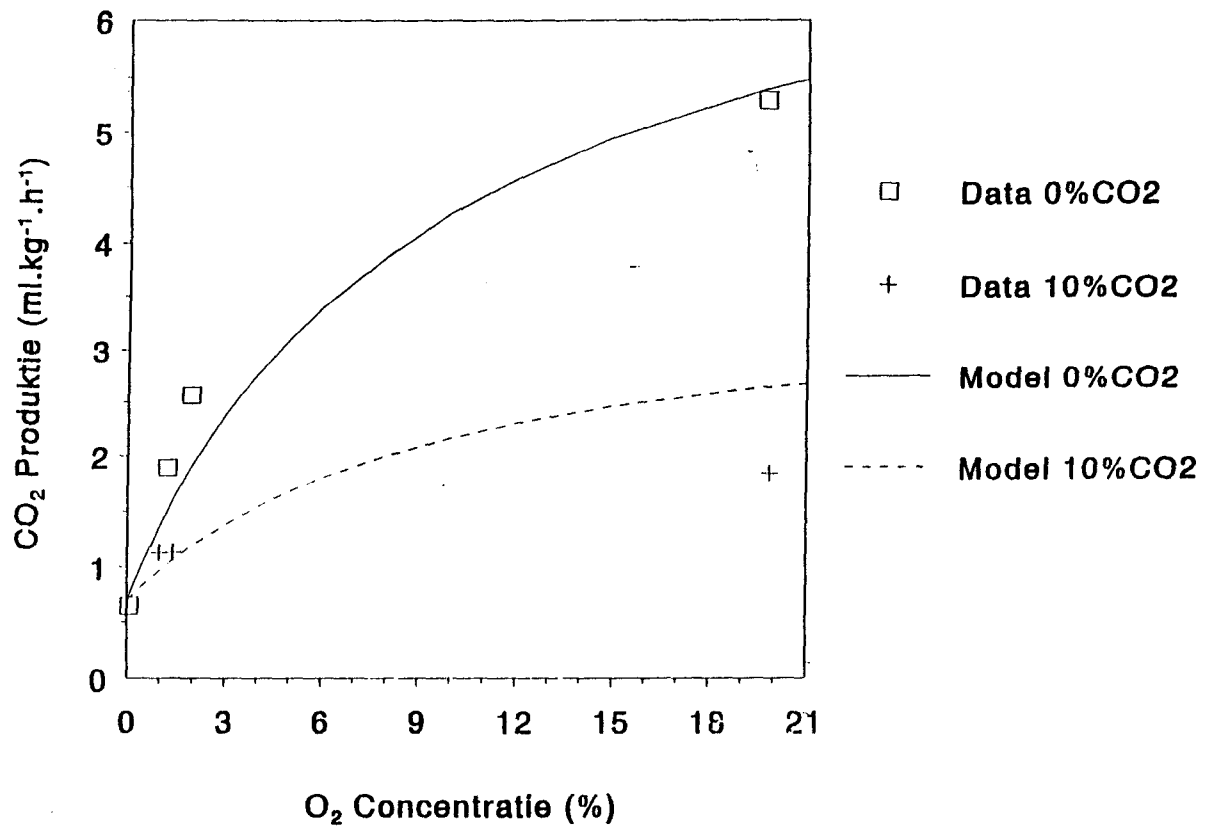
De porositeit van de peren neemt af in de tijd. Evenals de diffusieweerstand geeft de combinatie hoog CO<sub>2</sub> en 12 weken bewaring een lagere waarde. Dit wil zeggen dat de peer minder poreus wordt en de diffusie dus moeilijker wordt.

Dat door rijping van het produkt en schadelijke bewaaromstandigheden de diffusie/porositeit lager wordt geeft een belangrijke steun aan de hypothese dat ophoping van CO<sub>2</sub> in de vrucht een belangrijke oorzaak van hol en bruin kan zijn.

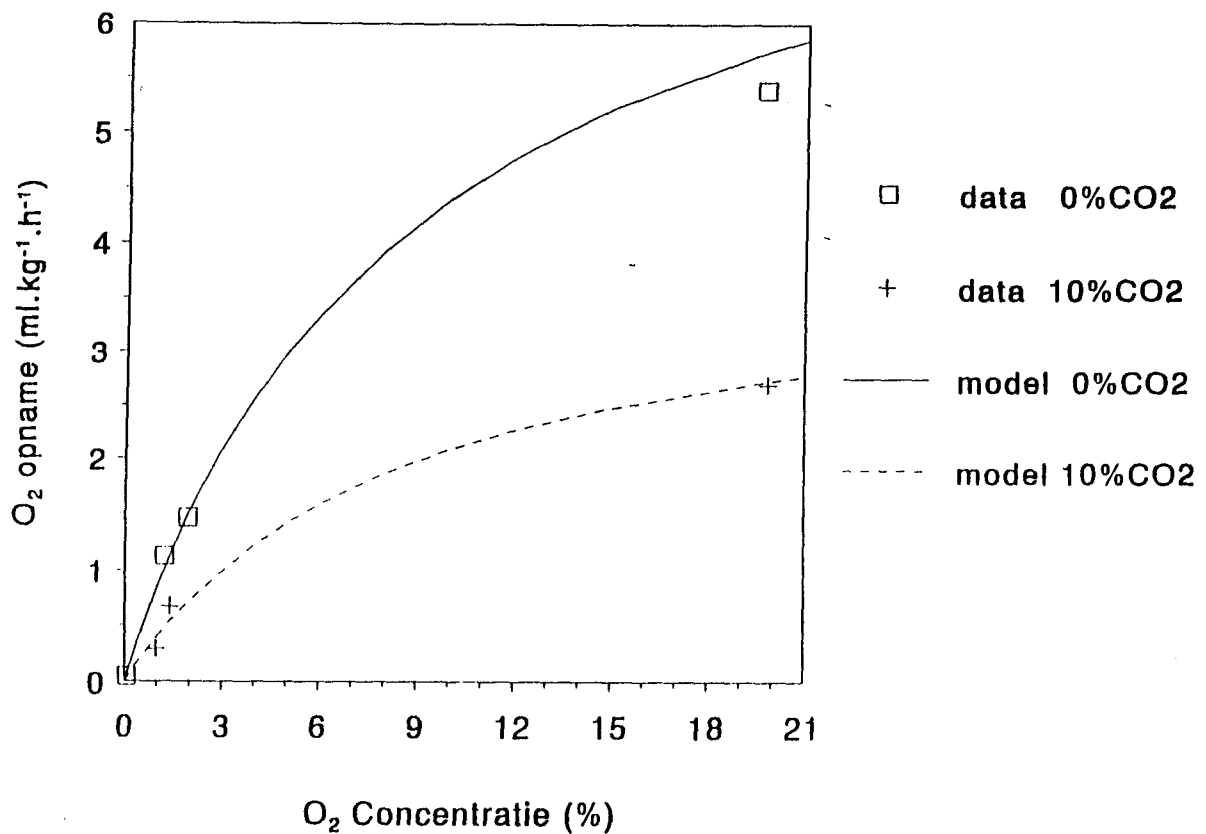
### 3.4 Ademhalingsmetingen

In figuur 13 en 14 wordt de gasuitwisseling van peren weergegeven. Hieruit blijkt dat de CO<sub>2</sub>-concentratie een groot effect heeft op de gasuitwisseling. Bij 21% O<sub>2</sub> is het verschil in O<sub>2</sub>-opname tussen peren bewaard bij 0 en 10% CO<sub>2</sub> ongeveer 3 ml.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. De ademhaling van peren bewaard bij 10% kooldioxide is maximaal 2.5 ml.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, terwijl de ademhaling voor peren bewaard bij 0% CO<sub>2</sub> maximaal 6 ml.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> is.

# Gasuitwisseling peer



# Gasuitwisseling peer



Een ander punt wat uit deze grafieken blijkt, is dat de fermentatie erg laag is. Dit is waar te nemen doordat bij lage zuurstofconcentraties de kooldioxideproductie laag is en af blijft nemen.

Uit deze grafieken is niet duidelijk bij welke zuurstofconcentratie de ademhaling begint af te nemen. Dit komt omdat er geen meetpunten zijn bij zuurstofconcentraties rond de 6%.

In figuur 3 wordt de Respiratiecoëfficiënt (RQ) weergegeven. De RQ is de verhouding tussen de kooldioxydeproductie en de zuurstofopname. Hieruit blijkt dat bij een lage O<sub>2</sub>-concentratie de RQ erg hoog is. Verder is gemeten dat de ATP-productie (energie) in peren daalt bij een hoge CO<sub>2</sub>-concentratie. Hieruit blijkt dat de hoeveelheid ATP die nodig is voor onderhoud (hier gesteld op

0.2 μmol.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), bij bewaring in hoog CO<sub>2</sub> de concentratie O<sub>2</sub> ook hoger moet zijn dan bij bewaring bij laag CO<sub>2</sub> om de benodigde hoeveelheid ATP te krijgen die noodzakelijk is voor onderhoud. Dit stemt overeen met de bevindingen in het verleden dat hol en bruin toeneemt naarmate het CO<sub>2</sub>-gehalte hoger en het O<sub>2</sub>-gehalte lager is.

#### 4.0 Biochemie van de bruinverkleuring.

Het is belangrijk om te weten hoe het mechanisme van de bruinverkleuring in de peer werkt als gevolg van schadelijke bewaaromstandigheden en gevoeligheid van het product. Bekend is dat polyfenolen in de vrucht worden omgezet door bepaalde enzymen waardoor de bruinverkleuring via een oxidatieproces zichtbaar wordt. Belangrijke verantwoordelijke enzymen zijn laccase en tyrosinase en het totaal aan polyphenoloxidasen (PPO). De stof die uiteindelijk de bruinverkleuring te zien geeft is melanine.

In dit onderzoek is getracht om de activiteit van de enzymen en het totaalpolyfenol in de vrucht aan de gevoeligheid voor bruinverkleuring te relateren. Tevens werd de verdeling van de enzymen binnen de peer bekeken. Er zijn peren uit verschillende (deels schadelijke) bewaaromstandigheden gemeten. Monsters voor het bruinverkleurings onderzoek kwamen van de 2 herkomsten, de 2 CO<sub>2</sub>-gehalten en de 3 pluktijdstoppen.

#### 4.1 Enzymactiviteit in bruine en niet-bruine peren.

Van de peren met de verschillende achtergronden werd een monster genomen uit de kern waarin de totale PPO-, Tyrosinase - en Laccase activiteit bepaald werd. Met de Minolta Chromameter werd de intensiteit van het bruine weefsel bepaald. De bedoeling was om de enzymactiviteit in verband te brengen met de mate van interne bruining. Uit figuur 1 blijkt dat er geen relatie bestaat tussen bruinverkleuring en enzymactiviteit. Hooguit kan opgemerkt worden dat bij bruine peren de Tyrosinase-

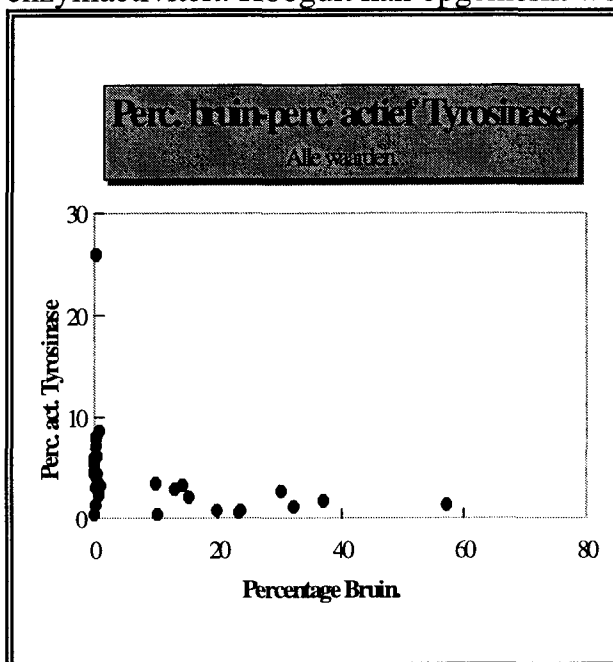


Fig. 1 Percentage bruinverkleuring uitgezet tegen het percentage actief Tyrosinase van het kernweefsel van dezelfde peer. Metingen zijn een combinatie van pluktijdstop, CO<sub>2</sub>-concentratie, etc.. Elke meting werd in duplo uitgevoerd.

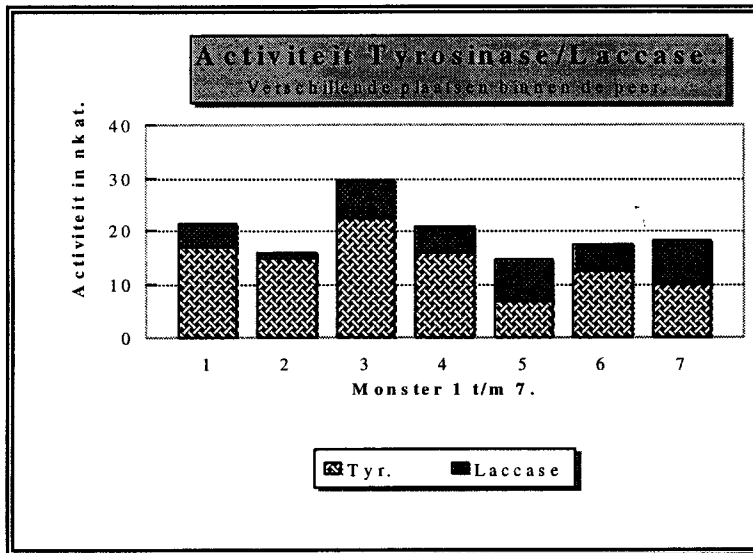
gemiddeld lager is, en niet boven de 5 % uitkomt. Factoren als pluktijdstip, CO<sub>2</sub>-concentratie en herkomst hebben geen invloed op de activiteit van polyfenoloxidasen in het weefsel. De Minolta-waarden (niet weergegeven) gaven een duidelijk onderscheid tussen bruine en niet bruine peren. De geringe verschillen tussen de PPO-activiteiten van de objecten doet vermoeden dat andere factoren een belangrijke rol spelen bij bruinverkleuring. Mogelijk belangrijk zijn de decompartmentalisatie van PPO's en de aanwezigheid van bepaalde anti-oxidanten in het weefsel.

#### 4.2 Enzymactiviteiten binnen de peer.

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

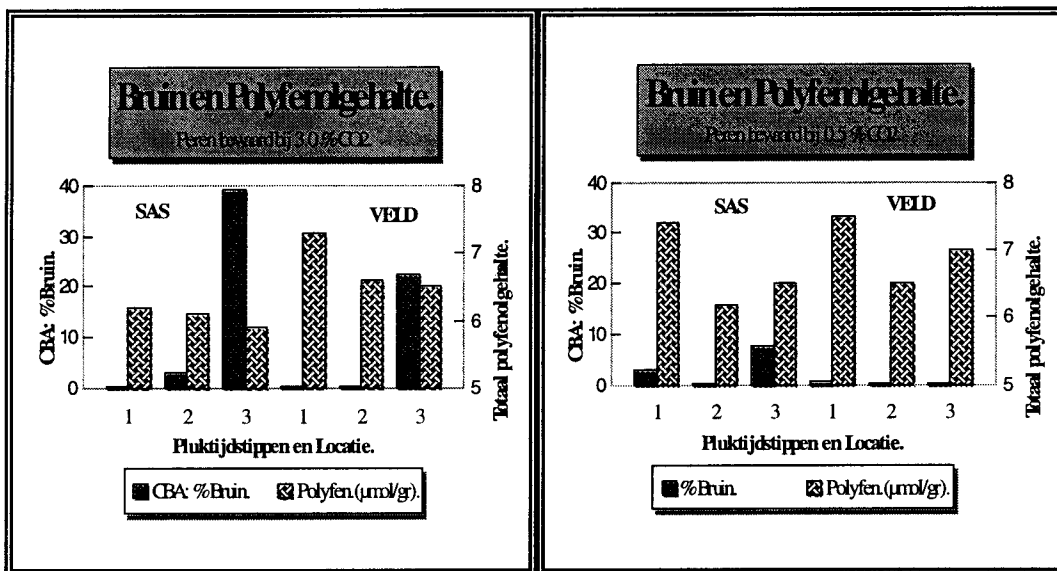
1. De schil.
2. De kern (met pitjes).
3. Gezond weefsel nabij grens bruin-niet bruin.
4. Weefsel op deze grens.
5. Bruin weefsel nabij de grens bruin-niet bruin.
6. 'Ingeklonken' weefsel in een holle plek.
7. Weefsel verder van een holle plek.

Van alle monsters werd de Laccase- en de (actieve en latente) Tyrosinase activiteit bepaald. De Laccase activiteit is lager dan de Tyrosinase activiteit, dat bleek al uit eerdere experimenten. Er lijken verschillen te bestaan tussen de verschillende monsterplaatsen, de standaard deviaties zijn echter zeer groot. In monsters uit de schil zit opvallend veel meer latent Tyrosinase. In monsters uit de kern van de peer is het percentage actief Tyrosinase relatief zeer hoog.



**Figuur 3:** Tyrosinase en Laccase activiteiten van weefsel op verschillende plaatsen in de peer (zie tekst). Binnen één balkje: onderste gedeelte, Tyrosinase; bovenste gedeelte Laccase.

#### 4.3 Bepaling van het totaal polyfenolgehalte.



**Figuur 4 en 5:** Peren bewaard bij 3.0% CO<sub>2</sub> en 0.5% CO<sub>2</sub>. Op de x-as staan de drie pluktijdstoppen weergegeven. De eerste drie waarden zijn SAS-peren de andere waarden zijn VELD-peren. Linker balk van elke cluster is de bruin, het rechter balkje de polyfenol-waarde.

Wat betreft het totaal polyfenolgehalte is er een duidelijke invloed van de CO<sub>2</sub>-concentratie en het pluktijdstop op de bruinverkleuring. Later geplukte peren, en peren van locatie SAS worden -zo blijkt wederom- eerder bruin. Anderzijds lijkt het totaal



polyfenolgehalte geen relatie te vertonen met pluktijdstip, locatie, CO<sub>2</sub>-concentratie of mate van bruining.

De vraag is waarom er geen duidelijk verband tussen de bruinkleuring enerzijds en de activiteit van de enzymen en het gehalte aan polyfenolen anderzijds. Een aantal verklaringen zijn denkbaar:

- Hoeveelheid polyfenolen en enzymen zijn niet limiterend voor bruinverkleuring
- Er is sprake van meerdere polyfenolen
- Bepaalde antioxidanten voorkomen bruinverkleuring
- Enzymen zijn maar zeer kort actief.

Op basis van het bruinverkleuringsonderzoek zou mogelijk een testmethode gebaseerd kunnen worden voor de gevoeligheid van het product voor hol en bruin (één van de doelstellingen van het project). Het is duidelijk dat het verband tussen bruinverkleuring en enzymen/polyfenolen te gering is om dit te ontwikkelen.

Het blijkt duidelijk dat de bruinverkleuringsreactie een gevolg is van een weefselschade die al eerder is opgetreden. Door decompartmentalisatie van organellen doordat mogelijk membranen kapot gaan treedt de bruinverkleuringsreactie op.

De polyfenolen zijn vooral gelocaliseerd in de vacuole, de enzymen in de plastiden en mitochondriën. Bij het kapot gaan van deze organellen komen enzymen en substraat bij elkaar waardoor bruinverkleuring kan optreden. Het is daarom noodzakelijk het onderzoek te richten op de oorzaken van deze decompartmentalisatie.

## 5.0 Nondestructieve meetmethoden van bruine en holle peren.

### 5.1. Detectie hol.

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

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

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

Tabel 1 Aantasting door hol gemeten met Röntgendetectie en visuele controle van peren bewaard in 2% O<sub>2</sub> en variabele CO<sub>2</sub> concentraties

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

## 5.2 Nondestructieve meting inwendig bruin

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

Gezien de beperkte mogelijkheden binnen het project voor de ontwikkeling van detectiemethoden werden slechts de ter beschikking zijnde signalen getest. Met deze signalen werden de mogelijkheden van het gebruik van de trillingstechniek voor het meten van hol en bruin in peer aangegeven.

Onderzoeksaspecten:

- (1) detectie bruine en niet bruine peren
- (2) signaalbeïnvloeding door het rijpheidsstadium
- (3) test op semi-praktijkschaal
- (4) effect van hol in peren op bruindetectie vastgesteld.

Voor het onderzoek op het ATO werd gebruik gemaakt van peren van 2 herkomsten (Sas en Veld), 3 pluktijdstippen bewaard in 0.5 en 3 % CO<sub>2</sub>.

Peren werden gedurende 2 uur geacclimatiseerd bij kamertemperatuur ( $\pm 20^{\circ}\text{C}$ ). Van iedere peer werd het gewicht en de maximale diameter bepaald. Vervolgens werden op elke peer vier posities op gelijke afstand ter hoogte van het klokhuis gemarkeerd. Met de trillingsdetector werden op deze posities met drie verschillende calibratiemethoden (C, E en K) trillingsregimes van de peren gemeten. In het vooronderzoek bleek calibratie signaal E het beste resultaat te geven. Per peer werd een gemiddelde van de vier trillingssignalen berekend. Dit gemiddelde signaal werd per groep bruine en gave peren gemiddeld. De peren werden tevens ondergedompeld om te bepalen of deze bleef drijven. Naast een stevigheidsbepaling werden de peren ook overlangs doorsneden voor de beoordeling van bruin en hol. Voor het onderzoek op semi-praktijkschaal werd gebruik gemaakt van peren uit het FPO-onderzoek van diverse bewaaromstandigheden en 5 pluktijdstippen. Naast het trillingssignaal werden ook gewicht, kleur en Instronwaarde vastgelegd.

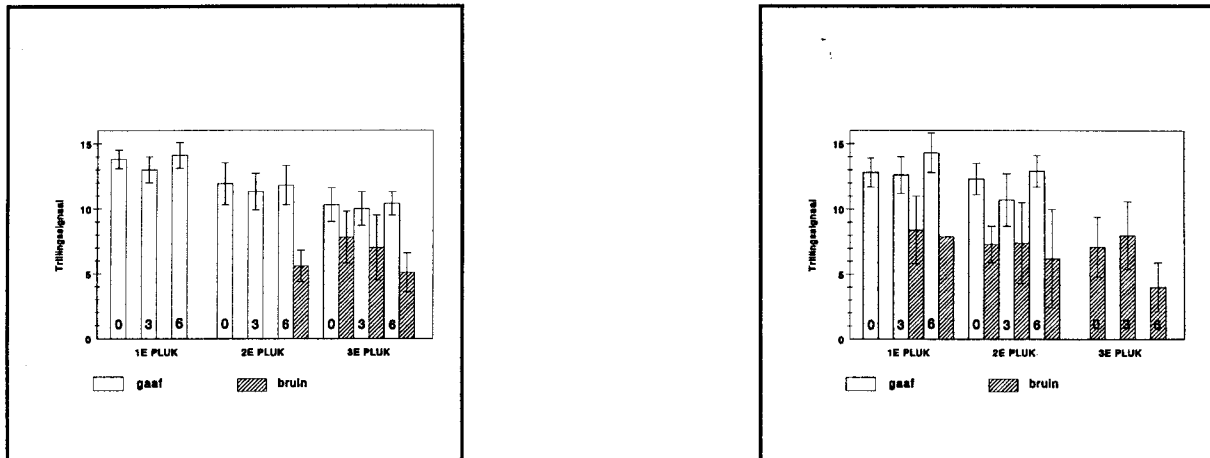
### *Uitstalling*

De trillingswaarden van gave peren veranderen niet gedurende de uitstalperiode van 10 dagen, dus het trillingsgedrag van gave peren verandert niet door het narijpen. De methode kan dus gedurende de uitstalfase worden gebruikt en een eventueel lagere waarde van het signaal wordt niet veroorzaakt door het afrijpen van de peer.

### *Trillingswaarden*

De waarden van de signalen van de calibratiemethode vertonen veel overeenkomsten met de waarden van methode E. De gemiddelde waarden methode C zijn hoger, maar de standaardafwijking voor met name de niet-bruine peren is groter. Methode E (Figuur 1) lijkt voor het detecteren van bruin in peren daarom het meest geschikt en kan de basis zijn voor verdere, peer-specifieke calibraties.

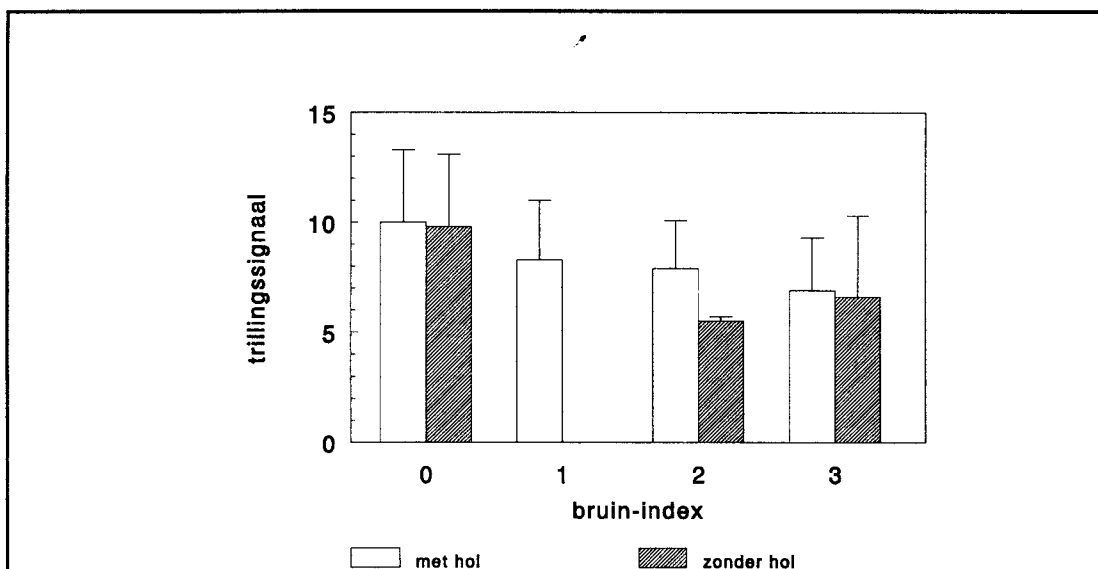
Bruine peren hebben met beide calibratiemethoden een significant lager signaal dan gave peren. Dit geeft aan dat er mogelijkheden zijn om bruine peren nondestructief te meten.



Figuur 1 Calibratiesignaal E van gave en bruine peren, bewaard bij 0,5% CO<sub>2</sub> (links) of 3,0% CO<sub>2</sub> (rechts) en 0, 3 of 6 dagen uitgestald

*Testen van detectiemethode met peren van het Proefstation Wilhelminadorp*

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



Figuur 2. Gemiddeld trillingsignaal E van alle peren met verschillende bruinindex en gesplitst in wel of niet hol.

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

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

In tabel 2 zijn de gemiddelde trillingssignalen van bruine en niet-bruine/holle peren per conditie weergegeven. Deze trillingswaarden zijn uitgezet tegen de gemiddelde bruinindex per conditie. Dit verband is weergegeven in Figuur 5.

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

Tabel 2. Het gemiddelde trillingssignaal per pluk (n=25), bewaard bij  $-0,5^{\circ}\text{C}$  onder 4  $\text{CO}_2$ -concentraties (alle 2,0%  $\text{O}_2$ ) en na verschillende tijden tot het bereiken van de 2,0%  $\text{O}_2$  (bij 0,5%  $\text{CO}_2$ ).

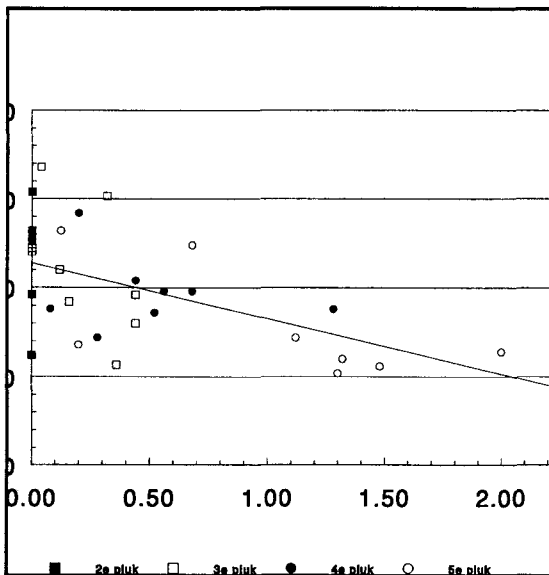
$\text{CO}_2$ (%)	1e pluk	2e pluk	3e pluk	4e pluk	5e pluk
0*	$11,7 \pm 2,6$	$9,8 \pm 3,4$	$11,1 \pm 2,9$	$6,0 \pm 1,4$	$7,9 \pm 1,9$
0,5	$5,3 \pm 2,1$	$11,3 \pm 2,1$	$13,4 \pm 2,2$	$12,1 \pm 2,2$	$7,7 \pm 2,6$
1,5	$7,6 \pm 3,2$	$11,5 \pm 2,0$	$9,0 \pm 2,7$	$9,9 \pm 2,2$	$8,2 \pm 2,9$
3,0	$7,6 \pm 2,2$	$9,7 \pm 2,4$	$7,8 \pm 2,6$	$9,3 \pm 2,7$	$7,8 \pm 3,0$

\* 0%  $\text{CO}_2$  en 21%  $\text{O}_2$

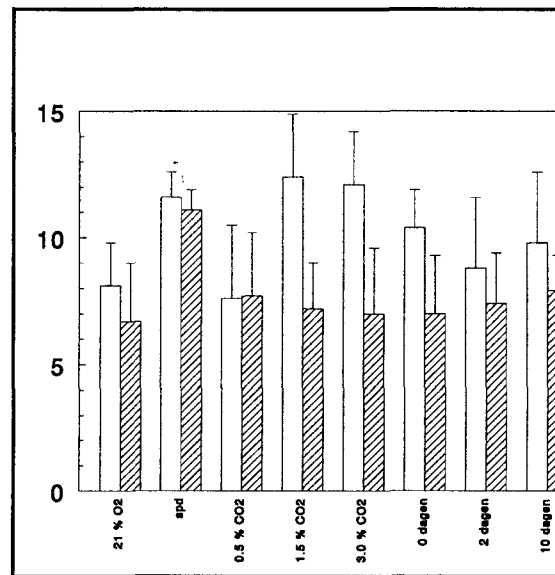
In Figuur 4 zijn de trillingssignalen van alle gave en bruine peren van de vijfde pluk weergegeven. Hieruit blijkt dat gave en bruine peren op individuele basis redelijk van elkaar zijn te onderscheiden.

In het algemeen kan gesteld worden dat het gewicht, de kleur en de stevigheid van de peer geen maat is voor de inwendige bruinverkleuring. Bruine peren drijven vrijwel altijd. Echter, ook ongeveer 30% van de niet-bruine peren drijft. Dit leidt tot een onacceptabel grote onterechte deklassering indien het drijven van de peer als maat voor inwendig bruin wordt gehanteerd.

Met de trillingstechniek is in principe onderscheid te maken tussen individuele gave en bruine peren. De betrouwbaarheid en gevoeligheid dienen te worden opgevoerd.



Figuur 3. Gemiddeld trillings signaal van partijen peren (pluktijdstippen bewaarcondities) uitgezet tegen de gemiddelde bruinindex van de partij



Figuur 4. Het gemiddelde trillings signaal van gave en bruine peren en van de 5e pluk, bewaard onder diverse condities.

Hoewel de techniek niet-invasief is en voor andere vruchten niet-destructief is gebleken, dient dit laatste nog voor peer te worden aangetoond. Er zijn geen aanwijzingen dat hol in peren de bruin-detecterende signalen beïnvloedt. De voor bruindetectie gebruikte signalen zijn niet geschikt om hol in peren te detecteren. Voor hol-detectie zal een specifieke calibratie dienen plaats te vinden. Er is een redelijk geschikt calibratiesignaal voorhanden dat voor peren van de vroege en late pluk significant verschillende waarden vertoont. De waarde van dit signaal wordt bovendien niet beïnvloed door het rijpen van de peer tijdens de uitstalfase. De methode kan dus gedurende de uitstalfase worden toegepast en verandering in de hoogte van de waarden wordt niet veroorzaakt door het rijpheidsstadium van de peer. De hoogte van de waarden van het trillings signaal bleken bij peren van verschillende herkomsten en gemeten op verschillende tijden tijdens de bewaring te verschillen. De reden hiervan dient nader onderzocht te worden. Het is mogelijk dat langdurig bewaarde peren een ander calibratie-signaal behoeven als relatief kort bewaarde peren.

## 6.0 Conclusies

### 6.1 Conclusies bruinverkleuringsonderzoek

- Het totaal polyfenolgehalte (substraat) vertoont geen relatie te met pluktijdstip, locatie, CO<sub>2</sub>-gehalte en/of de mate van bruinverkleuring.
- Er is geen duidelijk verband tussen de enzymactiviteit (Tyrosinase, Laccase en PPO) en de bruinverkleuring in de peren.
- De redenen waarom er geen verband is tussen polyfenolen/enzymen en de bruinverkleuring is niet duidelijk.

Mogelijkheden:

- korte periode enzymactiviteit
- interactie met antioxidanten
- polyfenolen/enzymen niet limiterend voor bruinverkleuring
- aanwezigheid meerdere polyfenolen.

### 6.2 Conclusies bewaaronderzoek

- Bij een later pluktijdstip treedt meer hol en bruin op
- Bewaring en 3%CO<sub>2</sub> veroorzaakte meer hol en bruin, in 0.5% CO<sub>2</sub> ontstaat procentueel meer hol.
- Het percentage bruine peren was al na 3 maanden bepaald, het percentage holle peren neemt daarna nog duidelijk toe. Het ontstaan van hol en bruin lijkt dezelfde oorzaken te hebben.
- Grove peren lijken gevoeliger voor hol en bruin

### 6.3 Conclusies inductie hol en bruin

- Het is mogelijk om in een periode van maximaal 12 weken geprogrammeerd hol en bruin in peren te induceren bij hoge CO<sub>2</sub>-gehalten (10%)
- In 10% CO<sub>2</sub> en 0.25% O<sub>2</sub> treedt voornamelijk hol op, in 2% zuurstof treedt voornamelijk bruin op.
- In 0% CO<sub>2</sub> komt nauwelijks hol en bruin voor onafhankelijk van O<sub>2</sub>.
- CO<sub>2</sub> lijkt de hoofdoorzaak van de afwijkingen te zijn.

### 6.4 Conclusies anaërobe componenten.

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

## 6.5 Conclusies respiratie, diffusie en porositeit

- Vooral het CO<sub>2</sub>-gehalte is bepalend voor de respiratie
- Tot 2 a 3% is de invloed van zuurstof op de respiratie beperkt
- Bij bewaring in hoog CO<sub>2</sub> en door rijping ontstaat een hogere diffusie weerstand.
- een hoger CO<sub>2</sub>-gehalte en rijping veroorzaakt tevens een lagere porositeit
- Het ATP niveau daalt door hog CO<sub>2</sub> maar tevens door verlaagd zuurstof

## 6.6 Conclusies niet destructieve detectie van hol en bruin

- Met Röntgendetectie kan op een betrouwbare manier hol worden gedetecteerd.
- De resultaten met deze methode zijn nog beter dan de visuele inspectie
- Met de trillingstechniek kan in principe onderscheid gemaakt worden tussen bruine en niet bruine peren.
- De betrouwbaarheid is onvoldoende om in alle situaties bruine van niet bruine peren te kunnen onderscheiden.
- De calibratie signalen gebruikt voor het bruinonderzoek zijn niet geschikt om holle peren te detecteren.
- Voor een verfijning van de techniek voor detectie van bruin moet een specifiek calibratiesignaal worden gemaakt.

## 7.0 Verder onderzoek

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

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

Belangrijk zijn twee hoofdlijnen in het onderzoek. Ten eerste is dit het diffusie- en ademhalingsgedrag van de peren. Vooral de diffusie van CO<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> in de vrucht is van groot belang. Hierbij is de methodiekontwikkeling van de diffusie ook van groot belang. Met de Ne methode kunnen complete peren worden onderzocht echter het is dan nog niet bekend waar er precies diffusiebarrières in de peer zijn. Eén mogelijkheid is om weefselschijfjes uit de peer te nemen en hiervan de diffusie te meten. Verder is een O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> sensor van groot belang om interne concentraties te meten.

Ook het respiratiegedrag blijft van belang. Het is noodzakelijk om in relatie met de diffusie metingen goede modellen te ontwikkelen van het ademhalingsgedrag tijdens



pluk- en bewaaromstandigheden. Hierbij moet ook de noodzakelijke minimale energiebehoefte van het produkt betrokken worden (ATP/ADP)

Een tweede belangrijke discipline is het onderzoek naar de oorzaak van de schade. De factoren die van belang zijn bij de degradatie van membranen van celorganellen moeten ruime aandacht krijgen. De rol van schadelijke bewaaromstandigheden op radicaalvorming, antioxidanten, signaalstoffen, componenten en enzymen in de citrioenzuurcyclus

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

Het onderzoek naar nondestructieve meetmethoden moet voorlopig gestopt worden. Voor de holdetectie is een goede methode voorhanden, voor bruine peren is dit nog discutabel. De trillingstechniek is in principe geschikt om bruine peren van gave peren te onderscheiden. Voor het verhogen van de gevoeligheid en de betrouwbaarheid kan een - inwendig bruin - specifiek signaal worden gec calibreerd.